

**Effekte einer pränatalen Betamethasongabe auf die
Synapsendichte und das serotonerge System im
fetalen Schafmodell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

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

**von Melanie Träupmann
geboren am 27.11.1984 in Rudolstadt**

Gutachter

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

2. Prof. Dr. med. Uwe Scheider, Jena

3. PD Dr. med. Torsten Braun, Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. November 2018

Abkürzungsverzeichnis

α	Anti
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
Ag	Antigen
AK	Antikörper
AP	Arbeitspuffer
AP-T	Arbeitspuffer mit Triton
AVP	Arginin-Vasopressin
BM	Betamethason
CRH	Kortikotropin-releasing-Hormon
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
CAH	Kongenitale Nebennierenhyperplasie
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
ECoG	Elektrokortikogramm
g	Gramm
GC	Glukokortikoid
h	Stunde
HHN	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
11 β -HSD2	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
5HT	5-Hydroxytryptophan
i.m.	intramuskulär
IR	Immunreaktivität
i.v.	intravenös
IVTK	Institut für Versuchstierkunde
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute

µl	Mikroliter
n	Anzahl
NaBH ₄	Natriumborhydrit
ng	Nanogramm
PBS	Phosphatpuffer
R	Rezeptor
RT	Raumtemperatur
SSW	Schwangerschaftswoche
Syn	Synaptophysin
T	Temperatur
V	Verdünnung
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Synthetische Glukokortikoide im klinischen Alltag	3
2.2.	Pränatale Glukokortikoide und ihre Nebenwirkungen	5
2.2.1	Einfluss auf die fetale Entwicklung	5
2.2.2	Einfluss auf die strukturelle Reifung im fetalen Gehirn	6
2.2.3	Einfluss auf die funktionelle Reifung im fetalen Gehirn	8
2.2.4	Einfluss auf die Reifung der Hypothalamus-Hypophysen- Nebennierenachse	11
2.2.5	Einfluss auf das serotonerge Transmittersystem	14
2.3.	Der Neurotransmitter Serotonin	16
2.3.1	Historische Entdeckung des Serotonins	16
2.3.2	Vorkommen des Serotonins	16
2.3.3	Serotoninmetabolismus	18
2.3.4	Ontogenese des serotonergen Systems	19
2.4.	Klassifizierung der Serotoninrezeptoren	20
3.	Ziele der Arbeit	26
4.	Methoden und Material	28
4.1	Versuchstiere und experimentelles Protokoll	28
4.2	Terminierte Konzeption	28
4.3	Applikation von Betamethason	28
4.4	Histochemische und immunhistochemische Färbungen im fetalen Schafsgehirn	29
4.4.1	Gewinnung des fetalen Hirngewebes	29
4.4.2	Histochemische Färbung mit Hämatoxylin-Eosin	30
4.4.3	Immunhistochemische Darstellung der serotonergen Rezeptoren (5HT _{5A} und 5HT ₇)	30
4.4.4	Immunhistochemische Darstellung der Synaptophysin- Immunreaktivität	32

4.5	Lichtmikroskopische Auswertung und digitale Bildanalyse	33
4.6	Statistische Auswertung	36
5	Ergebnisse	37
5.1	Betamethasoneffekte auf die synaptische Dichte	37
5.2	Betamethasoneffekte auf das serotonerge System	39
5.2.1	Expression von 5HT5A-Rezeptoren	39
	5HT5A-Rezeptoren im frontalen Cortex	39
	5HT5A-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus	41
	5HT5A-Rezeptoren im Locus coeruleus	42
	5HT5A-Rezeptoren im Nucleus paraventricularis	43
	5HT5A-Rezeptoren in den Nuclei pontis	44
5.2.2	Expression von 5HT7-Rezeptoren	45
	5HT7-Rezeptoren im frontalen Cortex	45
	5HT7-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus	47
	5HT7-Rezeptoren im Locus coeruleus	48
	5HT7-Rezeptoren im Nucleus paraventricularis	49
	5HT7-Rezeptoren in den Nuclei pontis	50
6	Diskussion	52
6.1	Diskussion von Material und Methoden	52
6.1.1	Das Tiermodell	52
6.1.2	Applikation von Betamethason	53
6.1.3	Immunhistochemische Färbetechniken	55
6.2	Diskussion der Ergebnisse	57
6.2.1	Betamethasoneffekte auf die Synaptophysin- Immunreaktivität	57
6.2.2	Verteilung der serotonergen Rezeptoren 5HT5A und 5HT7 im fetalen Gehirn	61
	5HT5A-Rezeptor-Immunreaktivität	62
	5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität	63
6.2.3	Effekte einer pränatalen Betamethasontherapie auf die serotonergen Rezeptoren 5HT5A und 5HT7	64

7.	Schlussfolgerung	69
8	Quellenverzeichnis	71
9	Anhang	97
9.1	Danksagung	97
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	98
9.3	Lebenslauf	99

1 Zusammenfassung

Glukokortikoide werden bei einer drohenden Frühgeburt zwischen der 22. und der 34. Schwangerschaftswoche zur Beschleunigung der Lungenreifung beim Fetus eingesetzt. Damit soll das Auftreten eines Atemnotsyndroms verhindert werden, was mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität des geborenen Kindes assoziiert ist. Diese Therapie erhalten ca. 3-6% aller Schwangeren.

In mehreren vorangegangenen klinischen Untersuchungen am Menschen sowie in tierexperimentellen Studien wurden bereits sowohl akute Effekte als auch Langzeiteffekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf das Verhalten sowie das Auftreten neuropsychiatrischer Erkrankungen, insbesondere von Depression, beschrieben. Depressive Störungen werden vorrangig durch eine Störung des serotonergen Systems vermittelt und sind unter anderem auch durch eine Hyperaktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) bedingt. Die Programmierung der HHN-Achse ist bereits gut erforscht. Die Aktivität der HHN-Achse wird pränatal durch epigenetische Mechanismen programmiert. So führen pränatale Glukokortikoide zu einer Desensibilisierung der Glukokortikoidrezeptoren und der negativen Rückkopplung und damit zu einer verstärkten Kortisolausschüttung. Daraus resultiert eine erhöhte Stressempfindlichkeit im späteren Leben. Eine erhöhte Stressempfindlichkeit ist zu Depressionen assoziiert. Im Gegensatz zur Entwicklung der HHN-Achse sind mögliche Änderungen der Entwicklung des serotonergen Systems durch pränatale Glukokortikoide nur unzureichend untersucht.

Unsere Hypothese war, dass eine pränatale Betamethasontherapie die Entwicklung des serotonergen Systems stört. Hierbei lag der Fokus auf den 5HT_{5A}- und 5HT₇-Rezeptoren aufgrund ihrer Funktion bei dem Auftreten von Depressionen und damit verbundenen Schlafstörungen. Um den globalen Effekt einer Beeinflussung der Entwicklung des serotonergen Systems auf die Hirnentwicklung darzustellen, wurde das neuronale Netzwerk im frontalen Cortex mit untersucht. Hierzu wurde Synaptophysin untersucht, welches in ca. 95% der neokortikalen Synapsen enthalten und transmitterunabhängig ist und somit ein Marker für die für die Synaptogenese darstellt. Damit ist Synaptophysin verantwortlich für die Ausbildung des neuronalen Netzes.

Zur Untersuchung wurde das Schaf als Tiermodell angewendet, welches sich schon in vorangegangenen Untersuchungen als gutes Tiermodell etablierte, da die Gehirnentwicklung weitestgehend der des Menschen ähnelt und somit besser auf den Menschen übertragen werden kann, als Untersuchungen bei Ratten, die postnatale Hirnentwickler sind.

Es wurde Betamethason in der klinisch zur Lungenreifung verwendeten Dosis $2 \times 110 \mu\text{g}/\text{kg}$ maternal i.m., entspricht damit $2 \times 8 \text{mg}$ Betamethason für eine 70kg schwere Schwangere, im Abstand von 24 Stunden zum Zeitpunkt 0,70 der Trächtigkeitsdauer (106./107. Trächtigkeitstag, 150 Trächtigkeitstage) des Schafes verabreicht und die Gehirne zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer (112. Trächtigkeitstag) entwickelt. Mithilfe der Immunhistochemie stellten wir die Immunreaktivität von den 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren im frontalen Cortex, Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis und in den Nuclei pontis dar und untersuchten mögliche Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung. Synaptophysin untersuchten wir im frontalen Cortex.

Betamethason führte zu einer signifikanten Verminderung der Synaptophysin-Immunreaktivität im frontalen Cortex (Lamina II/III und Lamina V/VI). Weiter ließ sich eine signifikante Reduktion der 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität im Nucleus suprachiasmaticus und Locus coeruleus, aber nicht im Cortex und den anderen Hirnstrukturen nachweisen. Betamethasoneffekte auf die 5HT5A-Rezeptor-Immunreaktivität ließen sich nicht beobachten.

Betamethason nimmt damit Einfluss auf die Hirnentwicklung in Bezug auf die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes im untersuchten frontalen Cortex und des serotonergen Systems, insbesondere der 5HT7-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus und Locus coeruleus. Möglich ist, dass sich die genannten Hirnstrukturen in einer vulnerablen Phase der Entwicklung befinden und somit pränatal verabreichte Glukokortikoide zu Veränderungen in der Rezeptordichte führen können. Inwieweit die beobachteten Effekte reversibel sind, lässt sich anhand dieser Arbeit nicht sagen, da nur die akuten Effekte untersucht wurden.

Daher ist es notwendig, dass der Einsatz von pränatalen Glukokortikoiden aufgrund deren vielfältiger Nebenwirkungen in der Klinik sorgfältig abgewogen werden sollte.

2 Einleitung

2.1 Synthetische Glukokortikoide im klinischen Alltag

Weltweit werden jährlich ca. 15 Millionen Kinder zu früh geboren (WHO 2004, Howson et al. 2013). Die Rate der Frühgeburten ist weiter steigend: Während es 2009 ca. 9,6% Frühgeburten weltweit gab, stieg die Rate im Jahr 2010 auf 11,1% an. In Deutschland lag die Frühgeburtenrate 2011 bei 9,0% (AQUA 2010), damit nimmt Deutschland unter den europäischen Ländern einen der vorderen Plätze im Frühgeburtenregister ein (European Perinatal Health Report 2008). Insbesondere stieg die Anzahl der extremen Frühgeburten (kleiner 28. SSW) um 65% in Deutschland an (European Perinatal Health Report 2008, Schlußner 2013). Nach den aktuellen Angaben des European Perinatal Health Report von 2010 liegt Deutschland mit 1,3% der Geburten kleiner der 32. SSW an zweiter Stelle der europäischen Länder. Etwa 0,6% aller Kinder in Deutschland werden mit einem Gestationsalter unter der 28. SSW geboren (AQUA-Institut 2014).

Die Frühgeburt, definiert als eine Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche (Steer 2005), ist mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität in der Gesamtpopulation assoziiert (Haram 2003, Roberts 2007, Howson 2013).

Im Jahr 2010 wurden ca. 77% der perinatalen Mortalität auf die Frühgeburtenlichkeit (vor allem unterhalb der 28.SSW) zurückgeführt (AQUA 2010, Schlußner 2013). Bei den Frühgeborenen liegt ein erhöhtes Risiko (ca. 60%) vor, an einem akuten Atemnotsyndrom (Respiratory Distress Syndrom, RDS) aufgrund der Unreife der Lunge zu erkranken, was eine Hauptursache für die Mortalität der frühgeborenen Babys ist (Robertson et al. 1992). Weiterhin wurde beobachtet, dass 20% der Frühgeborenen, welche mit einem Geburtsgewicht weniger als 1500g zur Welt kommen, intraventrikuläre Blutungen aufweisen und ein erhöhtes Risiko (ca. 28%) für die Entstehung einer nekrotisierenden Enterokolitis haben (Ballabh 2009). Eine Frühgeburt kann des Weiteren mit einer beeinträchtigten motorischen und kognitiven Entwicklung im Kindesalter korrelieren (European Perinatal Health Report 2008).

Zur Verhinderung der Frühgeburtenlichkeit sowie zur Induktion der fetalen Lungenreife, um das Risiko eines Atemnotsyndroms zu reduzieren und damit die Überlebenswahrscheinlichkeit des Fetus zu erhöhen, werden Betamethason und Dexamethason genutzt. Die Therapie mit synthetischen Glukokortikoiden zur fetalen Lungenreife wurde zunächst experimentell beim Schaf gefunden und bald darauf

auf den Menschen übertragen (Liggins 1969, Liggins und Howie 1972), wobei sich die am Tiermodell gezeigten positiven Effekte bestätigten.

Bekannt ist, dass es durch die maternale intramuskuläre Injektion der plazentagängigen Glukokortikoide zu einer Stimulation der strukturellen Lungenreifung durch die Steroidwirkungen an den Epithelzellen sowie an den mesenchymalen Fibroblasten der Atemwege kommt. Weiterhin bewirken die Glukokortikoide eine Förderung der intraalveolären Surfactantsynthese mit daraus resultierender zunehmender Surfactantsekretion (Ballard 1995, Bolt et al. 2001). Bei Untersuchungen am Schaf wurden durch die Glukokortikoidbehandlung vergrößerte Alveolen mit einem Verlust von interstitiellem Lungengewebe (Willet et al. 1999) sowie eine deutliche Volumenzunahme der Lunge beschrieben (Jobe et al. 1993). Durch die Glukokortikoide kommt es möglicherweise zu einer Hemmung der Proliferation zugunsten der Differenzierung des Gewebes (Wyrwoll und Holms 2012), hier insbesondere des Lungengewebes (Jobe 2001, Grier und Halliday 2004). Durch diesen Mechanismus kommen die Kinder mit einem geringeren Geburtsgewicht sowie einer kleineren Körpergröße zur Welt, weitere Ausführungen dazu siehe Kapitel 2.2.

Neben dem Effekt der gewünschten fetalen Lungenreifung konnten unter der pränatalen Glukokortikoidgabe in verschiedenen Studien eine beachtliche Reduktion der neonatalen Mortalität (um 31%), des Auftretens intraventrikulärer Hirnblutungen und deren mögliche Folgen wie eine Ventrikulomalazie oder periventrikuläre Leukomalazie sowie die Reduktion einer nekrotisierenden Enterokolitis dokumentiert werden (Crowley 1990 und 1995, Leviton et al. 1993, NIH 1995, Canteroi et al. 2001, Roberts und Dalziel 2006, Brownfoot et al. 2008), so dass sich diese Methode weiter etabliert hat.

Im klinischen Alltag werden die synthetischen Glukokortikoide Betamethason und Dexamethason zur Lungenreifung und Verzögerung der Geburt (Welberg 2001) zwischen der 24. und 34. Schwangerschaftswoche verabreicht (NIH 2000, Mahony et al. 2010). Nach den Richtlinien des National Institute of Health (NIH) sowie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) wird dabei eine Dosierung von zweimal 12mg Betamethason innerhalb von 24 Stunden als i.m. Injektion oder eine viermalige i.m. Injektion von 6mg Dexamethason alle 12 Stunden empfohlen (National Institute of Health 1995). Bei einer weiterhin bestehenden drohenden Frühgeburt kann ein zweiter Kurs ein bis zwei Wochen später verabreicht werden (Quinlivan 1998, Caughey und Parer 2002, RCOG 2010). In Anbetracht der zuneh-

mend besser bekannten unerwünschten Effekte der pränatalen Glukokortikoide auf den Fetus und insbesondere die Nebenwirkungen einer wiederholten Gabe der Glukokortikoide (siehe Kap. 2.2) wird in Abwägung von Risiko und Nutzen heute nur ein einziger Behandlungszyklus mit Glukokortikoiden empfohlen (NIH 2000, AWMF 2010). Circa 3-6% aller Schwangeren erhalten eine pränatale Glukokortikoidtherapie (Walfish et al 2001, Mahony 2010).

Im Folgenden wird genauer auf die Nebenwirkungen der pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die fetale Entwicklung und Hirnreifung eingegangen.

2.2 Pränatale Glukokortikoide und ihre Nebenwirkungen

2.2.1 Einfluss auf die fetale Entwicklung

In den letzten Jahren wurden vielfältige Nebenwirkungen der pränatalen Glukokortikoidtherapie deutlich. Nach einer einmaligen pränatalen Glukokortikoidbehandlung wurde eine Wachstumsretardierung in Bezug auf die Körpergröße und das Gehirngewicht beim Menschen beobachtet (French et al 1999, Bloom et al. 2001, Murphy et al. 2001). Dadurch wurde vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen dem reduzierten Gehirngewicht und Schwierigkeiten beim Lernen, Kognition und Konzentration im Schulalter gibt (Stathis et al. 1999). Im Erwachsenenalter fiel in retrospektiven Untersuchungen bei psychologischen Tests im Zusammenhang mit einem reduzierten Geburtsgewicht und verringerten Kopfumfang eine Anfälligkeit gegenüber Stress auf (Nilsson et al. 2001). Auch beim nichtmenschlichen Primaten (Reinisch et al. 1979, Uno et al. 1994) sowie beim Schaf (Jobe et al. 1998, Huang et al. 1999, Aghajafari et al. 2002, Moss et al. 2005, Gatford et al. 2008) und der Ratte (Bakker et al 1995, Burlet et al. 2005, Hauser et al. 2006) konnten nach einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung eine reduzierte Körpergröße und ein vermindertes Gehirngewicht beobachtet werden. Am Schafmodell zeigte sich eine bis zum 3. Lebensjahr persistierende Verminderung des Gehirngewichts (Moss et al. 2005). Die pränatalen Glukokortikoide wirken dabei als Reifungsstimulus. Die reifen Zellen können sich nicht mehr so gut teilen, so dass es zu einem verminderten Wachstum kommt (Wyrwoll und Holms 2012).

Eine mehrmalige pränatale Glukokortikoidbehandlung beim trächtigen Rhesusaffen und Schaf zeigte bei den Nachkommen ein reduziertes Geburtsgewicht mit verminderten Gehirn-, Pankreas- und Nebennierengewicht (Johnson et al. 1981, Newnham

et al. 1999, Sloboda et al. 2000). Weiterhin wurden ein vermindertes Geburtsgewicht (Ikegami 1997) und eine Verminderung des Kopfumfanges beim Menschen beobachtet (French et al 1999). In Verbindung mit dem reduzierten Geburtsgewicht konnten in Untersuchungen an Ratten und am Menschen auch pathophysiologische Manifestierungen im Sinne einer arteriellen Hypertonie, Insulinresistenz und Hyperglykämie im Erwachsenenalter nachgewiesen werden (Tono et al. 1988, Barker 1993, Levitt 1996, Lindsay 1996, Lithell et al. 1996, Phillips et al. 1998, Danziel et al. 2000). Gleiche Ergebnisse wurden im Schafmodell nach einer kontinuierlichen fetalen Kortisolinfusion über 48 Stunden nachgewiesen (Dodic und Wintour 1994).

Im Gegensatz zu den genannten Beobachtungen gab es andererseits klinische Studien am Menschen, in denen keine Auswirkungen einer wiederholten pränatalen Glukokortikoidgabe auf neurologische Veränderungen oder Körpergröße bei Neugeborenen (Thorpe et al. 2001 und 2002) und bei Kindern im 2. Lebensjahr auftraten (Crowther et al. 2007, Peltoniemi et al. 2009). Parallel dazu wurde nach einer langanhaltenden pränatalen Dexamethasonbehandlung in reduzierter Dosis ab dem 1. Trimester bei einem erhöhten Risiko einer kongenitalen Nebennierenhyperplasie (CAH) ein normales Geburtsgewicht beschrieben (Forst et al. 1993, Mercado et al. 1995).

Eine pränatale Glukokortikoidtherapie hat auch funktionelle Effekte. So ließen sich bei menschlichen Feten eine Abnahme der Körperbewegungen, der Atemfrequenz und der Herzfrequenzvariabilität nachweisen (Mulder et al. 1994, Senat et al. 1998). Im Folgenden soll weiter auf die Effekte von pränatalen Glukokortikoiden auf die Hirnreifung eingegangen werden.

2.2.2 Einfluss auf die strukturelle Reifung im fetalen Gehirn

In vielen tierexperimentellen Untersuchungen konnten unter hohen Glukokortikoidgaben oder unter mehrfacher pränataler Glukokortikoidbehandlung Veränderungen des fetalen Gehirns beschrieben werden. So wurden im fetalen Gehirn am Schaf eine verzögerte Myelinisierung durch verminderte Immunreaktivität von Basischem Myelinprotein und eine reduzierte Anzahl der Oligodendrozyten nach maternaler und fetaler Betamethasongabe nach dem klinischen Protokoll beschrieben (Antonow-Schlorke et al. 2009). Zusätzlich ergab sich nach einer wiederholten pränatalen Glukokortikoidbehandlung ein erhöhtes Risiko einer verzögerten

Myelinisierung des Sehnervens (Dunlop 1997) und des Corpus callosum (Huang et al. 2001) am Schaffeten, was auch beim Menschen nachgewiesen werden konnte (Weinstock 1997, 2001). Trotz des reifungsstimulierenden Effekts der Glukokortikoide (Wyrwoll und Holms 2012) konnte bei tierexperimentellen Studien an Schaffeten nach einer mehrmaligen pränatalen Gabe von Glukokortikoiden eine mögliche gestörte Hirnreifung z. B. in Bezug auf die Myelinisierung des Gehirns beobachtet werden (Howard 1975, Huang et.al 2001).

Immunhistochemische Untersuchungen an fetalen Affen- und Schafsgehirnen konnten nach einer fetalen kontinuierlichen Betamethasoninfusion eine Abnahme der Expression von Mikrotubulus-assoziierten Proteinen nachweisen, welche in die zerebrale Morphogenese involviert und für die spätere Aufrechterhaltung der neuronalen Morphologie elementar sind (Antonow-Schlorke et al. 2001, Schwab et al. 2001, Antonow-Schlorke et al. 2003). Die Abnahme dieser zytoskeletalen Proteine stellt dabei einen Hinweis auf eine frühe intrazelluläre, strukturelle Störung dar (Bywood und Johnson 2000). Weitere experimentelle Untersuchungen am fetalen Paviangehirn ergaben nach mehrmaliger pränataler Glukokortikoidbehandlung eine verzögerte Myelinisierung mit Nachweis einer verminderten Immunreaktivität von Basischem Myelinprotein sowie einer Volumenreduktion der grauen Substanz (Shiedls et al. 2012). Auch am heranreifenden Gehirn der Ratte wurden eine verzögerte Myelinisierung sowie eine verminderte Reifung der Gliazellen beschrieben (Howard 1975). Am fetalen Rhesusaffen- sowie an adulten Rattengehirnen konnten eine verminderte Neuronenzahl, eine Degeneration der Dendriten des Hippocampus sowie ein reduziertes Hippocampusvolumen unter wiederholter Dexamethasongabe beobachtet werden (Uno et al. 1990 und 1994, Sapolsky et al. 1990).

Weiterhin ließen sich Veränderungen im Bereich des neuronalen Netzwerkes im Sinne von Veränderungen der Synaptogenese nachweisen. Als Marker wurde häufig Synaptophysin verwendet. Synaptophysin ist ein Glykoprotein, welches sich in den präsynaptischen Vesikeln aller Wirbeltiere befindet (Wiedenmann 1985, Rehm 1986) und in ca. 95% der neokortikalen Synapsen enthalten ist (Rehm et al 1986). Die Synaptophysin-Immunreaktivität stellt die Anhäufung von synaptischen Vesikeln dar, die als granuläres Muster in den Regionen der synaptischen Endigungen lichtmikroskopisch erscheinen (Wiedenmann 1985, Leclerc 1989) und gilt somit als Maß für die Dichte synaptischer Endigungen (Maslah et al. 1990, Sarnat et al.1999). Deshalb ist Synaptophysin ein Marker für die Synaptogenese und verantwortlich für die Ausbil-

derung des neuronalen Netzes (Knaus et al. 1986, Ovtscharoff et al. 1993, Masliah et al. 1994). Synaptophysin kann bereits in der 20. Gestationswoche mit Beginn der Synaptogenese nachgewiesen werden (Grunnet 1995). In vorigen tierexperimentellen Untersuchungen konnte nach einer kontinuierlichen fetalen Betamethasoninfusion über 48 Stunden eine signifikante Reduktion der Synaptophysin-Immunreaktivität im frontalen Cortex, Putamen und Hippocampus nachgewiesen werden (Antonow-Schlorke et al. 2001 am Schaf zum Zeitpunkt 0,87 der Trächtigkeitdauer, Colberg et al. 2004 am Schaf zum Zeitpunkt 0,75 der Trächtigkeitdauer). In der vorliegenden Arbeit sollte die maternale intramuskuläre pränatale Betamethason-applikation in einer Dosierung von 110µl/kg, entspricht der klinischen Dosis von 2x8mg bei einer 70kg schweren Schwangeren, zweimal im Abstand von 24 Stunden zum Zeitpunkt 0,70 der Trächtigkeitdauer (106. und 107. Trächtigkeitstag bei einer Gesamtdauer von 150 Trächtigkeitstagen) im Vergleich zu der fetalen Applikation untersucht werden. Die maternale Applikation in der vorliegenden Arbeit ist dabei näher an der Klinik.

Die beschriebenen strukturellen Änderungen sind möglicherweise mit funktionellen Störungen assoziiert, insbesondere die strukturellen hippocampalen Veränderungen könnten mit späteren Gedächtnis- und Verhaltensänderungen in Zusammenhang gebracht werden (Bremner et al. 1995, Sheline et al. 1996). Neben den strukturellen Veränderungen konnten auch funktionelle Veränderungen nach einer pränatalen Glukokortikoidtherapie beschrieben werden, auf welche im Folgenden eingegangen wird.

2.2.3 Einfluss auf die funktionelle Reifung im fetalen Gehirn

Ein wesentlicher Marker für die funktionelle Hirnentwicklung ist die Entwicklung der Schlafstadien, weil hier die Reifung vieler Hirnstrukturen (u.a. Cortex, Thalamus, Hypothalamus, Pons, Hirnstamm) und Transmittersysteme (aminerg und cholinerg) involviert sind (McCormick und Bal 1997). Der NREM-Schlaf unterliegt der aminergen thalamischen und der mesenzephalo-retikulären Steuerung (McCormick und Bal 1997). Die Erzeugung und Aufrechterhaltung des REM-Schlafs hingegen wird durch cholinerge Neurone in der medullären Formatio reticularis und dem dorsalen pontinen Tegmentum generiert und durch pontine Hirnstrukturen vermittelt (McCormick und Bal 1997). Weiterhin sind hierbei aufsteigende cholinerge Bahnen zum

thalamokortikalen System essentiell (Francesconi et al. 1988, McCormick et al. 1988, Pace-Schotte 2002). Die Generierung der Schlafstadienwechsel erfolgt im Hirnstamm (McCormick und Bal 1997). Die Schlafstadienlänge wird dabei durch einen ultradianen Oszillator in der mesopontinen Verzweigung reguliert. Die Kontrolle der Schlafstadienlänge erfolgt über zirkadiane Oszillatoren im Nucleus suprachiasmaticus (Pace-Schott und Hobson 2002), welcher wiederum Informationen direkt oder über den dorsomedialen hypothalamischen Kern zum ventrolateralen präoptischen hypothalamischen Kern und weiter in die aminergen Hirnstammkerne (Locus coeruleus, Nuclei raphe) sendet (Sun et al. 2000, Chou et al. 2002). Der NREM- und REM-Schlaf werden somit in Abhängigkeit der aktiven Neurone im ventrolateralen präoptischen Kern gesteuert (Lu et al. 2000).

Akute Effekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie zeigten am fetalen Schaf Hinweise auf Veränderungen der elektrokortikalen Hirnfunktion mit Abnahme der Komplexität der registrierten kortikalen ECoG-Aktivität innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Betamethasontherapie (Schwab et al. 2001a) sowie eine Verzögerung der akustisch evozierten Potentiale beim menschlichen Feten, was eine verzögerte kortikale Reifung daraus schließt (Schleussner et al. 2004). Hinsichtlich der Reifung wurde die Schlafstadienentwicklung untersucht. Am Schafmodell konnte ab dem Zeitpunkt 0,76 – 0,8 der Trächtigkeitsdauer (115. – 120. Trächtigkeitstag) eine beginnende Schlafdifferenzierung mittels ECoG (Groh 2008) dargestellt werden. Beim Menschen zeigte sich in der 32. SSW (0,83 der Gestationsdauer) eine Schlafstadiendifferenzierung (Curzi Dascalova et al. 1993, Selton et al. 2000). Frühere Untersuchungen am Schaffeten mittels ECoG konnten nach pränataler Glukokortikoidbehandlung eine Förderung der Reifung des REM-Schlafes, nicht aber des NREM-Schlafes beobachten (Groh 2008). Nach Applikation von Betamethason zum Zeitpunkt 0,7 der Trächtigkeitsdauer (106. Trächtigkeitstag) konnte bereits nach 6 Tagen eine vollständige Reifung des REM-Schlaf-ECoG's gezeigt werden. Normalerweise findet die REM-Schlaf-Reifung beim Schaf um den Zeitpunkt 0,86 der Trächtigkeitsdauer (130. Trächtigkeitstag) statt (Groh 2008). Es wird somit angenommen, dass die vorzeitige Reifung des REM-Schlafes durch eine beschleunigte Reifung des cholinergen Systems, da der REM-Schlaf cholinerg vermittelt wird (McCormick und Bal 1997), durch die pränatale Glukokortikoidgabe hervorgerufen wird (Zahalka et al. 1993, Shi et al. 1998).

Das NREM-Schlaf-ECoG, welches ab dem Zeitpunkt 0,74 der Trächtigkeitsdauer (112. Trächtigkeitstag) beim fetalen Schaf nachzuweisen ist, zeigte sich nicht beeinflusst unter der pränatalen Betamethasonbehandlung (Groh 2008). Die Entwicklung des NREM-Schlafs ist serotonerg und adrenerg vermittelt (Pace-Schott 2002, Steriade 2005) und es ist bereits bekannt, dass das monoamine System im Vergleich zu dem cholinergen System viel eher reift (Lauder und Bloom 1974). Dies könnte der Grund für die frühere Reifung des NREM-Schlafes im Vergleich zum REM-Schlaf sein und der damit verbundenen geringeren Vulnerabilität der bereits gereiften Hirnstrukturen (Kriegebaum et al. 2010).

Parallel zur vorzeitigen Reifung des REM-Schlafes unter Einfluss einer einmaligen pränatalen Glukokortikoidgabe konnte eine persistierende Schlafstadienfragmentierung sowohl im REM- als auch im NREM-Schlaf im Schafmodell beobachtet werden (Groh 2008). Diese beschriebenen Veränderungen stehen im engen Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen wie z. B. der Depression, da die Schlafstadienfragmentierung ein wichtiges Symptom bei der menschlichen Depression ist (Tsuno et al. 2005). An Ratten konnte nachgewiesen werden, dass eine Schlafstadienfragmentierung bis in das Erwachsenenalter bestehen bleiben kann (Huizink 2004). Dies ist möglicherweise eine Erklärung für das Auftreten von Depressionen im Erwachsenenalter sowie Verhaltensauffälligkeiten wie erhöhte Emotionalität, Schüchternheit und Zurückgezogenheit im Kindesalter nach pränataler Glukokortikoidgabe bzw. Stress während der Schwangerschaft (Derks et al. 1995, Trautmann et al. 1995, French et al 2004).

Untersuchungen am menschlichen Feten sowie am Schaffeten ergaben unter dem Einfluss einer pränatalen Betamethasongabe chronische Veränderungen der funktionellen Hirnreifung im Sinne einer Verzögerung der Latenzzeiten der kortikalen akustisch und sensorisch evozierten Potenziale (Anegroaie et al. 2017, Weiß 2011). Dies beruht möglicherweise auf einer Verzögerung der Myelinisierung (Antonow-Schlorke et al. 2009), siehe Kap. 2.2.2. Neben der Reifung des Gehirns haben pränatale Glukokortikoide auch Einfluss auf die Reifung der Stress-Achse (HHN-Achse), die wesentlich die Hirnfunktion moduliert (Challis und Brooks 1989).

