

**Perinatale mentale gezondheid van moeder en
gedrag van het kind:
de interactie tussen psychosociale en biologische factoren**

Stijn Vos
Anna Soerensen
Dries Martens
Tim Nawrot

Universiteit Hasselt

Steunpunt Welzijn, Volksgezondheid en Gezin
Minderbroedersstraat 8 – B-3000 Leuven
Tel 0032 16 37 34 32
E-mail: swvg@kuleuven.be
Website: <http://www.steunpuntwvg.be>

**STEUNPUNT
WELZIJN
VOLKSGEZONDHEID &
GEZIN**

Publicatie nr. 2024/02

SWVG-Rapport 27

Titel rapport: Perinatale mentale gezondheid van moeder en gedrag van het kind: de interactie tussen psychosociale en biologische factoren

Promotor: prof. dr. Tim NAWROT

Onderzoekers: Stijn Vos, Anna Soerensen, dr. Dries Martens

Universiteit Hasselt, Centrum voor Milieukunde

Dit rapport kwam tot stand met de steun van de Vlaamse Overheid. In deze tekst komen onderzoeksresultaten van de auteur(s) naar voor en niet die van de Vlaamse Overheid. De Vlaamse Overheid kan niet aansprakelijk gesteld worden voor het gebruik dat kan worden gemaakt van de meegedeelde gegevens.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt zonder uitdrukkelijk te verwijzen naar de bron.

No material may be made public without an explicit reference to the source.

Het consortium SWVG

<i>Deelnemende instellingen - Dagelijks bestuur</i>	
KU Leuven	
· LUCAS, Centrum voor zorgonderzoek en consultancy	Prof. dr. Anja Declercq Prof. dr. Koen Hermans
· Instituut voor Sociaal Recht	Prof. dr. Johan Put
· HIVA - Onderzoeksinstituut voor Arbeid en Samenleving	Prof. dr. Tine Van Regenmortel
UGent	
· Vakgroep Bestuurskunde en Publiek Management	Prof. dr. Bram Verschuere
· Vakgroep Volksgezondheid en Eerstelijnszorg	Prof. dr. Katrien Vanthomme
· Vakgroep Volksgezondheid en Eerstelijnszorg	Prof. dr. Jeroen Trybou
Vrije Universiteit Brussel	
· Faculteit Psychologie en Educatiewetenschappen	Prof. dr. Johan Vanderfaeillie
Universiteit Antwerpen	
· Faculteit Sociale Wetenschappen	Prof. dr. Koen Decancq
<i>Partnerinstellingen</i>	
Universiteit Hasselt	
· Faculteit Geneeskunde en Levenswetenschappen	Prof. dr. Wim Pinxten
Thomas More Hogeschool	
· Unit Mens & Welzijn	Dr. Peter De Graef
Arteveldehogeschool	
· Sociaal Werk	
Hogeschool Gent	
· Onderzoekscentrum 360° Zorg en Welzijn	
UC Leuven-Limburg	
· Research & Expertise - Expertisecentrum Health Innovation	
Karel De Grote hogeschool	
· Onderzoek en maatschappelijke dienstverlening	
Hogeschool PXL	
· Expertisecentrum PXL Social Work Research	
Odisee co-hogeschool	
· Studiegebied Sociaal-Agogisch Werk	
KeFor	
· Kenniscentrum Forensisch Psychiatrische Zorg	
<i>Coördinatie en secretariaat</i>	
Coördinator SWVG Administratieve ondersteuning	Dr. Kathleen De Cuyper Manuela Schröder Lut Van Hoof

Rapport 27

Februari 2024

Perinatale mentale gezondheid van moeder en gedrag van het kind: de interactie tussen psychosociale en biologische factoren

Onderzoekers: Stijn Vos, Anna Soerensen, dr. Dries Martens

Promotor: Prof. dr. Tim Nawrot

Universiteit Hasselt, Centrum voor Milieukunde

Samenvatting

Het is gekend dat de maternale gemoedstoestand tijdens en na de zwangerschap via biologische mechanismen een belangrijke invloed kan hebben op de gezondheid van de nakomeling, mogelijks tot op volwassen leeftijd. Deze onderliggende biologische mechanismen zijn zeer divers. In deze studie wordt er ingegaan op een aantal biologische merkers, die gerelateerd zijn aan een aantal van deze belangrijke mechanismen.

De eerste merker die we onderzochten is de telomeerlengte. Telomeren zijn structuren op het uiteinde van het DNA die met verloop van tijd steeds korter worden. Ze kunnen dus beschouwd worden als een biologische merker van veroudering. De tweede categorie van merkers die we onderzochten was DNA methylatie. DNA methylatie is een vorm van een epigenetica, wat wil zeggen dat het gaat om aanpassingen op de structuur van het DNA die gevolgen kunnen hebben voor de regulatie en expressie van de betrokken genen. In deze studies werd DNA methylatie op genen betrokken in de biologische respons op stress (*NR3C1*) en ontwikkeling (*IGF2/H19*) onderzocht.

Er is relatief weinig onderzoek waarin in één studie verbanden tussen de volgende factoren onderzocht worden: (1) predictoren van de mentale gezondheid van de moeder in de perinatale periode (zowel prenataal als in het postpartum); (2) de werking van het biologisch stress-systeem –gemeten aan de hand van zowel epigenetische processen als telomeerlengte- bij moeder en kind in de postpartum periode; en (3) het gedrag en de ontwikkeling van het kind in de postpartum periode en tot kleuterleeftijd. Tijdens dit onderzoeksproject onderzochten we de verbanden biologische merkers, maternale (mentale) gezondheid en gedrags- en ontwikkelingsuitkomsten bij het kind om beleidsrelevante en vernieuwende kennis te vergaren.

We maakten gebruik van het Prenatal Early Life Stress (PELS) Tilburg cohort. Aan de hand van beschikbare biologische stalen werden epigenetische merkers bepaald (DNA methylering) op genen, betrokken in de biologische stressrespons (*NR3C1*), en in de vroege ontwikkeling (*IGF2/H19*), geanalyseerd. Ook werd biologische veroudering onderzocht door het meten van de telomeerlengte in de beschikbare stalen.

Prenatale werkgerelateerde onevenwichtigheid in inspanning-beloning bleken negatief geassocieerd met telomeerlengte bij het jonge kind. We stelden vast dat hoe meer een zwangere vrouw aangeeft dat de waardering die ze in de werkcontext krijgt te klein is naargelang de geleverde inspanning, hoe korter de telomeerlengte van het kind. De telomeerlengte van het jonge kind was verder ook positief geassocieerd met oriënterend/regulerend gedrag op dezelfde leeftijd (4-6 maanden) en voorspellend voor levendigheid-gedrag op 3-4-jarige leeftijd. Deze resultaten suggereren dat het werk van de moeder langdurige gevolgen kan hebben voor het jonge kind, en bovendien dat telomeerlengte zowel geassocieerd is met huidige als toekomstige gedragsuitkomsten.

Methylering van *NR3C1* op de leeftijd van 4-6 maanden bleek positief geassocieerd te zijn met verschillende factoren: maternale werkgerelateerde fysieke eisen, levendigheid gedrag op de leeftijd van 4-6 maanden. In deze studie werd dus gevonden dat het werk van de moeder tijdens de zwangerschap invloed heeft op het jonge kind en dat methylering van *NR3C1* gerelateerd is aan zowel het huidige gedrag als gedrag op 3-5-jarige leeftijd. We vonden echter geen verband tussen *NR3C1* of *IGF2* methylatie en telomeerlengte.

Op basis van deze resultaten kunnen we concluderen dat beide moleculaire merkers gelinkt zijn aan gedrag van het kind, en dat bepaalde prenatale werkgerelateerde factoren van de moeder gelinkt zijn aan de merkers onderzocht in deze studie. Dit onderstreept opnieuw het belang van ondersteuningsmechanismen en vooral van een interdisciplinaire benadering voor perinatale zorg wat betreft gezondheid van de moeder, maar ook voor de gezondheid van het kind.

Op basis van deze bevindingen stellen we deze beleidsaanbevelingen voor:

- Vroege invloed van maternale werk gerelateerde factoren op telomeerlengte

Implementeren van voorlichtingsprogramma's en ondersteuning voor zwangere vrouwen en jonge ouders om stressniveaus te verminderen. Deze studie toont aan dat de balans tussen inspanning en beloning op het werk belangrijk is voor de gezondheid van het kind. Interventies dienen dus ook gericht te zijn op het verbeteren van werksituaties van jonge (aanstaande) moeders.

- Telomeerlengte als voorspeller van gedragsuitkomsten

Deze studie toont verbanden tussen telomeerlengte en gedragsuitkomsten bij het kind. Het is belangrijk om te benadrukken dat diverse factoren zoals genetische predispositie, omgevingsinvloeden, en individuele variaties allemaal bijdragen aan de complexiteit van deze relatie. Dit onderzoek draagt wel bij aan het begrijpen van de biologische onderliggende mechanismen die ten grondslag liggen bij dit verband, maar telomeerlengte is in dit kader niet specifiek genoeg om bijvoorbeeld te gebruiken als screeningstool.

- Prenatale maternale cortisolniveaus en gedrag van het kind

Het verband tussen cortisolniveaus en gedragsuitkomsten benadrukt opnieuw het belang (op biologisch niveau) van een goede mentale gezondheid tijdens de zwangerschap. Via beleid kunnen interdisciplinaire programma's en zorgtrajecten voor (mentale) gezondheidsmonitoring tijdens de zwangerschap uitgevoerd worden. Door psychosociale ondersteuning aan zwangere vrouwen kan chronische stress vermeden worden (en dus kan men zo cortisolniveaus beheersen).

Inhoud

Hoofdstuk 1	Inleiding	7
Hoofdstuk 2	Telomeerlengte en gedragsuitkomsten bij het kind	11
1	Onderzoeksvragen	11
2	Methoden	12
2.1	Studiepopulatie	12
2.2	Psychosociale factoren	13
2.3	Werkgerelateerde factoren	13
2.4	Gedrag en ontwikkeling	13
2.5	Telomeerlengte	14
2.6	Statistische analyses	15
3	Resultaten	15
3.1	Studiepopulatie	15
3.2	Psychosociale factoren	18
3.3	Werkgerelateerde factoren	18
3.4	Gedrag en ontwikkeling	20
4	Discussie	21
Hoofdstuk 3	Maternale gezondheid en DNA methylatie niveaus bij het kind	25
1	Onderzoeksvragen	25
2	Methoden	26
2.1	Studiepopulatie	26
2.2	Psychosociale factoren	26
2.3	Werkgerelateerde factoren	27
2.4	Gedrag en ontwikkeling	27
2.5	DNA-methylering	28
2.6	Statistische analyse	28
3	Resultaten	29
3.1	Studiepopulatie	29
3.2	NR3C1 Methylatie	30
3.3	IGF2/H19 Methylatie	31
4	Discussie	32
Hoofdstuk 4	Beleidsaanbevelingen:	35
Hoofdstuk 5	Referenties	37

Lijst tabellen

Tabel 1	PELS studiepopulatie karakteristieken	16
Tabel 2	Beschrijvend karakteristieken psychosociale, werkgerelateerde en gedragsuitkomsten.	17

Lijst figuren

Figuur 1	Verdeling en correlatie van telomeerlengte bij moeder en kind.	17
Figuur 2	Maternale ERI is geassocieerd met telomeerlengte van de baby (T/S ratio), $p = 0.02$, $n = 142$	19
Figuur 3	Baby oriëntatie/regulatie (effort-control) is lineair geassocieerd met baby telomeerlengte (T/S ratio) ($p = 0.03$, $n = 142$)	20
Figuur 4	Baby telomeerlengte (T/S ratio) is geassocieerd met ($p = 0.02$) kleuter levendigheid gedrag (leeftijd 3 – 5 jaar) ($n = 117$).	21
Figuur 5:	Associaties tussen baby NR3C1 methylatie en maternale werkgerelateerde fysieke eisen.	30
Figuur 6	Associaties tussen baby NR3C1 (Amplicon #1) methylatie en levendigheid gedrag (IBQ-R levendigheid).	31
Figuur 7	Verdeling van de methylatie niveaus op de verschillende CpG sites van het IGF2/H19 amplicon.	32

Hoofdstuk 1

Inleiding

Om inzicht te krijgen in het ontstaan van gezondheidsproblemen is inzicht in onderliggende biologische mechanismen belangrijk. In de eerste 1000 dagen (en vooral in de eerste helft van de zwangerschap) worden organen aangelegd; die zich in de eerste 1000 dagen aan een hoog tempo ontwikkelen door celdeling, differentiatie van cellen en groei. Het organisme is plastisch en past zich aan de prenatale omgeving aan. Dat laatste gebeurt ook wanneer deze omgeving niet-optimaal of mogelijk ziekmakend is (bv. als de moeder chronische stress heeft, zwaarlijvig is, blootgesteld is aan schadelijke stoffen, ...); daardoor herbergt deze periode de oorsprong van latere lichamelijke en mentale gezondheidsproblemen. Dit onderzoek zal bijdragen aan het inzicht over factoren tijdens de eerste 1000 dagen waarop het beleid preventief kan inzetten. De resultaten kunnen daarom mogelijk bijdragen aan het uitwerken van nieuwe richtlijnen voor beleidsmedewerkers, zorgverstrekkers en ouders over in welke omgeving het stress systeem optimaal kan ontwikkelen waardoor de kans kleiner is dat een individu later in het leven onderhevig is aan een ontregeld stresssysteem en eventuele vroegtijdige verouderingsprocessen.

De interdisciplinaire, internationale onderzoeksgroep 'Developmental Origins of Health and Disease' (DOHaD) gaat uit van de hypothese dat wat zich tijdens de prenatale en vroeg postnatale ontwikkeling afspeelt én de wijze waarop omgevingsfactoren deze vroege ontwikkeling beïnvloeden aan de oorsprong kan liggen van latere gezondheidsproblemen en ziekten. Onderzoekers leggen zich hierbij toe op het bestuderen van de samenhang tussen psychosociale en biologische factoren. DOHaD-onderzoek toonde bijvoorbeeld aan dat bepaalde omgevingsfactoren waaraan de moeder is blootgesteld in de zwangerschap (zoals stress, en groene ruimte) het stress-systeem van de moeder beïnvloeden. Dit laatste zal op zijn beurt het stress-systeem van de nakomeling beïnvloeden. Eén van de gevolgen van blootstelling van de moeder aan langdurige en intense stress tijdens haar zwangerschap is dat het **stress-systeem** van haar baby zowel bij rust als bij stress té sterk reageert of net té zwak zal reageren. Dit maakt een individu biologisch kwetsbaar. Deze kwetsbaarheid is een belangrijke oorzaak van een zwakke lichamelijke en mentale gezondheid van de nakomeling (1–3).