2.2.4 Einfluss auf die Reifung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) entwickelt sich sehr zeitig in der fetalen Reifung und deren Funktion reift über den gesamten Schwangerschaftsverlauf (Bolt et al. 2002), wobei die Reifung der endgültigen Koordination der einzelnen Komponenten im letzten Trimester stattfindet. In der 6. Schwangerschaftswoche (SSW) des Menschen (0,16 der Gestationsdauer) kann eine rudimentäre Adenohypophyse und in der 7. SSW (0,18 der Gestationsdauer) die Anlage des Hypothalamus definiert werden (Brosnan 2001). Kortikotrope Hormone ließen sich mittels Immunhistochemie in der 7. SSW und eine ACTH-Sekretion in der 8. SSW (0,21 der Gestationsdauer) beim Menschen nachweisen (Baker und Jaffe 1976, Asa et al. 1986). Die ersten Kortikotropin-releasing-Hormon-Fasern wurden in der 16. SSW nachgewiesen (Bresson et al. 1985). Die menschliche Hypophyse ist ab der 10. SSW (0,26 der Gestationsdauer) bereits in der Lage, auf eine externe CRH-Stimulation unter in vitro-Bedingungen mit einer zunächst geringen ACTH-Ausschüttung zu reagieren (Gyevai 1980). Ab der 16. SSW (0,42 der Gestationsdauer) war das Ausmaß der ACTH-Ausschüttung nach einer externen CRH-Stimulation mit der Ausschüttung einer adulten Hypophyse vergleichbar (Gyevai 1980). Im Tiermodell anhand von Schaffeten ließ sich das Vorhandensein von bioaktiven CRH und AVP im Hypothalamus ab dem Zeitpunkt 0,42 der Trächtigkeitdauer (63. Trächtigkeitstag) nachweisen (Currie und Brooks 1992). Ab dem Zeitpunkt 0,63 der Trächtigkeitdauer (95. Trächtigkeitstag) des fetalen Schafs ließ sich nach CRH-Gabe eine ACTH-Ausschüttung aus der Hypophyse belegen (Brooks et al. 1987). Die menschliche Nebenniere ist ab der 10. SSW (0,26 der Gestationsdauer) in der Lage, Kortisol und dessen Vorstufen zu produzieren und zu sezernieren (Macnaughton et al. 1977). Beim fetalen Schaf dagegen beginnt die Kortisolproduktion in den Nebennierenzellen nach ACTH-Stimulation ab dem Zeitpunkt 0,33 der Trächtigkeitdauer (50. Trächtigkeitstag) (Wintour et al. 1975). Die Kortisolproduktion wird aber während der Entwicklung noch einmal gestoppt, so dass der Fetus im Wesentlichen vom mütterlichen Kortisol abhängig ist, was zum Zeitpunkt 0,6 bis 0,86 der Trächtigkeitdauer (90. - 130. Trächtigkeitstag) beim fetalen Schaf vorliegt (Hennessy et al. 1982). Durch die Ruhephase der Nebennierenaktivität ist die Kortisolproduktion vermindert (Wintour 1975, Keller-Wood et al. 2006). Korrelierend zu der reduzierten Kortisolproduktion ließ sich eine verminderte Expression von Kortisol-mRNA im Feten nachweisen (Keller-Wood et al. 2006). Beim Menschen

ist eine Ruhephase der Nebennierenaktivität nicht beschrieben, jedoch sehr wahrscheinlich, da sich die Entwicklung dieser beiden Spezies sehr ähnelt (Ruckebusch 1972, Clewlow et al. 1983). Im letzten Trimester sowohl beim Menschen (28. SSW, 074 der Gestationsdauer) als auch beim Schaf (0,81 bis 0,9 der Trächtigkeitsdauer, 122. bis 135. Trächtigkeitstag) kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von CRH (Brooks und Charllis 1988) sowie zur Reifung der CRH-Rezeptoren im Gehirn, wodurch es zu einer erhöhten Sensitivität der Hypophyse gegenüber CRH kommt (Challis und Brooks 1989). Wenige Tage vor der Geburt beim Menschen (0,86 der Gestationsdauer) und beim Schaf (0,81 bis 0,9 der Trächtigkeitsdauer) wird eine erhöhte ACTH-Ausschüttung beobachtet (Challis et al. 2000, Wood et al. 2005). Gleichzeitig zeigt sich eine erhöhte Sensitivität der Nebennieren gegenüber ACTH, so dass eine gesteigerte Kortisolausschüttung stattfindet (Challis et al. 2000). Im Schafmodell konnten bereits im letzten Trimester hohe GlukokortikoidrezeptormRNA-Spiegel im Cortex, Hippocampus und in den Nuclei paraventricularis nachgewiesen werden (Andrews und Matthews 2000). Pränatal verabreichte synthetisierte Glukokortikoide können somit mit einer hohen Affinität an die Glukokortikoidrezeptoren binden (Bamberger et al. 1996, Grossmann et al. 2004) und damit eine Veränderung in der Funktionalität der HHN-Achse hervorrufen.

Die Aufgabe der HHN-Achse besteht in der Regulation und Aktivierung von Stressreaktionen mithilfe der Freisetzung von Kortisol aus der Nebenniere. Weitere Funktionen werden der HHN-Achse beim Wachstum und Entwicklung des Fetus sowie bei der Geburtseinleitung zugeschrieben (Liggins 1994). Der Nucleus paraventricularis im Hypothalamus wirkt stimulierend oder hemmend auf die Sekretion des Kortikotropin-releasing-Hormons (CRH) und Vasopressin (AVP), welche wiederum stimulierend auf den Hypophysenvorderlappen einwirken. Es erfolgt daraufhin die Sekretion des ACTH (adrenocorticotropes Hormon), welches die Freisetzung von Kortisol aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde bewirkt (Dallman et al. 1987, Matthews und Challis 1996). Kortisol hemmt seine eigene Aktivität über einen negativen Feedbackmechanismus über Glukokortikoidrezeptoren vor allem im Hippocampus, welcher als Regulator der HHN-Achse fungiert, sowie über den Hypothalamus und die Hypophyse, welche ebenfalls über Glukokortikoidrezeptoren verfügen (Keller-Wood und Dallman 1984, Jacobsen und Sapolsky 1991, Andrews und Matthews 2000, Ulupinar 2009).

Es wird angenommen, dass durch die pränatale Glukokortikoidbehandlung strukturelle neuronale Veränderungen am Gehirn stattfinden können (siehe Kap. 2.2.2), welche möglicherweise die HHN-Achse beeinflussen (Matthews 2002). Veränderungen an der HHN-Achse, im Sinne einer dauerhaften Überaktivität dieser, können für spätere Verhaltensänderungen verantwortlich sein (Wyrwoll und Holms 2012). Durch die Behandlung mit pränatalen synthetisierten Glukokortikoiden beim Menschen im letzten Trimester (Challis et al. 2001) werden die Glukokortikoidrezeptoren im Hippocampus und Hypothalamus hohen Kortisolspiegeln ausgesetzt. Dadurch kann es zu einer Sollwertverstellung bzw. Desensibilisierung der Glukokortikoidrezeptoren kommen (Holsboer 2000, Welberg und Seckl 2001). Korrelierend damit wurde nach einer pränatalen Glukokortikoidapplikation eine verminderte Dichte an Glukokortikoid- und Mineralkortikoidrezeptoren im Hippocampus beschrieben (Levitt et al. 1996, Meaney et al. 2000, Welberg et al. 2000, Liu et al. 2001, Matthews 2002). Die verminderte Sensitivität sowie eine verminderte Anzahl von Glukokortikoidrezeptoren im Hypothalamus und in der Hypophyse resultieren in einer möglichen Abschwächung des negativen Feedbackmechanismus, wodurch es zu hohen Kortisolkonzentrationen im Blut kommt (Holsboer 2000).

Während der zerebralen Reifung ist es somit möglich, dass höhere Kortisolspiegel aufgrund einer verminderten negativen Rückkopplung toleriert werden. In Stresssituation können daher übersteigerte Plasma-Kortisol-Spiegel auftreten (Uno et al. 1994). Nach einer pränatalen maternalen Betamethason- bzw. Dexamethasongabe wurde an Schaffeten und bei Nachkommen behandelter Ratten eine erhöhte Aktivität der HHN-Achse gezeigt (Uno et al. 1994, Levitt et al. 1996, Shoener et al. 2006). Die erhöhte Aktivität der HHN-Achse konnte beim Schaf noch ein Jahr später dokumentiert werden (Sloboda et al. 2002). Beim Menschen ließen sich erhöhte Plasma-Kortisolspiegel im Erwachsenenalter nachweisen (Phillips 2000), welche durch die Sollwertverstellung der HHN-Achse hervorgerufen worden sein könnten. Bei Neugeborenen sowie bei Kindern im Alter von sechs bis elf Jahren, welche einer pränatalen Glukokortikoidtherapie unterlagen, kam es zu einer erhöhten Kortisolausschüttung während einer Stressreaktion (Alexander et al. 2012, Davis et al. 2011a). Auch in Untersuchungen an nichtmenschlichen Primaten konnten nach einer pränatalen Dexamethasonbehandlung erhöhte Plasma-Kortisolspiegel bis in das Erwachsenenalter beschrieben werden (Uno et al. 1994, de Vries et al. 2007). Chronisch erhöhte Kortisolspiegel werden mit Verhaltensstörungen wie Depression und auch mit dem

Auftreten von Arteriosklerose, Immunsuppression, erhöhten Cholesterinwerten sowie mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus assoziiert (Sapolsky et al. 2000, Lupien und Lepage 2001, O'Regan et al. 2004, Woods und Weeks 2005). Durch diese Ergebnisse stellte sich die Vermutung, dass es zu einer veränderten Programmierung der HHN-Achse durch die pränatalen Glukokortikoide kommt, wodurch vermehrt Kortisol sezerniert wird und daraus resultierend es zu einer verminderten Ausschüttung von Serotonin kommt. In verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen wurde eine enge Verbindung zwischen der Programmierung der HHN-Achse und dem serotonergen Transmittersystem beschrieben (Wyrwoll und Holmes 2012). Das Serotonin beeinflusst, insbesondere über den 5HT7-Rezeptor, die vermehrte Expression der Glukokortikoidrezeptor-mRNA, im Besonderen der Glukokortikoidrezeptoren Typ II, im fetalen Hippocampus der Maus, der Ratte und des Meerschweinchens (Mitchell et al. 1990, Meaney et al. 2000, Erdeljan et al. 2001 und 2005, LaPlante et al. 2002, Andrews et al. 2004). Gleichzeitig besteht eine mögliche enge Verbindung zwischen den pränatal applizierten Glukokortikoiden und deren direkten Einfluss auf die serotonerge Transmission über Serotoninrezeptoren (Watanabe et al. 1993). Deshalb sollen die Effekte auf das serotonerge System im Folgenden erläutert werden.

2.2.5 Einfluss auf das serotonerge Transmittersystem

Serotonin wirkt stimmungsaufhellend, entspannend, schlaffördernd, antidepressiv, schmerzhemmend und motivationsfördernd. Ein Mangel an Serotonin bewirkt Depressionen, Angstzustände, Konzentrationsstörungen sowie Schlaflosigkeit (Slotkin et al. 1996). Der Neurotransmitter Serotonin ist an der stressinduzierten Sekretion des Kortikotropin-releasing-Hormons (CRH) aus dem Hypothalamus beteiligt (Calogero et al. 1989, Saphier et al. 1995). Weiterhin konnte an Ratten gezeigt werden, dass Serotonin bei der Triggerung der Freisetzung von ACTH in der Hypophyse eine Rolle spielt (Bruni et al. 1982, Spinedi et al. 1983, De Souza 1986, Jorgensen 2007), sowie an der Expression von Glukokortikoidrezeptoren in den hippocampalen Neuronen mitwirkt (Maus: Erdeljan et al. 2001; Ratte: Mitchell et al. 1990, LaPlante et al. 2002; Meerschweinchen: Erdeljan et al. 2000). Es ist bekannt, dass vor allem 5HT1A-, 5HT2A- sowie 5HT7-Rezeptoren (Untersuchungen an der Ratte: Koenig et al. 1987, Lorens 1987, Bagdy et al. 1990, Fuller 1996) die serotonerge Stimulation im

Rahmen der HHN-Achse regeln und an der Sekretion des Kortikotropin-releasing-Hormons, an der zirkadianen ACTH-Ausschüttung sowie an der Expression der Glukokortikoidrezeptoren (Szafarczyk et al. 1983, Andrews et al. 2004) beteiligt sind.

Eine pränatale Glukokortikoidgabe oder pränataler Stress der Mutter und die damit verbundene mögliche dauerhafte Dysregulation der HHN-Achse können indirekt die serotonergen, dopaminergen und GABAergen Neurotransmittersysteme stören, so z. B. wurde bei Untersuchungen an der Ratte eine reduzierte Serotoninkonzentration im Neocortex, Mesencephalon, in der Pons (Muneoka et al. 1997), im Hypothalamus (Peters 1982) und im Hippocampus nach pränatalem Stress bzw. nach pränatal verabreichten Glukokortikoiden beobachtet (Hayashi et al. 1998), welche noch bis in das Erwachsenenalter nachgewiesen werden konnte (Muneoka et al. 1997). Es wird angenommen, dass die erhöhten Kortisolspiegel im Fetus eine Verminderung des Serotonin- und Noradrenalingehaltes im Gehirn bewirken, was charakteristisch für das Auftreten von depressiven Erkrankungen wäre (Slotkin et al. 1996, Muneoka et al. 1997, Hanley 2003). Es ist bereits bekannt, dass Kortisol, welches in Stresssituationen vermehrt sezerniert wird (Welberg und Seckl 2001), die Serotoninausschüttung supprimiert, wodurch es zu reduzierten Serotoninkonzentrationen im Blut kommt (Hayashi et al. 1998). Darüber hinaus hat Serotonin wahrscheinlich auch einen Einfluss auf die Synaptogenese (Lesch 1998). Eine reduzierte Serotoninkonzentration führte am Hippocampus der Ratte zu einer verminderten synaptischen Dichte (Hayashi 1998). Unklar ist bis heute der genaue Wirkungsgrad der pränatalen Glukokortikoide auf das serotonerge System. Es ist möglich, dass die Glukokortikoide direkt in die Synthese des Serotonins eingreifen oder durch eine mögliche Schädigung der heranreifenden Hirnstrukturen die Synthese des Serotonins beeinflussen (Whitaker-Azmitia 1993). Weiterhin ist eine Wirkung der Glukokortikoide auf die serotonergen Neurone durch z. B. Veränderung oder Hemmung der Zellteilung und einer damit verbundenen verminderten Serotoninsynthese möglich (Kitraki et al. 1996).

Bei pathologischen Veränderungen des serotonergen Systems kommt es zu depressiven Verhaltensstörungen und Schizophrenie (Delbende et al 1992, Welberg 2000, Seckl 2001, Weinstock 2001, Sloboda et al. 2005), Angststörungen, Essstörungen und chronischem Fatigue-Syndrom (Maes 1995, Welberg 2001, Hanley 2003). Auf-

grund der vielfältigen Funktionen des Serotonins soll im Folgenden genauer auf den Neurotransmitter eingegangen werden.

2.3 Der Neurotransmitter Serotonin

2.3.1 Historische Entdeckung des Serotonins

Initial wurde das biogene Amin Serotonin in den frühen 1930er Jahren in den enterochromaffinen Zellen des gastrointestinalen Trakts durch Vittorio Erspamer entdeckt und eine Funktion des Serotonins als Auslöser der Kontraktion der glatten Muskulatur am Uterus der Ratte beschrieben (Erspamer 1937). Die Arbeitsgruppe um M. Rapport isolierte aus Rinderblut bei der Suche nach Komponenten, die zu einer Vasokonstriktion führen, ein Serums substrat, welches den Namen Serotonin (abgeleitet von Serum und Tonus) erhielt (Rapport et al. 1948). Später konnte die chemische Struktur von Serotonin nachgewiesen werden (Rapport 1949). Erstmals wurde Serotonin 1953 im Gehirn von Säugetieren nachgewiesen (Twarog 1954). Daraus schloss man, dass Serotonin als neuroaktive Substanz tätig ist und eine Beteiligung an psychiatrischen Erkrankungen aufweist. Kurz nach der Entdeckung im menschlichen Gehirn in den Nuclei raphe wurde Serotonin als wichtige Komponente für die psychische Gesundheit erkannt (Woolley 1954, Fuxe et al. 1965). Später wurde eine verminderte Aktivität von serotonergen Neuronen mit dem Auftreten affektiver Erkrankungen in Verbindung gebracht (Coppen 1967).

2.3.2 Vorkommen des Serotonins

Der Neurotransmitter Serotonin wird in verschiedenen endokrinen Drüsen synthetisiert, z. B. in extrazerebralen Drüsen wie der Schilddrüse (Tamir et al. 1989), Pankreas (Teff et al. 1988), Hoden (Aguilar et al. 1992) und im Ovar (Amenta et al. 1992). Dabei wirkt Serotonin unter anderem regulierend und stimulierend auf die weitere Hormonfreisetzung aus den genannten Organen (Hery et al. 1978, Randle et al. 1983, Tamir et al. 1992). Intrazerebral dienen vorrangig die Hypophyse und die Nuclei raphe der Serotoninsynthese (Azmitia 1978, Montage et al. 1988). Serotonin ist in nahezu allen Regionen des Gehirns durch seine serotonergen Projektionen nachzuweisen. Die serotonergen Neurone sind hauptsächlich in den Nuclei raphe lokalisiert. Es lassen sich im Hinblick auf die Projektionsgebiete zwei Raphe-Komplexe beschreiben (Dahlstrom und Fuxe 1964, Hornung 2003). Der kaudale

Raphe-Komplex, lokalisiert in der Medulla oblongata und der kaudalen Pons (Raphe obscurus, Raphe pallidus, Raphe magnus), bildet deszendierende Bahnen zum motorischen und autonomen System des Rückenmarks. Die Projektionsbahnen des rostralen Raphe-Komplexes, welcher sich im Bereich des Mittelhirns und der rostralen Pons (Raphe pontis, Raphe dorsalis, Raphe medianus, Raphe linearis caudalis, Nucleus tegmenti reticularis pontis) befindet, verlaufen ins Diencephalon und Vorderhirn. Die ascendierenden Projektionsbahnen innervieren dabei unter anderem den Cortex, das Striatum, den Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus und die Amygdala. Ihnen wird eine Beteiligung bei Gedächtnisbildung, Stimmung, Kognition, Angstverhalten, emotionalem und sozialem Verhalten (Sheard 1969), bei der zirkadianen Rhythmik (Jouvet 1967), Thermoregulation (Feldberg und Myers 1964), sowie dem Ess- und Sexualverhalten zugesprochen (Jacobs und Azmitia 1992, Lucki 1992, Leger et al. 2001, Kriegebaum et al. 2010). In der zirkadianen Rhythmik wirkt der Neurotransmitter Serotonin wahrscheinlich als Inhibitor auf den Nucleus suprachiasmaticus, welcher im Hypothalamus lokalisiert ist (Meyer-Bernstein 1996) und als Schrittmacher der zirkadianen Rhythmik gilt (Rusak 1979, Moore 1983). Der Nucleus suprachiasmaticus empfängt dabei serotonerge Nervenbahnen vom medianen und dorsalen Nucleus raphe sowie direkte Innervationen von der Retina ausgehend über den retinohypothalamischen Trakt (Hendrickson et al. 1972, Pickard 1982, Johnson et al. 1988a,b, Stehle 2003) als auch indirekte Informationen über den geniculohypothalamischen Trakt vom Corpus geniculatum ausgehend über autonome Regionen des Rückenmarkes und sympathische Ganglien (Johnson et al. 1988b, Morin et al. 1992, Reuss 1996). Durch Licht-Dunkel-Phasen, welche mittels der Retina und den retinohypothalamischen Nervenbahnen auf den Nucleus suprachiasmaticus übertragen werden, wird ein 24-Stunden-Rhythmus generiert (Korf 2006). Dem zirkadianen Rhythmus unterliegen weiterhin physiologische, biochemische und morphologische Parameter in Säugetieren, welche während des Tagesverlaufes Veränderungen unterliegen (Reuss 1996). Serotonin und Melatonin, welches durch die N-Acetyltransferase aus Tryptophan in der Glandula pinealis gebildet wird (Lerchl 2002), interagieren dabei eng miteinander. Durch den nächtlichen Anstieg der N-Acetyltransferase wird vermehrt Melatonin gebildet und der Serotoninspiegel fällt ab. Am Tag nimmt durch den Lichteinfall auf die Retina die Enzymaktivität ab und es wird vermehrt Serotonin synthetisiert (Stehle 2003), wodurch der Wach-Schlaf-Rhythmus generiert wird. Änderungen in diesem Mechanismus können wieder-

rum zu Schlafstörungen führen, welche ein typisches Symptom bei Depressionen sind (Delbende et al. 1992, Thase et al. 1997, Hedlund 2005, Tsuno et al. 2005, Bonaventure 2007).

2.3.3 Serotoninmetabolismus

Serotonin gehört, wie auch Adrenalin, Dopamin und Histamin, zu den Monoamintransmittern und ähnelt durch das Vorhandensein einer Aminogruppe den Aminosäuren (Kriegebaum et al. 2010). Die Biosynthese findet dabei zum Großteil im Soma, sowie in einem geringeren Teil in den Dendriten und Axonen der Neuronen statt.

Serotonin wird aus der Aminosäure Tryptophan gebildet, welche mittels eines Transporters (Large-neutral-aminoacid-(LNAA)-Transporter) über die Blut-Hirn-Schranke in das serotonerge Neuron transportiert wird. Dabei wandelt das Enzym Tryptophanhydroxylase das L-Tryptophan in L-5-Hydroxytryptophan um, welches wiederum durch das Enzym L-Aminosäure-Decarboxylase zum 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) decarboxyliert wird (Kriegebaum et al. 2010). Serotonin wird anschließend mithilfe des vesikulären Monoamin-Transporters (VMAT) in den präsynaptischen Vesikeln gespeichert (Weihe et al. 1994). Die Freisetzung des Serotonins in den präsynaptischen Spalt erfolgt über eine Depolarisation der synaptischen Membran mit begleitendem Kalziumeinstrom in die Zelle (Kriegebaum et al. 2010). Serotonin bindet dann entweder an postsynaptische oder präsynaptische Rezeptoren und löst weitere Signaltransduktionen aus. Mittels eines Serotonintransporters (SERT) gelangt der Neurotransmitter in die präsynaptischen Vesikel zurück oder wird durch die Monoaminoxidase (MAO-A oder MAO-B) abgebaut (Waldmeier 1987). Es entsteht das Zwischenprodukt 5-Hydroxyindolacetaldehyd, welches mittels des Enzyms Aldehyddehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) oxidiert wird. Die schematische Darstellung ist hierzu in Abbildung 1 ersichtlich.

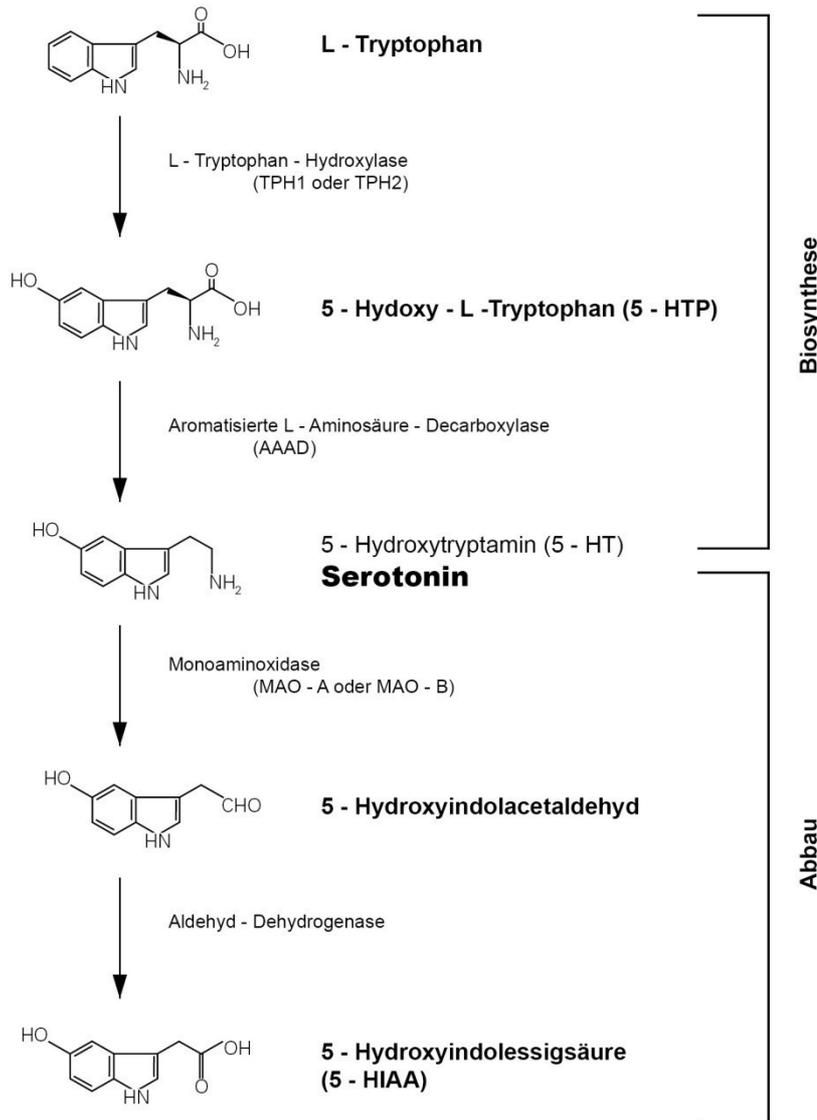


Abb. 1 Biosynthese und Abbau des Serotonins

2.3.4 Ontogenese des serotonergen Systems

Es wird angenommen, dass sich das serotonerge Neurotransmittersystem ontogenetisch als eines der ersten Systeme im fetalen Gehirn von Säugern manifestiert, denn die serotonergen Neurone in den Nuclei raphe gehören zu den sich am frühesten entwickelnden Strukturen im fetalen Gehirn (Kriegebaum et al. 2010). Beim Menschen entstehen die serotonergen Neurone zwischen der 5. und 6. Gestationswoche im anterioren und posterioren embryonalen Hinterhirn (Cordes 2005), welches sich dann weiterentwickelt zu den Nuclei raphe und der Pons.

Serotonin wird dabei eine bedeutende Rolle bei morphogenetischen Aktivitäten in der frühen fetalen Gehirnreifung und in der späteren Neurogenese zugesprochen

(Catalano 2001, Lesch 2001, Andrews et al. 2004) wie z. B. bei der Zellproliferation, der Zellmigration und – differenzierung sowie bei der Synapsenbildung (Lesch 1998). Bei Untersuchungen an der Ratte wurde beobachtet, dass Serotonin noch vor der Synaptogenese synthetisiert wird und der Schluss gezogen, dass es ein Entwicklungssignal für die Synaptogenese sein könnte (Lauder 1990). Des Weiteren konnte bei Untersuchungen an Mäusen die Wirkung des Serotonins auf die Entwicklung und Differenzierung von glutamatergen Neuronen während der fetalen kortikalen Reifung dokumentiert werden (Lavadas et al. 1997). Der Einfluss des Serotonins auf die Förderung des Größenwachstums der Axone und der Zellkörper sowie deren Überleben konnte in vitro gezeigt werden (Liu et al. 1991). Im Falle einer verminderten Serotoninkonzentration ist das Auftreten einer Veränderung der Zellteilung von neuronalen Vorläuferzellen (Lauder 1978), einer veränderten Axonverzweigung, einer pathologischen Dendritogenese sowie einer zunehmenden Apoptose (Caspar 2003) als auch einer reduzierten Synapsendichte im Hippocampus während der Synaptogenese im fetalen Gehirn möglich (Mazer et al. 1997).

Zusammenfassend ist Serotonin wirksam in der frühen morphogenetischen Reifung des Gehirns, später übernimmt Serotonin in den reifen Neuronen die Funktion als Neurotransmitter (Whitaker-Azmitia 2001). Im serotonergen System selbst wirkt Serotonin als Wachstumsfaktor und reguliert Proliferation und Differenzierung der serotonergen Neurone (Whitaker-Azmitia 1993). Weiterhin kann eine Störung im serotonergen Transmittersystem, insbesondere die Abnahme von Serotonin, schwere psychische Erkrankungen wie Depressionen oder Schizophrenie bewirken (Lesch und Mössner 1998). Es ist unklar, ob die Abnahme von Serotonin oder die Abnahme der Sensitivität der Serotoninrezeptoren dabei vordergründig ist. Im nächsten Kapitel soll deshalb auf die Serotoninrezeptoren und ihre Funktionen, insbesondere im Gehirn, eingegangen werden.

2.4 Klassifizierung der Serotoninrezeptoren

Die Unterscheidung der Serotoninrezeptoren erfolgte erstmals durch Gaddum und Picarelli 1957. Dabei wurden die Serotoninrezeptoren in D-Rezeptoren (vermitteln Kontraktion der glatten Muskulatur, antagonisierbar durch Dibenzylin) und M-Rezeptoren (vermitteln Depolarisation cholinergischer Neurone, antagonisierbar durch

Morphin) unterschieden. Später wurden die Rezeptoren nach ihrer Struktur und nach ihren Effektmechanismen in 7 Familien (5HT1-7) unterteilt (Hoyer et al. 1994, 2002, Kroeze et al. 2002), welche noch heute Gültigkeit haben. Der 5HT3-Rezeptor nimmt eine Sonderstellung ein, da er zu den Liganden-gesteuerten Ionenkanälen zählt. Die anderen 5HT-Rezeptoren zählen zu den G-Protein-vermittelten Rezeptoren (Maricq et al. 1991, Kroeze et al. 2002). Im Folgenden soll die anatomische Verteilung und die dazugehörige Funktion der Serotonin-Rezeptoren in einer tabellarischen Übersicht aufgezeigt werden (Tab. 1).