Epigenetische factoren spelen een belangrijke rol in deze processen. Wat zijn **epigenetische factoren** en wat is het belang ervan? Letterlijk verwijst epi-genetica naar wat 'boven' of 'meer' is dan de genetica. Daar waar genetische risicofactoren verwijzen naar genetische overerving, waarvoor DNA-sequenties van de genen die het menselijke genoom uitmaken bepalend zijn, hebben epigenetische factoren te maken met niet-genetische overerving. Het gaat om overerfbare wijzigingen in genexpressie; omdat deze niet kunnen verklaard worden door wijzigingen in onderliggende DNA-sequenties gaat het om niet-genetische overerving. Nieuwe inzichten betreffen: (1) inzicht in het feit dat slecht een gen dat tot expressie komt (lees: is 'aangeklikt') mede een invloed zal hebben op fenotypische kenmerken; in een gen dat is 'uitgeschakeld', 'tot stilte is gebracht' ('silenced is') vindt namelijk geen transcriptie plaats; (2) inzicht in het feit dat het 'aan- en uitklikken' van genen onder bepaalde omstandigheden omkeerbare processen zijn, (3) toenemende kennis van een aantal van de processen die het al dan niet tot expressie komen van genen leiden, zoals (de)methylering van DNA en histonmodificatie. Daar waar opvolging van DNA-sequenties niet kan gewijzigd worden, kunnen epigenetische regulatiemechanismen wel beïnvloed worden door de omgevingsomstandigheden. En dat biedt therapeutische mogelijkheden. Via

interventie kunnen bijvoorbeeld de nadelige effecten die gerelateerd zijn aan epigenetische wijzingen vermeden worden, en kunnen mogelijk gunstige epigenetische effecten gepromoot worden.

Telomeren zijn de uiteindes van onze chromosomen en bevatten herhalende stukjes DNA die verkorten naarmate een cel zal delen en verouderd. De lengte van telomeren blijkt een goede indicator -en een mogelijk achterliggend mechanisme- voor het ontwikkelen van hart- en vaatziekten, longziekten en vroegtijdige sterfte (4). Pasgeborenen van moeders die veel stress hadden tijdens de zwangerschap hebben kortere **telomeren** dan pasgeborenen van moeders die weinig of geen stress hadden tijdens de zwangerschap (5,6) en op volwassen leeftijd heeft de eerste groep nog altijd kortere telomeren dan de tweede groep (7). Dit betekent dat wanneer men in de baarmoeder blootgesteld was aan stress die de moeder ervaart, men mogelijk eerder ouderdoms- gerelateerde ziekten zou kunnen ontwikkelen. Anderzijds hebben veerkracht, een positieve ingesteldheid (8) én ook wonen in een groene omgeving tijdens de zwangerschap, mogelijks een positieve invloed heeft op telomeerlengte van de nakomeling, wat op zich een positieve samenhang met een goede werking van het stress systeem vertoont.

Meer stress blijkt gelinkt te zijn aan kortere telomeren (9,10). Traumatische stress tijdens de kindertijd blijkt significante effecten te hebben op telomeerlengte (11). Individuen die lijden aan depressie vertonen over het algemeen kortere telomeren, waarbij de ernst van de depressie ook van significant belang is (12). De achterliggende moleculaire verklaring voor deze associaties en de richting van de beschreven verbanden zijn echter nog niet volledig uitgeklaard. Daartoe is bijkomend onderzoek nodig in cohorten waarin psychosociale gegevens én biologische merkers van zowel moeders als van hun kinderen van in de prenatale periode verzameld werden.

De perinatale periode is niet alleen fysiek maar ook emotioneel een periode van grote veranderingen voor de moeder. Dit maakt het een gevoelige periode voor de geestelijke gezondheid. Zwangere vrouwen kampen vaak met psychologische stress of angst, en hebben een hoger risico om depressies te ontwikkelen, zowel prenataal als in het postpartum. Bovendien is aangetoond dat moeders die tijdens de zwangerschap een negatieve gemoedstoestand hadden, een verhoogde kans hebben dat ze ook in het postpartum gekenmerkt worden door een negatieve gemoedstoestand. Ten gevolge daarvan zullen ze minder optimaal interageren met hun kind dan moeders die in de postpartum periode een positieve gemoedstoestand hebben. Naast de vermelde biologische factoren kan dus uiteraard ook **de moeder-kind interactie** in het postpartum gevolgen hebben voor het gedrag en de ontwikkeling van de baby (13).

Er is in het DOHaD-onderzoeksveld **relatief weinig onderzoek waarin in één studie verbanden tussen de volgende factoren kunnen onderzocht worden:**

1. Predictoren van de mentale gezondheid van de moeder in de perinatale periode (zowel prenataal als in het postpartum);
2. De werking van het stress-systeem –gemeten aan de hand van zowel epigenetische processen als telomeerlengte- bij moeder en kind in de postpartum periode;
3. Het gedrag en de ontwikkeling van het kind in de postpartum periode en tot kleuterleeftijd.

Met dit project trachtten we dus meer inzicht te krijgen in de verbanden tussen deze 3 typen van factoren. In de volgende twee hoofdstukken worden de resultaten van dit onderzoek voorgesteld. Hoofdstuk 2 gaat over de verbanden die we vonden tussen telomeerlengte en gedragsuitkomsten bij

het kind. Hoofdstuk 3 gaat over de verbanden die we vaststelden tussen maternale gezondheid tijdens de zwangerschap en DNA methylatie niveaus bij het kind. Op basis van deze bevindingen doen we een aantal concrete beleidsaanbevelingen, namelijk het implementeren van interdisciplinaire voorlichtingsprogramma's, ondersteuning en psychosociale zorg voor zwangere vrouwen om (onder andere werk gerelateerde) stressniveaus tijdens deze gevoelige levensfase te verminderen.

Hoofdstuk 2

Telomeerlengte en gedragsuitkomsten bij het kind

1 Onderzoeksvragen

Telomeren zijn nucleoproteïnestructuren die zich aan het einde van de chromosomen bevinden en het DNA beschermen tegen de degradatie die over de jaren heen ontstaat omwille van continue celdelingen. Omwille van deze celdelingen wordt DNA steeds korter, telomeren dienen als een buffer op het DNA die ervoor zorgt dat de waardevolle genetische informatie niet verloren gaat. Telomeren worden dus vanaf de geboorte steeds korter, en daarom worden ze erkend als een moleculaire marker voor biologische veroudering, die in verband wordt gebracht met levensduur en ziekte (14).

Telomeren zijn gevoelig voor externe invloeden. Er is aangetoond dat telomeerlengte geassocieerd is met externe blootstellingen zoals luchtvervuiling (14,15), groene ruimte (16,17), en stress (18,19). Volgens de DOHaD-hypothese (Developmental Origins of Health and Disease) kunnen blootstellingen tijdens de zwangerschap en op jonge leeftijd langdurige gevolgen hebben voor de gezondheid van de nakomeling. Onderzoek heeft inderdaad aangetoond dat telomeerlengte (TL) bijzonder gevoelig is voor blootstelling tijdens het vroege leven (20–22). Met name maternale stress tijdens de zwangerschap werd onderzocht, waarbij is aangetoond dat prenatale psychosociale stress een negatief effect heeft op de TL van het kind (5,6,23). Een mogelijke verklaring hiervoor is de invloed van de HPA-as, waarbij hoge maternale cortisolniveaus tijdens de zwangerschap een negatieve invloed hebben op de TL van het kind (24), en een kortere TL gepaard gaat met een hogere cortisolreactiviteit op stress (25).

Andere stressfactoren bij de moeder, zoals depressie en ervaren stress, blijken ook negatief geassocieerd te zijn met de TL van het kind (26–28), en psychologische veerkracht lijkt een positief effect te hebben op de TL van het kind (8), wat benadrukt hoe uitgebreid de categorie stress is. Niet alle onderzoeken vinden echter dezelfde associaties. (24,29,30) Er zijn inderdaad verschillende aspecten van stress bij moeders, waarbij veel onderzoeken gebruikmaken van typische testbatterijen zoals de waargenomen stressschaal (PSS) en de Holmes and Rahe Stress Scale Questionnaire. Andere gebruiken echter ander vragenlijsten, wat vergelijkingen bemoeilijkt. Ook de meetmethoden voor telomeerlengte verschillen.

Aangezien is aangetoond dat TL bij de geboorte het sterkst wordt beïnvloed in de eerste levensjaren, waarbij de positie ten opzichte van andere individuen in de loop van de tijd hetzelfde blijft (20), is het belangrijk om de invloed van TL in het vroege leven te beoordelen als voorspeller voor cognitieve en fysieke gezondheid op latere leeftijd.

Prenatale cortisolniveaus kunnen ook het gedrag van de baby beïnvloeden. Dit blijkt duidelijk uit onderzoek waarin prenatale cortisolniveaus geslacht -specifiek het ongemak van kinderen ten opzichte van opgelegde beperkingen voorspellen (31), en waarin hoge cortisolniveaus worden geassocieerd met een minder gunstige cognitieve ontwikkeling (32). Prenatale cortisol van de moeder heeft ook langduriger effecten en is gecorreleerd aan externaliserend gedrag (33) en affectieve problemen bij kinderen (34). Het is bovendien vastgesteld dat prenatale cortisolniveaus een negatieve invloed hebben op het IQ van kinderen op 7-jarige leeftijd (35) en dat het voorkomen van kenmerken van de autismespectrumstoornis verhoogt (36). Dit maakt het een relevante moleculaire marker bij het onderzoeken van de effecten van prenatale stress op het gedrag van de nakomeling.

TL is in verband gebracht met cognitie bij oudere volwassenen (38), ongeduld bij studenten (38) en vijandigheid bij volwassenen (39–41). Achtergelaten kinderen blijken een kortere TL te hebben en meer psychologische en gedragsproblemen, waarbij TL een groot deel van de associatie bleek te mediëren (42,43). Daarnaast is TL in verband gebracht met neurologische ontwikkeling (45), ADHD (45,46) en opstandig gedrag (47) bij kinderen, en vroeg ontstane depressieve stoornis bij adolescenten (48). Echter, alleen Feiler en Pham onderzochten TL als voorspeller van gedrag en neurologische ontwikkeling, en geen van beiden corrigeerde voor maternale TL, wat belangrijk is vanwege de genetische component (49), zeker als TL geassocieerd is met gedrag, waarbij positieve of negatieve maternale gedragskenmerken kunnen worden weerspiegeld op het kind. Deze studie zal voornamelijk gericht zijn op het onderzoeken van de associaties tussen 1) de invloed van prenatale blootstelling aan stress van de moeder op telomeerlengte van de baby, 2) maternale postpartum telomeerlengte en telomeerlengte van de baby en 3) telomeerlengte van de baby en gedrag van het kind op de leeftijd van 4-6 maanden en 3-5 jaar.

2 Methoden

2.1 Studiepopulatie

Deelnemers van het Prenatal Early Life Stress (PELS) cohort werden gerekruteerd in het Sint-Elisabethziekenhuis en 4 verloskundigenpraktijken in de buurt van Tilburg (Nederland), waar in totaal 190 zwangere vrouwen werden gerekruteerd tijdens de vroege zwangerschap. Na een introductie van het onderzoek door de medische staf, lieten geïnteresseerde deelnemers hun contactgegevens achter voor de onderzoekers. De onderzoekers maakten dan een afspraak met de deelnemer voor een eerste studiebezoek. Alle deelnemers gaven informed consent, in overeenstemming met de Verklaring van Helsinki. Deelnemers rapporteerden informatie over geboortedatum, werk, opleidingsniveau, etc. in een algemene vragenlijst aan het begin van het onderzoek.

Het onderzoek bestond uit zes opeenvolgende meetmomenten, T1 tot T6 genoemd, waarvan de eerste drie plaatsvonden tijdens de zwangerschap en de laatste drie na de geboorte van de baby's. Deelnemers konden kiezen tussen een vragenlijst op papier en potlood of een elektronische versie. Sessies T1 tot T3 vonden meestal plaats bij de deelnemers thuis, tenzij de deelnemer liever ergens anders afsprak, bijvoorbeeld op het werk, bij haar ouders thuis of in het Babylab van Tilburg University. Alle postpartum metingen vonden plaats in het Tilburg University Babylab. Via verloskundigen en ziekenhuisverpleegkundigen, en het raadplegen van medische dossiers, werd ook informatie over de bevalling verzameld. In dit onderzoek zijn metingen gebruikt van tijdstippen T2, T4 en T6, die respectievelijk overeenkomen met een zwangerschapsduur van 16 - 23 weken, een leeftijd van 4 - 6 maanden en een leeftijd van 3 - 5 jaar. 152 moeder-kind paren namen deel op T4, waar biologische stalen werden genomen van de moeder (als de moeder verkoos om geen bloed te laten afnemen, werd in plaats daarvan een speekselstaal genomen; bloedstalen: $n = 128$, speekselstalen: $n = 24$) en de baby (speekselstalen; $n =$). Uit de stalen werd DNA geëxtraheerd en bewaard bij -80°C tot het moment van analyse. Op T6 werden gedrags- en temperamentmetingen bij het kind uitgevoerd.

2.2 Psychosociale factoren

Maternale zelfgerapporteerde toestandsangst werd gemeten op T2, wat overeenkomt met de zwangerschapsduur van 16-23 weken, met behulp van de Nederlandse versie van de Spielberger State - Trait Anxiety Inventory (50), die 20 items voor toestandsangst en 20 items voor trait anxiety bevat. Alle items werden gescoord van 1 tot 4 (1 = helemaal niet, 4 = heel erg).

Maternale zelf gerapporteerde depressieve symptomen werden gemeten met de Edinburgh Postnatal Depression Scale (EDS) op T2, een vragenlijst ontwikkeld door Cox et al. (1987) (51) om moeders te screenen op depressieve symptomen tijdens de zwangerschap en de postnatale periode. De vragenlijst bestaat uit 10 items met een score van 0 tot 3 over depressieve symptomen waarvan een somscore kan worden berekend voor de algehele depressieve symptomen.

2.3 Werkgerelateerde factoren

De deelnemers vulden de Copenhagen Psychosocial Questionnaire (COPSOQ) (52) in tijdens T2. De resultaten van deze vragenlijst werden gebruikt om psychosociaal welzijn te bepalen met betrekking tot verschillende werkgerelateerde domeinen. Daarnaast werd de Effort-Reward Imbalance Questionnaire (ERI-Q) (53) gebruikt om de scores voor onbalans tussen inspanning en beloning voor alle deelnemers te bepalen. Zes gebieden met betrekking tot de inspanning of belasting van het werk werden onderzocht, met ja/nee vragen zoals 'Ik moet vaak overwerken'. Als het antwoord 'ja' was, werd een vervolgschaal van 1 - 5 voor de intensiteit verstrekt, gaande van 'Weinig tot geen inspanning' tot 'Zeer grote inspanning/belasting'. Beloning werd gemeten op het gebied van waardering, verloning en werkzekerheid, met vragen als 'Ik krijg de waardering die ik verdien van mijn collega's.' De ERI (Effort-Reward ratio) werd berekend door inspanning/beloning x correctiefactor, waarbij de correctiefactor werd gebruikt om te corrigeren voor het verschillende aantal vragen in het inspannings- en beloningsgedeelte van de vragenlijst.

2.4 Gedrag en ontwikkeling

Het temperament van de baby werd door de moeder gerapporteerd met behulp van de korte versie de Infant Behaviour Questionnaire (IBQ-R) (54,55) op T4, 4 - 6 maanden oud, in het Nederlands. De korte versie van de IBQ-R meet het temperament van baby's aan de hand van 37 items over de frequentie van bepaald gedrag in specifieke situaties (spelen, in bad gaan, etc.) in de voorgaande week (bv. 'Hoe vaak glimlachte de baby toen hij in bad werd gedaan?'). Items worden gescoord op een zevenpunts Likertschaal (1 = nooit, 7 = altijd). Een tweede orde factoranalyse op de scores van de sub schalen van de originele IBQ-R (lange versie) resulteerde in de volgende drie brede dimensies die ook worden gebruikt voor de korte versie van de IBQ-R: levendigheid (13 items), negatieve affectiviteit (12 items) en oriëntatie/regulatie (13 items). Levendigheid/extraversie wordt gedefinieerd als een combinatie van lage verlegenheid en hoge benaderingsbereidheid (bv. 'Tijdens een kiekeboe spel, hoe vaak glimlachte de baby?') en is gekoppeld aan de persoonlijkheidskenmerken 'aangenaamheid' en 'extraversie'. Negatieve affectiviteit wordt gedefinieerd als de neiging van een nakomeling om negatieve gevoelens te ervaren (bv. "Hoe vaak maakte de baby zich druk of protesteerde hij/zij toen hij/zij op de rug werd gelegd?") en wordt in verband gebracht met neuroticisme en negatieve emotionaliteit bij volwassenen. Tot slot is oriëntatie/regulatie gedefinieerd als de neiging van een baby om zichzelf te reguleren en is

het gekoppeld aan plezier met een lage intensiteit (bv. 'Als de baby rustig speelde met een van zijn/haar favoriete speeltjes, hoe vaak toonde hij/zij dan plezier?') en de duur van het oriënteren (bv. 'Hoe vaak heeft de baby de afgelopen week 5 minuten of langer naar een mobiel, wiegbumper of foto gestaard?') en is het gekoppeld aan het persoonlijkheidskenmerk 'consciëntieusheid' bij volwassenen. In onze steekproef vertoonden de IBQ-R sub schalen een goede interne consistentie op alle schalen (Cronbach's α = tussen .70 en .90).

Op T6 (3 - 5 jaar) werd de korte versie van de Children's Behaviour Questionnaire (CBQ-R) van Putnam en Rothbart gebruikt (56,57), die schalen heeft die vergelijkbaar zijn met de IBQ-R (58). De schaalverschillen tussen de IBQ-R en de CBQ-R zijn het hernoemen van schalen voor de oudere leeftijdsgroep ("duur van oriënteren" naar "aandacht richten" en "snelheid van naderen" naar "positieve anticipatie"), het verwijderen van schalen in de CBQ-R ("affiliatie/aanhalingheid") en het toevoegen van schalen in de CBQ-R ("ongemak", "impulsiviteit", "remmende controle" en "verlegenheid"). De korte versie van de CBQ-R bevat 36 items met uitspraken over het kind, waarbij de moeder de geschiktheid beoordeelt op een zevenpunts Likertschaal, gaande van 1 (extreem onwaar) tot 7 (extreem waar). Net als de IBQ-R bevat de CBQ-R drie brede dimensies, namelijk levendigheid/extraversie, negatieve affectiviteit en zelfregulatie, waarbij de laatste hetzelfde is als reguleren/oriënteren in de IBQ, maar met de toegevoegde mogelijkheid voor het kind om de focus te verleggen en vooruit te plannen. Voorbeelden voor elke dimensie zijn "mijn kind gaat graag van hoge glijbanen of andere avontuurlijke activiteiten", "mijn kind wordt boos als hij iets niet kan vinden waarmee hij wil spelen" en "mijn kind benadert plaatsen waarvan hem verteld is dat ze gevaarlijk zijn langzaam en voorzichtig".

2.5 Telomeerlengte

De relatieve gemiddelde telomeerlengte (TL) van moeder en kind (4 - 6 maanden) werd gemeten met een aangepaste kwantitatieve polymerasereactiemethode (qPCR) van Cawthon (59) in mondcellen (voor het kind) of in veneus bloed (voor de moeder). Deze methode is gebaseerd op TL die bestaat uit enkele duizenden TTAAGGG herhalingen. Door het te vergelijken met een enkelvoudig gekopieerd of stabiel referentiegen krijgt men een verhouding van de TL ten opzichte van dat gen (T/S-verhouding), die de relatieve lengte van de telomeer DNA-strengen weergeeft. Dit is nauwkeuriger dan het gebruik van de qPCR-waarden voor het telomeer alleen, omdat kleine verschillen in de template-input zullen worden gecorrigeerd in vergelijking met het stabiele gen. De uiteindelijke concentraties van het qPCR-mengsel voor de telomeerplaten waren 1X KAPA SYBR® FAST (low rox) mastermix, 20 nM dithiothreitol (DTT), 100 nM TelG (ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT) en 100n M TelC (TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACCA). De cyclusomstandigheden voor de telomeerplaten waren 1 cyclus bij 95°C gedurende 3 m, 2 cycli bij 94°C gedurende 3 s en 49°C gedurende 15 s, 30 cycli bij 94°C gedurende 3 s, 62°C gedurende 5 s en 74°C gedurende 10 s. Het "single copy" gen, humaan β -globine (HBG), mengsel bevatte 1X KAPA SYBR® FAST (low rox) mastermix, 450 nM HBG1 (GCTTCTGACAACCTGTTCACTAGC) en 450 nM HBG2 (CACCAACTTCATCCACGTTTACC) in de eindconcentratie, en werd gemeten met het volgende qPCR-cyclusprogramma: 1 cyclus bij 95°C gedurende 3 m, 40 cycli bij 95°C gedurende 3 s en 58°C gedurende 15 s. Beide cycli werden afgesloten met een smeltcurve. Stalen werden in drievoud gemeten met Quantstudio 5 (Applied Biosystems) in een 384-wells formaat met snelle modus. Twee 6-punts seriële 1:3 verdunningen bestaande uit gepoolde stalen en één individueel staal, en 5 interrun-kalibratoren (IRC's) werden in drievoud opgenomen. Amplificatiecurven werden visueel geïnspecteerd en individuele technische replicaten werden verwijderd als de Ct-variatie meer dan 0,3 was. qBase plus (Biogazelle, Zwijnaarde, België) werd

gebruikt voor verwerking en normalisatie naar het HBG-gen en inter-runvariatie. De intraclass correlatiecoëfficiënt (ICC) werd gebruikt voor het meten van de herhaalbaarheid van zowel de triplo's als de platen, met behulp van het “*rptR*” R-pakket (60), met een 95% betrouwbaarheidsinterval (CI). De ICC werd gemeten voor de telomeerlengte metingen, het “single copy” gen en de TS-ratio. Deze waren respectievelijk 0.991 (0.989 tot 0.992), 0.975 (0.97 tot 0.979) en 0.971 (0.965 tot 0.976). Om de herhaalbaarheid over de verschillende platen te meten, werd de inter-assay ICC berekend op basis van de vijf IRC's, wat resulteerde in een ICC van 0.956 (0.69 tot 0.986).

2.6 Statistische analyses

Alle statistische analyses werden uitgevoerd met R versie 4.0.2 (R Core Team, Wenen, Oostenrijk). Om vertekening door ontbrekende gegevens te voorkomen, voerden we meervoudige imputatie uit met behulp van een voorspellende gemiddelde matchingsprocedure met behulp van het “*mice*” R-pakket. In totaal werden 8 datasets gegenereerd met een maximum van 5 iteraties. Daarna werden de geïmputeerde datasets samengevoegd met behulp van de functie `merge_imputations` uit het `sjmisc` R-pakket (61), Telomeerlengte was beschikbaar voor 142 van de 152 verzamelde stalen (93.4%).

Met behulp van lineaire regressie modellen analyseerden we de relatie tussen de mentale gezondheid van de moeder tijdens de zwangerschap, werkgerelateerde factoren en beschermende factoren en de telomeerlengte van de baby op 4-6 maanden. Er werden eveneens lineaire regressie modellen gebruikt om de verbanden tussen telomeerlengte van moeder en gedrags- en ontwikkelingsresultaten van baby's en peuters te onderzoeken. Alle modellen werden gecorrigeerd voor leeftijd van de moeder, opleidingsniveau, BMI en geslacht en leeftijd van het kind ten tijde van de studie, waarbij opleidingsniveau werd gedefinieerd als laag (minder dan een middelbareschooldiploma), gemiddeld (alleen een middelbareschooldiploma) of hoog (hogeschool of universiteit). Daarnaast pasten we onze modellen aan voor maternale telomeerlengte in gevoeligheidsanalyse, als een alternatieve maat voor genetische effecten, en onderzochten we of waargenomen associaties significant bleven. GraphPad Prism 8.0.2 werd gebruikt voor Pearson's correlatie tussen maternale en kind telomeerlengte, naast het plotten van de bijbehorende grafieken.

3 Resultaten

3.1 Studiepopulatie

De beschrijvende statistieken van de onderzoekspopulatie zijn samengevat in tabel 1. De studie bestond uit 152 moeder-kind paren, waarbij de moeders een gemiddelde leeftijd hadden van 31,6 jaar (SD: +- 4.4) op T4, wat overeenkomt met baby's van 4 - 6 maanden. De meeste moeders hadden een diploma middelbaar onderwijs (hogeschool of universiteit; n = 122), terwijl 68 deelnemers alleen een diploma lager onderwijs (middelbare school) hadden. De meeste deelnemende moeders waren getrouwd of woonden samen met hun partner (n = 150), terwijl een klein deel alleenstaand was (n = 2). De gemiddelde BMI van de moeder was 24.1 (+- 4.0). De beschrijvende statistieken voor alle psychosociale, werkgerelateerde en ontwikkelingsresultaten zijn samengevat in Tabel 2. Relatief kleine percentages van de deelnemers hadden scores voor toestand (11.1%) of eigenschapsangst (9.9%) boven de cutoff waarde van 40 en 43 respectievelijk. Wat betreft EDS-score was er ook slechts een klein percentage boven de cutoff waarde van 11 (6.1%).

In de leeftijdsfase van 3-5 jaar werden gegevens over temperament van het kind (CBQ) verkregen voor 113 kinderen (deelnamepercentage = 73.9%). Kenmerken van de studiepogulatie verschilden niet significant tussen de steekproef bij de geboorte versus de follow-up fase (zoals beoordeeld door student t-test of Chi kwadraat test, al naar gelang van toepassing). Telomeerlengte was normaal verdeeld voor zowel moeder als kind (Figuur 1). Bovendien was de telomeerlengte van moeder en kind (4 - 6 maanden) significant met elkaar gecorreleerd (Pearson $r = 0.236$, $p < 0.01$).

Tabel 1 PELS studiepogulatie karakteristieken

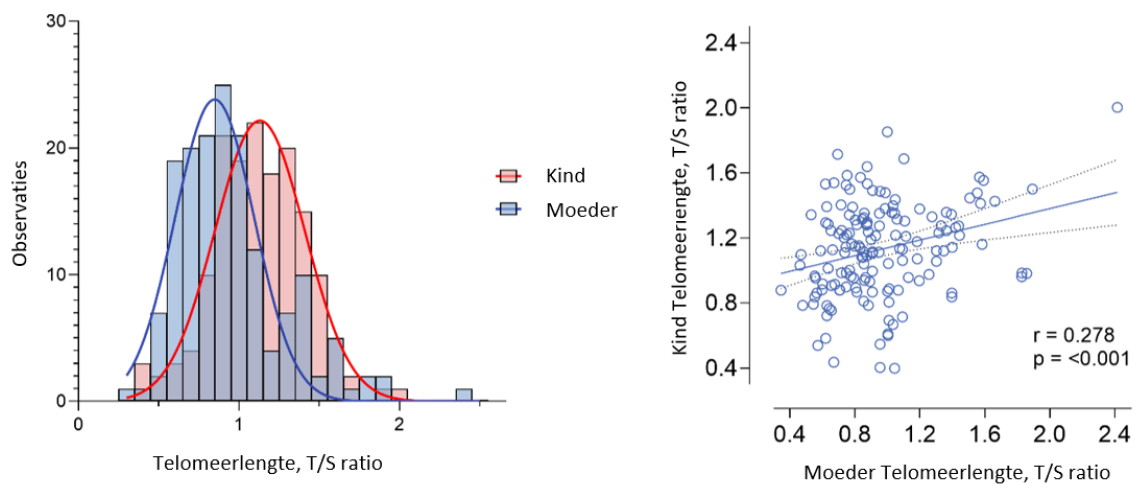
Karakteristiek	Gemiddelde (+- SD) of Frequentie
Leeftijd moeder (jaren)	31.6 (+- 4.4)
Opleidingsniveau*	
Laag	0
Medium	68
Hoog	122
Burgerlijke status	
Getrouwd	83
Samenwonend	32
Geregistreerde partners	35
Alleenstaand	2
Anders	0
BMI moeder	24.1 (+- 4.0)
Leeftijd baby (T4) (days)	106.0 (+- 45.6)
Leeftijd kind (T6) (years)	4.1 (+- 0.2)
Zwangerschapsduur (weken)	39.8 (+- 1.6)
Geslacht kind	
Jongens	70
Meisjes	82

*: Laag = Geen diploma of alleen lagere schooldiploma; Medium = Middelbareschooldiploma; Hoog = Diploma hoger onderwijs of beter (postgraduaat/PhD)

Tabel 2 Beschrijvend karakteristieken psychosociale, werkgerelateerde en gedragsuitkomsten.