Tab.1 Übersicht über die Serotoninrezeptoren und ihre Funktion

Rezeptor	Vorkommen	Funktion	Quelle
5HT1A	ZNS: Cortex, Hippocampus, Amygdala, Septum, Hypothalamus, Nuclei raphe, Substantia gelatinosa des Rückenmarkes, Geringe Konzentration im Thalamus, Basalganglien	ZNS: Aggression, Angst- und Suchtverhalten, Ess- und Sexualverhalten, Gedächtnis, Gemütslage, Depression, soziales Verhalten, Lernvorgänge, Schlaf, zentrale Blutdruckregulation, Autorezeptor, Übelkeit, Schmerz, Respiration, Thermoregulation	Marazziti et al. 1994, Compaan 1996, Barnes 1999, Sargent et al. 2000, Andrews et al. 2004, Rausch et al. 2006, Lundberg et al. 2007, Wang et al. 2009, Pytliak 2011
	Peripherie: Gastrointestinaltrakt, Milz, Plexus myentericus	Peripherie: Blutdruck, Herzfrequenz, Vasokonstriktion, Erektion, Pupillendilatation	Pytliak 2011
5HT1B	ZNS: Cortex, Striatum, Basalganglien, dorsale Nuclei raphe, Substantia nigra, Globus pallidus	ZNS: Aggression, Angst- und Suchtverhalten (vor allem gegenüber Alkohol bei Knockout-Mäusen), Lernen, Bewegung, Gedächtnis, Gemütslage, Sexualität, Autorezeptor, Hemmung der Dopaminfreisetzung, Steuerung anderer Neurotransmitter wie Acetylcholin, Noradrenalin, Glutamat	Ramboz et al. 1996, Saudou et al. 1996, Brunner 1999, Vernäs 2005, Groenink et al. 2006, Pytliak 2011
	Peripherie: Herz, Gefäße, nasale Mukosa	Peripherie: pulmonale und koronare Vasokonstriktion, Erektion	Morelli 2007

Rezeptor	Vorkommen	Funktion	Quelle
5HT1D	ZNS: frontaler Cortex, Hippocampus, Amygdala, Substantia nigra, Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus	ZNS: Bewegung, Angstverhal- ten, Vasokonstriktion im Gehirn, Autorezeptor, hemmende Funktion auf cholinerge, noradrenerge, glutamaterge und dopaminerge Neurone	Lowther et al. 1992/1997, Varnäs et al. 2001, Pullar 2004
	Peripherie: Herz, Gefäße	Peripherie: zerebrale Vasokonstriktion	Pytliak 2011
5HT1E	ZNS: Cortex, Striatum, Hippocampus, Nu- cleus caudatus, Putamen, Globus pallidus, Amygda- la, Hypothalamus, Bulbus olfactorius	ZNS: Gedächtnis, Emotionen, Schmerzen	Lowthers 1992, Bruinvels 1994, Shimron-Abarbanell et al. 1995
	Peripherie: nicht bekannt	Peripherie: nicht bekannt	
5HT1F	ZNS: Cortex, Striatum, Hippocampus, Bulbus ofactorius, Rückenmark, dorsale Nuclei ra- phe, Nucleus tractus solitarius	ZNS: mögliche Beeinflussung von Bewegung und Angst- verhalten	Pascual et al. 1996, Gastro 1997
	Peripherie: Uterus, Koronarar- terien	Peripherie: Vasokonstriktion	Nilson et al. 1999
5HT2A	ZNS: Cortex, Hippo- campus, Amygda- la, Striatum, Hypo- thalamus, Bulbus olfactorius, Nucle- us accumbens	ZNS: Angst-, Ess-, Suchtverhal- ten, Wahrnehmung, Vor- stellungsvermögen, Ler- nen, Gedächtnis, Gemüts- lage, Sexualität, Schlaf- verhalten, Thermoregulati- on	Pompeiano 1994, Dwivedi 1998
	Peripherie: Uterus, Darm, Harnwege, Thrombozyten, Gefäße, glatte Muskulatur	Peripherie: Kontraktion der glatten Muskulatur von Harnwe- gen, Darm und Uterus, Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation, Erhöhung der Kapillarpermeabilität	Cook et al. 1994, Nagatomo 2004, Pytliak 2011

Rezeptor	Vorkommen	Funktion	Quelle
5HT2B	ZNS: Neocortex, Amygdala, Septum, Hypothalamus, Cerebellum	ZNS: Angst-, Ess- und Schlafverhalten, Migräne	Schmuck 1994, Kennet et al. 1998, Schaerlinger 2003, Launay 2006
	Peripherie: Darm, Herz, Niere, Leber, Plazenta, Gefäße, Magen	Peripherie: Vasokonstriktion, Kontraktion der glatten Muskulatur, Motilität des Gastrointestinaltrakts	Kursar et al. 1992, Schmuck et al. 1996
5HT2C	ZNS: Cortex, Substantia nigra, Hypothalamus, Septum, Globus pallidus, Plexus choroideus Rückenmark	ZNS: Steuerung des motorischen Verhaltens, Angst-, Ess- und Suchtverhalten, Bewegung, Gemütslage, Sexualität, Schlafverhalten, Thermoregulation, Migräne	Pompeiano 1994, Westberg 2002, Schaerlinger 2003
	Peripherie: nicht bekannt	Peripherie: nicht bekannt	
5HT3	ZNS: Cortex, Amygdala, Hippocampus, Bulbus olfactorius, Hirnstamm, limbisches System, Substantia gelatinosa des Rückenmarks	ZNS: Angst-, Suchtverhalten, Übelkeit und Auslösen des Brechreflexes (vor allem unter Chemotherapie), Lernen, Gedächtnis, neuronale Erregung, Schmerzinduktion, Essstörungen, Migräne	Tecott 1993
	Peripherie: an Zellwänden von Neuronen	Peripherie: Motilität des Gastrointestinaltrakts	Rex 2007
5HT4	ZNS: Neocortex, Basalganglien, Hippocampus, Substantia nigra	ZNS: Angst-, und Essverhalten, Lernen, Gedächtnis, Emotionen, Lernprozesse, Respiration, Regulation der Sekretion von Acetylcolin, Dopamin und Serotonin selbst	Vernäs 2003, Cartier 2005, Ciranna 2006
	Peripherie: Darm, Blase, Herz, Nebenniere	Peripherie: Motilität des Gastrointestinaltraktes, Atmungskontrolle, Auslösen der Glukokortikoidausschüttung aus den Nebennierenrindenzellen	Taniyama 2000

Rezeptor	Vorkommen	Funktion	Quelle
5HT5A	ZNS: Cortex, Hippocampus, Hypothalamus, Thalamus, Cerebellum, Bulbus olfactorius, Pons, Locus coeruleus	ZNS: Bewegung, Schlaf- und Essverhalten, Verhalten in Stresssituationen, Angst- und Depressionsverhalten, Gedächtnisprozesse, Lernen, Gehirnentwicklung, zirkadiane Rhythmik	Pasqualetti et al. 1998, Grailhe et al. 2001, Nelson 2004, Cordes 2005, Thomas 2006
5HT5B	Peripherie: nicht bekannt	Peripherie: nicht bekannt	Grailhe et al. 2001, Nelson 2004
	ZNS: Vorkommen im Gehirn von Mäusen und Ratten, nicht bekannt beim Menschen	ZNS: Nicht bekannt	
5HT6	Peripherie: nicht bekannt	Peripherie: nicht bekannt	Kohen et al. 1996, Woolley 2004
	ZNS: Cortex, limbisches System, Caudatum, Substantia nigra	ZNS: Angstverhalten, Wahrnehmung, Lernen, Gedächtnis, Gemütszustände, Ernährung	
5HT7	Peripherie: nicht bekannt	Peripherie: nicht bekannt	Lovenberg 1993, Plassat et al. 1993, Ruat 1993, Shen et al. 1993, Roth 1994, To et al. 1995, Gustafson 1996, Hagan 2000, Thomas et al. 2002/2003/2004, Glass 2003, Hedlund 2004/2009/2005, Cordes 2005, Duncan und Franklin 2007, Belmarker 2008
	ZNS: Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus insbesondere Nucleus suprachiasmaticus, Amygdala, Cortex, dorsale Nuclei raphe, Pons, Hirnstamm	ZNS: Gedächtnis, Gemütslage, Respiration, Schlafverhalten (zirkadiane Rhythmik, Auftreten von Schlafstörungen, Zunahme der Latenzzeit und quantitative Abnahme des REM-Schlafes), Thermoregulation, Schmerzen, Auftreten von Depressionen, Schizophrenie und Angstverhalten	
	Peripherie: glatte Muskulatur des Gastrointestinaltraktes, kardiovaskuläres System (z.B. Koronarien)	Peripherie: Vasokonstriktion, Relaxation der Muskulatur, Reizdarmsyndrom, Kontrolle der Miktion	Bard et al. 1993, Schoeffter et al. 1996, Tuladhar et al. 2003, Hedlund 2009

Aus der Übersicht geht hervor, dass Serotoninrezeptoren im menschlichen Körper in allen Organsystemen vorkommen. Serotonin vermittelt überaus vielfältige Effekte über die Aktivierung spezifischer an die Zellmembran gebundener Rezeptoren, welche zum Teil auch als Autorezeptoren fungieren. Bekannte Signalwege führen über die Aktivierung (5HT4-, 5HT6-, 5HT7-Rezeptoren) oder Hemmung (5HT1-Rezeptor) der Adenylatcyclase, Aktivierung der Phospholipase C (5HT2-Rezeptor) (Kriegebaum et al. 2010), über Kalziumkanäle und Aktivierung von Proteinkinasen (Raymond et al. 2001). Die Signaltransduktion der 5HT5-Rezeptoren ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass der Rezeptor über eine Inhibition der Adenylatcyclase wirkt (Francken et al. 1998).

In der Ausbildung von Depressionen und Schlafstörungen sind insbesondere die 5HT1-, 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren vorrangig beteiligt (Holsboer 2001). Da der 5HT1-Rezeptor bereits gut untersucht ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren und mögliche Veränderungen nach einer pränatalen Glukokortikoidgabe im fetalen Schafsgehirn untersucht.

3 Ziele der Arbeit

Wie im Kapitel 2.2 beschrieben haben pränatale Glukokortikoide Einfluss auf die Entwicklung der Hirnfunktion und befördern das Auftreten von Verhaltensauffälligkeiten und Depressionen in späteren Leben (Slotkin et al. 1996, Muneoka et al. 1997, Hanley 2003). Neben einer Programmierung und Hyperaktivierung der HHN-Achse (Wyrwoll und Holms 2011) kann möglicherweise auch ein Glukokortikoideinfluss auf die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes und des serotonergen Systems für die Entwicklung von Depressionen eine Rolle spielen. Während die Effekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die Funktion und Reifung der HHN-Achse relativ gut untersucht wurden, sind die Glukokortikoideffekte auf die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes und des serotonergen Systems kaum untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden inwieweit pränatale Glukokortikoide einen Effekt auf die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes und das serotonerge System im fetalen Gehirn haben. Hierbei wurden insbesondere strukturelle Veränderungen der 5HT_{5A}- und 5HT₇-Rezeptoren untersucht, welche zu den wichtigsten serotonergen Rezeptoren im Gehirn gehören. Es liegen nur wenige Daten zu Veränderungen dieser Rezeptoren nach einer pränatalen Glukokortikoidapplikation in einer klinischen Dosis an einem dem Menschen nahe verwandtem Tiermodell vor.

Zum Zeitpunkt 0,70 der Trächtigkeitsdauer beim Schaf, entspricht der 28. SSW beim Menschen, wurde Betamethason in der klinisch verwendeten Dosis (2x8mg körperlsgewichtsadaptiert auf das Körpergewicht einer 70kg schweren Schwangeren) dem Mutterschaf intramuskulär injiziert.

Unsere Hypothese war, dass pränatal verabreichte Glukokortikoide, in der vorliegenden Arbeit das Betamethason in der klinisch zur Lungenreifung verwendeten Dosis, die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes und des serotonergen Systems stören.

Ziele der Arbeit waren:

1. Die Untersuchung der Effekte einer pränatalen maternalen intramuskulären Glukokortikoidtherapie auf das neuronale Netzwerk anhand der Synaptophysin-Immunreaktivität. Synaptophysin ist ein unspezifischer Marker

für Synapsen und in ca. 95% der neokortikalen Synapsen enthalten (Wiedenmann 1985, Rehm 1986).

2. Die Untersuchung der serotonergen 5HT5A- und 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität im frontalen Cortex (Lamina II/III und Lamina V/VI), Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis aufgrund ihrer Beteiligung an der Regulation von Schlaf und Verhalten sowie ihrer Involvierung in depressive Störungen.

Die Untersuchungen wurden am Tiermodell des fetalen Schafes durchgeführt, welches das wichtigste Tiermodell ist, an dem auch die pränatale Glukokortikoidtherapie zur Lungenreifung entwickelt wurde (Liggins 1969, Liggins und Howie 1972). Weiterhin ähnelt die Gehirnentwicklung des Schafes der des Menschen (Astom 1967, Dobbing & Sands 1979).

Mittels Immunhistochemie wurden die Synaptophysin-Immunreaktivität sowie die Immunreaktivität der serotonergen Rezeptoren 5HT5A und 5HT7 in den genannten Hirnstrukturen dargestellt und mögliche strukturelle Veränderungen dokumentiert. Die Immunhistochemie hat sich für einen spezifischen Antigennachweis etabliert und ist ein häufig angewandtes Verfahren. In dieser Arbeit sollte die ABC-Methode zum Einsatz kommen. Die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion wird mittels Immunkomplex verstärkt und durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Mittels Lichtmikroskop sollten die ausgewählten Hirnstrukturen bewertet werden. Die weitere Auswertung sollte dann mittels Bildverarbeitungsprogramm erfolgen, um die Fläche der Immunreaktivität erheben zu können, welche sich zur Auswertung schon in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bewährte. Dafür wurden die histologischen Bilder in Graustufen umgewandelt. Die statistische Auswertung sollte mit dem Mann-Whitney-Test erfolgen.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die Auswirkungen einer pränatalen Betamethasontherapie auf das fetale Gehirn umfassender zu erkennen und mögliche Wirkungsmechanismen für die im späteren Leben auftretenden neuropsychiatrischen Störungen näher zu erklären. Die Studie könnte helfen, das Wissen über mögliche Nebenwirkungen von Glukokortikoiden zur Verbesserung der Lungenreifung zu ergänzen und deren Einsatz angemessen zu bewerten.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere und experimentelles Protokoll

Die Experimente wurden an trächtigen Schafen am Institut für Versuchstierkunde (IVTK) der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt und durch die Tierschutzkommission des Freistaates Thüringen genehmigt. Ich habe mich auf die Aufarbeitung des Hirngewebes (Schneiden, Färben) und dessen Auswertung (Mikroskopieren, Einscannen der Schnitte, Bildverarbeitung und -analyse) fokussiert. Bei der Durchführung der Experimente war ich selbst nicht zugegen, doch sollen sie zum besseren Verständnis beschrieben werden.

4.2 Terminierte Konzeption

Die mütterlichen Schafe (Merino- und Schwarzkopfkreuzungen) wurden terminiert verpaart. Dies setzte eine Synchronisierung des Ovulationszykluses voraus. Die Schafe wurden bei einem Schäfer gehalten. Die Ovulation wurde durch ein standardisiertes Verfahren ausgelöst. Dabei wurde zur Zyklusblockade dem Mutterschaf ein mit Gestagenen getränkter Schwamm vaginal implantiert, der kontinuierlich Gestagene abgab. Sobald der natürliche Zyklus blockiert war, wurde der Schwamm wieder entnommen und dem Mutterschaf Choriongonadotropine zur Ovulationsauslösung verabreicht. Die Paarung, die in den nächsten 48 Stunden stattfand, wurde von einem Schäfer beobachtet und die Trächtigkeit am 20. Trächtigkeitstag (Trächtigkeitsdauer von insgesamt 150 Tagen) anhand der Progesteronspiegel der Muttertiere überprüft.

Die Muttertiere wurden etwa 5 Tage vor Beginn der Experimente ins IVTK gebracht, damit sie sich an die neue Umgebung gewöhnen konnten. Die Haltung erfolgte in einem Tierstall bei einem festen zirkadianem Rhythmus mit 14 Stunden Helligkeit und 10 Stunden Dunkelheit und unter Aufsicht eines Tierarztes.

4.3 Applikation von Betamethason

In dieser Studie wurden 17 Schaffeten eingeschlossen, dabei erhielten 6 Muttertiere (7 Schaffeten, davon ein Zwillingsspaar) zum Zeitpunkt 0,7 der Trächtigkeitsdauer (106. und 107. Trächtigkeitstag von insgesamt 150 Trächtigkeitstagen) eine Betamethasonbehandlung. Es wurde Betamethason (Betamethason-Phosphat,

Celestan soluble Essex, München, Deutschland) in einer Dosierung von 110µl/kg zweimal im Abstand von 24 Stunden maternal i.m. appliziert. Eine gewichtsadaptierte Dosierung von 110µl/kg beim Schaf entspricht einer Betamethasongabe von 2x8mg bei einem angenommenen Gewicht von 70kg einer Schwangeren. Diese Dosis ist entsprechend der Leitlinien Europas und Deutschlands üblich (NIH 2000, DGGG 2008). Die 7 Mutterschafe aus der Kontrollgruppe (10 Schaffeten, davon 3 Zwillingspaare) erhielten ein entsprechend gleiches Volumen an isotonischer Kochsalzlösung (2,2ml i.m.).

4.4 Histochemische und immunhistochemische Färbungen im fetalen Schafsgehirn

4.4.1 Gewinnung des fetalen Hirngewebes

Zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer (112. Trächtigkeitstag) wurde der Fetus durch Sectio caesarea entwickelt. Dabei wurde dem Muttertier zur Einleitung der Anästhesie 1g Ketamin i.m. verabreicht, zur Aufrechterhaltung der Anästhesie diente 4%iges Halothan. Im Operationssaal wurde die Bauchdecke des trächtigen Tieres durch einen Medianschnitt eröffnet und der alleine nicht lebensfähige Fetus mittels eines Uterusschnittes entwickelt. Das Muttertier wurde daraufhin in tiefer Anästhesie durch eine i.v. Gabe von Magnesiumchlorid getötet.

Anschließend wurde die fetale Arteria carotis communis aufgesucht und punktiert. Ein Katheter wurde in diese kopfwärts vorgeschoben und die cerebralen Gefäße mit heparinierter, physiologischer Kochsalzlösung blutleer gespült. Das fetale Gehirn wurde im Anschluss mit einer gepufferten 4%igen Paraformaldehydlösung fixiert. Eine Gehirnhemisphäre wurde zur histologischen Untersuchung genutzt, diese wurde zufällig ausgewählt.

Nach Freipräparieren des fetalen Gehirns aus der Schädelkalotte wurde das Gewebe in einer 2%igen Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C für eine Woche belassen und nachfixiert. Danach wurde das Gehirn in 7mm dicke, koronal geschnittene Blöcke geteilt und diese mittels Histokinette (Gewebeeinbettautomat, Leica TP 1020, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland) in Paraffin überführt und anschließend an der Paraffinausgießstation (Leica EG 1160, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland) eingebettet. Von den Gewebelöcken wurden am Rotationsmikrotom (HM 335E, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) 6µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen, die mit Vectabond

TM Reagent (Vector Laboratories, Burlingame, Kanada) vorbehandelt waren und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

4.4.2 Histochemische Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Zur anatomischen Übersicht der Schnittpräparate erfolgte eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Als Färbeergebnis wurden blau-violette Zellkerne und ein rosa-rotes Zellplasma sichtbar (Mulisch und Welsch 2010).

Die entsprechenden Gehirnschnitte wurden durch die absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend mit Hämatoxylinlösung (Hämatoxylin, Fluka Chemie, Buchs, Deutschland) nach Mayer angefärbt (Kernfärbung). Es folgte eine Spülung mit Leitungswasser zum Bläuen. Nach dem Bläuen wurden die Schnitte in Eosinlösung (Eosin, Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingestellt (zytoplasmatische Färbung). Danach wurden die Präparate entwässert und als Dauerpräparat eingeschlossen. Die detaillierte Färbetechnik ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2 Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Vorgang	Medium	Dauer
Entparaffinieren	2x Xylol 2x Isopropanol 100% 2x Isopropanol 80% 2x Isopropanol 50%	je 10 min je 5 min je 5 min je 5 min
Spülen	Aqua dest	5 min
Kernfärbung	Hämatoxylin nach Mayer	9 min
Differenzieren	Fließendes Leitungswasser	9 min
Spülen	Aqua dest	1 min
Gegenfärbung: Zytoplasmatische Färbung	Eosin (vor Gebrauch 1 Tropfen Essigsäure in Küvette)	max. 1 min

4.4.3 Immunhistochemische Darstellung der serotonergen Rezeptoren (5HT5A und 5HT7)

Mögliche Betamethasoneffekte auf das serotonerge System wurden anhand der immunhistochemischen Verteilung der 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren im frontalen Cortex (Lamina II/III und Lamina V/VI), im Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis und in den Nuclei pontis untersucht.

Die Immunhistochemie der 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren erfolgte nach der ABC-Methode. Diese hat eine hohe Sensitivität aufgrund der Verstärkung des ursprünglichen Signals der Antigen-Antikörper-Reaktion durch den Biotin-Avidin-Komplex um den Faktor 1:1000 (Noll und Schaub-Kuehnen 2000). Bei der ABC-Methode, benannt nach dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, bindet ein unkonjugierter (unmarkierter) Primärantikörper an das Antigen. Der applizierte Sekundärantikörper, der mit Biotin markiert ist (biotinyliert), bindet an den Primärantikörper-Antigen-Komplex. Der biotinylierte Sekundärantikörper reagiert nun mit einem zugesetzten Avidin-Biotin-Komplex. Dabei wird die hohe Affinität von Biotin zu Avidin ausgenutzt, wobei jedes Avidin-Glykoprotein jeweils 4 Bindungsplätze für das Biotin aufweist. Diese sind jedoch nie alle belegt, sodass der sekundäre Antikörper mit einer nicht besetzten Stelle reagieren kann (Lautner 2008). Die eigentliche Farbreaktion findet durch den Umsatz der Peroxidase durch Wasserstoffperoxid statt, die am Biotin kovalent gebunden ist. Dabei zerfällt das Enzym zu Wasser und Sauerstoff. Das Hinzufügen eines Chromogens, wie 3'3'-Diaminobenzidin (DAB), liefert die Elektronen für den Zerfall der Peroxidase und wird oxidiert, wodurch es zur Ausfällung eines braunen, in Wasser und Alkohol unlöslichen Reaktionsproduktes kommt (Lang 2006).

Nach dem Entparaffinieren der Schnittpräparate mit Neoclear (MERCK, Darmstadt, Deutschland) und Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) wurden die Schnitte in eine Lösung von 1ml Wasserstoffperoxid in 50%igem Isopropanol 20min bei Raumtemperatur eingestellt, um die endogene Peroxidase zu blocken. Nach Einstellen der Präparate in 0,5%igem Natriumborhydrit zur Blockierung reaktiver Aldehydgruppen folgten mehrfaches Spülen mit Phosphatpuffer (PBS) und Arbeitspuffer (AP) plus Triton. Des Weiteren wurden die Schnitte mit einem Gemisch aus 1,5ml AP plus Triton und 22,5µl 1,5%igem Normalserum (Goat-Serum, Chemicon International, Billerica, USA) inkubiert (30min, 37°C), um unspezifische Bindungen zu blockieren. Danach folgte die Inkubation der Schnitte mit den primären polyklonalen Antikörpern 5HT5A (Immunostar, Hudson, USA) und 5HT7 (Acris, Hiddenhausen, Deutschland) in einer Konzentration von 1:1000. Die Negativkontrolle erhielt stattdessen Normalserum in entsprechender Konzentration (1,5%ig). Nach der Inkubationszeit von 12 Stunden bei 4°C folgten Spülungen mit AP plus Triton und die Inkubation des sekundären Antikörpers (Anti-Rabbit-IgG, Rabbit-Kit, Vectastain, USA) in einer Verdünnung von 1:400 (2h, 37°C). Nach wiederholtem Spülen der Schnitte wurde der ABC-Komplex (ABC KIT, Vector

Labortories, Burlington, Canada) aufgetragen. Dieser musste eine halbe Stunde vor Verwendung aus Reagent A (Avidin DH) und Reagent B (biotinylierte Enzyme) mit AP und Triton hergestellt werden, um ein Aktivitätsmaximum zu erreichen. Nach 1 Stunde Einwirkdauer folgten Spülungen zur Beseitigung überschüssiger Komplexe. Zur Visualisierung der Immunmarkierung mithilfe von DAB (Sigma Fast 3,3-Diaminobenzidine Tablet Sets, Sigma-Aldrich-Chemie, Taufkirchen, Deutschland) wurden eine Tablette Wasserstoffperoxid und je eine Tablette 3,3-Diaminobenzidin in Aqua dest gelöst und gleichmäßig auf die Schnitte verteilt und ca. 6 Minuten darauf belassen. Zum Schluss folgten Spülungen mit Aqua dest, Entwässern mithilfe der aufsteigenden Alkoholreihe und das Einschließen der Präparate mit einem Eindeckmedium (Neo-Mount, MERCK GmbH, Darmstadt, Deutschland). Details für die Anwendung der Chemikalien sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

4.4.4 Immunhistochemische Darstellung der Synaptophysin-Immunreaktivität

Synaptophysin ist ein Membranprotein der präsynaptischen Vesikel und gilt als Markerprotein für die synaptische Dichte (Wiedenmann und Franke 1985, Rehm et al. 1986, Masliah et al. 1994). Durch die Synaptophysin-Immunreaktivität werden Anhäufungen von synaptischen Vesikeln dargestellt, die als granuläres Muster in den synaptischen Endigungen im Lichtmikroskop erscheinen (Wiedenmann und Franke 1985, Leclerc et al. 1989).

Das Färbeprotokoll folgte weitestgehend dem im Kapitel 4.4.3 beschriebenen Protokoll für den Nachweis der serotonergen Rezeptoren unter Verwendung von Pferde-Serum (Horse-Serum, Sigma, Missouri, USA), gelöst in 5ml AP-T in einer 1,5%igen Konzentration, dem monoklonalen primären Antikörper (Anti-Synaptophysin, 1:1000, Sigma, MO, USA) und einem sekundären Antikörper (Anti-Mouse-IgG, 1:200, biotinylated Antibody, Vectastain, USA).

Details für die Anwendung der Chemikalien sind nachfolgender Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 3 Protokoll der immunhistochemischen Färbungen nach der ABC-Methode für 5HT5A, 5HT7 und Synaptophysin.

Vorgang	Medium	Dauer	T/C°		
Entparaffinieren	2x Neoclear 100%	je 10 min	RT		
	2x Isopropanol 100%	5 min	RT		
	1x Isopropanol 80%	5 min	RT		
	1x Isopropanol 50%	5 min	RT		
Blockierung endogener Peroxidase	Isopropanol/H ₂ O ₂ 1%ig	20 min	RT		
	Aqua dest	10min	RT		
Blockierung Aldehydgruppe	NaBH ₄ /Aqua dest 0,5%ig	20min	RT		
	Aqua dest	10min	RT		
	PBS	5 min	RT		
	60ml AP/30µl T 0,05%ig	5 min	RT		
Inkubation mit Normalserum	5HT5A 1,5%ig	5HT7 1,5%ig	Syn 1,5%ig	30min	37°C
Inkubation mit primärem AK	α-5HT5A 1:1000	α-5HT7 1:1000	α-Syn 1:1000	12 h	4°C
	2x AP/T			je 5 min	RT
Inkubation mit sekundärem AK	α-5HT5A V1:400	α-5HT7 V1:400	α-Syn V1:200	2h	37°C
	2x AP/T			je 5 min	RT
ABC-Komplex	4%iger ABC-Komplex			1 h	37°C
	AP/T			5 min	RT
	2x PBS			je 5 min	RT
	Aqua dest			5 min	RT
Visualisierung der Ag-AK-Reaktion	DAB 0,7mg/ml			< 10 min	
	H ₂ O ₂ 0,2mg/ml				
Entwässern	2x Aqua dest			je 5 min	
	Isopropanol 80%			5 min	RT
Einschließen	2x Isopropanol 100%			je 5 min	RT
	2x Neoclear 100%			je 5 min	RT
	Entelan				

α - anti, Ag - Antigen, AK - Antikörper, RT - Raumtemperatur, T - Temperatur, Syn - Synaptophysin, V - Verdünnung, AP - Arbeitspuffer, H₂O₂ - Wasserstoffperoxid, NaBH₄ - Natriumborhydrit, PBS - Phosphatpuffer, T - Triton, Herstellung AP: 500 ml PBS-Puffer, 250 µl Tween 20 und 2,5 g Rinderserumalbumin

4.5 Lichtmikroskopische Auswertung und digitale Bildanalyse

Die zu untersuchenden anatomischen Strukturen wurden durch Zuhilfenahme eines anatomischen Atlas für das Schafsgehirn (Johnson et al. 2016) am Lichtmikroskop (Axioplan 2 imaging, Zeiss AG, Jena, Deutschland) bestimmt.

Um die Immunreaktivität der 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren sowie die synaptische Dichte zu beurteilen, wurden im frontalen Cortex die Lamina II/III und die Lamina V/VI separat ausgewertet, um ontogenetisch jüngere und ältere kortikale Schichten

zu trennen. Die Unterscheidung der Laminae erfolgte nach anatomischen Kennzeichen (siehe Abb. 2). Die Lamina II (Lamina granularis externa) ist nervenzellreich. Viele kleine Nervenzellen, die so genannten Körnerzellen treten gehäuft auf. Für die Lamina III (Lamina pyramidalis externa) sind die kleinen und mittleren Pyramidenzellen mit ihren charakteristischen Dendriten, die bis in die Lamina I reichen oder als Kommissurenfasern zu homologen Gebieten des Cortex der gegenüberliegenden Hemisphäre gelangen, charakteristisch (Schiebler und Schmidt, 2003). Die Lamina V enthält die großen Pyramidenzellen (Lamina pyramidalis interna), die einen Durchmesser von 100µm erreichen können. In der Lamina VI (Lamina multiformis) finden sich spindelförmige Nervenzellen, deren Axone in die weiße Substanz oder zurück in die oberen Rindenregionen ziehen. Eine schematische Darstellung der kortikalen Schichten zeigen die folgende Abbildungen 2 und 3.

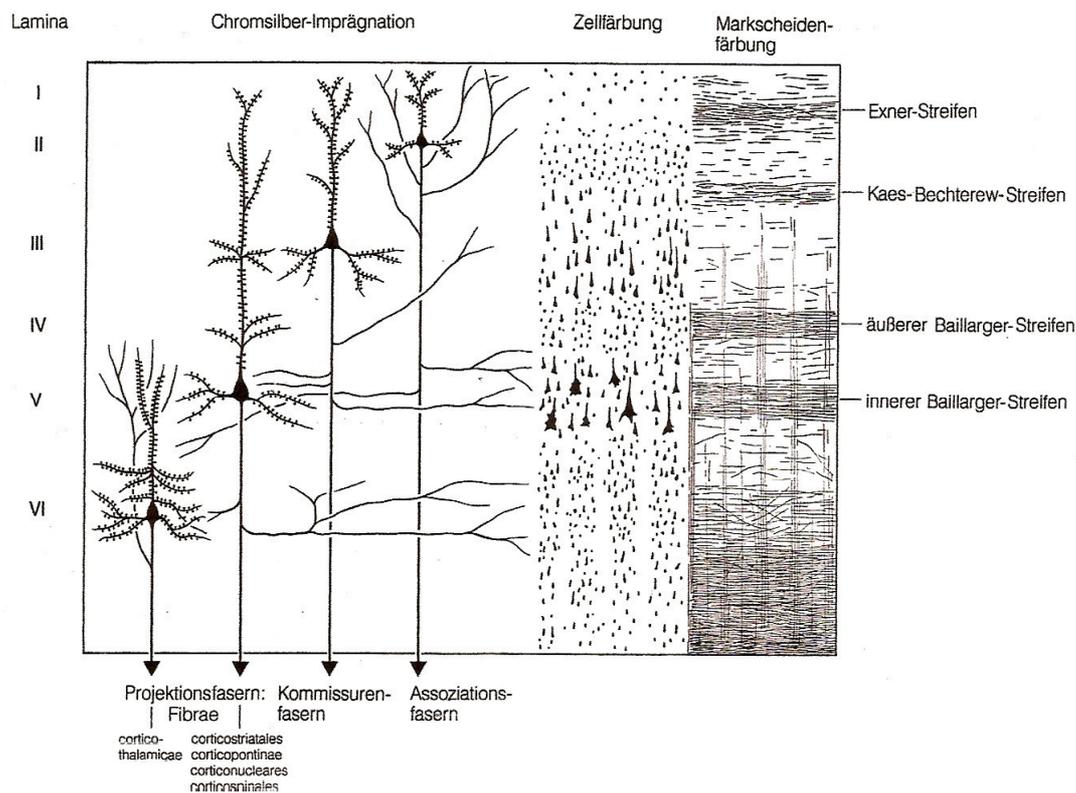


Abb. 2 Schematische Darstellung des horizontalen Schichtenaufbaus des humanen Cortex cerebri. Links: Darstellung efferenter Neuronensysteme (Projektionsfasern, Kommissurenfasern, Assoziationsfasern) in Verbindung zum Schichtenaufbau. Mitte: zytoarchitektonische Schichtengliederung. Rechts: Faserbild nach Markscheidenfärbung. Quelle: Schiebler, Schmidt; Anatomie; 2002



Lamina I

Lamina II

Lamina III

Lamina IV

Lamina V

Lamina VI

Abb. 3 In der lichtmikroskopischen Darstellung (Endvergrößerung 126 fach) sind die Laminae des frontalen Cortex gut zu erkennen.

Die gewünschten cerebralen Strukturen wurden anhand der Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gehirnschnitte lokalisiert, weil die Hirnstrukturen in den genannten immunhistochemischen Färbungen nicht deutlich zu erkennen waren. Es wurde ein entsprechender Bildausschnitt in dem mit 5HT5A, 5HT7 und Synaptophysin gefärbten benachbarten Schnitten ausgewählt. Dabei wurden 5 repräsentative Bildausschnitte aus Lamina II/III und Lamina V/VI des frontalen Cortex, Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis und Nuclei pontis ausgesucht (Endvergrößerung am Lichtmikroskop 250 fach) und der qualitativ beste Ausschnitt ausgewertet. Es wurde darauf geachtet, dass der gesamte Bildausschnitt mit der Struktur ausgefüllt war. Die histologischen Bilder wurden digitalisiert und durch eine am Lichtmikroskop montierte Farbvideokamera (AxioCam HR, Zeiss AG, Jena, Deutschland) standardisiert (Weißabgleich, Kunstlicht) aufgenommen. Die im Computer gespeicherten Bilder wurden daraufhin mithilfe eines Bildverarbeitungsprogramm (Scion Image 1,62 NIH, USA) ausgewertet. Die histologischen Bilder wurden in Graustufen (256 Graustufen) umgewandelt. Für die Immunreaktivität von Synaptophysin und der Serotonin-Rezeptoren (5HT5A, 5HT7) wurde unter visueller Kontrolle am Mikroskop ein Schwellenwert unter Zuhilfenahme der Negativkontrolle zur Festsetzung des spezifischen Signals aus der Immunmarkierung festgelegt. Grauwerte, die über dem Schwellenwert lagen, galten dabei als positiv.

4.6 Statistische Auswertung

Die Immunreaktivität wurde anhand der Fläche berechnet. Die Fläche hat in vorangegangenen Arbeiten als relevanter Auswertungsparameter gedient. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mithilfe des Programmes SPSS (Version 13.0 und 15.0 für Windows) statistisch ausgewertet. Mittels Mann-Whitney-Test wurden die beiden experimentellen Gruppen hinsichtlich der Effekte einer Betamethasonbehandlung geprüft. Die Signifikanzprüfung erfolgte bei zweiseitiger Fragestellung. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als Signifikanzniveau festgelegt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts wiedergegeben.

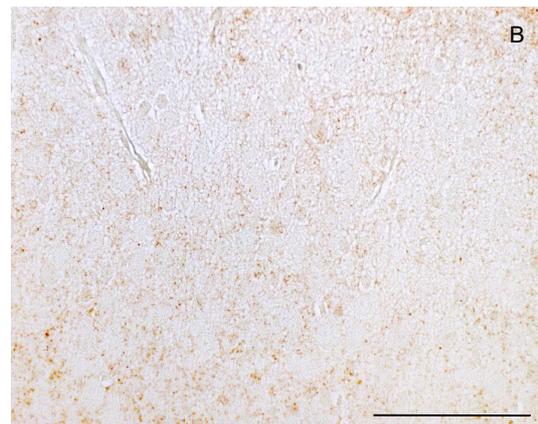
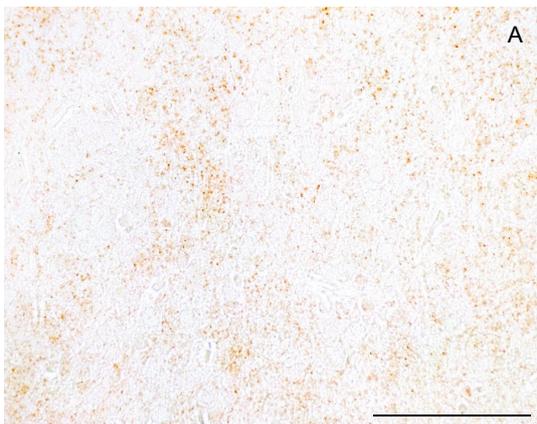
5 Ergebnisse

5.1 Betamethasoneffekte auf die synaptische Dichte

Die immunhistochemische Verteilung von Synaptophysin erscheint lichtmikroskopisch als granuläres Muster auf den Neuronen und im Neuropil und ist zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitdauer im gesamten Cortex cerebri weit verbreitet (Abb. 4).

Betamethason verminderte die Fläche der Synaptophysin-Immunreaktivität der Lamina II/III um 41,5% ($p < 0,001$, Abb. 4 und 5). In den Lamina V/VI sank bei den mit Betamethason behandelten Tieren die Fläche der Synaptophysin-Immunreaktivität um 37,6% ($p < 0,01$, Abb. 4 und 5). Details hierzu zeigt die Tabelle 4.

Lamina II/III



Lamina V/VI

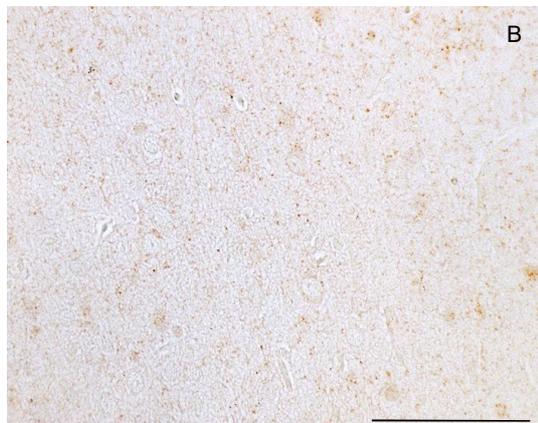
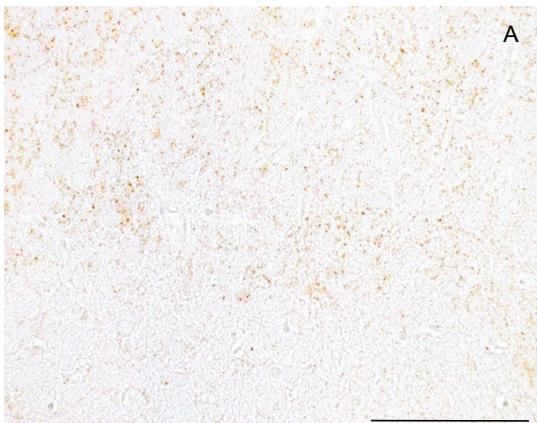


Abb. 4 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von Synaptophysin (braune Präzipitate) im frontalen Cortex (Lamina II/III, Lamina V/VI) in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100 μ m). Beachten Sie die verminderte Fläche der Synaptophysin-Immunreaktivität nach Betamethasonbehandlung.



Abb. 5 Fläche der Synaptophysin-Immunreaktivität im frontalen Cortex (Lamina II/III, Lamina V/VI) der Kontrollfeten (n=10) und Betamethason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitdauer. **p<0,01, *** p<0,001.

Tab. 4 Synaptophysin-Immunreaktivität (Syn-IR) und Betamethason (BM)-Effekte im fetalen Schafsgehirn

	Fläche Syn-IR (mm ² *10 ⁻²)	
	Kontrolle	BM
Lamina II/III	4,01 ± 0,15	2,34 ± 0,21***
Lamina V/VI	3,54 ± 0,14	2,21 ± 0,28**

Angegeben ist die Fläche der Syn-IR durch den Mittelwert ± SEM der Kontrollfeten und der Betamethason-behandelten Feten nach einer einmaligen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitdauer. ** p<0,01, *** p<0,001

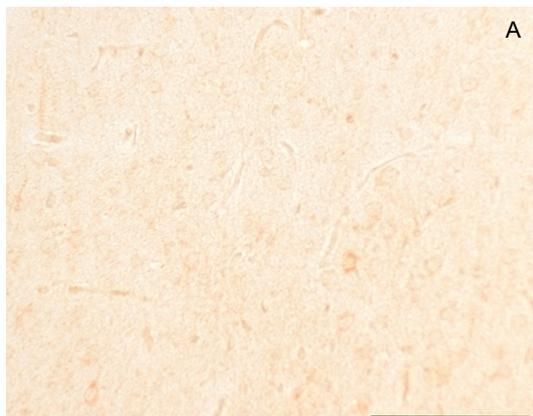
5.2 Betamethasoneffekte auf das serotonerge System

5.2.1 Expression von 5HT5A-Rezeptoren

Zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer ließen sich 5HT5A-Rezeptoren immunhistochemisch im Gehirn von Schaffeten in allen untersuchten Strukturen nachweisen. Die Immunmarkierung von 5HT5A-Rezeptoren erschien als granuläre Partikel in Zellsomata der Neuronen und den Dendriten und war im gesamten Gehirn weit verbreitet (Abb. 6, 8, 10, 12, 14). In den 5HT5A-Rezeptor-positiven Neuronen traten die Zellsomata stärker hervor als die neuronalen Fortsätze. Betamethason führte zu keinen signifikanten Änderungen der Immunreaktivität in den untersuchten Hirnregionen (frontaler Cortex, Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis, Abb. 6 - 15, Tab. 5). Die ausgeprägteste Immunreaktivität von 5HT5A-Rezeptoren zeigte sich im Nucleus suprachiasmaticus (Nucleus suprachiasmaticus > Nuclei pontis > Nucleus paraventricularis > Lamina II/III > Lamina V/VI > Locus coeruleus).

5HT5A-Rezeptoren im frontalen Cortex

Lamina II/III



Lamina V/VI

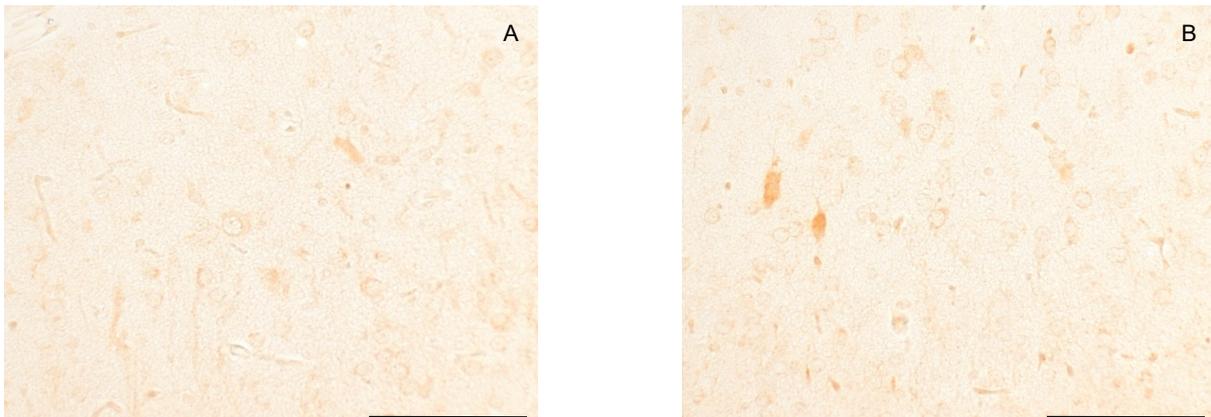


Abb. 6 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT5A-R (braune Präzipitate) im frontalen Cortex (Lamina II/III, Lamina V/VI) in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100 μ m).



Abb. 7 Fläche der 5HT5A-R-Immunreaktivität im frontalen Cortex (Lamina II/III, Lamina V/VI) der Kontrollfeten (n=10) und Betamethason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitdauer.

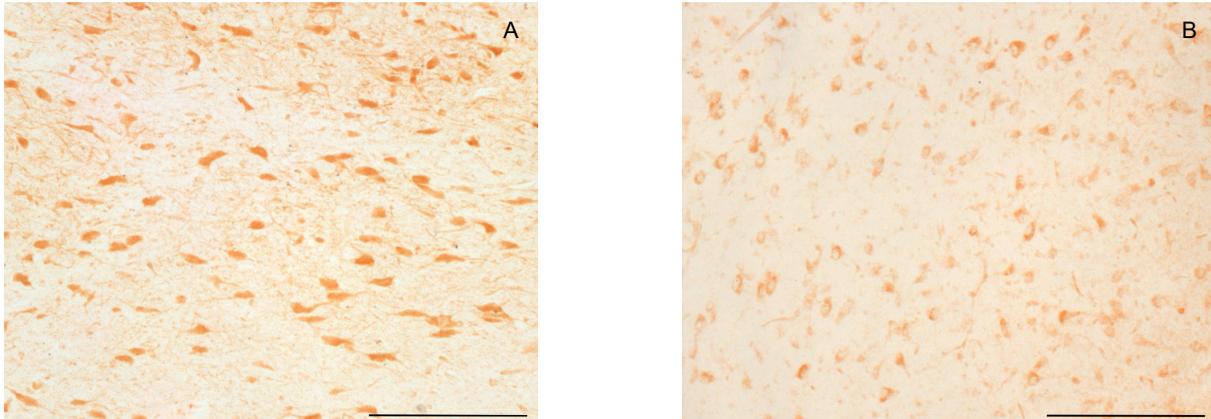
5HT5A-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus

Abb. 8 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT5A-R (braune Präzipitate) im Nucleus suprachiasmaticus in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100µm).

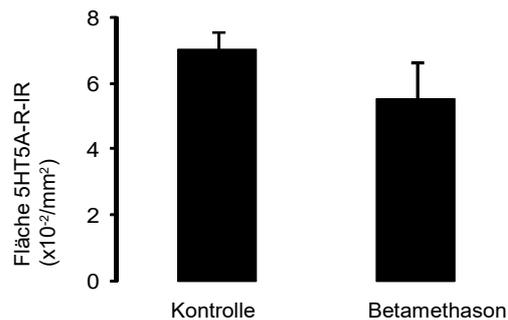


Abb. 9 Fläche der 5HT5A-R-Immunreaktivität im Nucleus suprachiasmaticus der Kontrollfeten (n=10) und Bethametason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer.

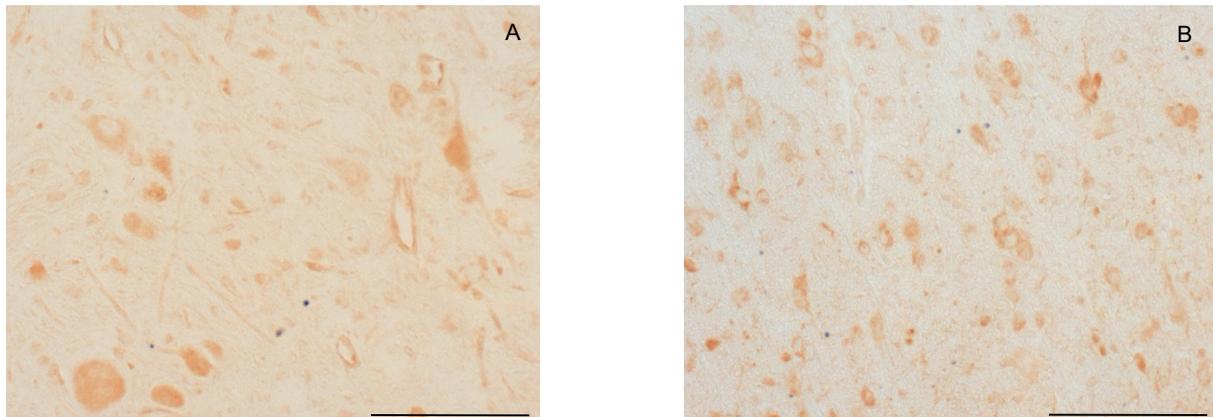
5HT5A-Rezeptoren im Locus coeruleus

Abb. 10 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT5A-R (braune Präzipitate) im Locus coeruleus in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100µm).

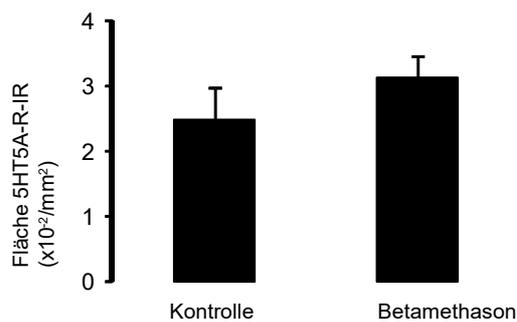


Abb. 11 Fläche der 5HT5A-R-Immunreaktivität im Locus coeruleus der Kontrollfeten (n=10) und Betamethason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitdauer.

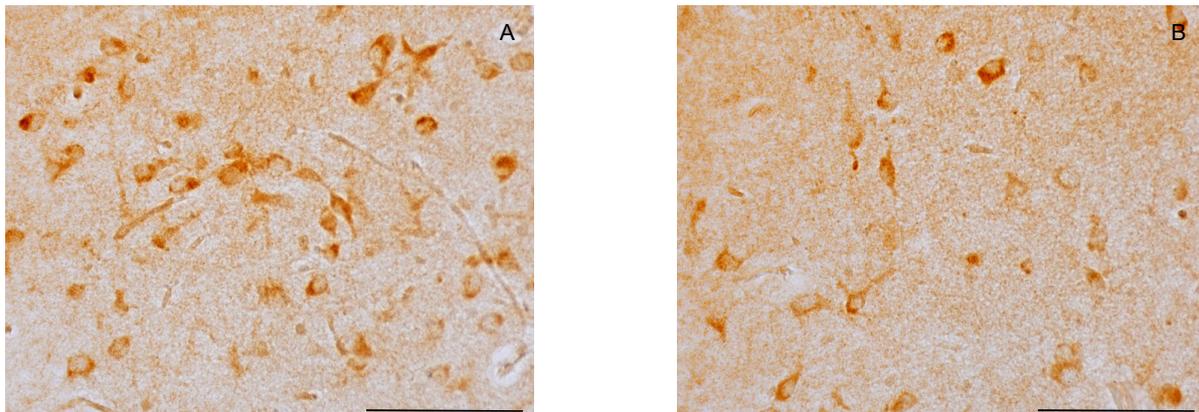
5HT5A-Rezeptoren im Nucleus paraventricularis

Abb. 12 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT5A-R (braune Präzipitate) im Nucleus paraventricularis in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100µm).

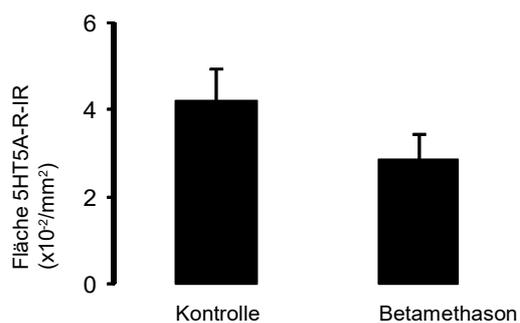


Abb. 13 Fläche der 5HT5A-R-Immunreaktivität im Nucleus paraventricularis der Kontrollfeten (n=10) und Betamethason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer.

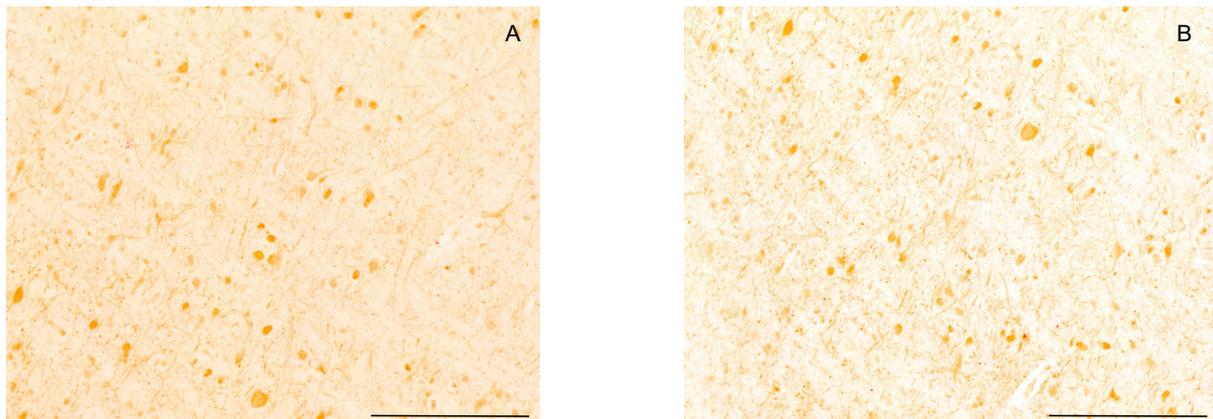
5HT5A-Rezeptoren in den Nuclei pontis

Abb. 14 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT5A-R (braune Präzipitate) in den Nuclei pontis in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100µm).

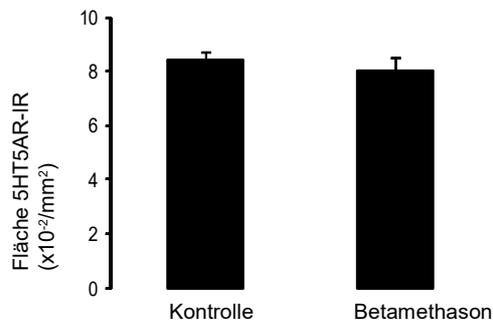


Abb. 15 Fläche der 5HT5A-R-Immunreaktivität in den Nuclei pontis der Kontrollfeten (n=10) und Betamethason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer.

Tab. 5 5HT5A-Rezeptor-Immunreaktivität (5HT5A-R-IR) und Betamethason (BM)-Effekte im fetalen Schafsgehirn.

	Fläche 5HT5A-R-IR (mm ² *10 ⁻²)	
	Kontrolle	BM
Lamina II/III	3,40 ± 0,36	2,82 ± 0,26
Lamina V/VI	2,94 ± 0,22	3,03 ± 0,29
SCN	7,01 ± 0,58	5,51 ± 1,11
LC	2,49 ± 0,48	3,11 ± 0,34
PVN	4,21 ± 0,72	2,85 ± 0,58
PN	6,65 ± 0,62	5,49 ± 0,53

Angegeben ist die Fläche der 5HT5A-R-IR durch den Mittelwert ± SEM der Kontrollfeten und der Betamethason-behandelten Feten nach einer einmaligen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. SCN - Nucleus suprachiasmaticus, LC - Locus coeruleus, PVN - Nucleus paraventricularis, PN - Nuclei pontis

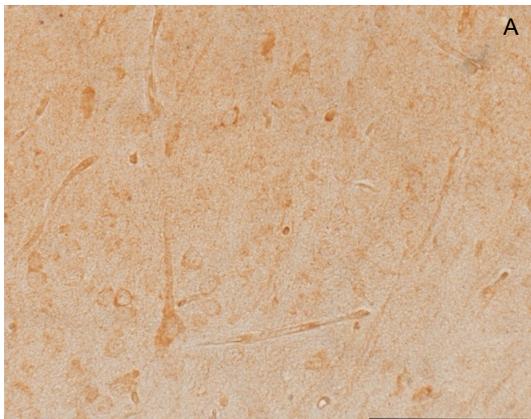
5.2.2 Expression von 5HT7-Rezeptoren

Zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer ließen sich 5HT7-Rezeptoren immunhistochemisch im Gehirn von Schaffeten in allen untersuchten Strukturen nachweisen. Die Immunmarkierung von 5HT7-Rezeptoren erschien als granuläre Partikel in Zellsomata der Neuronen und den Dendriten und war im gesamten Gehirn weit verbreitet (Abb. 16, 18, 20, 22, 24). In den 5HT7-Rezeptor-positiven Neuronen traten die Zellsomata stärker hervor als die neuronalen Fortsätze. In der vorliegenden Arbeit ließ sich die ausgeprägteste Fläche der 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität in den Nuclei pontis und im Nucleus suprachiasmaticus nachweisen (Nuclei pontis > Nucleus suprachiasmaticus > Locus coeruleus > Nucleus paraventricularis > Lamina II/III > Lamina V/VI).

5HT7-Rezeptoren im frontalen Cortex

Es konnte kein Einfluss auf die 5HT7-Rezeptor-IR durch eine einmalige Gabe von Betamethason im Cortex nachgewiesen werden (Abb. 16 und 17).

Lamina II/III



Lamina V/VI

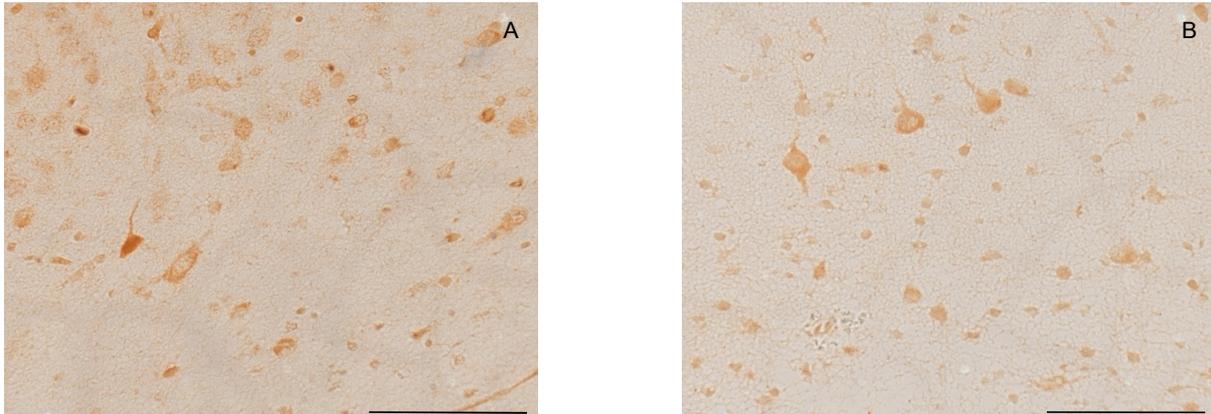


Abb. 16 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT7-R (braune Präzipitate) im frontalen Cortex (Lamina II/III, Lamina V/VI) in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100 μ m).



Abb. 17 Fläche 5HT7-R-Immunreaktivität im frontalen Cortex (Lamina II/III, Lamina V/VI) der Kontrollfeten (n=10) und Betamethason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer.

5HT7-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus

Betamethason reduzierte die Fläche der 5HT7-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus um 42% ($p < 0,05$, Abb. 18 und 19).

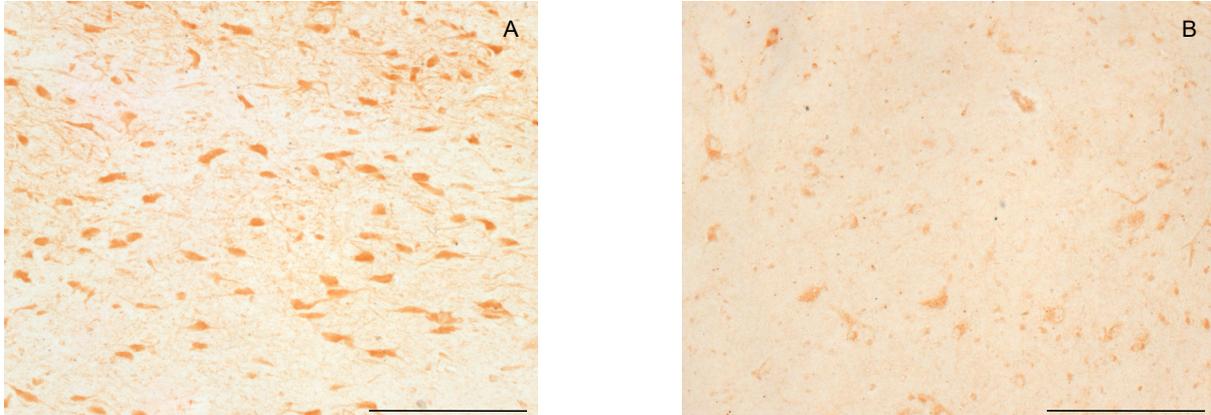


Abb. 18 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT7-R (braune Präzipitate) im Nucleus suprachiasmaticus in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100 μ m). Beachten Sie die verminderte Fläche der 5HT7-R-Immunreaktivität nach Bethamethasonbehandlung.

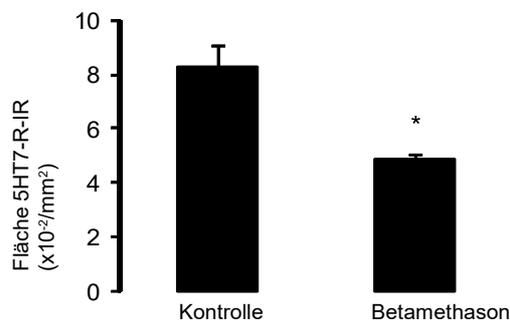


Abb. 19 Fläche der 5HT7-R-Immunreaktivität im Nucleus suprachiasmaticus der Kontrollfeten ($n=10$) und Betamethason-behandelten Feten ($n=7$) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. * $p < 0,05$.

5HT7-Rezeptoren im Locus coeruleus

Betamethason verminderte die Fläche der 5HT7-R-IR um 34,3% ($p < 0,05$, Abb. 20 und 21).

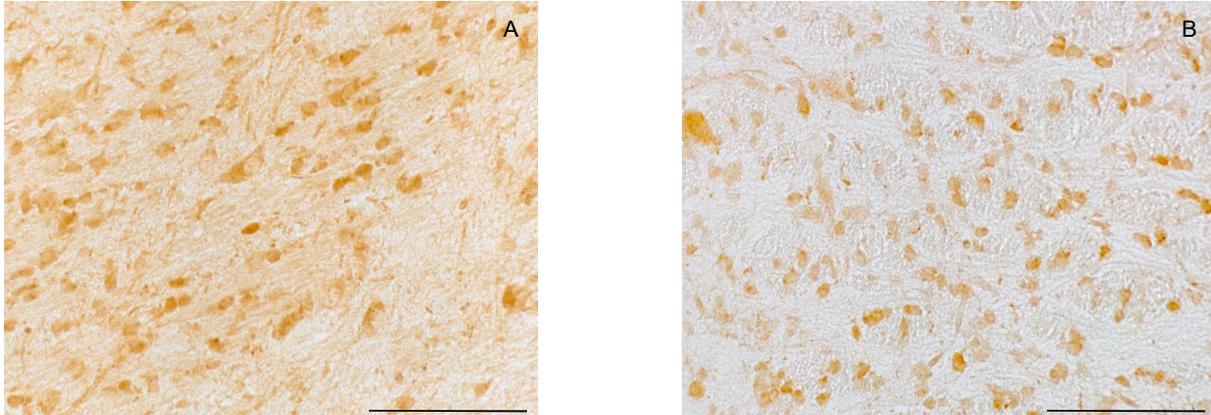


Abb. 20 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT7-R (braune Präzipitate) im Locus coeruleus in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100 μ m). Beachten Sie die verminderte Fläche der 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität nach Betamethasonbehandlung.

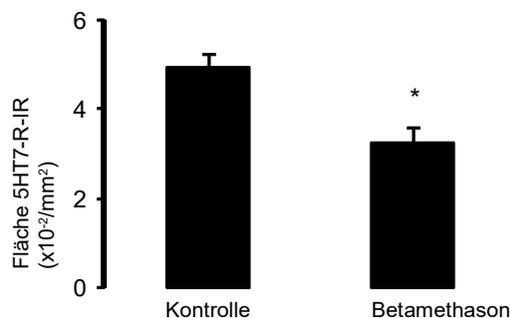


Abb. 21 Fläche der 5HT7-R-Immunreaktivität im Nucleus coeruleus der Kontrollfeten (n=10) und Betamethason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. * $p < 0,05$.

5HT7-Rezeptoren im Nucleus paraventricularis

Unter Betamethason erhöhte sich die Fläche der 5HT7-R-IR tendenziell im Vergleich zu den Kontrollfeten (Abb. 22 und 23).

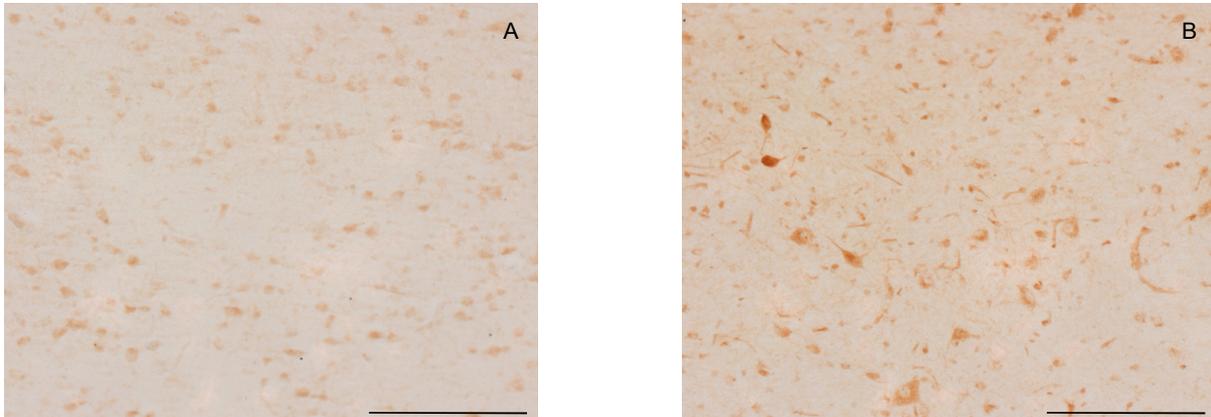


Abb. 22 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT7-R (braune Präzipitate) im Nucleus paraventricularis in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100 μ m).