Schaal	Variabele	Tijdpunt	Gemiddelde	Mediaan	1ste Kwartiel	3rde Kwartiel	IQR
STAI	Toestand Angst	T2	31.95	32.0	28.00	36.00	8.00
	Eigenschap Angst	T2	32.99	32.00	27.00	37.00	10.00
EDS	EDS score	T2	4.23	4.00	1.75	6.00	4.25
COPSOQ	Emo. vereisten	T2	21.55	22.00	19.00	25.00	6.00
	Fys. vereisten	T2	13.09	12.00	9.00	18.00	9.00
	Ontwikkelingskansen	T2	8.29	9.00	7.00	9.00	2.00
SOCIAL	Tevredenheid met sociaal leven	T3	7.80	8.00	7.00	9.00	2.00
IBQ-R	Levendigheid	T4	4.65	4.48	3.85	5.31	1.46
	Neg. aff.	T4	3.72	3.58	3.08	4.17	1.08
	Zelfregulatie	T4	5.84	6.00	5.58	6.17	0.58
CBQ-R	Levendigheid	T6	3.97	3.92	3.58	4.25	0.67
	Neg. aff.	T6	3.30	3.39	3.85	5.39	1.54
	Zelfregulatie	T6	4.83	4.92	4.18	5.50	1.32
	Haar cortisol (pg/mg haar)	T3	50.88	19.80	13.00	32.00	19.00

Figuur 1 Verdeling en correlatie van telomeerlengte bij moeder en kind.



3.2 Psychosociale factoren

De gemiddelde maternale toestand angst score tijdens de zwangerschap was 31.6 (SD: +- 6.3). De maternale eigenschap angst score tijdens de zwangerschap was 32.8 (SD: +- 6.2). Verder was er geen verband tussen maternale toestandsangst tijdens de zwangerschap en telomeerlengte van moeder of kind (respectievelijk $p = 0.95$ en $p = 0.48$). Voor maternale eigenschap angst tijdens de zwangerschap zagen we wel een verband met maternale telomeerlengte (0.17, $p < 0.01$), maar niet met telomeerlengte van het kind ($p = 0.97$).

De gemiddelde maternale Edinburgh Depression Scale (EDS) score tijdens de zwangerschap was 4.13 (SD: +- 3.27). Verder zagen we geen verband tussen de maternale EDS-score tijdens de zwangerschap en de telomeerlengte van de moeder of het kind ($p = 0.82$ en $p = 0.30$).

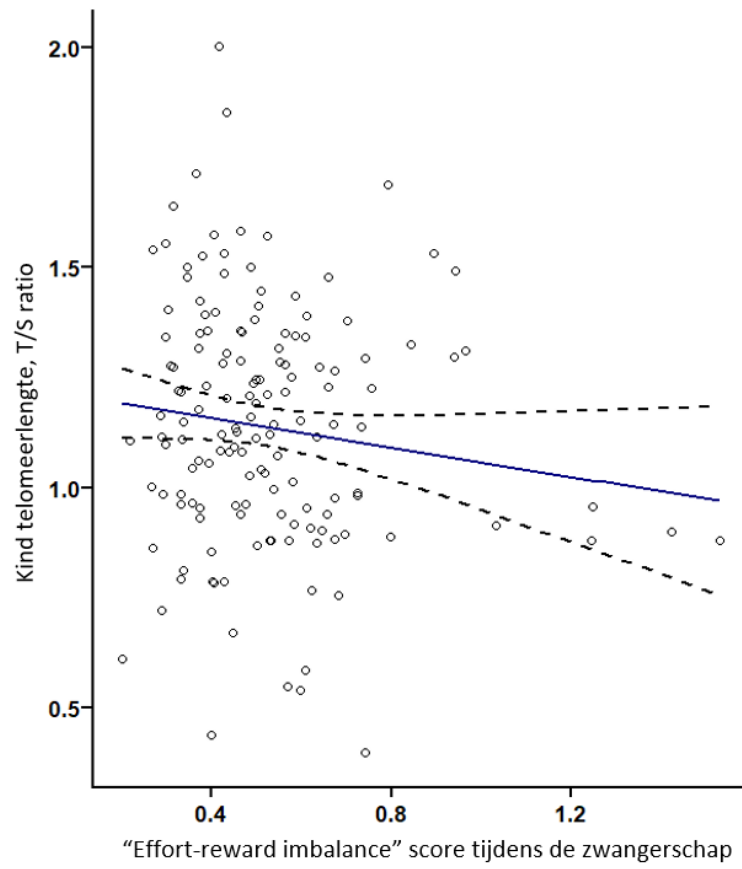
De gemiddelde score voor tevredenheid met het sociale leven tijdens de zwangerschap was 7.80 (SD: +- 1.23). Tevredenheid met het sociale leven was niet geassocieerd met cortisol van de moeder ($p = 0.68$), of met telomeerlengte van het kind ($p = 0.42$). Echter, tevredenheid met het sociale leven tijdens de zwangerschap was negatief geassocieerd met maternale telomeerlengte (11% afname, $p = 0.04$).

3.3 Werkgerelateerde factoren

De gemiddelde maternale COPSQQ score voor de sub schaal Ontwikkelingsmogelijkheden tijdens de zwangerschap was 8.29 (SD: +- 1.38). Voor de sub schaal fysieke eisen was de gemiddelde score 13.09 (SD: +- 5.57). Voor de sub schaal emotionele eisen was de gemiddelde score 21.92 (SD: +- 4.52). Maternale emotionele eisen op het werk tijdens de zwangerschap waren positief geassocieerd met maternale telomeerlengte (9% toename, $p = 0.01$), maar niet met telomeerlengte van het kind ($p = 0.79$).

We zagen een negatief verband tussen de werkgerelateerde onevenwicht tussen inspanning en beloning (ERI) van de moeder tijdens de zwangerschap en de relatieve telomeerlengte van de baby op de leeftijd van 4-6 maanden (figuur 2). Voor een IQR toename in de ERI-score nam de T/S ratio met 6% af ($p = 0.02$). Wanneer het model bovendien werd aangepast voor maternale telomeerlengte, bleef deze associatie vergelijkbaar (5% reductie, $p = 0.03$). Maternale ERI tijdens de zwangerschap was niet geassocieerd met de telomeerlengte van de moeder ($p = 0.61$).

Figuur 2 Maternale ERI is geassocieerd met telomeerlengte van de baby (T/S ratio), $p = 0.02$, $n = 142$



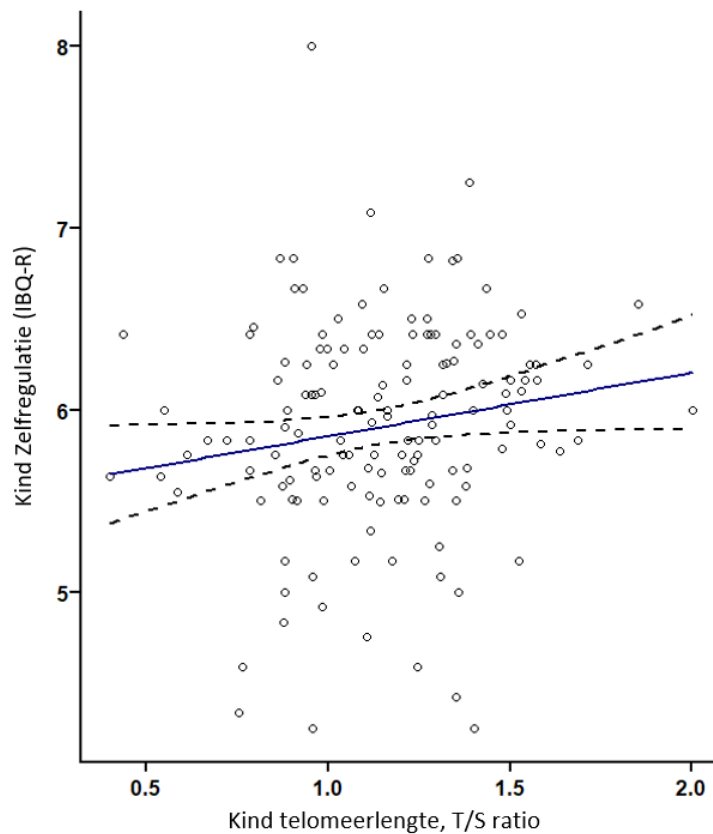
3.4 Gedrag en ontwikkeling

De gemiddelde levendigheid score van de baby op de leeftijd van 4 - 6 maanden (IBQ-R) was 4.65 (SD: +- 1.16). De gemiddelde score voor inspanningscontrole bij baby's op dezelfde leeftijd was 4.83 (SD: +- 0.61), terwijl de gemiddelde score voor negatieve affectiviteit 3.72 (SD: +- 1.12) was.

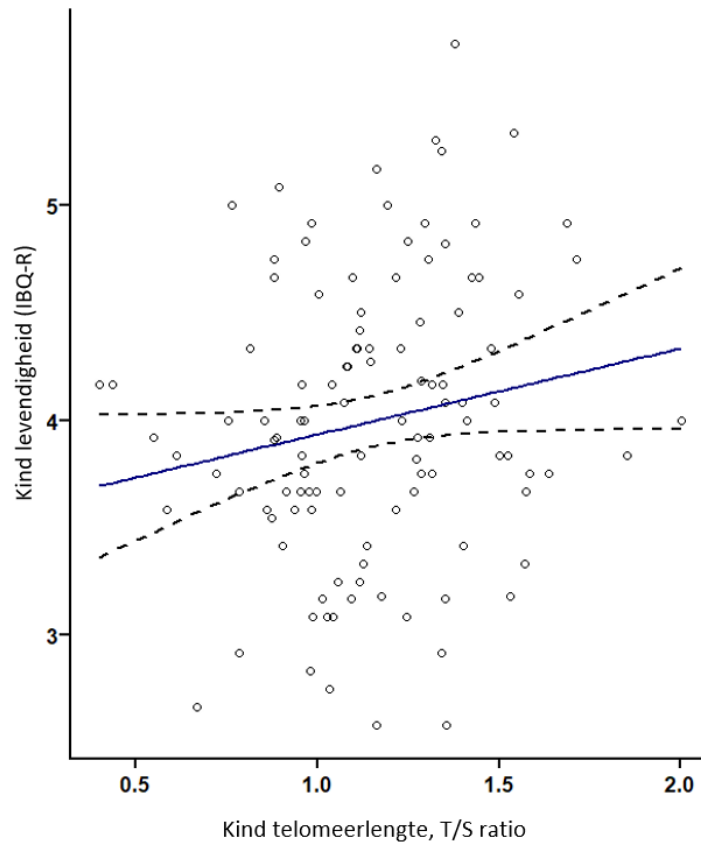
Op de leeftijd van 3 - 5 jaar was de gemiddelde levendigheid score (CBQ-R) 3.94 (SD: +- 0.62), de gemiddelde effort-control score 4.79 (SD: +- 0.72), en de gemiddelde negatieve affectiviteit score 3.32 (SD: +- 0.9).

We zagen dat de telomeerlengte van de baby op de leeftijd van 4 - 6 maanden geassocieerd was met oriëntatie/regulatie op dezelfde leeftijd ($p = 0.01$) (Figuur 3). Bovendien voorspelde telomeerlengte van de baby levendigheid-gedrag op de kleuterleeftijd ($p = 0.01$) (figuur 4). Deze associaties bleven significant na extra correctie voor maternale telomeerlengte.

Figuur 3 Baby oriëntatie/regulatie (effort-control) is lineair geassocieerd met baby telomeerlengte (T/S ratio) ($p = 0.03$, $n = 142$)



Figuur 4 Baby telomeerlengte (T/S ratio) is geassocieerd met ($p = 0.02$) kleuter levendigheid gedrag (leeftijd 3 – 5 jaar) ($n = 117$).



4 Discussie

In deze studie werden verbanden onderzocht tussen maternale stress tijdens de zwangerschap, telomeerlengte van moeder en kind het gedrag van de nakomelingen op de leeftijd van 4 - 6 maanden en 3 - 5 jaar. Onze belangrijkste bevindingen waren als volgt: i) Maternale TL bleek significant gecorreleerd te zijn met baby-TL, in lijn met eerdere studies. (62–65) ii) Zelfs na correctie voor maternale TL, leeftijd, opleidingsniveau, BMI en het geslacht en de leeftijd van het kind, bleek een grotere onbalans tussen inspanning en beloning op het werk van de moeder tijdens de zwangerschap negatief samen te hangen met de TL van de baby op de leeftijd van 4 - 6 maanden ($P=0.03$). iii) Daarnaast bleek de TL van de baby op de leeftijd van 4 - 6 maanden samen te hangen met gedragsuitkomsten op de leeftijd van 4 - 6 maanden ($p = 0.01$) en 3 - 5 jaar ($p = 0.01$), respectievelijk in de vorm van oriëntatie/regulatie en een hogere levendigheid. Bovendien vonden we dat deze associaties onafhankelijk waren van maternale telomeerlengte (erfelijke factor).