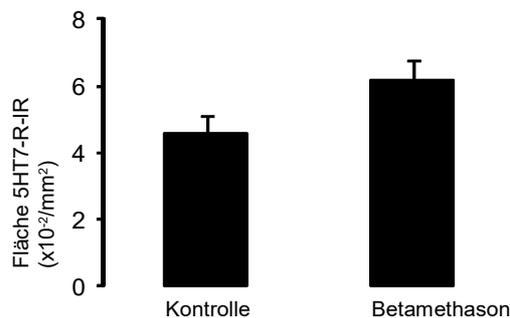


Abb. 23 Fläche der 5HT7-R-Immunreaktivität im Nucleus paraventricularis der Kontrollfeten (n=10) und Betamethason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer.

5HT7-Rezeptoren in den Nuclei pontis

Eine einmalige Betamethasonbehandlung veränderte die immunhistochemische Verteilung von 5HT7-R in den Nuclei pontis nicht (Abb. 24 und 25).

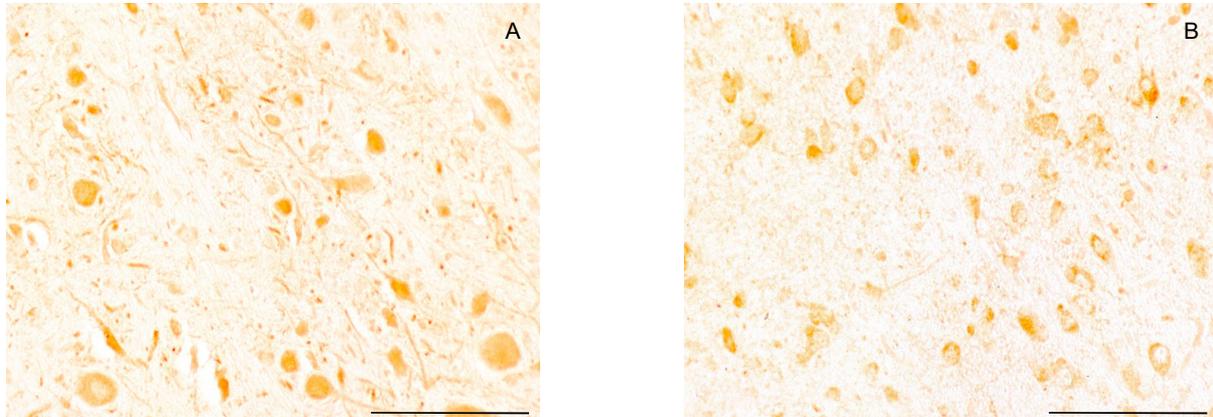


Abb. 24 Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Verteilung von 5HT7-R (braune Präzipitate) in den Nuclei pontis in Kontrollfeten (A) und in Betamethason-behandelten Feten (B) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. (Vergrößerung 40fach, Abbildungsmaßstab 100µm).

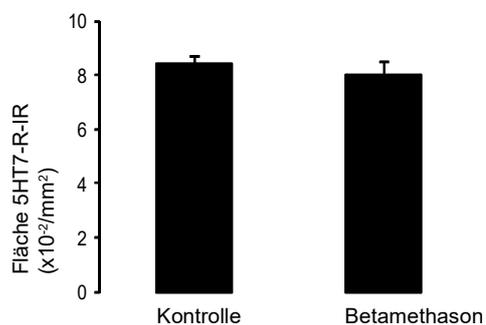


Abb. 25 Fläche der 5HT7-R-Immunreaktivität in den Nuclei pontis der Kontrollfeten (n=10) und Betamethason-behandelten Feten (n=7) zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer.

Damit führte Betamethason zu einer Reduktion von Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus und Locus coeruleus, aber nicht im frontalen Cortex, Nucleus paraventricularis und in den Nuclei pontis (Tab.6).

Tab. 6 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität (5HT7-R-IR) und Betamethason (BM)-Effekte im fetalen Schafsgehirn

	Fläche 5HT7-IR ($\text{mm}^2 \cdot 10^{-2}$)	
	Kontrolle	BM
Lamina II/III	2,71 ± 0,24	2,59 ± 0,19
Lamina V/VI	1,89 ± 0,15	1,47 ± 0,17
SCN	8,31 ± 0,76	4,86 ± 0,22*
LC	4,93 ± 0,32	3,24 ± 0,36*
PVN	4,58 ± 0,53	6,17 ± 0,61
PN	8,42 ± 0,27	8,04 ± 0,44

Angegeben ist die Fläche der 5HT7-R-IR durch den Mittelwert ± SEM der Kontrollfeten und der Betamethason-behandelten Feten nach einer einmaligen Betamethasonbehandlung zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer. SCN - Nucleus suprachiasmaticus, LC - Locus coeruleus, PVN - Nucleus paraventricularis, PN - Nuclei pontis. *p<0,05.

6 Diskussion

6.1 Diskussion von Material und Methoden

6.1.1 Das Tiermodell

In der vorliegenden experimentellen Untersuchung wurde das Schaf als Tiermodell genutzt. Einerseits bewährte sich das Schaf als Versuchstier schon in vorangegangenen Studien zur Klärung der Wirkung der Glukokortikoide auf das fetale Gehirn sowie im Hinblick auf physiologische und pathophysiologische Fragestellungen in Bezug auf die fetale Entwicklung des Menschen (Ruckebusch 1972, Clewlow et al. 1983), andererseits nutzten wir es um an bereits vorhandene Forschungsergebnisse anknüpfen zu können (Schwab et al. 2000, Antonow-Schlorke 2001, Groh 2008). Die ersten Studien im Hinblick auf die pränatale Anwendung von Glukokortikoiden wurden von Mount Liggins zur Beschleunigung der Lungenreifung beim Schaf durchgeführt (Liggins 1969). Die positiven Beobachtungen führten dann zur Etablierung des Tiermodells bezüglich der perinatalen Glukokortikoidtherapie und fanden Anwendung beim Menschen bei einer drohenden Frühgeburt zur Induktion der Lungenreifung (Liggins & Howie 1972).

Da der Ablauf der intrauterinen Entwicklung des Schaffeten der menschlichen intrauterinen Entwicklung, insbesondere der Hirnreifung, ähnelt, können wissenschaftliche Ergebnisse zum Teil auch auf den Menschen übertragen werden (Astom 1967, Dobbing & Sands 1979). Insbesondere die HHN-Achse reift beim fetalen Schaf wie beim Menschen im letzten Trimester (Challis und Brooks 1989). Zu beachten ist jedoch, dass beim Schaf die Reifung des Gehirns tendenziell früher einsetzt im Vergleich zum Menschen, so dass das Gehirn des Schafs zur Geburt etwas reifer ist (Astom 1967, Dobbing & Sands 1979).

Um eine vergleichende objektive Auswertung zu erhalten, wurden die Mutterschafe terminiert verpaart und in einem Tierstall mit einem festen zirkadianem Rhythmus bei 14 Stunden Helligkeit, 10 Stunden Dunkelheit und regelmäßiger Fütterung, da die zirkadiane Rhythmik auch von der Fütterung abhängig ist (Simonetta 1991), gehalten. Diese Maßnahmen erfolgten, damit die im Vordergrund stehende durchgeführte Glukokortikoidtherapie und ihr Einfluss auf das fetale Gehirn untersucht werden konnte, unter Ausblendung äußerer Umwelteinflüsse, welche Stress auf das Muttertier ausüben könnten. Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass beim Schaf Einlings- oder Zwillingsträchtigkeiten vorherrschen im Gegensatz zum Menschen, bei welchem

Zwillingsgeburten eher die Seltenheit sind. In der vorliegenden Arbeit waren 3 Zwillingspaare von den insgesamt 10 Feten festzustellen. Bei Zwillingsschwangerschaften sind die Nachkommen meistens kleiner und haben einen geringeren Körperumfang (Buckler und Green 2004, Bloomfield et al. 2007). In Untersuchungen am Schaf zeigten sich etwa gleiche ACTH-Konzentrationen im fetalen Blut in Ein- und Zwillingen (Rumball et al. 2008). Die Kortisolkonzentration war zum untersuchten Zeitpunkt (132. Trächtigkeitstag) bei Zwillingen jedoch niedriger (Rumball et al. 2008), was daran liegen kann, dass die Kortisolfreisetzung bei Einlingen am 128. Trächtigkeitstag beginnt und bei Zwillingen am 135. Trächtigkeitstag des Schafes (Edwards und McMillen 2002). Im Alter von 10 Monaten ließen sich in den untersuchten Schafen jedoch keine signifikanten Unterschiede in der ACTH- und Kortisolkonzentration bei Ein- und Zwillingen finden; die zur Geburt leichteren Zwillingseten zeigten eine tendenziell verminderte ACTH- und Kortisolkonzentration (Bloomfield et al. 2007). Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte in der vorliegenden Arbeit keine Differenzierung zwischen Ein- und Zwillingen, zumal die Untersuchungen an den Feten deutlich vor der fetalen Kortisolezernierung stattfanden. Zudem waren sowohl in der behandelten als auch in der Kontrollgruppe Zwillinge, so dass ein entstehender Fehler systematisch beide Gruppen gleichmäßig betrifft.

6.1.2 Applikation von Betamethason

In unserem Experiment wurden 7 Schaffeten einer maternalen intramuskulären pränatalen Betamethasonapplikation unterzogen. Dabei wurde Betamethason (Betamethason-Phosphat, Celestan solubile Essex, München, Deutschland) in einer Dosierung von 110µl/kg zweimal im Abstand von 24 Stunden am 106. und 107. Gestationstag maternal i.m. appliziert. Eine gewichtsadaptierte Dosierung von 110µl/kg beim Schaf entspricht einer Betamethasongabe von 2x8mg bei einem angenommenen Gewicht von 70kg der Schwangeren nach den Leitlinien der NIH (National Institutes of Health 2000) und der DGGG (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2008) bei drohenden Frühgeburten zur Induktion der Lungenreifung. Im Normalfall wird nur ein Behandlungszyklus mit 2x8mg Betamethason (DGGG 2008), wie in der vorliegenden Arbeit verwendet, angestrebt, da die Breite der Nebenwirkungen der Glukokortikoide nicht zu vernachlässigen ist (Haram 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine maternale intramuskuläre Applikation favorisiert, da diese der Klinik entspricht und Vergleiche mit bereits vorhandenen Ergebnissen nach einer fetalen Applikation von Betamethason in Bezug auf Effekte auf das neuronale Netzwerk vorgenommen werden können (Antonow-Schlorke et al. 2001, Colberg et al. 2004).

Synthetische Glukokortikoide kommen im Vergleich zu endogenen Glukokortikoiden aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit und ihrer längeren Wirkungsdauer sowie aufgrund ihrer niedrigen Affinität zu den Mineralglukokortikoidrezeptoren zur klinischen Anwendung (Grossmann et al. 2004, Sloboda et al. 2005). Dabei können sowohl Betamethason als auch Dexamethason leicht die Plazentaschranke penetrieren, da die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD2) der Plazenta eine niedrige Affinität zu den synthetischen Glukokortikoiden aufweist (Blanford et al. 1977, Anderson 1979, Roberts et al. 2006). Die 11 β -HSD2 inaktiviert ca. 80 - 90% des mütterlichen Kortisols in der Plazenta (Welberg et al. 2011, Seckl 2004, Sloboda et al. 2005, Benediktsson 1997, Shams 1998, Burton et al. 1999), damit keine extrem hohen Kortisol-Konzentrationen die Entwicklung des Fetus beeinflussen, welcher bis kurz vor dem Ende der Schwangerschaft nicht selbst in der Lage ist Kortisol zu produzieren (Challis 1989).

In den internationalen und deutschen Leitlinien werden sowohl Betamethason als auch Dexamethason zur Förderung der Lungenreifung empfohlen. Betamethason und Dexamethason weisen bis auf eine Methylgruppe in Position 16 eine ähnliche chemische Struktur auf und sind in ihrer Effektivität vergleichbar (The Neonatal Formulary 2006). Unklar ist jedoch bis heute, ob entweder Betamethason oder Dexamethason die bessere Substanz ist, da die Ergebnisse der bisherigen klinischen Studien nicht einheitlich sind, so dass es in den Kliniken vermutlich unterschiedliche Behandlungsansätze gibt. Die Arbeitsgruppe um Brownfoot konnte keine signifikanten Unterschiede in der Therapie mit Betamethason oder Dexamethason im Hinblick auf das Auftreten des neonatalen Atemnotsyndroms, schweren Hirnblutungen, perinataler Mortalität oder in Bezug auf das Geburtsgewicht belegen (Brownfoot et al. 2008). Die experimentelle Arbeitsgruppe um Derks konnte am fetalen Schaf nach pränataler Betamethason- bzw. Dexamethasonbehandlung eine ähnliche Wirkung der beiden Substanzen auf das kardiovaskuläre System (Erhöhung des Blutdruckes beim fetalen Schaf) und auf die elektrokortikale Aktivität nachweisen (Derks et al. 1997). In späteren Arbeiten ließ sich unter Dexamethason im Vergleich zur

Betamethasongabe ein geringeres Risiko gegenüber intraventrikulären Blutungen beweisen (Brownfoot 2013).

Wir haben Betamethason eingesetzt, da in klinischen Untersuchungen diese Substanz im direkten Vergleich mit Dexamethason zu einem besseren neurologischen Outcome, zu einem verminderten Risiko eines eingeschränkten Hörvermögens und zu einem geringeren Risiko einer neonatalen Mortalität beim Menschen führt (Lee et al. 2008).

Betamethason wird in zwei verschiedenen chemischen Verbindungen als Medikament empfohlen, zum Einen ist es als Betamethason-Phosphat erhältlich, zum Anderen als Betamethason-Acetat. Die biologische Halbwertszeit von Betamethasonphosphat beträgt 36 - 54 Stunden und wird schnell intramuskulär absorbiert (Sloboda et al. 2005). Betamethason-Acetat hat eine längere Halbwertszeit, da es durch den in Kristallform suspendierten schwerlöslichen Ester langsamer im Körper gelöst wird (Fachinformation zu Celestan®). Beide Betamethasonverbindungen werden kombiniert im Präparat (Celestan®) eingesetzt, um einen maximalen Effekt zu erhalten (Sloboda et al. 2005). Wir haben ebenfalls das Kombinationspräparat Celestan® angewendet.

6.1.3 Immunhistochemische Färbetechniken

Nach der Ovulation, welche durch ein standardisiertes Verfahren unabhängig von Jahres- und Paarungszeit ausgelöst wurde, wurde der Fetus exakt am 112. Trächtigkeitstages (0,73 der Trächtigkeitsdauer) durch Sectio caesarea entwickelt. Damit ist eine Vergleichbarkeit der behandelten Tiere gewährleistet. Nach Gewinnung des fetalen Gehirns nach Freipräparieren, welches nur 1 - 2 Minuten dauerte, wurde dieses sofort mit einer gepufferten 4%igen Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend in einem 2%igen Paraformaldehyd-verdünnten Fixativ bei 4°C für eine Woche belassen. Durch die schnelle Fixierung wurden biochemische Veränderungen weitestgehend verhindert und somit die Autolyse gestoppt und das Präparat dauerhaft haltbar gemacht. Die Fixierung ist ein Routineverfahren in der Neuropathologie und ermöglicht einen sehr guten Erhalt des Gewebes. Die daraufhin erfolgte Paraffineinbettung erlaubt im Gegensatz zu Gefrierschnitten das Anfertigen von dünnen Schnitten in hoher Qualität, da die Strukturhaltung im Vergleich zu Gefrierschnitten deutlich besser ist. Es wurden 6µm dünne Schnitte angefertigt, um lichtmikroskopische adä-

quate Aussagen zu der Immunmarkierung der angefärbten Rezeptoren in den ausgewählten Hirnregionen ohne Überlagerungen durch zu viel Umgebungsgewebe zu erlangen.

Die Antigenität der Schnitte war gut, so dass die unten genannten immunhistochemischen Färbungen eine gute Färbequalität aufwiesen.

Immunhistochemische Färbemethoden haben sich seit vielen Jahren zum Antigen-nachweis in unterschiedlichen Geweben etabliert (Sternberger et al. 1970) und sind ein häufig angewandtes Verfahren. Dabei wird sich die Antigen-Antikörper-Reaktion zu Nutze gemacht. Durch die Spezifität von Antikörpern mit bestimmten Antigenen in vivo oder unter Laborbedingungen einen Immunkomplex zu bilden, ist es möglich die entstandenen Präzipitate mittels Färbetechnik sichtbar zu machen und deren Verteilung zu dokumentieren. Besonders die ABC-Färbetechnik hat sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität, bedingt durch die Verstärkung des Antigen-Antikörper-Komplexes durch den Biotin-Avidin-Komplex, gegenüber den direkten und indirekten Färbemethoden bewährt (Noll und Schaub-Kuehnen 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die ABC-Methode am fetalen Schafsgehirn durchgeführt, um die serotonergen Rezeptoren 5HT_{5A} und 5HT₇ sowie Synaptophysin darzustellen. Synaptophysin ist in ca. 95% aller neokortikalen Synapsen im Vertebratengehirn nachweisbar (Wiedenmann et al. 1985, Leclerc et al. 1989) und befindet sich bevorzugt in den kleinen synaptischen Vesikeln vom Typ I und Typ II (Leclerc et al. 1989, Masliah et al. 1990). Damit eignet sich Synaptophysin, welches ein Ca²⁺-bindendes Membranglykoprotein der präsynptischen Vesikel ist (Rehm et al. 1986), als Marker für die Synaptogenese.

Für die untersuchten serotonergen Rezeptoren wirken die verwendeten monoklonalen Antikörper sehr spezifisch und verhindern dadurch eine Anfärbung anderer serotonerger Rezeptoren, welche die Auswertung verfälschen könnten. Mittels Immunhistochemie wird die Verteilung der serotonergen Rezeptoren in den Neuronen und Dendriten der untersuchten Hirnstrukturen nachgewiesen, welche sich als braunes granuläres Muster manifestieren und sich gut darstellen ließen. Die durchgeführten Färbungen waren von guter Qualität ohne signifikante Artefakte wie Verunreinigungen oder Gewebeschädigungen.

Vorteile der Immunhistochemie liegen in der standardisierten Anwendbarkeit, einer hohen räumlichen Auflösung sowie in einer hohen Reproduzierbarkeit. Ein Nachteil der Immunhistochemie ist, dass es sich hierbei um ein semiquantitatives Verfahren

handelt. Dieses gestattet den Vergleich relativer Werte, welche für die untersuchte Fragestellung eines Vergleichs zwischen experimentellen Gruppen, hier die Beurteilung von Betamethasoneffekten, ausreichend ist. Es wird hierbei nicht die absolute Proteinmenge ermittelt, sondern mithilfe der Immunmarkierungsintensität die Proteinexpression.

Mögliche Fehlerquellen wurden minimiert durch exakte Einhaltung des experimentellen Färbeprotokolls mit standardisierter Schnittdicke der histologischen Präparate, Verwendung von Reinstchemikalien, sauberes Arbeiten und Verwendung von Negativkontrollen bei der Immunmarkierung.

Die Auswertung erfolgte in standardisierten anatomischen Regionen, welche wir mittels Referenzatlases des Schafgehirns aufsuchten. Die Mikroskop- und Kameraeinstellungen wurden bei allen Untersuchungen konstant gehalten.

Zur Auswertung wurde die Fläche und nicht die optische Dichte genutzt, da sich die Fläche bereits in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe als besseres Verfahren bewährt hat (Antonow-Schlorke et al. 2000, Colberg et al. 2004).

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Betamethasoneffekte auf die Synaptophysin-Immunreaktivität

Zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer (112. Trächtigkeitstag) ließ sich Synaptophysin im frontalen Cortex der Kontroll- und Betamethasontiere nachweisen, wobei die Immunmarkierung von Synaptophysin lichtmikroskopisch als granuläres Muster erschien.

Es wurde der Einfluss einer pränatalen Betamethasongabe auf die synaptische Dichte zu Beginn des 3. Trimesters untersucht, also vor Beginn der Reifung der HHN-Achse. Beim Schaf beginnt die HHN-Achse etwa am 120. Trächtigkeitstag (Trächtigkeitsdauer 150 Tage) zu reifen (Challis et al. 2001).

Nach einer pränatalen maternalen intramuskulären Betamethasongabe in einer Dosis von 2x110µl/kg im Abstand von 24 Stunden, entspricht der klinisch angewandten Dosis von 2x8mg Betamethason bei einer 70kg schweren Schwangeren, zum Zeitpunkt 0,70 der Trächtigkeitsdauer (106. und 107. Trächtigkeitstag) fanden wir zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer (112. Trächtigkeitstag von 150 Trächtigkeitstagen), dem Tag, an welchem die fetalen Gehirne gewonnen wurden, eine signifikant reduzierte Synaptophysin-Immunreaktivität in der Lamina II/III und Lamina V/VI des

frontalen Cortex im Vergleich zu den Kontrolltieren. Es wurde zum Vergleich zu früheren Arbeiten nur der frontale Cortex und nicht auch die weiße Substanz untersucht (Colberg 2017), da entsprechend der anatomischen Verteilung der Synapsen eine hohe Intensität von Synaptophysin in der grauen Substanz und weniger in der weißen Substanz vorliegt (Colberg 2017).

Eine vorangegangene Studie von Frau Colberg am fetalen Schaf (Colberg 2017) zeigte in Korrelation mit den vorliegenden Ergebnissen ebenso akute Betamethasoneffekte auf die Synaptophysin-Immunreaktivität. So konnte zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer (110. Trächtigkeitstag, entspricht der 28. SSW beim Menschen) unmittelbar nach einer fetalen kontinuierlichen Betamethasongabe in einer Dosierung von 3,3µg/kg/h über 48 Stunden (Flussrate von 1ml/h) eine signifikante Verminderung der Synaptophysin-Immunreaktivität im frontalen Cortex sowie zusätzlich im Striatum und der Ca1-Region des Hippocampus nachgewiesen werden (Colberg et al. 2004, Colberg 2017). Die Arbeit von Frau Colberg ergab weiterhin 24 Stunden nach Beendigung der kontinuierlichen fetalen Betamethasoninfusion eine Reversibilität der Verluste der Synaptophysin-Immunreaktivität in den genannten Hirnregionen. Eine Reversibilität der akuten Verluste der Synaptophysin-Immunreaktivität nach einer maternalen intramuskulären Betamethasongabe wurde hierbei nicht untersucht.

Zudem erfolgten in der Arbeit von Frau Colberg Untersuchungen zu chronischen Effekten einer mehrmaligen pränatalen maternalen intramuskulären Betamethasongabe am fetalen Schafsgehirn. Zum Zeitpunkt 0,70 der Trächtigkeitsdauer (104./105. Trächtigkeitstag) sowie zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer (110/111. Trächtigkeitstag) wurde Betamethason maternal in einer klinisch angewandten Dosis von 2x110µg/kg intramuskulär appliziert. Zum Zeitpunkt 0,87 der Trächtigkeitsdauer (130. Trächtigkeitstag) wurden die fetalen Gehirne gewonnen. Mittels Immunhistochemie ergab sich nach einer mehrmaligen maternalen intramuskulären Betamethasongabe keine Veränderung des Synaptophysingehaltes in den untersuchten Gruppen nach 20 Tagen (Colberg 2017). Im Gegensatz zu den genannten Ergebnissen ließen sich in der vorliegenden Arbeit jedoch noch nach 6 Tagen Effekte einer maternalen Betamethasongabe auf die Synaptophysin-Immunreaktivität dokumentieren, so dass sich der Synaptophysingehalt nach einer maternalen Betamethasongabe offensichtlich in der Zeitspanne von 1 und 3 Wochen

nach Gabe erholt. Warum die Restitution des Synaptophysingehaltes schon 24 Stunden nach einer kontinuierlichen fetalen Betamethasoninfusion auftritt, ist unklar und liegt möglicherweise in der Pharmakodynamik begründet. Bei der kontinuierlichen fetalen Gabe über 48 Stunden zeigt sich ein steady state der Betamethasonkonzentration im fetalen Blut von 4,92ng/ml bei einer Dosierung von 3,3µg/kg/h (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe). Die peak-Konzentration von Betamethason nach einer maternalen Applikation in der Dosierung von 2x110µg/kg i.m., entsprechend der klinischen Dosis von 2x8g Betamethason zur Förderung der Lungenreifung, war 9,3ng/ml im fetalen Blut und damit doppelt so hoch wie nach der fetalen kontinuierlichen Gabe. Nach der maternalen Applikation in dieser Dosierung ist die Konzentration 12 Stunden nach der Gabe noch deutlich höher im Vergleich zur steady-state-Konzentration nach einer fetalen kontinuierlichen Betamethasoninfusion von 3,3µg/kg/h (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe). Die höhere Betamethasonkonzentration im fetalen Blut nach einer maternalen Applikation könnte die länger anhaltende Wirkung auf die Synaptophysin-Immunreaktivität im fetalen Schafsgehirn im Vergleich zur fetalen kontinuierlichen Infusion von 3,3µg/kg/h erklären.

Diese genannten akuten Effekte von Betamethason auf die Synaptophysin-Immunreaktivität verdeutlichen, dass Betamethason eine wenn auch transiente Auswirkung auf die Synaptogenese haben kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung passen zu den erhobenen Ergebnissen beim nichtmenschlichen Primaten und scheinen deshalb gut auf den Menschen übertragbar zu sein. Hierbei wurde zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer (134. Trächtigkeitstag) Betamethason in 4 Dosen von je 87,5µg/kg alle 12 Stunden maternal intramuskulär verabreicht, was einer klinischen Dosis von 2x12mg Betamethason entspricht. Die fetalen Gehirne wurden 12 Stunden nach der letzten Injektion gewonnen. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikant reduzierte Synaptophysin-Immunreaktivität im frontalen Cortex (Antonow-Schlorke et al. 2003).

Der Verlust der synaptischen Dichte hat möglicherweise akute funktionelle Konsequenzen und Auswirkungen auf die Erregungsweiterleitung bzw. kortikale Aktivierung, da sich bei Untersuchungen am fetalen Schaf 24 Stunden nach einer kontinuierlichen fetalen Betamethasongabe von 10µg/h über 48 Stunden eine transiente Reduktion elektrokortikaler Aktivität ergab, was Ausdruck für eine verminderte synaptische

Funktion darstellt (Schwab et al. 2001). Die EEG-Potentiale sind im Wesentlichen synaptische Summenpotentiale (Altwegg-Boussac et al. 2017).

Die signifikante Verminderung der synaptischen Dichte hat möglicherweise mehrere Ursachen. Möglich sind direkte Betamethasoneffekte auf die Expression von Synapsen bzw. strukturelle Veränderungen am Synaptophysin selbst. Die Expression der Synapsen wird möglicherweise durch die katabole Wirkung von Betamethason im ZNS beeinflusst (Doyle et al. 1994, Tuor et al. 1997). Strukturelle Veränderungen am Synaptophysin können durch eine betamethasonbedingte verminderte Phosphorylierung durch eine Hemmung der Aktivität der Atmungskette hervorgerufen werden (Evans und Cousin 2005). Die verminderte Phosphorylierung kann somit zu Konformationsänderungen des Synaptophysins führen, wodurch sich Synaptophysin möglicherweise immunhistochemisch nicht darstellen lässt.

Indirekte Effekte, welche die Synapsenzahlen beeinflussen könnten, könnten durch Betamethason hervorgerufene akute Verluste der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) MAP1B und MAP2 sein (Schwab et al. 2001a, Antonow-Schlorke et al. 2003a), welche neuronale Zytoskelettproteine und wichtig für die Synaptogenese sind (Tucker 1990). Hierdurch könnte die Synaptogenese gestört werden und somit als verminderte synaptische Dichte erscheinen (Masliah et al. 1990). Auch andere Strukturen des ZNS werden in ihrer Reifung durch Betamethason beeinflusst, wie z. B. die Myelinisierung (Dunlop 1997, Weinstock 1997, 2001). Zum Zeitpunkt 0,7 der Trächtigkeitsdauer des Schafs ist die Myelinisierung noch in der Entwicklung, welche zum Zeitpunkt 0,63 der Trächtigkeitsdauer beginnt (Antonow-Schlorke et al. 2009). Jedoch lässt sich eine Störung der Myelinisierung nicht in direkten Zusammenhang mit einer verminderten Synaptophysin-Immunreaktivität bringen. Inwieweit die Synaptophysinreduktion wirklich die Synaptogenese beeinflusst ist unklar, da die Reduktion von Synaptophysin nur transient (Colberg 2017) und die Synaptogenese ein länger andauernder Prozess ist (Holtmaat und Svoboda 2009).

Es wird weiterhin vermutet, dass eine Wechselwirkung zwischen dem serotonergen System und der Synaptogenese besteht und das serotonerge System als ein Reifungsstimulus auf die Synaptogenese wirkt (Lauder 1990, Mazer et al. 1997, Yang et al. 2014, Millard et al. 2017, Wirth et al. 2017), was die folgend genannten Studien verdeutlichen sollen. Die serotonergen Neurone entstehen im anterioren und posterioren Hinterhirn schon früh während der Entwicklung zwischen der 5. und 6.

Gestationswoche beim Menschen (Cordes 2005). Eine Aktivierung von 5HT7-Rezeptoren mittels eines selektiven Serotoninagonisten zeigte im adulten Mausgehirn eine beschleunigte Synaptogenese im Cortex sowie im Striatum (Speranza et al. 2017). Die Annahme weiter unterstützend, dass Serotonin als Reifungsstimulus auf die Synaptogenese wirkt, ergab sich an fetalen Zellkulturen des Hippocampus der Maus nach Applikation von 5HT1A-Agonisten eine deutlich gesteigerte Expression von Synapsen (Mogha et al. 2012). Im Gegensatz hierzu konnte in Untersuchungen unter einer verminderten Serotoninkonzentration im Gehirn eine verminderte Synaptogenese dargestellt werden (Lauder 1978). Hierbei stellte sich an fetalen Rattengehirnen mittels Audiographie nach einer maternalen Gabe von para-Chlorophenylalanin, was die Tryptophanhydroxylase hemmt, wodurch es zu einer verminderten Serotoninbildung kommt, eine verminderte Dichte von Synapsen im Hippocampus dar (Lauder 1978). Diese Ergebnisse konnten auch in einer später durchgeführten Untersuchung an fetalen Rattengehirnen in den Nuclei raphe nach einer maternalen Gabe von para-Chlorophenylalanin in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit bestätigt werden (Khozhai und Otellin 2012). Zusammenfassend gibt es möglicherweise mehrere Effekte, hervorgerufen durch die Betamethasongabe, welche die Synaptogenese stören können. Die Effekte einer pränatalen maternalen Applikation von Betamethason in der klinisch angewandten Dosis auf die Synaptogenese unterstützen damit die Annahme, dass man die Indikation zur Betamethasonbehandlung unter Berücksichtigung der daraus resultierenden Nebenwirkungen streng stellen muss.

6.2.2 Verteilung der serotonergen Rezeptoren 5HT5A und 5HT7 im fetalen Gehirn

In der vorliegenden Arbeit wurden die Serotoninrezeptoren 5HT5A und 5HT7 im fetalen Schafsgehirn mittels Immunhistochemie untersucht. Dabei wurden Hirnstrukturen ausgewählt, welche bei der Entwicklung des Verhaltens, bei der Entstehung von Verhaltensstörungen wie Depressionen sowie bei der Schlafgenerierung beteiligt sind. Neben dem frontalen Cortex (Lamina II/III und Lamina V/VI), Thalamus (Nucleus paraventricularis), Hypothalamus (Nucleus supra-chiasmaticus), Locus coeruleus und den Nuclei pontis, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, werden auch dem Hippocampus, den Basalganglien und der Amygdala eine bedeutende Rolle beim Auftreten von Verhaltensstörungen zugesprochen (Holsboer 2001,

Thobois et al. 2017, Wei et al. 2017). Bei der Generierung von Depressionen sind vorrangig die noradrenergen (vor allem im Locus coeruleus synthetisiert) und die serotonergen Transmittersysteme beteiligt (Bernard et al. 2010, Amare et al. 2017). Der Locus coeruleus ist zudem vor allem in die Generierung des NREM-Schlafes insbesondere durch noradrenerge Neurone, welche im Locus coeruleus lokalisiert sind, und auch anteilig durch serotonerge Neurone, involviert (Mallick et al. 2001, Khanday et al. 2016).

Zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer ließen sich 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren in allen untersuchten fetalen Hirnstrukturen (frontaler Cortex, Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis und Nuclei pontis) mittels Immunhistochemie nachweisen. Damit korrelieren die Ergebnisse bezüglich des Vorhandenseins und der Lokalisation der 5HT5A-Rezeptoren (adulte Mensch: Pasqualetti et al. 1998, Grailhe et al. 2001, Cordes 2005, Volk et al. 2010, Maus: Nelson 2004, Thomas 2006) und der 5HT7-Rezeptoren (Ratte: Lovenberg 1993, Ruat 1993, Roth 1994, Gustafson 1996, Meerschwein: To et al. 1995, Hagan 2000, Thomas et al. 2002/2003/2004, Glass 2003, Hedlund 2004/2005/2009, Cordes 2005, Duncan und Franklin 2007, Belmarker 2008, fetales Meerschwein: Andrews et al. 2004) mit früher durchgeführten experimentellen Untersuchungen vor allem am adulten Gehirn. Im fetalen Gehirn des Menschen ließen sich 5HT2-Rezeptoren im Thalamus in der 21. SSW, 5HT1- und 5HT4-Rezeptoren in der 31./32. SSW mittels Immunhistochemie nachweisen (Wai et al. 2011). Meines Wissens nach gibt es keine Untersuchungen, die 5HT5A-Rezeptoren und nur wenige Studien, die 5HT7-Rezeptoren am fetalen Gehirn untersucht haben (Andrews et al. 2004). Die Arbeitsgruppe um Andrews wies 5HT7-Rezeptor-mRNA im Hippocampus, Nucleus paraventricularis und im frontalen Cortex des fetalen Meerschweinchens nach (Andrews et al. 2004).

5HT5A-Rezeptor-Immunreaktivität

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die ausgeprägteste Immunreaktivität von 5HT5A-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus (Nucleus suprachiasmaticus > Nuclei pontis > Nucleus paraventricularis > Lamina II/III > Lamina V/VI > Locus coeruleus). Die serotonergen Rezeptoren befinden sich überwiegend im Nucleus suprachiasmaticus möglicherweise aufgrund der Rolle des Serotonins in der zirkadianen Rhythmik (Oporto et al. 2016), siehe hierzu Kapitel 2.3.2., jedoch auch auf-

grund der Funktion bei Depression, Gedächtnisprozessen und Lernen (Thomas 2006). Die starke Expression der 5HT5A-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus spricht für die vorangeschrittene Reifung der 5HT5A-Rezeptoren in dieser Struktur.

5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität

In dieser Arbeit zeigte sich die ausgeprägteste Immunreaktivität der 5HT7-Rezeptoren in den Nuclei pontis und dem Nucleus suprachiasmaticus (Nuclei pontis > Nucleus suprachiasmaticus > Locus coeruleus > Nucleus paraventricularis > Lamina II/III > Lamina V/VI). Die hohe Expression in diesen Hirnstrukturen ist in Übereinstimmung mit Literatur an adulten Gehirnen (adulte Maus: Plassat 1993, adultes Meerschwein: To et al. 1995, adulte Ratte: Ruat et al. 1993, Shen et al. 1993, Waeber und Moskowitz 1995, Gustafson et al. 1996, adulte Hamster: Duncan et al. 2007, adulter Mensch: Martin-Cora und Pazos 2004). In der Literatur finden sich darüber hinaus Angaben über hohe Konzentrationen von 5HT7-Rezeptoren in der Amygdala, Hippocampus, im Hirnstamm und in den Nuclei raphe (Lovenberg et al. 1993, To et al. 1995, Gustafson et al. 1996, Moyer und Kennaway 1999, Martin-Cora und Pazos 2004). Diese Regionen wurden durch mich jedoch nicht untersucht.

Die hohe Dichte der 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus ist in Übereinstimmung mit der Rolle des serotonergen Systems, insbesondere des 5HT7-Rezeptors, bei der Regulation von Funktionen des Nucleus suprachiasmaticus (Ying und Rusak 1997, Ehlen et al. 2001) und damit der zirkadianen Rhythmik und zusätzlich des Verhaltens (Lovenberg 1993, Ruat 1993, Hagan 2000, Glass 2003, Thomas et al. 2003, Hedlund 2004, Bonaventure 2007). Dem 5HT7-Rezeptor wird zudem aufgrund seiner anatomischen Verbreitung im Gehirn eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Depressionen zugesprochen (LeBon et al. 1997, Thomas et al. 2003, Hedlund 2009, Mnie-Filali et al. 2009). Es wurde somit in Übereinstimmung mit der Funktion des 5HT7-Rezeptors in der vorliegenden Arbeit eine hohe Dichte an 5HT7-Rezeptoren in Hirnstrukturen gefunden, welche in die Schlafgenerierung sowie bei der Entstehung von Depressionen einbezogen sind (Barnes und Sharp 1999, Martin-Cora und Pazos 2004).

Beim Menschen lässt sich in der 18. bis 30. SSW der Nucleus suprachiasmaticus als diskrete Struktur erkennen und ist in der 38. bis 42. SSW noch immer unreif, was sich in der unreifen zirkadianen Rhythmik der Babies widerspiegelt (Swaab et al.

1990). Beim fetalen Schaf ließ sich im letzten Trimester zum Zeitpunkt 0,9 der Trächtigkeitdauer (135. Trächtigkeitstag von einer Dauer von 150 Trächtigkeitstagen) eine neuronale Aktivität im Nucleus suprachiasmaticus erkennen (Constandil et al. 1990). Der Nucleus suprachiasmaticus kontrolliert mittels zirkadianer Oszillatoren die Schlafstadienlänge (Pace-Schott und Hobson 2002). Dabei wirkt Serotonin hemmend auf den Nucleus suprachiasmaticus (Meyer-Bernstein 1996).

Es gibt keine Daten zur Entwicklung des Locus coeruleus und Nuclei paraventricularis im fetalen Schaf. Beim Menschen ließ sich der Locus coeruleus um die 20. Schwangerschaftswoche mittels Immunhistochemie nachweisen (Zhang et al. 2015). Die Nuclei paraventricularis konnten durch immunhistochemische Färbemethoden in der 16. Schwangerschaftswoche beim Menschen identifiziert werden (Babović et al. 2004). Die Nuclei pontis ließen sich am fetalen Rattengehirn am 10. Trächtigkeitstag (Dauer 21 Trächtigkeitstage) nachweisen (Petkö et al. 1987), wobei hier darauf hingewiesen werden muss, dass Ratten postnatale Hirnentwickler sind (Semple et al. 2013).

6.2.3 Effekte einer pränatalen Betamethasontherapie auf die serotonergen Rezeptoren 5HT_{5A} und 5HT₇

Nach einer pränatalen maternalen intramuskulären Betamethasonapplikation in einer Dosierung von 110µl/kg zweimal im Abstand von 24 Stunden zum Zeitpunkt 0,70 der Trächtigkeitdauer (106. und 107. Trächtigkeitstag, Gesamtdauer 150 Trächtigkeitstage) konnte zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitdauer (112. Trächtigkeitstag) keine Änderung der 5HT_{5A}-Rezeptor-Immunreaktivität in den untersuchten Hirnregionen dokumentiert werden. Da sich keine Änderungen der 5HT_{5A}-Rezeptor-Immunreaktivität nach Betamethasongabe ergaben, kann angenommen werden, dass akute Betamethasoneffekte kaum dauerhafte Veränderungen in der Funktion des serotonergen Systems, die potentiell zu Verhaltensstörungen und Depressionen im späteren Leben führen können, über diesen Rezeptor bewirken. Der überwiegend fehlende Betamethasoneffekt auf die 5HT_{5A}-Rezeptoren in den untersuchten Hirnstrukturen (frontaler Cortex, Locus coeruleus, Nucleus suprachiasmaticus, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis) passt zu den fehlenden Betamethasoneffekten auf die Reifung des serotonerg vermittelten NREM-Schlafes (Groh 2008).

Die pränatale Betamethasongabe reduzierte die 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität signifikant im Nucleus suprachiasmaticus und im Locus coeruleus. In den übrigen untersuchten Hirnregionen (frontaler Cortex, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis) ergaben sich keine Änderungen. Die geschilderte Verminderung der 5HT7-Rezeptordichte im Nucleus suprachiasmaticus und Locus coeruleus könnte möglicherweise Funktionsstörungen im serotonergen System hervorrufen, welche ursächlich sind für die Programmierung von Verhaltensstörungen, insbesondere depressiver Erkrankungen, was bereits an der Ratte und beim Menschen nachgewiesen werden konnte (Delbende et al. 1992, Welberg 2000, Seckl 2001, Weinstock 2001, Sloboda et al. 2005). Es ist natürlich nicht klar, ob die Verminderung der 5HT7-Rezeptordichte transient ist oder während der Entwicklung wieder aufgeholt wird.

Nach einer pränatalen Betamethasonbehandlung sieht man eine Fragmentierung der Schlafstadien, welche möglicherweise auf die Effekte von Betamethason auf die 5HT7-Rezeptorimmunreaktivität und damit auf die serotonerge Aktivität im Nucleus suprachiasmaticus zurückzuführen sein könnten. Glukokortikoide führen zu einer vorzeitigen Entwicklung des REM-Schlafes, jedoch nicht des NREM-Schlafes, welcher serotonerg vermittelt ist (McCormick und Bal 1997, Pace-Schott 2002, Steriade 2005, Groh 2008). Für die fehlenden Glukokortikoideffekte auf den NREM-Schlaf spricht, dass kaum Effekte auf das serotonerge System im frontalen Cortex, Nucleus paraventricularis und Nuclei pontis, welche unter anderem an der Schlafgenerierung beteiligt sind, nachgewiesen werden konnten. Im Unterschied hierzu gibt es eine deutliche Suppression von Acetylcholinrezeptoren nach einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe). Das cholinerge System ist verantwortlich für die Generierung des REM-Schlafes (McCormick und Bal 1997), was die Glukokortikoideffekte auf die REM-Schlafentwicklung erklären könnte (Groh 2008).

Es ist unklar, warum gerade Betamethasoneffekte auf die 5HT7-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus und den Locus coeruleus zu finden sind. Die wenigen Studien, die es gibt, zeigen, dass diese Hirnstrukturen zusammen mit den anderen untersuchten Hirnstrukturen (frontaler Cortex, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis), auf dessen 5HT7-Rezeptoren Betamethason keine Effekte hat, sich morphologisch zur gleichen Zeit entwickeln (siehe oben). Möglicherweise ist das serotonerge

System in den Strukturen, die einen Betamethasoneffekt auf 5HT7-Rezeptoren zeigen, noch unreifer als die anderen Hirnstrukturen, die keinen Betamethasoneffekt auf die 5HT7-Rezeptoren zum Zeitpunkt der Betamethasonbehandlung zeigen. Unreife Hirnstrukturen sind wahrscheinlich empfindlich gegenüber Glukokortikoiden. Gegen die Unreife der Hirnstrukturen spricht jedoch, dass mehr 5HT7-Rezeptoren als 5HT5A-Rezeptoren in den untersuchten Strukturen gesehen wurden. Allerdings sagt die Zahl der Rezeptoren nichts über deren Reife und Funktionsfähigkeit aus. Hierzu wären Bindungsstudien notwendig. Möglich ist auch, dass die Strukturen, in denen die serotonergen Rezeptoren durch Betamethason supprimiert werden (Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus), mehr Glukokortikoidrezeptoren als die anderen untersuchten Hirnstrukturen (frontaler Cortex, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis) aufweisen. Hierzu fehlen jedoch noch Studien.

Zudem ist unklar, inwieweit die Betamethasoneffekte auf die 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität im Nucleus suprachiasmaticus und im Locus coeruleus reversibel sind. Untersuchungen der Reversibilität wären wichtig, um die Involvierung in programmierende Effekte auf das serotonerge System nachzuweisen. Langzeituntersuchungen bezüglich der Reversibilität der reduzierten Rezeptor-Immunreaktivität nach Glukokortikoidtherapie liegen nicht vor. Möglich ist eine dauerhafte Störung der Reifung des serotonergen Systems durch Glukokortikoide. Es ist bereits bekannt, dass pränatal verabreichte Glukokortikoide beziehungsweise chronischer Stress in der Schwangerschaft zu einer Programmierung einer Hyperaktivität der HHN-Achse führen können (Uno et al. 1994, Levitt et al. 1996, Bertram und Hanson 2002, Matthews 2002, Sloboda et al. 2002, Ising et al. 2005, Shoener et al. 2006, Wyrwoll und Holms 2011). Dadurch wird vermehrt Kortisol sezerniert (Rubin et al. 1987), was ein typisches Merkmal bei Patienten mit Depression ist (Carroll 1982, Young et al. 2001) und bis in das spätere Leben reichen kann. Das vermehrt sezernierte Kortisol supprimiert Serotonin, so dass eine verminderte Serotoninkonzentration vorzufinden ist; ein Mangel an Serotonin ist neben Noradrenalin ein wesentlicher Bestandteil in der Pathophysiologie der Depressionen (Slotkin et al. 1996, Muneoka et al. 1997, Holsboer 2001, Hanley 2003, Van den Hove et al. 2006). Auch eine dauerhafte Suppression der 5HT7-Rezeptoren wäre möglich (Holsboer et al. 1995). Bei Menschen mit Depressionen ließen sich Änderungen im Schlafverhalten nachweisen (Bremner et al. 1995, Sheline et al. 1996), wie eine verminderte Schlafeffizienz, gehäuftes nächtliches Erwachen, verminderte Tiefschlafphasen sowie eine verkürzte REM-

Schlaflatenzzeit bei vermehrter Menge an REM-Schlaf, was zu einer Fragmentierung der Schlafstadien führt (Delbende et al. 1992, Thase et al. 1997, Hedlund 2005, Tsuno et al. 2005, Bonaventure 2007). Somit lässt sich nicht ausschließen, dass nach einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung die Veränderungen an den serotonergen Rezeptoren bestehen bleiben könnten, insbesondere wenn sie länger gegeben werden.

Es gibt nur wenige Untersuchungen zu Effekten einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf das fetale serotonerge System, um unsere Ergebnisse mit bereits erhobenen Ergebnissen zu vergleichen. So z. B. ergab eine Untersuchung am Meerschweinchen, bei welchem zur Geburt ein etwa genauso reifes Gehirn wie beim Menschen vorliegt (Dobbing und Sands 1970), nach einer wiederholten pränatalen Dexamethasonbehandlung (1mgkg^{-1} am 40., 41., 50., 51., 60. und 61. Trächtigkeitstag; Trächtigkeitdauer 70 Tage) eine Reduktion der 5HT7-Rezeptor-mRNA (mittels in situ Hybridisation) im Nucleus paraventricularis, nicht jedoch im Hippocampus (Andrews et al. 2004). Unsere Ergebnisse ergaben keine Änderung der 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität im Nucleus paraventricularis. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten dadurch bedingt sein, dass die mRNA-Expression nicht unbedingt die Proteinexpression widerspiegelt, die wir untersucht haben. Zudem ist die in situ Hybridisierung ein quantitatives Verfahren und die von uns durchgeführte Immunhistochemie nur ein semiquantitatives Verfahren.

Es gibt offensichtlich eine enge Wechselwirkung zwischen dem serotonergen Transmittersystem und dem Glukokortikoidsystem. Untersuchungen, welche den engen Zusammenhang zwischen dem serotonergen System und dem Glukokortikoidsystem unterstützen, sollen hier kurz genannt werden. Nach einer Adrenalectomie an adulten Ratten stellte sich mittels in vitro Autoradiographie eine erhöhte Dichte von 5HT1-Rezeptoren in verschiedenen Strukturen des Hippocampus, in der Substantia nigra und in den dorsalen Nuclei raphe dar (Biegon et al. 1985, De Kloet et al. 1986). Nach Applikation von Kortikosteron zeigte sich dann eine verminderte 5HT1A-Rezeptordichte im Hippocampus, keine Veränderungen traten im Cortex, in den medialen Nuclei raphe und im ventralen Bereich des Hippocampus auf. Auch in unserer Untersuchung ließen sich keine Effekte auf die Immunreaktivität der 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren im frontalen Cortex nachweisen. Umgekehrt beeinflusst auch Serotonin die Glukokortikoidrezeptorexpression, was sich mittels in vitro Untersuchungen an adulten Zellkulturen aus dem Hippocampus nachweisen ließ

(Laplante et al. 2002). Nach Gabe von 5HT7-Agonisten zeigte sich eine verstärkte Expression von Glukokortikoidrezeptoren im Hippocampus (Laplante et al. 2002). Auch über eine Stimulation von 5HT2A- und 5HT2c-Rezeptoren an Zellkulturen des Hippocampus der fetalen Ratte ließ sich eine Vermehrung der Glukokortikoidrezeptoren nachweisen (Héry et al. 2000). Weiterhin führt eine Aktivierung von 5HT7-Rezeptoren zu erhöhten Spiegeln des Transkriptionsfaktors NGFI-A in adulten Zellkulturen des Hippocampus, welcher ein Marker für neuronale Aktivität ist (Honkaniemi und Sharp 1999) und der wiederum eine vermehrte Expression von Glukokortikoidrezeptoren im Hippocampus bewirkt (Weaver et al. 2001). Der NGFI-A-Transkriptionsfaktor ließ sich in deutlich erhöhter Konzentration im Hippocampus um den 60. Trächtigkeitstag (Trächtigkeitsdauer 70 Tage) beim Meerschwein nachweisen in Korrelation mit einer deutlichen erhöhten Konzentration an Glukokortikoidrezeptoren im Hippocampus (Andrews et al. 2004).

Es bleibt unklar warum gerade Betamethasoneffekte auf die 5HT7-Rezeptorimmunreaktivität und nicht auf die 5HT5A-Rezeptorimmunreaktivität nachgewiesen werden konnten, wobei beide Rezeptoren ihre Funktionen in Schlaf und Verhalten aufweisen (siehe Kap. 2.4, Tab. 1). Möglich ist, dass sich die 5HT7-Rezeptoren zum Zeitpunkt der Betamethasongabe im Nucleus suprachiasmaticus und Locus coeruleus in einer vulnerableren Phase befinden als die restlichen in dieser Arbeit untersuchten Hirnstrukturen. Möglicherweise haben sich auch Änderungen in der Rezeptordichte der 5HT7- und 5HT5A-Rezeptoren in den untersuchten Hirnstrukturen innerhalb der 6 Tage zwischen Betamethasongabe und Untersuchung der Gehirne wieder erholt und wir haben nur noch Residuen einer verzögerten Reversibilität gesehen, so dass es hilfreich sein wird, akute Effekte von Glukokortikoiden auf die serotonergen 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren in den Strukturen (frontaler Cortex, Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis) zu untersuchen. Da neben dem monoaminen Transmittersystem auch das GABAerge und cholinerge Transmittersystem wesentliche Bestandteile bei der Entstehung von Depressionen sind (Holsboer 2001), ist es notwendig, hier noch weitere Untersuchungen anzuschließen, da Serotonin nicht allein für die Entstehung von Depressionen verantwortlich ist (Holsboer 2001).

7 Schlussfolgerung

Zum Zeitpunkt 0,73 der Trächtigkeitsdauer konnte eine Synaptophysin-Immunreaktivität in den Lamina II/III und Lamina V/VI im frontalen Cortex nachgewiesen werden. Weiterhin konnten wir eine Immunreaktivität der 5HT5A- und 5HT7-Rezeptoren in allen untersuchten Hirnregionen (frontaler Cortex, Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis) nachweisen. Die ausgeprägteste Immunreaktivität beider Rezeptoren fand sich dabei im Nucleus suprachiasmaticus.

In der vorliegenden Arbeit konnten Betamethasoneffekte auf die Synaptophysinimmunreaktivität im frontalen Cortex beobachtet werden. Weiterhin ergaben sich Hinweise auf eine Verminderung der 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität durch Betamethason, aber nicht der 5HT5A-Rezeptor-Immunreaktivität, im Nucleus suprachiasmaticus und im Locus coeruleus. In den anderen Hirnregionen (frontaler Cortex, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis) ließen sich keine signifikanten Änderungen der 5HT7-Rezeptordichte beobachten. Die Effekte von Betamethason auf die 5HT7-Rezeptordichte im Nucleus suprachiasmaticus und Locus coeruleus hielten immerhin mindestens für 6 Tage nach der Betamethasongabe an. Inwieweit diese Effekte reversibel sind, lässt sich durch diese Arbeit nicht klären. Die Suppression der 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität im Nucleus suprachiasmaticus und Locus coeruleus, welche die Länge der Schlafstadien und deren Wechsel determinieren, könnte zu der in vorigen Arbeiten beschriebenen Schlafstadienfragmentierung beitragen (Groh 2008), was wiederum ein Symptom von Depressionen ist (Thase et al. 1997, Tsuno et al. 2005). Die fehlenden Betamethasoneffekte auf die 5HT5A- und 5HT7-Rezeptor-Immunreaktivität in den Hirnstrukturen, welche in die NREM-Schlafgenerierung involviert sind (frontaler Cortex, Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis, Nuclei pontis), sind in Übereinstimmung mit Arbeiten, die zeigen, dass eine pränatale Betamethasonbehandlung keine Änderung der Generierung und Reifung des NREM-Schlafes bewirkt (Groh 2008).

Auch wenn pränataler Stress zu Verhaltensauffälligkeiten und Depressionen im späteren Leben assoziiert ist (Welberg und Seckl 2001), so haben wir keine Hinweise darauf gefunden, dass eine Programmierung der Funktion oder eine Entwicklungsstörung des serotonergen Systems im frontalen Cortex, Nucleus suprachiasmaticus, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis und Nuclei pontis hierin involviert sind.

Allerdings haben wir nicht alle im Gehirn vorkommenden serotonergen Rezeptoren und alle Hirnstrukturen angeschaut, welche ebenfalls in die Generierung des Schlafes und bei der Entstehung von Verhaltensstörungen involviert sind. Weiterhin haben wir nicht die Funktion und Bindungskapazität der serotonergen Rezeptoren sowie die serotonergen Bahnsysteme untersucht. Hierzu sind noch weitere Untersuchungen des serotonergen Systems im fetalen Gehirn nach einer pränatalen Glukokortikoidgabe notwendig, vor allem im Hinblick auf eine mögliche Reversibilität der beobachteten Veränderungen, um Rückschlüsse auf mögliche Verhaltens- und Schlafstörungen im späteren Leben zu ziehen.

8 Quellenverzeichnis

- Agarwal R, Chiswick ML, Rimmer S, Taylor GM, McNally RJ, Alston RD, D'Souza SW. 2002. Antenatal steroids are associated with a reduction in the incidence of cerebral white matter lesions in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 86(2):96-101.
- Aghajafari F, Murphy K, Willan A, Ohlsson A, Amankwah K, Matthews S, Hannah M. 2001. Multiple courses of antenatal corticosteroids: a systematic review and meta-analysis. 185(5):1073-80.
- Aghajafari F, Murphy K, Matthews S, Ohlsson A, Amankwah K, Hannah M. 2002. Repeated doses of antenatal corticosteroids in animals: a systematic review. 186(4):843-9.
- Aguilar R, Anton F, Bellido C, Aguilar E, Gaytan F. 1995. Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. *J. Endocrinol.* 146:15–21.
- Alexander N, Rosenlocher F, Stalder T, Linke J, Distler W, Morgner J, Kirschbaum C. 2012. Impact of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on endocrine stress reactivity in term-born children. *J Clin Endocrinol Metab.* 97(10):3538-3544.
- Altwegg-Boussac T, Schramm AE, Ballesterio J, Grosselin F, Chavez M, Lecas S, Baulac M, Naccache L, Demeret S, Navarro V, Mahon S, Charpier S. 2017. Cortical neurons and networks are dormant but fully responsive during isoelectric brain state. *Brain.* 140(9):2381-2398.
- Amare AT, Schubert KO, Klingler-Hoffmann M, Cohen-Woods S, Baune BT. 2017. The genetic overlap between mood disorders and cardiometabolic diseases: a systematic review of genome wide and candidate gene studies. *Transl Psychiatry.* 7(1):e1007.
- Amenta F, Vega JA, Ricci A, Collier WL. 1992. Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. *Anat. Rec.* 233:478–484.
- Anderson DF, Stock MK, Rankin JH. 1979. Placental transfer of dexamethasone in nearterm sheep. *J Dev Physiol.* 1(6):431-436.
- Andrews MH, Matthews SG. 2000. Regulation of glucocorticoid receptor mRNA and heat shock protein 70 mRNA in the developing sheep brain. *Brain Res.* 878(1-2):174-82.
- Andrews MH, Kostaki A, Setiawan E, McCabe L, Owen D, Banjanin S, Matthews SG. 2004. Developmental regulation of the 5-HT₇ serotonin receptor and transcription factor NGFI-A in the fetal guinea-pig limbic system: influence of GCs. *J Physiol.* 555(Pt 3):659-70.
- Andrews MH, Kostaki A, Setiawan E, McCabe L, Matthews SG. 2004. Developmental regulation of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the fetal limbic system: response to antenatal glucocorticoid. *Brain Res Dev Brain Res.* 22;149(1):39-44.
- Anegroaie P, Frasch MG, Rupprecht S, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Witte OW, Schwab M. 2017. Development of somatosensory-evoked potentials in foetal sheep: effects of betamethasone. *Acta Physiol (Oxf).* 220(1):137-149.
- Antonow-Schlorke I, Kühn B, Müller T, Schubert H, Sliwka U, Nathanielsz PW, Schwab M. 2001. Antenatal betamethasone treatment reduces synaptophysin immunoreactivity in presynaptic terminals in the fetal sheep brain. *Neurosci Lett.* 297(3):147-50.

- Antonow-Schlorke I, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW. 2003a. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J Physiol.* 547(Pt 1):117-123.
- Antonow-Schlorke I, Helgert A, Gey C, Coksaygan T, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2009. Adverse effects of antenatal glucocorticoids on cerebral myelination in sheep. *Obstet Gynecol.* 113(1):142-51.
- AQUA-Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH. 2010. Geburtshilfe. Bundesauswertung zum Verfahrensjahr 2010 16/1.
- AQUA-Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH. 2014. Geburtshilfe. Bundesauswertung.
- Asa SL, Kovacs K, Laszlo FA, Domokos I, Ezrin C. 1986. Human fetal denohypophysis. Histologic and immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology.* 43(3):308-16.
- Astrom KE. 1967. On the early development of the isocortex in fetal sheep. *Prog Brain Res.* 26:1-59.
- AWMF. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). 2010. Empfehlung zum Vorgehen bei vorzeitigem Blasensprung.
- Azmitia EC, Segal M. 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 179: 641-667.
- Babović SS, Mijatov-Ukropina L, Stojsić-Dzunja L, Srdić B. 2004. Development of paraventricular nucleus (PVN) associated with immunoreactivity to tyrosine hydroxylase (TH) in the second half of gestation. *Med Pregl.* 57(9-10):421-8.
- Bagdy G, Calogero AE, Szemeredi K, Gomez MT, Murphy DL, Chrousos GP, Gold PW 1990. Beta-endorphin responses to different serotonin agonists: involvement of corticotropin-releasing hormone, vasopressin and direct pituitary action. *Brain Res.* 537:227–232.
- Baker BL, Jaffe RB. 1975. The genesis of cell types in the adenohypophysis of the human fetus as observed with immunocytochemistry. *Am J Anat.* 143(2):137-61.
- Bakker JM, Schmidt ED, Kroes H, Kavelaars A, Heijnen CJ, Tilders FJ, van Rees EP. 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.* 31;63(2):183-91.
- Ballabh P, Lo ES, Kumari J, Cooper TB, Zervoudakis I, Auld PA, Krauss AN. 2002. Pharmacokinetics of betamethasone in twin and singleton pregnancy. *Clin Pharmacol Ther.* 71(1):39-45.
- Ballabh P. 2010. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease, *Pediatric Research.* 67,1–8.
- Ballard PL, Ballard RA. 1995. Scientific basis and therapeutic regimens for use of Antenatal glucocorticoids. *American journal of obstetrics and gynecology.* 173:254-62.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev.* 17(3):245-61.
- Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. 1993. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 268(31):23422-6.

- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. 1993. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*. 36(1):62-7.
- Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ, Wield G. 1993. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *Br Med J*. 306:422-426.
- Barnes NM, Sharp T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 38(8):1083-152.
- Baumgarten HG, Klemm HP, Sievers J, Schlossberger HG. 1982. Dihydroxytryptamines as tools to study the neurobiology of serotonin. *Brain Res Bull*. 9(1-6):131-50.
- Beinder E. 2007. Fetale Wachstumsrestriktion und Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Erwachsenenalter. *Der Gynäkologe*. 40:241-247.
- Belmaker R, Agam G. 2008. Major depressive disorder. *N. Engl. J. Med*. 358:55-68.
- Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. 1993. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet*. 341 (8841):339-41.
- Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. 1997. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 46(2):161-6.
- Bernard R, Kerman IA, Thompson RC, Jones EG, Bunney WE, Barchas JD, Schatzberg AF, Myers RM, Akil H, Watson SJ. 2011. Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression. *Mol Psychiatry*. 16(6):634-46.
- Bertram CE, Hanson MA. 2002. Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction*. 124(4):459-67.
- Biegon A, Rainbow TC, McEwen BS. 1985. Corticosterone modulation of neurotransmitter receptors in rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res*. 332(2):309-14.
- Bingzheng L, Zhenye Z, Liansong C. 1990. A mathematical model of the regulation system of the secretion of glucocorticoids. *Journal of Biological Physics*. 17(4):221-233.
- Blanford AT, Murphy BE. 1977. In vitro metabolism of prednisolone, dexamethasone, betamethasone, and cortisol by the human placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 127 (3):264-267.
- Bloom SL, Sheffield JS, McIntire DD, Leveno KJ. 2001. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstet Gynecol*. 97(4):485-90.
- Bloomfield F, Oliver M, Harding J. 2007. Effects of twinning, birth size, and postnatal growth on glucose tolerance and hypothalamic-pituitary-adrenal function in postpubertal sheep. *AM J PHYSIOL-ENDOC M*. 292(1):E231-E237.
- Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van des Waal HH. 2001. Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol*. 32(1):76-91.
- Bolt RJ, Weissenbruch vMM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. 2002. Development of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Fetus and Preterm Infant. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 15(6):759-69.
- Bonaventure P, Kelly L, Aluisio L, Shelton J, Lord B, Galici R, Miller K, Atack J, Lovenberg TW, Dugovic C. 2007. Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. *J Pharmacol Exp Ther*. 321(2):690-8.

- Bradbury MJ, Dement WC, Edgar DM. 1998. Effects of adrenalectomy and subsequent corticosterone replacement on rat sleep state and EEG power spectra. *Am J Physiol.* 275(2 Pt 2):R555-65.
- Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, Southwick SM, Delaney RC, McCarthy G, Charney DS, Innis RB. 1995. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry.* 152(7):973-81.
- Bresson JL, Clavequin MC, Fellmann D, Bugnon C. 1985. Anatomical and ontogenetic studies of the human paraventriculo-infundibular corticoliberin system. *Neuroscience.* 14(4):1077-90.
- Brooks AN, Challis JR, Norman LJ. 1987. Pituitary and adrenal responses to pulsatile ovine corticotropin-releasing factor administered to fetal sheep. *Endocrinology.* 120(6):2383-2388.
- Brooks AN, Challis JR. 1988. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in birth. *Can J Physiol Pharmacol.* 66(8):1106-1112.
- Brosnan PG. 2001. The hypothalamic pituitary axis in the fetus and newborn. *Semin Perinatol.* 25(6):371-84.
- Brownfoot FC, Gagliardi DI, Bain E, Middleton P, Crowther CA. 2013. Different corticosteroids and regimes for accelerating fetal lung maturation for woman at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 29;8:CD006764.
- Bruni JF, Hawkins RL, Yen SS. 1982. Serotonergic mechanism in the control of beta-endorphin and ACTH release in male rats. *Life Sci.* 30(15):1247-54.
- Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Gustafson EL, Durkin MM, Mengod G, Branchek TA, Hoyer D, Palacios JM. 1994. Localization of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} alpha, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptor messenger RNA in rodent and primate brain. *Neuropharmacology.* 33(3-4):367-86.
- Brunner D, Buhot MC, Hen R, Hofer M. 1999. Anxiety, motor activation, and maternal-infant interactions in 5HT_{1B} knockout mice. *Behav Neurosci.* 113(3):587-601.
- Buckler JM, Green M. 2004. A comparison of the early growth of twins and singletons. *Ann Hum Biol* 31:311–332.
- Burlet G, Fernet B, Blanchard S, Angel E, Tankosic P, Maccari S, Burlet A. 2005. Antenatal glucocorticoids blunt the functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of neonates and disturb some behaviors in juveniles. *Neuroscience.* 33(1):221-30.
- Burton PJ, Waddell BJ. 1999. Dual function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. *Biol Reprod.* 60(2):234-240.
- Bywood PT, Johnson SM. 2000. Dendrite loss is a characteristic early indicator of toxin-induced neurodegeneration in rat midbrain slices. *Exp Neurol.* 161(1):306-316.
- Calogero AE, Bernardini R, Margioris AN, Bagdy G, Gallucci WT, Munson PJ, Tamarkin L, Tomai TP, Brady L, Gold PW, Chrousos GP. 1989. Effects of serotonergic agonists and antagonists on corticotropin-releasing hormone secretion by explanted rat hypothalamus. *Peptides.* 10:189–200.
- Canterino JC, Verma U, Visintainer PF, Elimian A, Klein SA, Tejani N. 2001. Antenatal steroids and neonatal periventricular leukomalacia. *Obstet Gynecol.* 97:135-139.
- Carroll J. 1982. Clinical application of the dexamethasone suppression test for endogenous depression. *Pharmacopsychiatry* 15:19-24.

- Cartier D, Jégou S, Parmentier F, Lihmann I, Louiset E, Kuhn JM, Bastard C, Plouin PF, Godin M, Vaudry H, Lefebvre H. 2005. Expression profile of serotonin₄ (5-HT₄) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas. *Eur J Endocrinol.* 153(6):939-47.
- Castro ME, Pascual J, Romón T, del Arco C, del Olmo E, Pazos A. 1997. Differential distribution of [³H]sumatriptan binding sites (5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} and 5-HT_{1F} receptors) in human brain: focus on brainstem and spinal cord. *Neuropharmacology.* 36(4-5):535-42.
- Catalano M. 2001. Functionell gene-linkes polymorphic regions and genetically controlles neurotransmitters metabolism. *Eur Neuropsychopharmacology.* 11(6):431-9.
- Caughey AB, Parer JT. 2002. Recommendations for repeat courses of antenatal corticosteroids: a decision analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 186(6):1221-6.
- Challis JRG, Brooks AN. 1989. Maturation and activation of hypothalamic-pituitary adrenal function in fetal sheep. *Endocr Rev.* 10(2):182-204.
- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. 2000. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev.* 21(5):514-550.
- Challis JRG, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J. 2001. The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and postnatal health. *Mol Cell Endocrinol.* 185:135-144.
- Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB. 2002. Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci.* 22(3):977-990.
- Ciranna L. 2006. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA- mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. *Curr Neuropharmacol.* 4(2):101-14.
- Clewlow F, Dawes GS, Johnston BM, Walker DW. 1983. Changes in breathing, electrocortical and muscle activity in unanaesthetized fetal lambs with age. *J Physiol.* 341:463-476.
- Colberg C, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Witte OW, Schwab M. 2004. Recovery of glucocorticoid-related loss of synaptic density in the fetal sheep brain at 0,75 of gestation. *Neurosci Lett.* 364(2):130-4.
- Colberg C. 2017. Akute und chron Effekte einer antenatalen Glukokortikoidtherapie auf die synaptische Dichte - Eine Studie am chronisch instrumentierten Schaffeten in utero. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Compaan JC, Groenink L, van der Gugten J, Maes RA, Olivier B. 1996. 5-HT_{1A} Receptor agonist flesinoxan enhances Fos immunoreactivity in rat centralamygdala, bed nucleus of the stria terminalis and hypothalamus. *Eur J Neurosci.* 8(11):2340-7.
- Constandil L, Parraguez VH, Torrealba F, Valenzuela G, Serón-Ferré M. 1995. Day-night changes in c-fos expression in the fetal sheep suprachiasmatic nucleus at late gestation. *Reprod Fertil Dev.* 7(3):411-3.
- Cook EH Jr, Fletcher KE, Wainwright M, Marks N, Yan SY, Leventhal BL. 1994. Primary structure of the human platelet serotonin 5-HT_{2A} receptor: identify with frontal cortex serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Neurochem.* 63(2):465-9.
- Coppen A. 1967 The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry.* 113 (504):1237-64.
- Coppen A, Shaw DM, Herzberg B, Maggs R. 1967. Tryptophan in the treatment of depression. *Lancet.* 2(7527):1178-80.
- Cordes SP. 2005. Molecular genetics of the early development of hindbrainserotonergic neurons. *Clin Genet.* 68(6):487-94.

- Crowley P, Chalmers I, Keirse MJ. 1990. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol.* 97(1):11-25.
- Crowley PA. 1995. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the Randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol.* 173(1):322-35.
- Crowther CA, Harding J. 2003. Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory disease. *Cochane Database Syst Rev.* (3):CD003935.
- Crowther CA, Haslam RR, Hiller JE, Doyle LW, Robinson JS. 2006. Neonatal respiratory distress syndrome after repeat exposure to antenatal corticosteroids: a randomised controlled trial. *Lancet.* 367(9526):1913-9.
- Crowther CA, Doyle LW, Haslam PR, Hiller JE, Harding JE, Robinson JS. 2007. AC-TORDS Study Group. Outcome at 2 years of age after repeat doses of antenatal corticosteroids. *N Engl J Med.* 357(12):1179-89.
- Currie IS, Brooks AN. 1992. Corticotrophin-releasing factors in the hypothalamus of the developing fetal sheep. *J Dev Physiol.* 17(5):241-246.
- Curzi Dascalova L, Figueroa J, Eiselt M, Christova E, Virassamy A, d'Allest A, Guimaraes H, Gaultier C, Dehan M. 1993. Sleep state organization in premature infants of less than 35 weeks' gestational age. *Pediatr Res.* 34:624-628.
- Czock D, Keller F, Rasche FM, Häussler U. 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet.* 44(1):61-98.
- Dahlström A, Fuxe K. 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* 20(7):398-9.
- Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N. 1987. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res.* 43:113-73.
- Dalziel SR, Walker NK, Parag V, Mantell C, Rea HH, Rodgers A, Harding JE. 2005. Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet.* 365(9474):1856-62.
- Dalziel SR, Lim VK, Lambert A, McCarthy D, Parag V, Rodgers A, Harding JE. 2005. Antenatal exposure to betamethasone: psychological functioning and health related quality of life 31 years after inclusion in randomised controlled trial. *BMJ.* 331(7518):665.
- Davis EP, Waffarn F, Sandman CA. 2011a. Prenatal treatment with glucocorticoids sensitizes the hpa axis response to stress among full-term infants. *Dev Psychobiol.* 53(2):175-183.
- De Kloet ER, Sybesma H, Reul HM. 1986. Selective control by corticosterone of serotonin₁ receptor capacity in raphe-hippocampal system. *Neuroendocrinology.* 42(6):513-21.
- De Souza, EB 1986. Serotonin and dopamine receptors in the rat pituitary gland: autoradiographic identification, characterization, and localization. *Endocrinology.* 119:1534-1542.
- De Vries A, Holmes MC, Heijnis A, Seier JV, Heerden J, Louw J, Wolfe-Coote S, Meaney MJ, Levitt NS, Seckl JR. 2007. Prenatal dexamethasone exposure induces changes in nonhuman primate offspring cardiometabolic and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *J Clin Invest.* 117(4):1058-67.
- Delbende C, Delarue C, Lefebvre H, Bunel D.T, Szafarczyk A, Mocaer E, Kamoun A, Jegou S, Vaudry H. 1992. Glucocorticoids, transmitters and stress. *Br. J. Psychiatry Suppl.* 24-35.

- Derks JB, Mulder EJ, Visser GH. 1995. The effects of maternal betamethasone administration on the fetus. *Br J Obstet Gynaecol.* 102(1):40-46.
- Derks JB, Giussani DA, Jenkins SL, Wentworth RA, Visser GH, Padbury JF, Nathanielsz PW. 1997. A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol Lond.* 499(Pt 1):217-26.
- Dessens AB, Haas HS, Koppe JG. 2000. Twenty-year follow-up of antenatal corticosteroid treatment. *Pediatrics.* 105(6):E77.
- DGGG. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. 2008. Antenatale Kortikosteroide zur Lungenreife (ACS).
- Dobbing J, Sands J. 1970. Growth and development of the brain and spinal cord of the guinea pig. *Brain Res.* 17:115–123.
- Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev.* 3(1):79-83.
- Dodic M, Wintour EM. 1994. Effects of prolonged (48 h) infusion of cortisol on blood pressure, renal function and fetal fluids in the immature ovine foetus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 21(12):971-80.
- Doyle P, Guillaume-Gentil C, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1994. Effects of corticosterone administration on local cerebral glucose utilization of rats. *Brain Res.* 645(1-2):225-230.
- Doyle LW, Ford GW, Davis NM, Callanan C. 2000. Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clin Sci (Lond).* 98(2):137-42.
- Doyle LW, Ford GW, Rickards AL, Kelly EA, Davis NM, Callanan C, Olinsky A. 2000. Antenatal corticosteroids and outcome at 14 years of age in children with birth weight less than 1501 grams. *Pediatrics.* 106(1):E2.
- Duncan MJ, Franklin KM. 2007. Expression of 5-HT7 receptor mRNA in the hamster brain: effect of aging and association with calbindin-D28K expression. *Brain Res.* 1143:70-7.
- Dunlop SA, Archer MA, Quinlivan JA, Beazley LD, Newnham JP. 1997. Repeated prenatal corticosteroids delay myelination in the ovine central nervous system. *J Matern Fetal Med.* 6(6):309-13.
- Dwivedi Y, Pandey GN. 1998. Quantitation of 5HT2A receptor mRNA in human postmortem brain using competitive RT-PCR. *Neuroreport.* 9(17):3761-5.
- Edwards LJ, McMillen IC. 2002. Impact of maternal undernutrition during the periconceptional period, fetal number, and fetal sex on the development of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in sheep during late gestation. *Biol Reprod.* 66(5):1562-9.
- Ehlen JC, Grossman GH, Glass JD. 2001. In vivo resetting of the hamster circadian clock by 5-HT7 receptors in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 21(14):5351-7.
- Empana JP, Anceschi MM, Szabo I, Cosmi EV, Breart G, Truffert P. 2004. Antenatal corticosteroids policies in 14 European countries: factors associated with multiple courses. The EURAIL survey. *Acta Paediatr.* 93(10):1318-22.
- Erdeljan P, MacDonald JF, Matthews SG. 2000. Do glucocorticoids and serotonin modify glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA levels in fetal guinea pig neurons, in vitro? *Abstr Soc Neurosci.* 152:153.
- Erdeljan P, MacDonald JF, Matthews SG. 2001. Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor (GR) but not mineralocorticoid receptor (MR) mRNA levels in fetal mouse hippocampal neurons, in vitro. *Brain Res.* 896:130–136.

- Erdeljan P, Andrews MH, MacDonald JF, Matthews SG. 2005. Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor mRNA levels in fetal guinea-pig hippocampal neurons, in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 17(7):743-9.
- Erspamer V, Vialli M. 1937. Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Boll d Soc Med-chir Pavia.* 51:357–363.
- EURO-PERISTAT Project: European Perinatal Health Report 2008.
- Evans GJO, Cousin MA. 2005. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 6):1350–1353.
- Feldberg W, Myers RD. 1964. Effects on temperature of amines injected into the cerebral ventricles. A new concept of temperature regulation. *J Physiol (Lond).* 173: 226-231.
- Firk C, Markus C. 2007. Serotonin by stress interaction: a susceptibility factor for the development of depression? *J Psychopharmacol.* 21,538-544.
- Forest MG, David M, Morel Y. 1993. Prenatal diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 45(1-3):75-82.
- Francesconi W, Müller CM, Singer W. 1988. Cholinergic mechanisms in the reticular-control of transmission in the cat lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol.* 59(6):1690-718.
- Francken BJ, Jurzak M, Vanhauwe JF, Luyten WH, Leysen JE. 1998. The human 5-HT_{5A} receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. *Eur J Pharmacol.* 361(2-3):299-309.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. 1999. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol.* 180(1Pt1):114-21.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP. 2004. Repeated antenatal corticosteroids: Effects on cerebral palsy and childhood behaviour. *Am J Obstet Gynecol.* 190(3):588-95.
- Fuller RW. 1996. Serotonin receptors involved in regulation of pituitary- adrenocortical function in rats. *Behav. Brain Res.* 73:215–219.
- Fuxe K, Ljunggren L. 1965. Cellular localization of monoamines in the upper brain stem of the pigeon. *J Comp Neurol.* 125(3):355-81.
- Gaddum JH, Picarelli ZP. 1957. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother.* 12(3):323-8.
- Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. 2003. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci.* 4(12):1002-12.
- Gatford KL, Owens JA, Li S, Moss TJ, Newnham JP, Challis JR, Sloboda DM. 2008. Repeated betamethasone treatment of pregnant sheep programs persistent reductions in circulating IGF-I and IGF-binding proteins in progeny. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295 (1):E170-178.
- Geurts FJ, De Schutter E, Timmermans JP. 2002. Localization of 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT_{5A} and 5-HT₇ receptor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *J Chem Neuroanat.* 24(1):65-74.
- Glass JD, Grossman GH, Farnbauch L, DiNardo L. 2003. Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 23(20):7451-60.
- Goldenberg RL, Wright LL. 2001. Repeated courses of antenatal corticosteroids. *Obstet Gynecol.* 97(2):316-7.
- Grailhe R, Grabtree GW, Hen R. 2001. Human 5-HT(5) receptors: the 5-HT(5A) receptor is functional but the 5-HT(5B) receptor was lost during mammalian evolution. *Eur J Pharmacol.* 418(3):157-67.

- Grier DG, Halliday HL. 2004. Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development. *Treat Respir Med.* 3(5):295-306.
- Groenink L, van Bogaert MJ, van der Gugten J, Oosting RS, Olivier B. 2003. 5-HT_{1A} receptor and 5-HT_{1B} receptor knockout mice in stress and anxiety paradigms. *Behav Pharmacol.* 14(5-6):369-83.
- Groh T. 2008. Zur Entstehung der Schlafstadien und ihrer chronischen Beeinflussung durch eine pränatale Glukokortikoidbehandlung zur Förderung der Lungenreife. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Grossmann C, Scholz T, Rochel M, et al. 2004. Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: a comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. *Eur J Endocrinol.* 151(3):397-406.
- Grunnet ML. 1995. A lectin and synaptophysin study of developing brain. *Pediatr Neurlog.* 13(2):157-60.
- Guinn DA, Atkinson MW, Sullivan L, Lee M, MacGregor S, et al. 2001. Single vs weekly courses of antenatal corticosteroids for women at risk of preterm delivery: A randomized controlled trial. *JAMA.* 286(13):1581-7.
- Gunnar M, Quevedo K. 2007. The neurobiology of stress and development. *Annu Rev Psychol.* 58:145-73.
- Gustafson EL, Durkin MM, Bard JA, Zgombick J, Branchek TA. 1996. A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. *Br J Pharmacol.* 117(4):657-66.
- Gyevai A. 1980. Fine structure of, and ACTH production by, human fetal pituitaries taken at different periods of gestation. An in vitro study. *Acta Biol Acad Sci Hung.* 31(1-3):107-120.
- Hagan JJ, Price GW, Jeffrey P, Deeks NJ, Stean T, et al. 2000. Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 130(3):539-48.
- Hanley NR, Van de Kar LD. 2003. Serotonin and the neuroendocrine regulation of the hypothalamic--pituitary-adrenal axis in health and disease. *Vitam Horm.* 66:189-255.
- Haram K, Mortensen JH, Wollen AL. 2003. Preterm delivery: an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 82(8):687-704.
- Hauser J, Feldon J, Pryce CR. 2006. Prenatal dexamethasone exposure, postnatal development, and adulthood prepulse inhibition and latent inhibition in Wistar rats. *Behav Brain Res.* 175(1):51-61.
- Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. 1998. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci.* 16(3-4):209-16.
- Hedlund PB, Sutcliffe JG. 2004. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. *Trends Pharmacol Sci.* 25(9):481-6.
- Hedlund PB, Kelly L, Mazur C, Lovenberg T, Sutcliffe JG, Bonaventure P. 2004. 8-OH-DPAT acts on both 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors to induce hypothermia in rodents. *Eur J Pharmacol.* 487(1-3):125-32.
- Hedlund PB, Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. 2005. 5-HT₇ receptor inhibition and inactivation induce antidepressantlike behavior and sleep pattern. *Biol Psychiatry.* 58(10):831-7.
- Hedlund PB. 2009. The 5-HT₇ receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology (Berl).* 206(3):345–354.

- Helmer H. 2003. Leitlinien zum Management der drohenden Frühgeburt bei Einlings- und Zwillingschwangerschaft. Consensusmeeting. Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe. 24(1):18-24.
- Hendrickson AE, Wagoner N, Cowan WM. 1972. An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connections. *Zellforsch Mikrosk Anat.* 135(1):1-26.
- Hennessy DP, Coghlan JP, Hardy KJ, Scoggins BA, Wintour EM. 1982. The origin of cortisol in the blood of fetal sheep. *J Endocrinol.* 95(1):71-9.
- Hery M, Laplante E, Kordon C. 1978. Participation of serotonin in the phasic release of luteinizing hormone. II. Effects of lesions of serotonin-containing pathways in the central nervous system. *Endocrinology.* 102:1019–1025.
- Héry M, Sémont A, Fache MP, Faudon M, Héry F. 2000. The effects of serotonin on glucocorticoid receptor binding in rat raphe nuclei and hippocampal cells in culture. *J Neurochem.* 74(1):406-13.
- Holsboer F. 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology.* 23(5):477-501.
- Holsboer F. 2001. Kognition und Hypercortisolismus bei Depression im Alter. [Dissertation]. München: Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität.
- Holsboer F, Lauer CJ, Schreiber W, Krieg JC. 1995. Altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation in healthy subjects at high familial risk for affective disorders. *Neuroendocrinology.* 62(4):340-7.
- Holtmaat A, Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci.* 10(9):647-58.
- Honkaniemi J, Sharp FR. 1999. Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures. *Eur J Neurosci.* 11:10–17.
- Hornung JP. 2003. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 26(4):331-43.
- Howard E, Benjamins JA. 1975. DNA ganglioside and sulfatide in brains of rats given corticosterone in infancy, with an estimate of cell loss during development. *Brain Res.* 92(1):73-87.
- Howson CP, Kinney MV, Lawn JE, World Health Organization. 2012. March of Dimes, PMNCH, Save the Children, WHO. Born too soon: the global action report on preterm birth.
- Howson CP, Kinney MV, McDougall L, Lawn JE. 2013. The Born Too Soon Preterm Birth Action Group, Born Too Soon: Preterm birth matters. *Reprod Health.* 10(Suppl 1):S1.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, et al. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* 46(2):157-203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(4):533-54.
- Huang WL, Beazley LD, Quinlivan JA, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 1999. Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynaecol.* 94(2):213-8.
- Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2001. Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci.* 19(4):415-25.
- Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK. 2004. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull.* 130(1):115-42.

- Ikegami M, Jobe AH, Newnham J, Polk DH, Willet KE, Sly P. 1997. Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *Am J Respir Crit Care Med.* 156(1):178-84.
- Ising M, Künzel HE, Binder EB, Nickel T, Modell S, Holsboer F. 2005. The combined dexamethasone/CRH test as a potential surrogate marker in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 29,1085–1093.
- Jacobs BL, Azmitia EC. 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* 72:165-229.
- Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. 2000. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry.* 5:262–269.
- Jacobson L, Sapolsky R. 1991. The role of the hippocampus feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.* 12(2):118-34.
- Jobe AH, Polk D, Ikegami M, Newnham J, Sly P, Kohen R, Kelly R. 1993. Lung responses to ultrasound-guided fetal treatments with corticosteroids in preterm lambs. *J Appl Physiol.* 75(5):2099-105.
- Jobe AH, Wada N, Berry LM, Ikegami M, Ervin MG. 1998. Single and repetitive maternal glucocorticoid exposures reduce fetal growth in sheep. *Am J Obstet Gynaecol.* 178/5:880-5.
- Jobe AH. 2001. Glucocorticoids, inflammation and the perinatal lung. *Semin Neonatol.* 6(4):331-342.
- Jobe AH, Soll RF. 2004. Choice and dose of corticosteroid for antenatal treatments. *Am J Obstet Gynecol.* 190(4):878-881.
- Johnson JW, Mitzner W, Beck JC, London WT, Sly DL, Lee PA, Khouzami VA, Cavalieri RL. 1981. Long-term effects of betamethasone on fetal development. *Am J Obstet Gynecol.* 141(8):1053-64.
- Johnson RF, Moore RY, Morin LP. 1988. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res.* 460(2):297-313.
- Johnson RF, Morin LP, Moore RY. 1988. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res.* 462(2):301-12.
- Jørgensen HS. 2007. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan Med Bull.* 54(4):266-88.
- Keller-Wood ME, Dallman MF. 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev.* 5(1):1-24.
- Keller-Wood M, Powers MJ, Gersting JA, Ali N, Wood CE. 2006. Genomic analysis of neuroendocrine development of fetal brain-pituitary-adrenal axis in late gestation. *Physiol Genomics.* 24(3):218-224.
- Kennett GA, Trail B, Bright F. 1998. Anxiolytic-like actions of BW 723C86 in the rat Vogel conflict test are 5-HT_{2B} receptor mediated. *Neuropharmacology.* 37(12):1603-10.
- Khanday MA, Somarajan BI, Mehta R, Mallick BN. 2016. Noradrenaline from Locus Coeruleus Neurons Acts on Pedunculo-Pontine Neurons to Prevent REM Sleep and Induces Its Loss-Associated Effects in Rats. *eNeuro.* 3(6).
- Khozhaï LI, Otellin VA. 2012. Synaptogenesis in the dorsal raphe nucleus of rat medulla oblongata in serotonin deficiency. *Morfologija.* 142(6):20-4.
- Kitraki E, Alexis MN, Papalopoulou M, Stylianopoulou F. 1996. Glucocorticoid receptor gene expression in the embryonic rat brain. *Neuroendocrinology.* 63:305–317.
- Knaus P, Betz H, Rehm H. 1986. Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J Neurochem.* 47(4):1302-4.

- Koenig JI, Gudelsky GA, Meltzer HY. 1987. Stimulation of corticosterone and beta-endorphin secretion in the rat by selective 5-HT receptor subtype activation. *Eur. J. Pharmacol.* 137:1–8.
- Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL, Hamblin MW. 1996. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J Neurochem.* 66(1):47-56.
- Korf HW, von Gall C. 2006. Mice, melatonin and the circadian system. *Mol Cell Endocrinol.* 252(1-2):57-68.
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch KP, Reif A. 2010. Neurobiologische und entwicklungsgenetische Grundlagen, Serotonin-Kompakt-Teil 1. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG.
- Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL. 2002. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem.* 2(6):507-28.
- Lang G. 2006. Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Wien, New York: Springer Verlag. 257-94.
- Laplante P, Diorio J, Meaney MJ. 2002. Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT₇ receptor. *Brain Res Dev. Brain Res.* 139(2):199-203.
- Lauder JM. 1990. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci.* 600:297-313.
- Lauder JM, Bloom FE. 1974. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol.* 155(4):469-481.
- Lauder JM, Krebs H. 1978. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev Neurosci.* 1(1):15-30.
- Launay JM, Schneider B, Loric S, Da Prada M, Kellermann O. 2006. Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT_{2B} receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *FASEB J.* 20(11):1843-54.
- Lautner M. 2008. Rolle des Tumorphoxiemarkers Glut-1 in Ergänzung zu klinischen Parametern für prognostische Aussagen beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. [Dissertation]. Halle: Medizinische Fakultät. 12-13.
- Lavdas AA, Blue ME, Lincoln J, Parnavelas JG. 1997. Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 17(20):7872-80.
- Le Bon O, Staner L, Murphy JR, Hoffmann G, Pull CH, Pelc I. 1997. Critical analysis of the theories advanced to explain short REM sleep latencies and other sleep anomalies in several psychiatric conditions. *J Psychiatr Res.* 31(4):433-50.
- Leclerc N, Beesley PW, Brown I, Colonnier M, Gurd JW, Paladino T, Hawkes R. 1989. Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol.* 280(2):197-212.
- Lee BH, Stoll BJ, McDonald SA, Higgins RD. 2008. Neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants exposed prenatally to dexamethasone versus betamethasone. *Pediatrics.* 121(2):289-296.
- Leger L, Charnay Y, Hof PR, Bouras C, Cespuglio R. 2001. Anatomical distribution of serotonin-containing neurons and axons in the central nervous system of the cat. *J Comp Neurol.* 433:157-182.
- Lerchl A. 2002. Biological rhythms in the context of light at night (LAN). *Neuro Endocrinol Lett.* 2:23-7.

- Lesch KP. 2001. Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol.* 11(6):457-74.
- Lesch KP, Mössner R. 1998. Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biol Psychiatry.* 44(3):179-92.
- Leviton A, Kuban KC, Pagano M, Allred EN and Van Marter L. 1993. Antenatal corticosteroids appear to reduce the risk of postnatal germinal matrix hemorrhage in intubated low birth weight newborns. *Pediatrics.* 91:1083-1088.
- Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR. 1996. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology.* 64(6):412-8.
- Levitt NS, Lambert EV, Woods D, Hales CN, Andrew R, Seckl JR. 2000. Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young south african adults: early programming of cortisol axis. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(12):4611-8.
- Liggins GC. 1969. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol.* 45(4):515-523.
- Liggins GC, Howie RN. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics.* 50 (4):515-525.
- Liggins GC. 1994. The role of cortisol in preparing the fetus for birth *Reprod Fertil Dev.* 6(2):141-50.
- Lin HC, Su BH, Chen AC, et al. 2005. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 115:1-4.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CR, Seckl JR. 1996. Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension.* 27(6):1200-4.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. 1996. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia.* 39(11):1299-305.
- Lithell HO, McKeigue PM, Berglund L, Mohsen R, Lithell UB, Leon DA. 1996. Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *BMJ.* 312(7028):406-10.
- Liu JP, Lauder JM. 1991. Serotonin and nialamide differentially regulate survival and growth of cultured serotonin and catecholamine neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 62(2):297-305.
- Liu L, Li A, Matthews SG. 2001. Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280:E729-E739.
- Lorens SA, and Van de Kar LD. 1987. Differential effects of serotonin (5-HT 1A and 5-HT2) agonists and antagonists on rennin and corticosterone secretion. *Neuroendocrinology.* 45:305-310.
- Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA Foye PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, et al. 1993. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron.* 11(3):449-58.

- Lowther S, De Paermentier F, Crompton MR, Horton RW. 1992. The distribution of 5-HT_{1D} and 5-HT_{1E} binding sites in human brain. *Eur J Pharmacol.* 222(1):137-42.
- Lowther S, Katona CL, Crompton MR, Horton RW. 1997. 5-HT_{1D} and 5-HT_{1E/1F} binding sites in depressed suicides: increased 5-HT_{1D} binding in globus pallidus but not cortex. *Mol Psychiatry.* 2(4):314-21.
- Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB. 2000. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci.* 20 (10):3830-3842.
- Lucki I. 1992. 5-HT₁ receptors and behavior. *Neurosci Biobehav. Rev* 16:83-93.
- Lundberg J, Borg J, Halldin C, Farde L. 2007. A PET study on regional coexpression of 5-HT_{1A} receptors and 5-HTT in the human brain. *Psychopharmacology (Berl).* 195(3):425-33.
- Lupien SJ, Lepage M. 2001. Stress, memory, and the hippocampus: can't live with it, can't live without it. *Behav Brain Res.* 127(1-2):137-58.
- Macnaughton MC, Taylor T, McNally EM, Coutts JR. 1977. The effect of synthetic ACTH on the metabolism of [4-¹⁴C]-progesterone by the preivable human fetus. *J Steroid Biochem.* 8(5):499-504.
- Maes M, Meltzer HY, D'Hondt P, Cosyns P, Blockx P. 1995. Effects of serotonin precursors on the negative feedback effects of glucocorticoids on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Psychoneuroendo crinology.* 20(2):149-67.
- Mahony R, McKeating A, Murphy T, McAuliffe F, O'Herlihy C, Foley M. 2010. Appropriate antenatal corticosteroid use in women at risk for preterm birth before 34 weeks of gestation. *BJOG.* 117, 963-7.
- Mallick BN, Kaur S, Saxena RN. 2001. Interactions between cholinergic and GABAergic neurotransmitters in and around the locus coeruleus for the induction and maintenance of rapid eye movement sleep in rats. *Neuroscience* 104:467–485.
- Marti'n-Cora FJ, Pazos A. 2004. Autoradiographic distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain using [³H]mesulergine: comparison to other mammalian species. *British Journal of Pharmacology.* 141, 92–104.
- Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R. 1990. Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J Histochem Cytochem.* 38(6):837-44.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, De Teresa R, Alford M, Terry R. 1994. Synaptic and neuritic alterations during the progression od Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 174(1):67-72.
- Marazziti D, Marracci S, Palego L, Rotondo A, Mazzanti C, Nardi I, Ladinsky H, Giraldo E, Borsini F, Cassano GB. 1994. Localization and gene expression of serotonin (5HT_{1A}) receptors in human brain postmortem. *Brain Res.* 658(1-2):55-9.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. 1991. Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science.* 254(5030):432-7.
- Matthews SG. 2002. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab.* 13:375-380.
- Matthews SG, Challis JR. 1996. Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in fetal sheep. *Trends Endocrinol Metab.* 7(7):239-46.
- Mazer C, Muneyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. 1997. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density

- and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res.* 760(1-2):68-73.
- McCormick DA, Pape HC. 1988. Acetylcholine inhibits identified interneurons in the cat lateral geniculate nucleus. *Nature.* 334(6179):246-8.
- McCormick DA, Bal T. 1997. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci.* 20:185-215.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Weaver S, Yau J, Chapman K, Seckl JR. 2000. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. *J Neurosci.* 20(10):3926-35.
- Mercado AB, Wilson RC, Cheng KC, Wei JQ, New MI. 1995. Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 80(7):2014-20.
- Meyer-Bernstein EL, Morin LP. 1996. Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian-rhythm modulation. *J Neurosci.* 16(6):2097-111.
- Millard SJ, Weston-Green K, Newell KA. 2017. The effects of maternal antidepressant use on offspring behaviour and brain development: Implications for risk of neurodevelopmental disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 80:743-765.
- Miracle X, Di Renzo GC, Stark A, Fanaroff A, Carbonell-Estrany X, Saling E. 2008. Guidelines for the use of antenatal corticosteroids for fetal maturation. *J Perinat. Med.* 36:191-196
- Mitchell JB, Rowe W, Boksa P, Meaney MJ. 1990. Serotonin regulates type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures. *J Neurosci.* 10:1745-1752.
- Mnie-Filali O, Lambas-Señas L, Scarna H, Haddjeri N. 2009. Therapeutic potential of 5-HT₇ receptors in mood disorders. *Curr Drug Targets.* 10(11):1109-17.
- Mogha A, Guariglia SR, Debata PR, Wen GY, Banerjee P. 2012. Serotonin 1A receptor-mediated signaling through ERK and PKC α is essential for normal synaptogenesis in neonatal mouse hippocampus. *Transl Psychiatry.* 2:e66.
- Moore RY. 1983. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc.* 42(11):2783-9.
- Morelli N, Gori S, Choub A, Maluccio MR, Orlandi G, Guazzelli M, Murri L. 2007. Do 5HT_{1B/1D} receptor agonists have an effect on mood and anxiety disorders? *Cephalalgia.* 27(5):471-2.
- Morin LP, Blanchard J, Moore RY. 1992. Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis Neurosci.* 8(3):219-30.
- Moss TJ, Sloboda DM, Gurrin LC, Harding R, Challis JR, Newnham JP. 2001. Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(3):R960-70.
- Moss TJ, Doherty DA, Nitsos I, Sloboda DM, Harding R, Newnham JP. 2005. Effects into adulthood of single or repeated antenatal corticosteroids in sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 192 (1):146-152.
- Moyer RW, Kennaway DJ. 1999. Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett.* 271(3):147-50.
- Mulder EJ, Derks JB, Zonneveld MF, Bruinse HW, Visser GH. 1994. Transient reduction in fetal activity and heart rate variation after maternal betamethasone administration. *Early Hum Dev.* 36(1):49-60.
- Mulisch M, Welsch U, Hrsg. 2010. *Romeis-Mikroskopische Technik.* 18. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

- Mullins UL, Gianutsos G, Eison AS. 1999. Effects of antidepressants on 5-HT₇ receptor regulation in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology*. 21(3):352-67.
- Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K, Kamei K, Takigawa M, Takahashi K. 1997. Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *Am J Physiol*. 273(5 Pt 2):R1669-75.
- Murphy BP, Inder TE, Huppi PS, Warfield S, Zientara GP, Kikinis R, Jolesz FA, Volpe JJ. 2001. Impaired cerebral cortical gray matter growth after treatment with dexamethasone for neonatal chronic lung disease. *Pediatrics*. 107(2):217-21.
- Nagatomo T, Rashid M, Abul Muntasir H, Komiyama T. 2004. Functions of 5-HT_{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. 104(1):59-81.
- Nelson DL. 2004. 5-HT₅ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 3(1):53-8.
- Newnham JP, Evans SF, Godfrey M, Huang W, Ikegami M, Jobe A. 1999. Maternal, but not fetal, administration of corticosteroids restricts fetal growth. *J Matern Fetal Med*. 8(3):81-7.
- NIH Consensus Development Panel. 1995 und 2000. Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses - National Institutes of Health, Consensus Development Conference Statement.
- Nilsson T, Longmore J, Shaw D, Pantev E, Bard JA, Branchek T, Edvinsson L. 1999. Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. *Eur J Pharmacol*. 372(1):49-56.
- Nilsson PM, Nyberg P, Ostergren PO. 2001. Increased susceptibility to stress at a psychological assessment of stress tolerance is associated with impaired fetal growth. *Int J Epidemiol*. 30(1):75-80.
- Noll S, Schaub-Kuhnen S. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag.
- Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. 1998. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest*. 101(10):2174-81.
- Oporto GH 5th, Bornhardt T, Iturriaga V, Salazar LA. 2016. Genetic polymorphisms in the serotonergic system are associated with circadian manifestations of bruxism. *J Oral Rehabil*. 43(11):805-812.
- O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. 2004. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 287:E863-E870.
- Ovtscharoff W, Bergmann M, Marqueze-Pouey B, Knaus P, Betz H, Grabs D, Reisert I, Gratzl M. 1993. Ontogeny of synaptophysin and synaptoporin in the central nervous system: differential expression in striatal neurons and their afferents during development. *Brain Res Dev Brain Res*. 72(2):219-25.
- Pace-Schott EF, Hobson JA. 2002. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. *Nat Rev Neurosci*. 3(8):591-605.
- Pascual J, del Arco C, Romón T, del Olmo E, Castro E, Pazos A. 1996. Autoradiographic distribution of [³H]sumatriptan-binding sites in post-mortem human brain. *Cephalalgia*. 16(5):317-22.
- Pasqualetti M, Ori M, Nardi I, Castagna M, Cassano GB, Marazziti D. 1998. Distribution of the 5-HT_{5A} serotonin receptor mRNA in the human brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 56(1-2):1-8.