Er is ofwel een positieve correlatie gevonden tussen cortisol en negatieve affectiviteit, door gebruik te maken van cortisol en de IBQ (66), of geen correlatie, door gebruik te maken van cortisol in het moederlijk haar en de CBQ (67,68) 60,61 of IBQ (69). Ook met gebruik van andere de testen als uitkomstmaat werd gevonden dat een verhoogd prenataal cortisol de negatieve affectiviteit van de baby doet toenemen (70,71) evenals internaliserend gedrag bij jongens (72), geen van beide zijn echter in

overeenstemming met onze resultaten. Eén studie vond een associatie tussen maternaal interpersoonlijk trauma en verbaal geheugen, echter alleen bij mannelijke kinderen, waarbij maternaal cortisol het effect wijzigde (73). Een andere studie vond dat maternaal cortisol de cortisolreactiviteit bij kinderen wijzigde, waarbij steilere maternale cortisolfluctuaties gerelateerd waren aan een meer afgevlakte cortisolreactiviteit bij jongens (74). Deze aanpassing aan hogere prenatale cortisolniveaus kan de negatieve associatie tussen maternaal cortisol en negatieve affectiviteit bij kinderen verklaren die in onze studie werd gevonden. Als alternatief vonden Bosquet Enlow et. al. [2017] dat maternale levenslange blootstelling aan trauma negatief geassocieerd was met dalende reactiviteit/snelheid van herstel onder hoge maternale haarcortisolniveaus (log haarcortisol >2.16) (69), terwijl onder lage haarcortisolniveaus deze associatie positief was (log haarcortisol <0.22). Hoewel de gemiddelde en mediane haarcortisolconcentratie in onze studie binnen dit bereik vallen (respectievelijk 50,88 (log 1.71) en 19.80 pg/mL (log 1.30)), kan eenzelfde mechanisme ons resultaat hebben beïnvloed.

Van TL in cellen van de wang van kinderen is eerder gevonden dat het negatief geassocieerd is met internaliserende symptomen (47,75). Voor zover wij weten, is er echter geen onderzoek gedaan naar TL bij kinderen in relatie tot onbalans tussen inspanning en beloning van de moeder tijdens de zwangerschap, of met surrogaatgedrag van kinderen.

Zelfregulatie van het kind is eerder positief geassocieerd bevonden met TL bij kinderen van 8 - 10 jaar oud die blootgesteld waren aan moeilijke omstandigheden tijdens hun kindertijd (76). Terwijl onze studie dezelfde associatie vond in een veel jongere leeftijdsgroep (4 - 6 maanden), observeerden wij niet dezelfde associatie in de oudere groep, zijnde 3 - 5 jaar oud. Dit kan te wijten zijn aan het verschil in onze studiepopulaties (het gaat in deze studie niet om kinderen die blootgesteld werden aan moeilijke omstandigheden). Het zou ook aan het verschil in leeftijd kunnen liggen, aangezien Sosnowski et al. TL hebben gemeten op een leeftijd van 9 jaar, terwijl wij het hebben bepaald op een leeftijd van 4 - 6 maanden. Tenslotte zou het ook aan de keuze van de vragenlijsten kunnen liggen, waarbij Sosnowski het Child Development Supplement van de Panel Study of Income Dynamics (PSID-CDS-II en -III) gebruikte, en wij de herziene Infant Behaviour Questionnaire (IBQ-R). Internaliserende en externaliserende symptomen tijdens de kindertijd kunnen voorspellend zijn voor het risico op depressieve stoornissen (78), waarbij oriëntatie/regulatie geassocieerd blijkt te zijn met minder depressieve symptomen (78). Daarentegen is levendigheid bij kinderen positief geassocieerd met fysieke activiteit op volwassen leeftijd (79), IQ, academische resultaten en relaties op latere leeftijd (80). Het is daarom belangrijk om de dynamiek met TL in het vroege leven te begrijpen.

De causale richting van het verband tussen telomeerlengte en gedrag is nog onvoldoende bestudeerd om er een duidelijk uitspraak te kunnen over doen. Sommige onderzoeken zijn geneigd om gedrag te zien als het causale mechanisme achter TL-verandering (81,82), en stellen dat het mechanisme achter de invloed van TL op gedrag onduidelijk is (83). Het idee dat gedrag een causale invloed heeft op TL is inderdaad meer benaderbaar, bijvoorbeeld ongeduldig of risicovol gedrag waardoor de kans groter is dat men bijvoorbeeld gaat roken of ongezond gaat eten, wat resulteert in verhoogde oxidatieve stress en dus verhoogde kwetsbaarheid van TL. Aan de andere kant kunnen gezonde gedragingen zoals ontstekingsremmend eten of sporten de oxidatieve stress verminderen en telomerase activiteit verhogen (84), wat resulteert in minder slijtage van de telomeren. De actieve subeenheid van telomerase, TERT, kan ook van invloed zijn op de hersenfunctie, omdat de niet-canonieke functies ervan onder andere het *downstream* doelwit van de hersenafgeleide neurotrofische factor (BDNF) (85) zijn en neuronen beschermen tegen oxidatieve stress (86). Gezondheidsbevorderende gedragskenmerken kunnen daarom zowel de TL als de cognitieve functies verhogen (87,88).

Er bestaan echter ook moleculaire mechanismen achter TL die gedrag kunnen beïnvloeden. Het telomeerpositie-effect (TPE) is de verspreiding van heterochromatine van de telomeerregio naar genen in de buurt, waardoor deze tot zwijgen worden gebracht (89). Het stilleggen van genen over langere afstanden kan ook gebeuren doordat de telomeeruiteinden terug op de chromosomen lussen, dit mechanisme heet TPE over lange afstanden (TPE-OLD) (90). Hierdoor kan het zijn dat hoe korter de telomeren worden, hoe minder genen tot zwijgen worden gebracht (91), hetgeen dus een effect kan hebben op gedragsontwikkeling.

Deze studie heeft verschillende sterke punten. Ten eerste onderzocht de studie een tamelijk onontgonnen onderzoeksgebied, met name de effecten van werkgerelateerde factoren van de moeder tijdens de zwangerschap en gedrags- en ontwikkelingsresultaten van kinderen in relatie tot TL van de moeder en de baby. De studie heeft een behoorlijk groot aantal moeder-kind dyades, met een totaal van 152 moeder-kind paren. De inclusie van de moeders stelt ons in staat om te corrigeren voor maternale TL - waarvan bewezen is dat het correleert met de TL van het kind - en zo associaties te onderzoeken terwijl we tot op zekere hoogte kunnen controleren voor de genetische component van telomeerlengte biologie. Gecombineerd met het longitudinale aspect van het onderzoek, gedragsanalyse op de leeftijd van 4-6 maanden en 3-5 jaar, kunnen we een grondiger inzicht krijgen in hoe TL in het vroege leven het gedrag kan beïnvloeden, en mogelijk het risico op neurocognitieve problemen in het latere leven.

Beperkingen van deze studie zijn: een mogelijke ondervertegenwoordiging van deelnemers met een lage SES, waardoor de generaliseerbaarheid van deze studie naar de bredere populatie beperkt is. Omdat het gedrag en temperament van het kind door de moeder werd geëvalueerd, zou er bovendien sprake kunnen zijn van een vertekening. Een bevestiging van een andere persoon, bijvoorbeeld de andere ouder of een professional zou ideaal zijn geweest, indien mogelijk. Tot slot werd buccale TL gebruikt voor de kinderen; hoewel dit soort weefsel in heel wat studies wordt gebruikt, weerspiegelt het mogelijk niet de TL in andere weefsels (92). Hoewel de maternale TL's afkomstig zijn van bloed, is aangetoond dat buccale TL en bloed TL een hoge correlatie hebben (93), en daarom zouden ze onze resultaten niet moeten beïnvloeden.

Deze studie toonde aan dat ondergewaardeerd worden op het werk de TL van de nakomelingen zou kunnen verkorten, wat een negatief resultaat is. Op zijn beurt werd een langere TL bij kinderen geassocieerd met gedragskenmerken die zowel tijdens de kindertijd als in de kinderjaren gerelateerd zijn aan zelfregulatie en extraversie. Dit is belangrijk voor mentale en fysieke gezondheidssuitkomsten later in het leven en zou verder onderzocht moeten worden.

Hoofdstuk 3

Maternale gezondheid en DNA methylering niveaus bij het kind

1 Onderzoeksvragen

Epigenetische modificatie is onderzocht als een van de mechanismen die ten grondslag liggen aan het effect van prenatale blootstelling aan stress, met bijzondere aandacht voor de glucocorticoidreceptor NR3C1. Verschillende signaalmoleculen kunnen zich binden aan deze receptor, waaronder het stresshormoon cortisol, dat essentieel is voor prenatale ontwikkelingsprocessen, maar ook sterk wordt beïnvloed door stress vanwege de activering van de HPA-as (94). Een aantal psychiatrische stoornissen wordt toegeschreven aan ontregeling van de HPA-as, zoals depressie,(95) schizofrenie (96) en angst (97). Epigenetische regulatie van de HPA-as via NR3C1-methylering is uitgebreid bestudeerd (98–101), waarbij prenatale stress bij de moeder geassocieerd is met NR3C1-methylering bij het kind en methylering van het NR3C1-gen bij het kind geassocieerd is met schadelijk gedrag bij het kind (102). Er zijn echter zeer weinig integratieve studies die ook gedragsuitkomsten bij het kind onderzoeken in relatie met deze epigenetische processen.

Insulin-like groeifactor 2 (IGF2) is een belangrijk hormoon dat de groei en ontwikkeling reguleert, vooral prenataal, met inbegrip van neuronale groei en geheugenvorming (103). IGF2 expressie is inderdaad lager bij kinderen die klein geboren worden voor de zwangerschapsduur (104), waarbij het lichaam en de hersenen van het kind onderontwikkeld zijn bij de geboorte, wat mogelijk leidt tot verminderde cognitieve functies in het latere leven (105). Ondanks het feit dat het een *imprinted gene* is, waarbij het allel van de moeder epigenetisch gedeactiveerd wordt tijdens de ontwikkeling, is aangetoond dat het methyleringsprofiel van IGF2 kan variëren van persoon tot persoon, ook bij gezonde individuen (106). Methylering van IGF2 blijkt geassocieerd te zijn met het voorkomen van ADHD (107,108), en blootstelling aan prenatale stress is in verband gebracht met IGF2-methyleringsniveaus bij de geboorte (43,109,110). Tot nu toe is echter niet bekend hoe dit het gedrag van kinderen beïnvloedt.

Cortisolniveaus kunnen van invloed zijn op methyleringsniveaus. In één onderzoek hadden kinderen van moeders met PTSS een significante correlatie tussen bloedcortisol en NR3C1-methylering (111). In een ander onderzoek medieerde NR3C2-methylering bij kinderen de associatie tussen prenatale depressieve symptomen en speekselcortisol bij jongens (112). Omkeerbare, hogere methylering van NR3C1 bleek geassocieerd te zijn met een verhoogde stressrespons bij de baby (113). De resultaten zijn echter niet consistent wat betreft NR3C1 (114–116).

Om meer inzicht te krijgen in het effect van prenatale stress, onderzoekt deze studie de associatie van maternale psychosociale factoren en cortisolniveaus tijdens de zwangerschap en de postpartumperiode met de methylering van NR3C1 en IGF2/H19 bij moeders en hun baby's, en hoe deze laatste metingen samenhangen met het gedrag van de nakomeling op de leeftijd van 4 - 6 maanden en 3 - 5 jaar.

2 Methoden

2.1 Studiepopulatie

Deelnemers van het Prenatal Early Life Stress (PELS) cohort werden gerekruteerd in het Sint-Elisabethziekenhuis en 4 verloskundigenpraktijken in de buurt van Tilburg (Nederland), waar in totaal 190 zwangere vrouwen werden gerekruteerd tijdens de vroege zwangerschap. Na een introductie van het onderzoek door de medische staf, lieten geïnteresseerde deelnemers hun contactgegevens achter voor de onderzoekers. De onderzoekers maakten dan een afspraak met de deelnemer voor een eerste studiebezoek. Alle deelnemers gaven geïnformeerde toestemming, in overeenstemming met de Verklaring van Helsinki. Deelnemers rapporteerden informatie over geboortedatum, werk, opleidingsniveau, etc. in een algemene vragenlijst aan het begin van het onderzoek. Psychosociale factoren.

Het onderzoek bestond uit zes opeenvolgende meetmomenten, T1 tot T6 genoemd, waarvan de eerste drie plaatsvonden tijdens de zwangerschap en de laatste drie na de geboorte van de baby's. Deelnemers konden kiezen tussen een vragenlijst op papier en potlood of een elektronische versie. Sessies T1 tot T3 vonden meestal plaats bij de deelnemers thuis, tenzij de deelnemer liever ergens anders afsprak, bijvoorbeeld op het werk, bij haar ouders thuis of in het Babylab van Tilburg University. Alle postpartum metingen vonden plaats in het Tilburg University Babylab. Via verloskundigen en ziekenhuisverpleegkundigen, en het raadplegen van medische dossiers, werd ook informatie over de bevalling verzameld. In dit onderzoek zijn metingen gebruikt van tijdstippen T2, T4 en T6, die respectievelijk overeenkomen met een zwangerschapsduur van 16 - 23 weken, een leeftijd van 4 - 6 maanden en een leeftijd van 3 - 5 jaar. 152 moeder-kind paren namen deel op T4, waar biologische stalen werden genomen van de moeder (als de moeder weigerde bloed te laten afnemen, werd in plaats daarvan een speekselstaal genomen; bloedstalen: n = 128, speekselstalen: n = 24) en de baby. Uit de stalen werd DNA geëxtraheerd en bewaard bij -80°C tot het moment van analyse. Op T6 werden gedrags- en temperamentmetingen bij het kind uitgevoerd.

2.2 Psychosociale factoren

Maternale zelf gerapporteerde toestandsangst werd gemeten op T2, wat overeenkomt met de zwangerschapsduur van de baby van 16-23 weken, met behulp van de Nederlandse versie van de Spielberger State - Trait Anxiety Inventory (117) die 20 items voor toestandsangst en 20 items voor trait anxiety bevat. Alle items werden gescoord van 1 tot 4 (1 = helemaal niet, 4 = heel erg).

Maternale zelf gerapporteerde depressieve symptomen werden gemeten met de Edinburgh Postnatal Depression Scale (EDS) op T2, een vragenlijst ontwikkeld door Cox et al. (1987) (51) om moeders te screenen op depressieve symptomen tijdens de zwangerschap en de postnatale periode. De vragenlijst bestaat uit 10 items met een score van 0 tot 3 over depressieve symptomen waarvan een somscore kan worden berekend voor de algehele depressieve symptomen.