- Peltoniemi OM, Lano A, Yliherva A, Puosi R, Lehtonen L, Tammela O, Hallman M. 2009. Repeat Antenatal Betamethasone (RepeatBM) Follow-Up Study Group. Two-year follow up of a randomised trial with repeated antenatal betamethasone. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 94(6):F402-6.
- Pepin MC, Beaulieu S, Barden N. 1990. Differential regulation by dexamethasone of glucocorticoid receptor messenger RNA concentrations in neuronal cultures derived from rat hypothalamus and cerebral cortex. *Cell Mol Neurobiol.* 10:227-235.
- Peters D. 1982. Prenatal stress – effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacol Biochem Behav.* 17:721–725
- Petersen MC, Nation RL, Asheley JJ, McBride WG. 1980. The placental transfer of betamethasone. *Eur J Clin Pharmacol.* 18:245-247.
- Petersen MC, Nation RL, McBride WG, Ashley JJ, Moore RG. 1983. Pharmacokinetics of betamethasone in healthy adults after intravenous administration. *Eur J Clin Pharmacol.* 25(5):643-50.
- Petkő M, Stunya E. 1987. Ontogenesis of serotonergic nuclei in the rat stem. *Folia Histochem Cytobiol.* 25(2):143-8.
- Phillips DI, Barker DJ, Fall CH, Seckl JR, Whorwood CB, Wood PJ, Walker BR. 1998. Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab.* 83(3):757-60.
- Phillips DI, Walker BR, Reynolds RM, Flanagan DE, Wood PJ, Osmond C, Barker DJ, Whorwood CB. 2000. Low birth weight predicts elevated plasma cortisol concentrations in adults from 3 populations. *Hypertension.* 35(6):1301-6.
- Pickard GE. 1982. The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *J Comp Neurol.* 211(1):65-83.
- Pickard GE, Rea MA. 1997. Serotonergic innervations of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. *Biol Cell.* 89(8):513-23.
- Plagemann A. 2006. Fetale Programmierung und Funktionelle Teratologie. In: Ganten D, Ruckpaul K, Hrsg. *Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonatalen Erkrankungen.* 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. S.325-344.
- Plassat JL, Amlaiky N, Hen R. 1993. Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol Pharmacol.* 44(2):229-36.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. 1994. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 23(1-2):163-78.
- Pullar IA, Boot JR, Broadmore RJ, Eyre TA, Cooper J, Sanger GJ, Wedley S, Mitchell SN. 2004. The role of the 5-HT_{1D} receptor as a presynaptic autoreceptor in the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 493(1-3):85-93.
- Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M. 2011. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res.* 60(1):15-25.
- Quinlivan JA, Evans SF, Dunlop SA, Beazley LD, Newnham JP. 1998. Use of corticosteroids by Australian obstetricians—a survey of clinical practice. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 38(1):1-7.
- Quinlivan JA, Beazley LD, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2000. Retinal maturation is delayed by repeated, but not single, maternal injections of betamethasone in sheep. *Eye (Lond).* 14(Pt 1):93-8.

- Ramboz S, Saudou F, Amara DA, Belzung C, Segu L, Misslin R, Buhot MC, Hen R. 1996. 5-HT_{1B} receptor knock out-behavioral consequences. *Behav Brain Res.* 73(1-2):305-12.
- Randle JCR, Moor BC, and Kraicer J. 1983. Differential control of the release of proopiomelanocortin derived peptides from the pars intermedia of the rat pituitary. *Neuroendocrinology.* 37:131–140.
- Rapport MM. 1949. Serum vasoconstrictor (serotonin). The presence of creatinine in the complex: A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem.* 180:961–969.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. 1948a. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem.* 174: 35–738.
- Rausch JL, Johnson ME, Kasik KE, Stahl SM. 2006. Temperature regulation in depression: functional 5HT_{1A} receptor adaptation differentiates antidepressant response. *Neuropsychopharmacology.* 31(10):2274-80.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. 2001. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther.* 92(2-3):179-212.
- RCOG. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists). 2010. Antenatal Corticosteroids reduce neonatal morbidity and mortality. www.glowm.com/pdf/AntenatalCorticosteroidsToReduceNeonatalMorbidity.pdf
- Rehm H, Wiedenmann B, Betz H. 1986. Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J.* 5:535-541.
- Reinisch JM, Simon NG, Karow WG, Gandelman R. 1978. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science.* 202(4366):436-8.
- Reuss S. 1996. Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res.* 285(3):353-78.
- Rex A, Bert B, Fink H. 2007. History and new developments. The pharmacology of 5-HT₃ antagonists. *Pharm Unserer Zeit.* 36(5):342-53.
- Roberts D, Dalziel SR. 2006. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* CD004454.
- Robertson PA, Sniderman SH, Laros RK, Jr., et al. 1992. Neonatal morbidity according to gestational age and birth weight from five tertiary care centers in the United States, 1983 through 1986. *American journal of obstetrics and gynecology.* 166:1629-41.
- Roth B, Craigo S, Choudhary M, Uluer A, Monsma FJ, Shen Y, Meltzer H, Sibley D. 1994. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268:1403–1410.
- Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. 1993. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(18):8547-51.
- Rubin RT, Poland RE, Lesser IM, Winston RA, Blodgett AL. 1987. Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. I. Cortisol secretory dynamics in patients and matched controls. *Arch Gen Psychiatry.* 44(4):328-36.
- Ruckebusch Y. 1972. Development of sleep and wakefulness in the foetal lamb. *Electroencephalogr Clin Neurophysio.* 32(2):119-128.

- Rumball CW, Oliver MH, Thorstensen EB, Jaquier AL, Husted SM, Harding JE, Bloomfield FH. 2008. Effects of twinning and periconceptional undernutrition on late-gestation hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in ovine pregnancy. *Endocrinology*. 149(3):1163-72.
- Rusak B, Zucker I. 1979. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev*. 59:449-526.
- Saphier D, Farrar GE, and Welch, JE. 1995. Differential inhibition of stress-induced adrenocortical responses by 5-HT_{1A} agonists and by 5-HT₂ and 5-HT₃ antagonists. *Psychoneuroendocrinology*. 20:239–257.
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*. 10(9):2897-2902.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 21(1):55-89.
- Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ. 2000. Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 57(2):174-80.
- Sarnat HB, Born DE. 1999. Synaptophysin immunocytochemistry with thermal intensification: a marker of terminal axonal maturation in the human fetal nervous system. *Brain Dev*. 21(1):41-50.
- Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L, Buhot MC, Hen R. 1994. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science*. 265(5180):1875-8.
- Schaerlinger B, Hickel P, Etienne N, Guesnier L, Maroteaux L. 2003. Agonist actions of dihydroergotamine at 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors and their possible relevance to antimigraine efficacy. *Br J Pharmacol*. 140(2):277-84.
- Schiebler TH, Schmidt W, Hrsg. 2002. *Anatomie*. 8. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schleußner E, Arnscheidt C, Müller T, Schneider U, Haueisen J, Schwab K, Schwab M. 2004. Effects of antenatal glucocorticoids on human fetal cortical function detected by fetal magnetencephalography. *J Soc Gynecol Invest*. 11(Suppl.):69.
- Schleußner E, Schneider H. 2007. Fetale Programmierung. *Der Gynäkologe*. 40:239-240.
- Schleußner E. 2013. The prevention, diagnosis and treatment of premature labor. *Dtsch Arztebl Int*. 110(13):227–36.
- Schmand B, Neuvel J, Smolders-de Haas H, Hoeks J, Treffers PE, Koppe JG. 1990. Psychological development of children who were treated antenatally with corticosteroids to prevent respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 86(1):58-64.
- Schmidt K, Kott M, Müller T, Schubert H, Schwab M. 2000. Developmental changes in the complexity of the electrocortical activity in foetal sheep. *J Physiol Paris*. 94(5-6):435-43.
- Schmuck K, Ullmer C, Engels P, Lübbert H. 1994. Cloning and functional characterization of the human 5-HT_{2B} serotonin receptor. *FEBS Lett*. 342(1):85-90.
- Schmuck K, Ullmer C, Kalkman HO, Probst A, Lübbert H. 1996. Activation of meningeal 5-HT_{2B} receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur J Neurosci*. 8(5):959-67.

- Schoeffter P, Ullmer C, Bobirnac I, Gabbiani G, Lübbert H. 1996. Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptors in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 117(6):993-4.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Zwiener U, Bauer R. 1998. Brain-derived peptides reduce the size of cerebral infarction and loss of MAP2 immunoreactivity after focal ischemia in rats. *J Neural Transm.* 53:299-311.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kühn B, Müller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW. 2001. Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol.* 530(Pt 3):497-506.
- Schwab M, Schmidt K, Roedel M, Mueller T, Schubert H, Anwar MA, Nathanielsz PW. 2001a. Non-linear changes of electrocortical activity after antenatal betamethasone treatment in fetal sheep. *Journal of Physiology.* 531.2:535-543.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kuhn B, Müller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW. 2001b. Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol.* 530 (Pt 3):497-506.
- Schwab M, Coksaygan T, Samtani M, Jusko WJ, Nathanielsz PW. 2004. Kinetics of betamethasone in pregnant sheep after different doses; is the clinical dose supramaximal? *J Soc Gynecol. Invest.* 11(Suppl.):130.
- Schwab M. 2007. Fetale Hirnentwicklung und Programmierung von zerebralen Funktionsstörungen - Einfluss von pränataler Mangelernährung, Stress und Glukokortikoiden. *Der Gynäkologe.* 40:256-263.
- Schwab M, Thoms I, Schwab K. 2009. Effects of prenatal betamethasone exposure on autonomic function and cortical activity at the age of eight years - a pilot study. *J Dev Orig Health Dis.* 1(Suppl):17.
- Seckl JR. 2004. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *European Journal of endocrinology.* 151:49-62.
- Selton D, Andre M, Hascoet JM. 2000. Normal EEG in very premature infants: reference criteria. *Clin Neurophysiol.* 111(12):2116-2124.
- Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol.* 106-107:1-16.
- Senat MV, Minoui S, Multon O, Fernandez H, Frydman R & Ville Y. 1998. Effects of dexamethasone and betamethasone on fetal heart rate variability in preterm labour: a randomised study. *Br J Obstet Gynaecol.* 105,749-755.
- Shams M, Kilby MD, Somerset DA, Howie AJ, Gupta A, Wood PJ, Afnan M, Stewart PM. 1998. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Hum Reprod.* 13(4):799-804.
- Sheard MH. 1969. The effect of pCPA on behavior in rats: relation to brain serotonin and 5-HIAA. *Brain Res.* 15:524-528.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. 1996. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(9):3908-13.
- Shen Y, Monsma FJ Jr, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW, Sibley DR. 1993. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem.* 268(24):18200-4.
- Shi B, Rabin SJ, Brandoli C, Mocchetti I. 1998. Dexamethasone induces hypertrophy of developing medial septum cholinergic neurons: potential role of nerve growth factor. *J Neurosci.* 18(22):9326-9334.

- Shields A, Thomson M, Winter V, Coalson J, Rees S. 2012. Repeated courses of antenatal corticosteroids have adverse effects on aspects of brain development in naturally delivered baboon infants. *Pediatr Res.* 71(6):661-7.
- Shimizu M, Nishida A, Zensho H, Miyata M, Yamawaki S. 1997. Down-regulation of 5-hydroxytryptamine₇ receptors by dexamethasone in rat frontocortical astrocytes. *J Neurochem.* 68(6):2604-9.
- Shimron-Abarbanell D, Nöthen MM, Erdmann J, Propping P. 1995. Lack of genetically determined structural variants of the human serotonin-1E (5-HT_{1E}) receptor protein points to its evolutionary conservation. *Brain Res Mol Brain Res.* 29(2):387-90.
- Shibley JE, Schteingart DE, Tandon R, Pande AC, Grunhaus L, Haskett RF, Starkman MN. 1992. EEG sleep in Cushing's disease and Cushing's syndrome: comparison with patients with major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 15;32(2):146-55.
- Shoener JA, Baig R, Page KC. 2006. Prenatal exposure to dexamethasone alters hippocampal drive on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290(5):R1366-73.
- Silbernagel S, Lang F. 2009. *Taschenatlas Pathophysiologie.* 3. Auflage. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag. S.362-364
- Simonetta G, Walker DW, McMillen IC. 1991. Effect of feeding on the diurnal rhythm of plasma cortisol and adrenocorticotrophic hormone concentrations in the pregnant ewe and sheep fetus. *Exp Physiol.* 76(2):219-229.
- Sloboda DM, Newnham JP, Challis JR. 2000. Effects of repeated maternal betamethasone administration on growth and hypothalamic-pituitary-adrenal function of the ovine fetus at term. *J Endocrinol.* 165(1):79-91.
- Sloboda DM, Moss TJ, Gurrin LC, Newnham JP, Challis JR. 2002. The effect of prenatal betamethasone administration on postnatal ovine hypothalamic-pituitary-adrenal function. *J Endocrinol.* 172(1):71-81.
- Sloboda DM, Challis JR, Moss TJ et al. 2005. Synthetic glucocorticoids: antenatal administration and long-term implications. *Curr Pharm Des.* 11:1459-1472.
- Sloboda DM, Moss TJ, Li S, Doherty D, Nitsos I, Challis JR, Newnham JP. 2007. Prenatal betamethasone exposure results in pituitary-adrenal hyporesponsiveness in adult sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(1):E61-70.
- Slotkin TA, Barnes GA, McCook EC, Seidler FJ. 1996. Programming of brainstem serotonin transporter development by prenatal glucocorticoids. *Brain Res Dev Brain Res.* 93(1-2):155-61.
- Slotkin TA, Kreider ML, Tate CA, Seidler FJ. 2006. Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology.* 31(5):904-11.
- Smolders-de Haas H, Neuvel J, Schmand B, Treffers PE, Koppe JG, Hoeks J. 1990. Physical development and medical history of children who were treated antenatally with corticosteroids to prevent respiratory distress syndrome: a 10- to 12-year follow-up. *Pediatrics.* 86(1):65-70.
- Speranza L, Labus J, Volpicelli F, Guseva D, Lacivita E, Leopoldo M, Bellenchi GC, di Porzio U, Bijata M, Perrone-Capano C, Ponimaskin E. 2017. Serotonin 5-HT₇ receptor increases the density of dendritic spines and facilitates synaptogenesis in forebrain neurons. *J Neurochem.* 141(5):647-661.
- Spinedi E, Negro-Vilar A. 1983. Serotonin and adrenocorticotropin (ACTH) release: direct effects at the anterior pituitary level and potentiation of arginine vasopressin-induced ACTH release. *Endocrinology.* 112:1217-1223.

- Stathis SL, O'Callaghan M, Harvey J, Rogers Y. 1999. Head circumference in ELBW babies is associated with learning difficulties and cognition but not ADHD in the school-aged child. *Dev Med Child Neurol.* 41(6):375-80.
- Steer P. 2005. The epidemiology of preterm labour. *BJOG.* 112 Suppl1:1-3.
- Stehle JH, von Gall C, Korf HW. 2003. Melatonin: a clock-output, a clock-input. *J Neuroendocrinol.* 15(4):383-9.
- Steriade M. 2005. Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends Neurosci.* 28(6):317-324.
- Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 18:315-333.
- Sun X, Rusak B, Semba K. 2000. Electrophysiology and pharmacology of projections from the suprachiasmatic nucleus to the ventromedial preoptic area in rat. *Neuroscience.* 98(4):715-728.
- Swaab DF, Hofman MA, Honnebiel MB. 1990. Development of vasopressin neurons in the human suprachiasmatic nucleus in relation to birth. *Brain Res Dev Brain Res.* 52(1-2):289-93.
- Szafarczyk A, Ixart G, Alonso G, Malaval F, Nouguiet-Soule J, Assenmacher I. 1983. CNS control of the circadian adrenocortical rhythm. *J. Steroid Biochem.* 19:1009–1015.
- Tamir H, Liu KP, Payette RF, Hsiung SC, Adlersberg M, Nunez EA, Gershon MD. 1989. Human medullary thyroid carcinoma: characterization of the serotonergic and neuronal properties of a neurectodermally derived cell line. *J. Neurosci.* 9:1199–1212.
- Tamir H, Hsiung SC, Yu PY, Liu KP, Adlersberg M, Nunez EA, Gershon MD. 1992. Serotonergic signalling between thyroid cells: protein kinase C and 5-HT₂ receptors in the secretion and action of serotonin. *Synapse.* 12:155–168.
- Taniyama K, Makimoto N, Furuichi A, Sakurai-Yamashita Y, Nagase Y, Kaibara M, Kanematsu T. 2000. Functions of peripheral 5-hydroxytryptamine receptors, especially 5-hydroxytryptamine₄ receptor, in gastrointestinal motility. *J Gastroenterol.* 35(8):575-82.
- Tecott LH, Maricq AV, Julius D. 1993. Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(4):1430-4.
- Teff KL, Young SN. 1988. Effects of carbohydrate and protein administration on rat tryptophan and 5-hydroxytryptamine: differential effects on the brain, intestine, pineal, and pancreas. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66:683–688.
- Thase ME, Kupfer DJ, Fasiczka AJ, Buysse DJ, Simons AD, Frank E. 1997. Identifying an abnormal electroencephalographic sleep profile to characterize major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 41(9):964-73.
- Thobois S, Prange S, Sgambato-Faure V, Tremblay L, Broussolle E. 2017. Imaging the Etiology of Apathy, Anxiety, and Depression in Parkinson's Disease: Implication for Treatment. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 17(10):76.
- Thomas DR, Melotto S, Massagrande M, Gribble AD, Jeffrey P, Stevens AJ, Deeks NJ, Eddershaw PJ, Fenwick SH, Riley G, Stean T, Scott CM, Hill MJ, Middlemiss DN, Hagan JJ, Price GW, Forbes IT. 2003. SB-656104-A, a novel selective 5-HT₇ receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. *Br J Pharmacol.* 139(4):705-14.
- Thomas DR, Hagan JJ. 2004. 5-HT₇ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* *Br J Pharmacol.* 3(1):81-90.
- Thomas DR. 2006. 5-HT_{5A} receptors as a therapeutic target. *Pharmacol Ther.* 111(3):707-14.

- Thorp JA, Jones AM, Hunt C, Clark R. 2001. The effect of multidose antenatal beta-methasone on maternal and infant outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 184(2):196-202.
- Thorp JA, Jones PG, Peabody JL, Knox E, Clark RH. 2002. Effect of antenatal and postnatal corticosteroid therapy on weight gain and head circumference growth in the nursery. *Obstet Gynecol.* 99(1):109-15.
- To ZP, Bonhaus DW, Eglén RM, Jakeman LB. 1995. Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *Br J Pharmacol.* 115(1):107-16.
- Tonolo G, Fraser R, Connell JM, Kenyon CJ. 1988. Chronic low-dose infusions of dexamethasone in rats: effects on blood pressure, body weight and plasma atrial natriuretic peptide. *J Hypertens.* 6(1):25-31.
- Totterdell S. 2006. The anatomy of co-morbid neuropsychiatric disorders based on corticolimbic synaptic interactions. *Neurotoxicology Research.* 10:65-85.
- Trautman PD, Meyer-Bahlburg HF, Postelnek J, New MI. 1995. Effects of early prenatal dexamethasone on the cognitive and behavioral development of young children: results of a pilot study. *Psychoneuroendocrinology.* 20(4):439-49.
- Tsuno N, Besset A, Ritchie K. 2005. Sleep and depression. *J Clin Psychiatry.* 66(10):1254-69.
- Tucker RP. 1990. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Rev.* 15: 101-20.
- Tuladhar BR, Ge L, Naylor RJ. 2003. 5-HT₇ receptors mediate the inhibitory effect of 5-HT on peristalsis in the isolated guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol.* 138(7):1210-4.
- Tuor UI, Yager JY, Bascaramurty S, Del Bigio MR. 1997. Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in cerebral glucose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain. *J Neurochem.* 69(5):1954-1963.
- Twarog BM. 1954. Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. *J Cell Comp Physiol.* 44:141-163.
- Ulupinar E. 2009. Review: Effects of prenatal stress on developmental anatomy of the brain and adult behavioural pathology. *Anatomy-International Journal of Experimental and Clinical Anatomy.*
- Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM. 1990. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 53(2):157-67.
- Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J. 1994. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav.* 28(4):336-348.
- Van den Hove DL, Lauder JM, Scheepens A, Prickaerts J, Blanco CE, Steinbusch HW. 2006. Prenatal stress in the rat alters 5-HT_{1A} receptor binding in the ventral hippocampus. *Brain Res.* 1090(1):29-34.
- Varnäs K, Hall H, Bonaventure P, Sedvall G. 2001. Autoradiographic mapping of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors in the post mortem human brain using [³H]GR 125743. *Brain Res.* 915(1):47-57.
- Varnäs K, Halldin C, Pike VW, Hall H. 2003. Distribution of 5-HT₄ receptors in the postmortem human brain - an autoradiographic study using [¹²⁵I]SB 207710. *Eur Neuropsychopharmacol.* 13(4):228-34.
- Varnäs K, Hurd YL, Hall H. 2005. Regional expression of 5-HT_{1B} receptor mRNA in the human brain. *Synapse.* 56(1):21-8.

- Vermillion ST, Soper DE, Newman RB. 2000. Neonatal sepsis and death after multiple courses of antenatal betamethasone therapy. *Am J Obstet Gynecol.* 183(4):810-4.
- Vijay R. 2010. Effects of prenatal Dexamethasone on hippocampal serotonin 1A receptors in adult male rats. Master's Theses. Paper 37.
- Volk B, Nagy BJ, Vas S, Kostyalik D, Simig G, Bagdy G. 2010. Medicinal chemistry of 5-HT_{5A} receptor ligands: a receptor subtype with unique therapeutical potential. *Curr Top Med Chem.* 10(5):554-78.
- Waeber C, Moskowitz MA. 1995. Autoradiographic visualisation of [3H]5-carboxamidotryptamine binding sites in the guinea pig and rat brain. *Eur J Pharmacol.* 283(1-3):31-46.
- Waldmeier PC. 1987. Amine oxidases and their endogenous substrates (with special reference to monoamine oxidase and the brain). *J Neural Transm Suppl.* 23:55-72.
- Walfisch A, Hallak M, Mazor M. 2001. Multiple courses of antenatal steroids: risks and benefits. *Obstet Gynecol.* 98(3):491-7.
- Wai MS, Lorke DE, Kwong WH, Zhang L, Yew DT. 2011. Profiles of serotonin receptors in the developing human thalamus. *Psychiatry Res.* 185(1-2):238-42.
- Wang HT, Han F, Shi YX. 2009. Activity of the 5-HT_{1A} receptor is involved in the alteration of glucocorticoid receptor in hippocampus and corticotropin-releasing factor in hypothalamus in SPS rats. *Int J Mol Med.* 24(2):227-31.
- Wapner RJ, Sorokin Y, Thom EA, Johnson F, et al. 2006. Single versus weekly courses of antenatal corticosteroids: evaluation of safety and efficacy. *Am J Obstet Gynecol.* 195(3):633-42.
- Wapner RJ, Sorokin Y, Mele L, Johnson F, et al. 2007. Longterm outcomes after repeat doses of antenatal corticosteroids. *N Engl J Med.* 357(12):1190-8.
- Watanabe Y, Sakai R, McEwen B. 1993. Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5HT_{1A} and 5HT_{2a} receptors and transport sites for serotonin. *Brain Res.* 615,87-94.
- Weaver IC, La Plante P, Weaver S, Parent A, Sharma S, Diorio J, Chapman KE, Seckl JR, Szyf M, Meaney MJ. 2001. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Mol Cell Endocrinol.* 185(1-2):205-18.
- Wei Y, Li J, Wang H, Wang G. 2017. NUCB2/nesfatin-1: Expression and functions in the regulation of emotion and stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 81:221-227.
- Weihe E, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE. 1994. Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat. *J Mol Neurosci.* 5(3):149-64.
- Weinstock M. 1997. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev.* 21:1-10.
- Weinstock M. 2001. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol.* 65:427-451.
- Weiß C. 2011. Einfluss von Betamethason auf die Entwicklung der kortikalen Hirnfunktion und deren Erholung von einer intrauterinen Asphyxie beim fetalen Schaf in utero. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. 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(3):1047-54.

- Welberg LA, Seckl JR. 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J. Neuroendocrinol.* 13:113-128.
- Welberg LAM, Seckl JR, Holmes MC. 2001. Prenatal Glucocorticoid programming of brain, corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience.* 2001;104(1):71-9.
- Westberg L, Bah J, Råstam M, Gillberg C, Wentz E, Melke J, Hellstrand M, Eriksson E. 2002. Association between a polymorphism of the 5-HT_{2C} receptor and weight loss in teenage girls. *Neuropsychopharmacology.* 26(6):789-93.
- Whitaker-Azmitia PM. 1993. The role of serotonin and serotonin receptors in development of the mammalian nervous system. In Zagon IS., McLaughlin PJ, Hrsg. *Receptors in the Developing Nervous System.* 1. Auflage. Springer Netherlands. pp 43–53.
- Whitaker-Azmitia PM. 2001. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull.* 56:479–485.
- Wiedenmann B, Franke WW. 1985. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell.* 41(3):1017-28.
- Willet KE, McMenamin P, Pinkerton KE, Ikegami M, Jobe AH, Gurrin L, Sly PD. 1999. Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep. *Pediatr Res.* 45(5 Pt 1):615-25.
- Wintour EM, Brown EH, Denton DA, Hardy KJ, McDougall JG, Oddie CJ, Whipp GT. 1975. The ontogeny and regulation of corticosteroid secretion by the ovine foetal adrenal. *Acta Endocrinol (Copenh).* 79(2):301-316.
- Wirth A, Holst K, Ponimaskin E. 2017. How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons. *Prog Neurobiol.* 151:35-56.
- Wolf RF. 2001. Drainage von Erythrozyten aus dem Subarachnoidalraum in Lymphknoten - Eine tierexperimentelle Untersuchung zum Schädelhirntrauma. [Dissertation] Berlin: Freie Universität. S52-53.
- Wood CE. 2005. Estrogen/hypothalamus-pituitary-adrenal axis interactions in the fetus: The interplay between placenta and fetal brain. *J Soc Gynecol Investig.* 12(2):67-76.
- Woods LL, Weeks DA. 2005. Prenatal programming of adult blood pressure: role of maternal corticosteroids. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289:R955–R962.
- Woolley DW, Shaw E. 1954. A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 40. 228–231.
- Woolley ML, Marsden CA, Fone KC. 2004. 5-HT₆ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3(1):59-79.
- Wyrwoll CS, Holmes MC. 2012. Prenatal excess glucocorticoid exposure and adult affective disorders: a role for serotonergic and catecholamine pathways. *Neuroendocrinology.* 95(1):47-55.
- Yang CJ, Tan HP, Du YJ. 2014. The developmental disruptions of serotonin signaling may involved in autism during early brain development. *Neuroscience.* 267:1-10.
- Ying SW, Rusack B. 1997. 5-HT₇ receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.* 755,246 – 254.
- Young EA, Carlson NE, et al. 2001. Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women. *Neuropsychopharmacology.* 25(2): 267-7.

- Zahalka EA, Seidler FJ, Slotkin TA. 1993. Dexamethasone treatment in utero enhances neonatal cholinergic nerve terminal development in rat brain. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 81(2):191-198.
- Zhang A, Yu H, He Y, Shen Y, Zhang Y, Liu J, Fu B, Lv D, Miao F, Zhang J. 2015. Developmental expression and localization of MHC class I molecules in the human central nervous system. *Exp Brain Res.* 233(9):2733-43.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle allen, die mich bei dem Entstehen dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schwab für die Überlassung des Themas, seiner Geduld sowie Anregungen und Diskussionen zu diesem Thema.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dipl.-Biol. Iwa Antonow-Schlorke für die überaus gute Betreuung, unermüdliche Geduld sowie ihr freundschaftliches und herzliches Engagement, mit welchem sie mich die ganze Zeit begleitete.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen im Labor der experimentellen Neurologie, die mich tatkräftig bei dem Anfertigen und Färben der Schnitte unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Medizinstudium ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich immer bauen konnte sowie meinem Freund, der mich immer wieder liebevoll motiviert hat, die Arbeit zu einem erfolgreichen Ende zu bringen.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

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

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

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Prof. Dr. med. Matthias Schwab und

Frau Dipl.-Biol. Iwa Antonow-Schlorke, Klinik für Neurologie, FSU Jena,

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

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

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

Rudolstadt, den 16. Dezember 2017

Melanie Träupmann