2.3 Werkgerelateerde factoren

Deelnemers vulden de Copenhagen Psychosocial Questionnaire (COPSOQ) tijdens T2. De resultaten van deze vragenlijst werden gebruikt om psychosociaal welzijn te bepalen met betrekking tot verschillende werkgerelateerde domeinen. (52) Daarnaast werd de Effort-Reward Imbalance Questionnaire (ERI-Q) (53) gebruikt om de scores voor onbalans tussen inspanning en beloning voor alle deelnemers te bepalen. Zes gebieden met betrekking tot de inspanning of belasting van het werk werden onderzocht, met ja/nee vragen zoals 'Ik moet vaak overwerken'. Als het antwoord 'ja' was, werd een vervolgschaal van 1 - 5 voor de intensiteit verstrekt, gaande van 'Weinig tot geen inspanning' tot 'Zeer grote inspanning/belasting'. Beloning werd gemeten op het gebied van waardering, betaling en werkzekerheid, met vragen als 'Ik krijg de waardering die ik verdien van mijn collega's'. Als het antwoord 'nee' was op een positieve vraag, zoals in het voorbeeld, of 'ja' op een negatieve vraag, werd de deelnemer gevraagd om met behulp van de schaal van 1 - 5 de mate aan te geven. De ERI (Effort-Reward ratio) werd berekend door inspanning/beloning x correctiefactor, waarbij de correctiefactor werd gebruikt om te corrigeren voor het verschillende aantal vragen in het inspannings- en beloningsgedeelte van de vragenlijst.

2.4 Gedrag en ontwikkeling

Het temperament van de baby werd door de moeder gerapporteerd met behulp van de korte versie van de herziene Infant Behaviour Questionnaire (IBQ-R) (54,55,57) op T4, 4 - 6 maanden oud, in het Nederlands. De korte versie van de IBQ-R meet het temperament van baby's aan de hand van 37 items over de frequentie van bepaald gedrag in specifieke situaties (spelen, in bad gaan, etc.) in de voorgaande week (bv. 'Hoe vaak glimlachte de baby toen hij in bad werd gedaan?'). Items worden gescoord op een zevenpunts Likert-schaal (1 = nooit, 7 = altijd). Een tweede orde factoranalyse op de scores van de subschalen van de originele IBQ-R (lange versie) resulteerde in de volgende drie brede dimensies die ook worden gebruikt voor de korte versie van de IBQ-R: levendigheid (13 items), negatieve affectiviteit (12 items) en oriëntatie/regulatie (13 items). Levendigheid/extraversie wordt gedefinieerd als een combinatie van lage verlegenheid en hoge benaderingsbereidheid (bv. 'Tijdens een kiekeboe spel, hoe vaak glimlachte de baby?') en is gekoppeld aan de persoonlijkheidskenmerken 'aangenaamheid' en 'extraversie'. Negatieve affectiviteit wordt gedefinieerd als de neiging van een nakomeling om negatieve gevoelens te ervaren (bv. "Hoe vaak maakte de baby zich druk of protesteerde hij/zij toen hij/zij op de rug werd gelegd?") en wordt in verband gebracht met neuroticisme en negatieve emotionaliteit bij volwassenen. Tot slot is oriëntatie/regulatie gedefinieerd als de neiging van een baby om zichzelf te reguleren en is het gekoppeld aan plezier met een lage intensiteit (bv. 'Als de baby rustig speelde met een van zijn/haar favoriete speeltjes, hoe vaak toonde hij/zij dan plezier?') en de duur van het oriënteren (bv. 'Hoe vaak heeft de baby de afgelopen week 5 minuten of langer naar een mobiel, wiegbumper of foto gestaard?') en is het gekoppeld aan het persoonlijkheidskenmerk 'consciëntieusheid'. In onze steekproef vertoonden de IBQ-R subschalen een goede interne consistentie op alle schalen (Cronbach's α = tussen .70 en .90).

Op T6 (3 - 5 jaar) werd de korte versie van de Children's Behaviour Questionnaire (CBQ-R) van Putnam en Rothbart gebruikt (118), die schalen heeft die vergelijkbaar zijn met de IBQ-R. De schaalverschillen tussen de IBQ-R en de CBQ-R zijn het hernoemen van schalen voor de oudere leeftijdsgroep ("duur van oriënteren" naar "aandacht richten" en "snelheid van naderen" naar "positieve anticipatie"), het verwijderen van schalen in de CBQ-R ("affiliatie/aanhaligheid") en het toevoegen van schalen in de CBQ-

R ("ongemak", "impulsiviteit", "remmende controle" en "verlegenheid"). De korte versie van de CBQ-R bevat 36 items met uitspraken over het kind, waarbij de moeder de geschiktheid beoordeelt op een zevenpunts Likert-schaal, gaande van 1 (extreem onwaar) tot 7 (extreem waar). Net als de IBQ-R bevat de CBQ-R drie brede dimensies, namelijk levendigheid/extraversie, negatieve affectiviteit en effortful control, waarbij de laatste hetzelfde is als reguleren/oriënteren in de IBQ, maar met de toegevoegde mogelijkheid voor het kind om de focus te verleggen en vooruit te plannen. Voorbeelden voor elke dimensie zijn "mijn kind gaat graag van hoge glijbanen of andere avontuurlijke activiteiten", "mijn kind wordt boos als hij iets niet kan vinden waarmee hij wil spelen" en "mijn kind benadert plaatsen waarvan hem verteld is dat ze gevaarlijk zijn langzaam en voorzichtig".

2.5 DNA-methylering

Met behulp van 600 ng geëxtraheerd totaal genomisch DNA, werd mtDNA gelineariseerd met BamHI enzym (Thermo Fisher Scientific, Geel, België) en bisulfiet behandeld met behulp van de EZ-96 DNA methylation Gold kit (Zymo Research, Orange, USA) volgens de instructies van de fabrikant.

Methyleringsniveaus op meerdere CpG-plaatsen in 4 NR3C1-promotoramplicons en één IGF2/H19-genclusteramplicon werden bepaald. Er werd gekozen om dezelfde CpG sites te onderzoeken die in een vorige studie van het Steunpunt Welzijn, Volksgezondheid en Gezin ook onderzocht werden (Onderzoeksproject EF56: Onderzoek naar het effect van veerkracht in de perinatale periode). Voorafgaand aan pyrosequencing werden de regio's van interesse geamplificeerd door PCR met PyroMark PCR-kits (Qiagen Inc., Venlo, Nederland) in een thermisch cyclisch apparaat (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Temse, België). Geamplificeerde PCR-producten werden gesequeneerd door pyrosequencing met behulp van het PyroMark Q48 Autoprep systeem (Qiagen, Inc., Venlo, Nederland). De mate van methylering werd gedefinieerd als het percentage gemethyleerde cytosines ten opzichte van de som van gemethyleerde en niet-gemethyleerde cytosines. De resultaten werden gecorrigeerd voor variantie tussen de runs door IRC's (inter-run controlestalen) op elke schijf op te nemen en de gemeten waarden te corrigeren met behulp van ratio's die werden verkregen door het geometrische gemiddelde van de IRC's over alle schijven te delen door elke IRC per schijf (d.w.z. als de IRC lager was dan gemiddeld, was de ratio >1 en namen de methyleringspercentages licht toe). IRC-correctieratio's varieerden tussen 0.90 en 1.10. De efficiëntie van het bisulfietomzettingsproces werd beoordeeld aan de hand van niet-CpG cytosineresten binnen de te analyseren sequentie. Alle pyrogrammen werden visueel geïnspecteerd op mogelijke afwijkingen in het signaal die de uiteindelijke methyleringswaarden zouden kunnen beïnvloeden. Stalen die niet voldeden aan de pyrosequencing kwaliteitscontrole werden uitgesloten van de analyses.

2.6 Statistische analyse

Alle statistische analyses werden uitgevoerd met R versie 4.0.2 (R Core Team, Wenen, Oostenrijk). Om vertekening door ontbrekende gegevens te voorkomen, voerden we meervoudige imputatie uit met behulp van een voorspellende gemiddelde matchingsprocedure met behulp van het "mice" pakket voor R (119). Alle variabelen werden gebruikt voor de analyses (inclusief de onafhankelijke variabelen waargenomen impact van levensgebeurtenissen en dagelijkse problemen en covariabelen: geslacht van de deelnemer, leeftijd, opleiding en rookstatus), behalve de DNA-methyleringswaarden. In totaal werden 105 datasets gegenereerd met een maximum van 20 iteraties. Daarna werden de geïmputeerde datasets samengevoegd met behulp van de functie `merge_imputations` uit het "sjmisc" R-pakket (61),

wat resulteerde in de dataset voor verdere analyses. Voor de waargenomen impact van levensgebeurtenissen hadden we 15 deelnemers met ontbrekende gegevens (17.4%), terwijl we voor de waargenomen impact van dagelijkse beslomeringen 7 deelnemers hadden met ontbrekende gegevens (8.1%). DNA-methylering was beschikbaar voor alle verzamelde stalen en werd daarom niet meegenomen in de imputatie.

Met behulp van lineaire mixed effect modelanalyse maakten we één model per geanalyseerd amplicon. We beschouwden elke CpG-positie van één gen en testten de associaties tussen gen-specifieke DNA-methylering van de baby op de leeftijd van 4 - 6 maanden en de blootstelling van belang (geestelijke gezondheid van de moeder, werkgerelateerde factoren en beschermende factoren en gedrag van het kind op de leeftijd van 4 - 6 maanden of 3 - 5 jaar). Alle lineaire gemengde modellen werden gemaakt met behulp van de pakketten lme4 en lmerTest (120). De hoofdmodellen bevatten de blootstelling van belang en CpG-locatie als vaste effecten. Willekeurige intercepts werden opgenomen voor individuen. Alle modellen werden aangepast voor leeftijd van de moeder, opleidingsniveau, BMI en geslacht en leeftijd van het kind ten tijde van de steekproef, waarbij opleidingsniveau werd gedefinieerd als laag (minder dan een middelbare schooldiploma), gemiddeld (alleen een middelbare schooldiploma) of hoog (hogeschool of universiteit).

3 Resultaten

3.1 Studiepopulatie

De beschrijvende statistieken van de onderzoekspopulatie zijn samengevat in tabel 1. De studie bestond uit 152 moeder-kind paren, waarbij de moeders een gemiddelde leeftijd hadden van 31.6 jaar (SD: +/- 4.4) op T4, wat overeenkomt met baby's van 4 - 6 maanden. De meeste moeders hadden een diploma middelbaar onderwijs (hogeschool of universiteit; n = 122), terwijl 68 deelnemers alleen een diploma lager onderwijs (middelbare school) hadden. De meeste deelnemende moeders waren getrouwd of woonden samen met hun partner (n = 150), terwijl een klein deel alleenstaand was (n = 2). De gemiddelde BMI van de moeder was 24.1 (+/- 4.0).

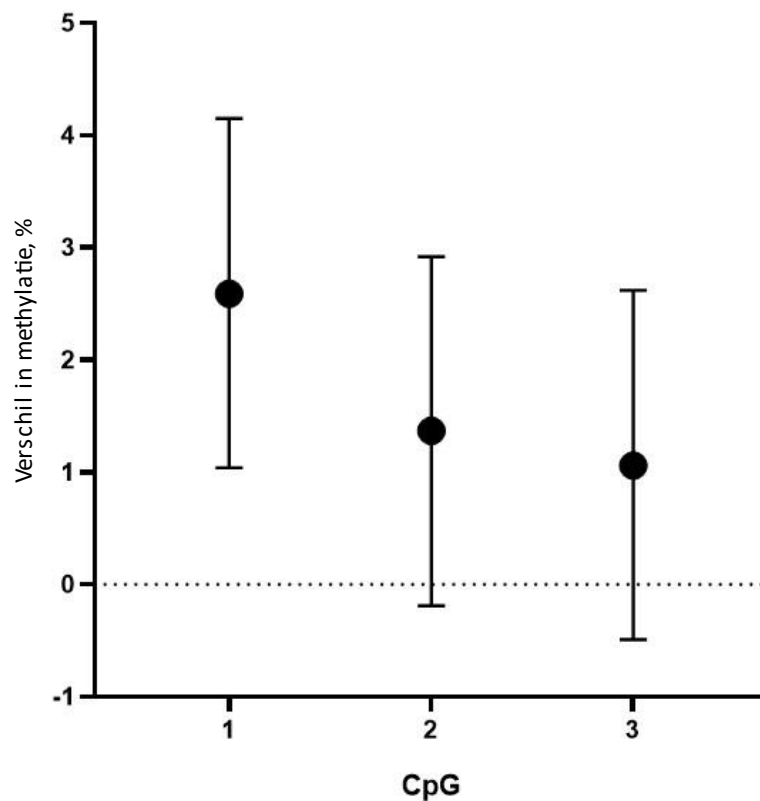
In de leeftijd van 3-5 jaar werden gegevens over het gedrag van kinderen (CBQ) verkregen voor 113 kinderen (deelnamepercentage = 73.9%). De kenmerken van de onderzoekspopulatie verschilden niet significant tussen de steekproef bij de geboorte versus bij de follow-up (zoals beoordeeld met de t-test van de student of de Chi kwadraat, naargelang het geval).

3.2 NR3C1 Methylatie

Absolute DNA-methylering niveaus op vier verschillende amplicons op de promotorregio van het glucocorticoïdreceptor gen (NR3C1) werden onderzocht bij zowel moeders als hun baby's, 4-6 maanden na de geboorte. Verder zagen we dat NR3C1 methylering niveaus van moeder en kind (gemeten in bloed voor moeders, buccale cellen voor de baby) gecorreleerd waren ($r = 0.26$, $p < 0.01$).

Maternale werkgerelateerde fysieke eisen tijdens de zwangerschap (op tijdstip T2) waren geassocieerd met DNA-methylering van baby op NR3C1 Amplicon #1 (figuur 5).

Figuur 5 Associaties tussen baby NR3C1 methylatie en maternale werkgerelateerde fysieke eisen.

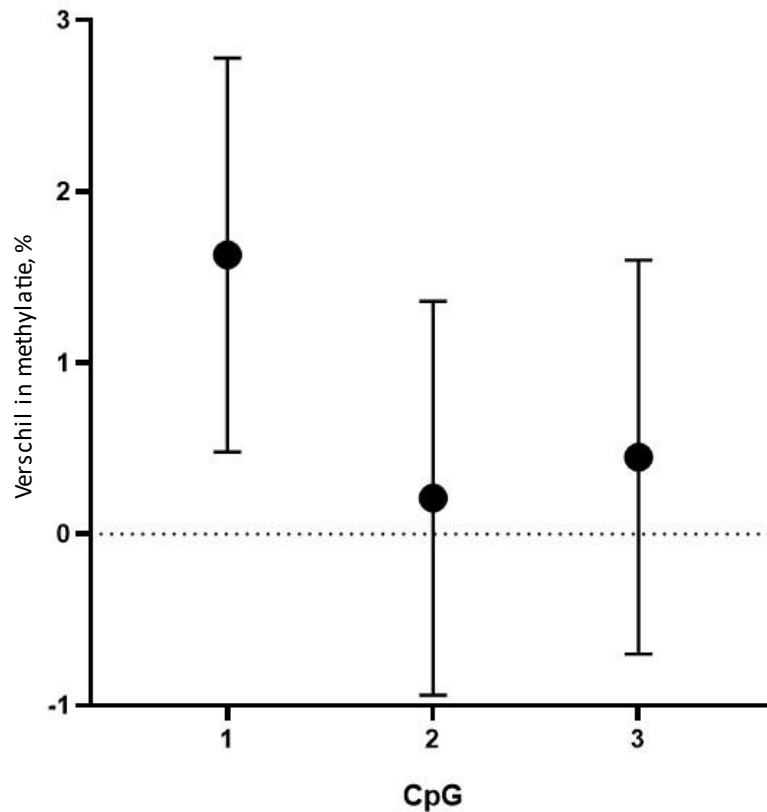


Voor een IQR toename in de fysieke eisen schaal, waren absolute methylering niveaus op de eerste CpG site 2.59% hoger (95%CI: +1.04% tot +4.15%). Vergelijkbare verhogingen werden waargenomen op de andere 2 CpG sites, maar deze waren niet significant op 95% betrouwbaarheidsniveau. Er waren geen andere werkgerelateerde factoren geassocieerd met NR3C1 methylering patronen bij kinderen. Verder zagen we geen associaties tussen indicatoren van de mentale toestand van de moeder (stress, angst, depressieve symptomen) of potentiële beschermende factoren (tevredenheid met hobby's en sociaal leven) tijdens de zwangerschap en NR3C1-methyleringspatronen bij baby van 4 - 6 maanden ($p > 0.05$).

We zagen geen associaties tussen cortisol in het haar van de moeder en DNA-methylering niveaus op een van de vier NR3C1-amplicons ($p > 0.10$).

Levendigheid gedrag van baby's (4 - 6 maanden oud) was geassocieerd met absolute DNA-methylering niveaus op NR3C1-amplicon #1 (figuur 6). Voor een IQR toename in de score van het kind voor overspannen gedrag, stegen de absolute DNA-methylering niveaus op de eerste CpG-site op Amplicon #1 met +1.63% (95%CI: +0.48% tot +1.63%).

Figuur 6 Associaties tussen baby *NR3C1* (Amplicon #1) methylatie en levendigheid gedrag (IBQ-R levendigheid).

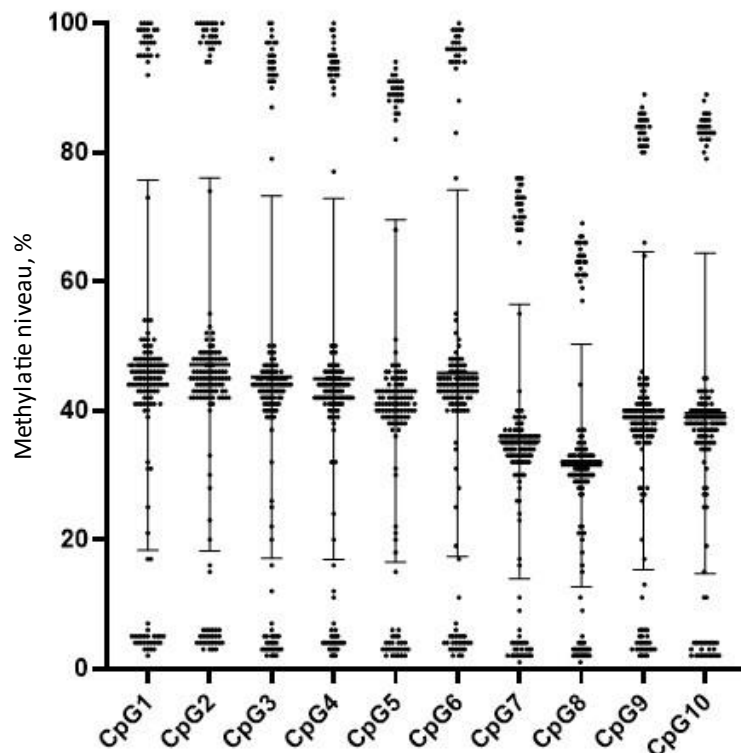


3.3 IGF2/H19 Methylatie

Absolute DNA-methylering niveaus op één amplicon van het IGF2/H19-gencluster werden onderzocht. We zagen dat IGF2/H19 methylering niveaus van moeder en kind (gemeten in bloed voor moeders, mondcellen voor baby) gecorreleerd waren ($r = 0.29$, $p < 0.01$).

Methylering niveaus op dit amplicon waren niet geassocieerd met de mentale toestand van de moeder, beschermende factoren, werkgerelateerde factoren, gedrags- of ontwikkelingsresultaten van het kind ($p > 0.05$). Verder zagen we geen associaties tussen cortisol in het haar van de moeder en DNA-methylering niveaus op het IGF2/H19-amplicon ($p > 0.10$). We zagen echter wel dat, in tegenstelling tot *NR3C1*, de methylering niveaus op het IGF2/H19-gencluster niet normaal verdeeld waren. De methylering waarden lijken te clusteren in 3 verschillende niveaus op dit amplicon: hoog gemethyleerd (>60%), gemiddeld gemethyleerd (30%-60%) en laag gemethyleerd (<30%) (Figuur 7). Bij het indelen van de stalen in deze categorieën zagen we dat baby's met hoog gemethyleerd IGF2/H19-amplicons significant ouder waren (gemiddelde leeftijd = 123 dagen) op het moment dat het staal werd genomen in vergelijking met kinderen met gemiddeld gemethyleerde amplicons ($p < 0,01$, gemiddelde leeftijd = 114 dagen). Op dezelfde manier waren kinderen in de categorie 'laag gemethyleerde amplicons significant' jonger (gemiddelde leeftijd = 108 dagen) in vergelijking met de groep kinderen met gemiddeld gemethyleerde amplicons ($p < 0.01$, gemiddelde leeftijd = 114 dagen).

Figuur 7 Verdeling van de methylatie niveaus op de verschillende CpG sites van het IGF2/H19 amplicon.



4 Discussie

In deze studie onderzochten we DNA methylatie in moeder-kind paren, in relatie met prenatale stress. We hebben de volgende belangrijke bevindingen: i) maternale bloed methylering niveaus van zowel de NR3C1 promotor regio en IGF2/H19 ICR correleerden positief met die van hun baby op de leeftijd van 4 - 6 maanden. ii) maternale werkgerelateerde fysieke eisen tijdens de zwangerschap bleken positief geassocieerd met NR3C1 methylering bij de baby op 4 - 6 maanden, iii) NR3C1 methylering bij de baby was significant en positief geassocieerd met levendigheid-gedrag van baby op de leeftijd van 4 - 6 maanden, maar was niet gerelateerd aan gedragsuitkomsten op de leeftijd van 3 - 5 jaar. iv) IGF2/H19 methylering in mondcellen van de baby bleek zich te clusteren in lage, gemiddelde en hoge methylering niveaus, die werden bepaald door de leeftijd van de baby, maar die niet samenhangen met stressfactoren van de moeder, werkgerelateerde factoren of gedragsuitkomsten die in deze studie werden onderzocht en v) prenataal cortisol bleek negatief samen te hangen met negatief affect bij de baby op de leeftijd van 4 tot 6 maanden.

Hoewel werkstress geassocieerd blijkt te zijn met verschillende methylering patronen van NR3C1 (121), is er zover wij weten geen onderzoek gedaan naar de invloed van werkgerelateerde factoren op de methylering niveaus bij het kind. Ook zijn er geen studies gevonden die NR3C1-methylering in verband brachten met de stress van kinderen, waardoor onze bevindingen zeer nieuw zijn. Dit werd echter niet

gevonden op de leeftijd van 3-5 jaar. Dit zou kunnen worden verklaard door de snelle methylering veranderingen tijdens het vroege leven en de kindertijd in vergelijking met de volwassenheid (123).

Voor zover wij weten, heeft geen enkele studie eerder een clustereffect van IGF2-methyleringsniveau's aangetoond. Wel hebben studies IGF2/H19 methylering onderzocht bij de geboorte en tot de leeftijd van 12 jaar later, met inconsistente resultaten (108,123–125). Drie van de studies vonden geen significant verschil (123–125), maar ze hadden allemaal een studiepopulatie van ongeveer 30 deelnemers. Rijlaarsdam et al. (108) vonden een significante afname in IGF2 methylering op de leeftijd van 7 jaar, met een studiepopulatie van 164. Hoewel het een kwestie van steekproefgrootte kan zijn, vonden we in onze studie nog steeds een toename in IGF2 methylering vanaf de leeftijd van 4 maanden tot 6 maanden, in tegenstelling tot de bevindingen van Rijlaarsdam et al. 2016. We kunnen echter mogelijke veranderingen in het methylering profiel na 6 maanden niet uitsluiten. De dynamiek van IGF2-methylering moet verder worden onderzocht, vooral omdat is aangetoond dat het geassocieerd is met hippocampusvolume (126) en puberteit (127).

Hyper-methylering van NR3C1 blijkt geassocieerd te zijn met gedrag bij baby en kinderen, zoals internaliserende (128) en externaliserende (129) gedragsproblemen op de leeftijd van 4-9 jaar, lagere sociaal-emotionele scores op de leeftijd van 6 en 18 maanden (130) en verhoogde angstigheid bij vrouwelijke baby's van 5 maanden (131). Daarentegen blijkt hypo-methylering bij volwassenen geassocieerd te zijn met depressieve stoornissen (132), posttraumatische stressstoornis, chronisch vermoeidheidssyndroom en ook externaliserende stoornissen (133). Prenatale blootstelling die de methylering niveaus van NR3C1 bij kinderen beïnvloedt, kan daarom langdurige gevolgen hebben voor het kind en moet nader worden onderzocht.

Deze studie had verschillende belangrijke voordelen in vergelijking met bestaande literatuur over dit onderwerp. Ten eerste onderzochten we een breed scala aan potentiële factoren, waaronder stressfactoren bij de moeder, werkgerelateerde factoren, mogelijk beschermende factoren en verschillende gedrags- en ontwikkelingsresultaten voor het kind. Deze studie heeft echter ook beperkingen. We zagen geen associaties tussen de mentale toestand van de moeder en DNA-methylering bij de baby op de leeftijd van 4-6 maanden. Dit kan worden verklaard door het feit dat onze studiepopulatie voornamelijk bestond uit gezonde moeders, met niet veel variatie in mentale toestand (in het bijzonder een ondervertegenwoordiging van uitgesproken negatieve mentale toestand in de steekproef). Bovendien waren we alleen in staat om moeders met een relatief hoog opleidingsniveau te includeren, die mogelijk niet representatief zijn voor de bredere algemene bevolking, waardoor onze mogelijkheid om onze bevindingen te generaliseren beperkt is.

In dit onderzoek werd gevonden dat maternale werkgerelateerde fysieke belasting tijdens de zwangerschap positief geassocieerd was met NR3C1-methylering van het kind, en dat NR3C1-methylering van de baby positief geassocieerd was met levendigheid-gedrag van de baby. IGF2/H19 methylering bleek samen te hangen met de leeftijd van de baby, maar was niet geassocieerd met psychosociale of gedragstests.

Hoofdstuk 4

Beleidsaanbevelingen

Telomeren, beschermende nucleoproteïestructuren aan het einde van chromosomen, zijn moleculaire merkers voor biologische veroudering en ziektegevoeligheid. De beleidsrelevantie van deze studies is mede gebaseerd op de bevinding dat telomeerlengte vroeg in het leven de belangrijkste voorspeller blijft voor telomeerlengte later in het leven (134). Dit is een belangrijk gegeven dat de waarde onderstreept van de Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothese.

Het concept van Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) benadrukt de cruciale rol van de vroege levensfase in het bepalen van de gezondheid gedurende de levensloop. Onderzoek binnen DOHaD richt zich op het begrijpen van hoe blootstellingen aan omgevingsfactoren, vooral tijdens de prenatale en vroege postnatale periode, invloed kunnen hebben op de latere gezondheid van individuen. De geïntegreerde aanpak van DOHaD onderstreept het belang van het bestuderen van zowel genetische als omgevingsinvloeden, en hoe deze interacties bepalend kunnen zijn voor de ontwikkeling van ziekten op latere leeftijd.

In het specifieke geval van onderzoek naar telomeerlengte binnen het DOHaD-kader wordt het duidelijk dat telomeerlengte, als een indicator van biologische veroudering, een waardevolle merker is voor het begrijpen van hoe levensomstandigheden tijdens het vroege leven (van bij de conceptie tot en met de eerste levensjaren) gezondheidstrajecten kunnen beïnvloeden. Deze benadering is van bijzonder belang en onderstreept het belang van het nemen van beleidsmaatregelen die gericht zijn op het bevorderen van gezonde zwangerschappen, het minimaliseren van stressfactoren en het ondersteunen van ouders tijdens de cruciale periode van de vroege kindertijd.

Door middel van de integratie van DOHaD-principes in beleidsvorming kunnen we doelgerichte strategieën ontwikkelen die niet alleen de gezondheid van individuen verbeteren maar ook bijdragen aan de preventie van chronische ziekten op populatieniveau. Met deze bredere DOHaD-context streven we naar een geïntegreerde benadering van beleidsvorming die de bevindingen van het biologisch onderzoek vertaalt naar concrete maatregelen ter ondersteuning van de gezondheid en ontwikkeling van de huidige en toekomstige generaties.

Belangrijkste Bevindingen en Beleidsimplicaties:

1. Vroege Invloed van Maternale Werkgerelateerde Factoren op Telomeerlengte:

- De balans tussen inspanning en beloning op het werk van de moeder tijdens de zwangerschap is geassocieerd met telomeerlengte bij de pasgeborenen. Een minder goede balans hangt samen met kortere telomeren bij het kind.
- **Beleidsaanbeveling:** Implementeer voorlichtingsprogramma's en ondersteuningsmechanismen voor zwangere vrouwen om stressniveaus te verminderen, wat mogelijk de gezondheid van hun kinderen op lange termijn ten goede komt. Deze studie toonde aan dat de balans tussen inspanning en beloning op het werk ook een invloed heeft op de gezondheid van het kind. Er moet dus ook gekeken worden naar interventies die gericht zijn op het verbeteren van de werksituaties van beroepsactieve zwangere vrouwen.

2. Telomeerlengte als Voorspeller van Gedragssuitkomsten:

- Telomeerlengte van het kind bij de geboorte is geassocieerd met het gedrag van het kind zowel in de postnatale periode als in de vroege kindertijd.
- **Beleidsaanbeveling:** Telomeerlengte kan in dit kader niet gebruikt worden als screeningstool, daarvoor is de merker niet specifiek genoeg. Het is immers belangrijk om te benadrukken dat diverse factoren zoals genetische predispositie, omgevingsinvloeden, en individuele variaties allemaal bijdragen aan de complexiteit van deze relatie. Dit onderzoek helpt wel bij het begrijpen van de onderliggende mechanismen die ten grondslag liggen aan de relatie tussen telomeerlengte en gedrag, hetgeen zeer belangrijk is om op termijn (met aanvullende wetenschappelijke kennis) tot meer causale interpretaties te kunnen komen.

3. Prenatale Maternale Cortisolniveaus en Gedrag van het kind:

- Maternale cortisolniveaus tijdens de zwangerschap zijn geassocieerd met het gedrag van het kind.
- **Beleidsaanbeveling:** Ondersteun interdisciplinaire programma's en zorgtrajecten voor (mentale) gezondheidsmonitoring tijdens de zwangerschap, en bied psychosociale ondersteuning aan zwangere vrouwen die het nodig hebben om chronische stress te vermijden (en dus cortisolniveaus te beheersen).

Besluit: Het begrijpen van de biologische mechanismen die ten grondslag liggen aan vroege levensomstandigheden en hun impact op telomeerlengte biedt waardevolle inzichten voor het vormgeven van beleid gericht op het verbeteren van de gezondheid en welzijn van de huidige en toekomstige generaties. De resultaten van deze studies dragen bij aan deze kennis. Ze benadrukken ook nogmaals het potentieel om, via interventies gericht op het vroege leven, tot op biologisch moleculair niveau de gezondheid van toekomstige generaties te verbeteren.

Referenties

1. Franke K, Van den Bergh BRH, de Rooij SR, Kroegel N, Nathanielsz PW, Rakers F, et al. Effects of maternal stress and nutrient restriction during gestation on offspring neuroanatomy in humans. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020 Oct;117:5–25.
2. Van Den Bergh BRH, Dahnke R, Mennes M. Prenatal stress and the developing brain: Risks for neurodevelopmental disorders. *Development and Psychopathology*. 2018 Aug 1;30(3):743–62.
3. Van den Bergh BRH, van den Heuvel MI, Lahti M, Braeken M, de Rooij SR, Entringer S, et al. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2020;117:26–64.
4. Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*. 2015 Dec 4;350(6265):1193–8.
5. Entringer S, Epel ES, Lin J, Buss C, Shahbaba B, Blackburn EH, et al. Maternal psychosocial stress during pregnancy is associated with newborn leukocyte telomere length. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2013 Feb;208(2):134.e1-134.e1347.
6. Send TS, Gilles M, Codd V, Wolf I, Bardtke S, Streit F, et al. Telomere Length in Newborns is Related to Maternal Stress During Pregnancy. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2017 Nov;42(12):2407–13.
7. Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Aug 16;108(33):E513–8.
8. Verner G, Epel E, Lahti-Pulkkinen M, Kajantie E, Buss C, Lin J, et al. Maternal Psychological Resilience During Pregnancy and Newborn Telomere Length: A Prospective Study. *The American journal of psychiatry*. 2021 Feb;178(2):183–92.
9. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Dec 7;101(49):17312–5.
10. Ridout KK, Ridout SJ, Goonan K, Tyrka AR, Price LH. Telomeres and Early Life Stress [Internet]. *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*. Elsevier; 2017. 185–193 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802175-0.00018-8>
11. Epel ES, Prather AA. Stress, Telomeres, and Psychopathology: Toward a Deeper Understanding of a Triad of Early Aging. *Annual review of clinical psychology*. 2018 May 7;14:371–97.
12. Ridout KK, Ridout SJ, Price LH, Sen S, Tyrka AR. Depression and telomere length: A meta-analysis. *Journal of affective disorders*. 2016 Feb;191:237–47.
13. Brummelte S, Galea LAM. Postpartum depression: Etiology, treatment and consequences for maternal care. *Hormones and Behavior*. 2016;77:153–66.

14. Martens DS, Cox B, Janssen BG, Clemente DBP, Gasparrini A, Vanpoucke C, et al. Prenatal Air Pollution and Newborns' Predisposition to Accelerated Biological Aging. *JAMA Pediatr.* 2017 Dec 1;171(12):1160–7.
15. Zong ZQ, Chen SW, Wu Y, Gui SY, Zhang XJ, Hu CY. Ambient air pollution exposure and telomere length: a systematic review and meta-analysis. *Public Health.* 2023 Feb;215:42–55.
16. Miri M, de Prado-Bert P, Alahabadi A, Najafi ML, Rad A, Moslem A, et al. Association of greenspace exposure with telomere length in preschool children. *Environmental Pollution.* 2020 Nov 1;266(Pt 1).
17. De Ruyter T, Martens DS, Bijmens EM, Nawrot TS, De Henauw S, Michels N. A multi-exposure approach to study telomere dynamics in childhood: A role for residential green space and waist circumference. *Environ Res.* 2022 Oct;213:113656.
18. Mathur MB, Epel E, Kind S, Desai M, Parks CG, Sandler DP, et al. Perceived stress and telomere length: A systematic review, meta-analysis, and methodologic considerations for advancing the field. *Brain Behav Immun.* 2016 May;54:158–69.
19. Schutte NS, Malouff JM. A meta-analytic review of the effects of mindfulness meditation on telomerase activity. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;42:45–8.
20. Martens DS, Van Der Stukken C, Derom C, Thiery E, Bijmens EM, Nawrot TS. Newborn telomere length predicts later life telomere length: Tracking telomere length from birth to child- and adulthood. *EBioMedicine.* 2021 Jan;63:103164.
21. Benetos A, Kark JD, Susser E, Kimura M, Sinnreich R, Chen W, et al. Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging Cell.* 2013 Aug;12(4):615–21.
22. Osler M, Bendix L, Rask L, Rod NH. Stressful life events and leucocyte telomere length: Do lifestyle factors, somatic and mental health, or low grade inflammation mediate this relationship? Results from a cohort of Danish men born in 1953. *Brain Behav Immun.* 2016 Nov;58:248–53.
23. Marchetto NM, Glynn RA, Ferry ML, Ostojic M, Wolff SM, Yao R, et al. Prenatal stress and newborn telomere length. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 Jul;215(1):94.e1-8.
24. Bosquet Enlow M, Sideridis G, Chiu YHM, Nentin F, Howell EA, Le Grand BA, et al. Associations among maternal socioeconomic status in childhood and pregnancy and hair cortisol in pregnancy. *Psychoneuroendocrinology.* 2019 Jan;99:216–24.
25. Gotlib IH, Lemoult J, Colich NL. Telomere length and cortisol reactivity in children of depressed mothers. *Molecular Psychiatry.* 2015;20(5):615–20.
26. Chen L, Ling KTM, Gong M. Variability in newborn telomere length is explained by inheritance and intrauterine environment. *BMC Medicine.* 2022;20(1).
27. Salihu HM, King LM, Nwoga C. Association Between Maternal-Perceived Psychological Stress and Fetal Telomere Length. *South Med J.* 2016;109(12):767–72.
28. Khalil D, PhD GC, RF M, DP T, T J, E D, et al. Psychosocial Factors and Telomere Length Among Parents and Infants of Immigrant Arab American Families. *Biological research for nursing.* 2023;25(1):137–49.

29. Ämmälä AJ, Vitikainen EIK, Hovatta I. Maternal stress or sleep during pregnancy are not reflected on telomere length of newborns. *Scientific Reports*. 2020;10(13986).
30. Minamoto T, Nakayama K, Ishibashi T. Pregnancy by assisted reproductive technology is associated with shorter telomere length in neonates. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(9688).
31. Braithwaite EC, Pickles A, Sharp H. Maternal prenatal cortisol predicts infant negative emotionality in a sex-dependent manner. *Physiol Behav*. 2017;175:31–6.
32. Davis EP, Sandman CA. The Timing of Prenatal Exposure to Maternal Cortisol and Psychosocial Stress Is Associated With Human Infant Cognitive Development. *Child Development*. 2010;81(1):131–48.
33. Fleck L, Fuchs A, Sele S. Prenatal stress and child externalizing behavior: effects of maternal perceived stress and cortisol are moderated by child sex. *Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health*. 2023;17(1).
34. Buss C, Davis EP, Shahbaba B, Pruessner JC, Head K, Sandman CA. Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(20):E1312–9.
35. LeWinn KZ, Stroud LR, Molnar BE, Ware JH, Koenen KC, Buka SL. Elevated maternal cortisol levels during pregnancy are associated with reduced childhood IQ. *International journal of epidemiology*. 2009;38(6):1700–10.
36. Andreasen JJ, Tobiasen BB, Jensen RC. Maternal cortisol in 3rd trimester is associated with traits of neurodevelopmental disorder in offspring. *Odense Child Cohort Psychoneuroendocrinology*. 2023;154:106293.
37. Gampawar P, Schmidt R, Schmidt H. Telomere length and brain aging: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2022 Sep;80:101679.
38. Yim OS, Zhang X, Shalev I, Monakhov M, Zhong S, Hsu M, et al. Delay discounting, genetic sensitivity, and leukocyte telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 8;113(10):2780–5.
39. Starnino L, Dupuis G, Busque L. The associations of hostility and defensiveness with telomere length are influenced by sex and health status. *Biology of Sex Differences*. 2021;12(1).
40. Brydon L, Lin J, Butcher L, Hamer M, Erusalimsky JD, Blackburn EH, et al. Hostility and cellular aging in men from the Whitehall II cohort. *Biol Psychiatry*. 2012 May 1;71(9):767–73.
41. Watkins LE, Harpaz-Rotem I, Sippel LM, Krystal JH, Southwick SM, Pietrzak RH. Hostility and telomere shortening among U.S. military veterans: Results from the National Health and Resilience in Veterans Study. *Psychoneuroendocrinology*. 2016 Dec;74:251–7.
42. Li X, Cai J, Yang L, Zhang X, Deng W, Ni P, et al. Correlation between reduced telomere length and behavioural and emotional problems in left-behind children in a rural area in China. *Psychoneuroendocrinology*. 2022 Jun;140:105732.

43. Chen J, Li Q, Rialdi A, Mystal E, Ly J, Finik J, et al. Influences of Maternal Stress during Pregnancy on the Epi/genome: Comparison of Placenta and Umbilical Cord Blood. *Journal of depression & anxiety*. 2014;3(2).
44. Feiler MO, Patel D, Li H, Meacham PJ, Watson GE, Shamlaye C, et al. The association between early-life relative telomere length and childhood neurodevelopment. *Neurotoxicology*. 2018 Mar;65:22–7.
45. Costa D de S, Rosa DVF, Barros AGA, Romano-Silva MA, Malloy-Diniz LF, Mattos P, et al. Telomere length is highly inherited and associated with hyperactivity-impulsivity in children with attention deficit/hyperactivity disorder. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:28.
46. Pham C, Vryer R, O’Hely M, Mansell T, Burgner D, Collier F, et al. Shortened Infant Telomere Length Is Associated with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in Children at Age Two Years: A Birth Cohort Study. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 21;23(9).
47. Wojcicki JM, Heyman MB, Elwan D, Shiboski S, Lin J, Blackburn E, et al. Telomere length is associated with oppositional defiant behavior and maternal clinical depression in Latino preschool children. *Transl Psychiatry*. 2015 Jun 16;5(6):e581.
48. Henje Blom E, Han LKM, Connolly CG, Ho TC, Lin J, LeWinn KZ, et al. Peripheral telomere length and hippocampal volume in adolescents with major depressive disorder. *Transl Psychiatry*. 2015 Nov 10;5(11):e676.
49. Broer L, Codd V, Nyholt DR. Meta-analysis of telomere length in 19 713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *European Journal of Human Genetics*. 2013;21(10):1163–8.
50. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE. STAI manual for the Stait-Trait Anxiety Inventory (‘self-evaluation questionnaire’). [Palo Alto, Calif: Consulting Psychologists Press; 1970.
51. Cox JL, Holden JM, Sagovsky R. Detection of postnatal depression. Development of the 10-item Edinburgh Postnatal Depression Scale. *Br J Psychiatry*. 1987 Jun;150:782–6.
52. Kristensen TS, Hannerz H, Høgh A, Borg V. The Copenhagen Psychosocial Questionnaire—a tool for the assessment and improvement of the psychosocial work environment. *Scandinavian journal of work, environment & health*. 2005 Dec;31(6):438–49.
53. Siegrist J. Effort-reward imbalance at work and health. In: Perrewe PL, Ganster DC, editors. *Historical and Current Perspectives on Stress and Health* [Internet]. Emerald Group Publishing Limited; 2002 [cited 2023 Sep 25]. p. 261–91. (Research in Occupational Stress and Well Being; vol. 2). Available from: [https://doi.org/10.1016/S1479-3555\(02\)02007-3](https://doi.org/10.1016/S1479-3555(02)02007-3)
54. Gartstein MA, Rothbart MK. Studying infant temperament via the Revised Infant Behavior Questionnaire. *Infant Behavior and Development*. 2003 Feb 1;26(1):64–86.
55. Putnam SP, Helbig AL, Gartstein MA, Rothbart MK, Leerkes E. Development and assessment of short and very short forms of the infant behavior questionnaire-revised. *Journal of personality assessment*. 2014;96(4):445–58.
56. Putnam SP, Rothbart MK. Development of short and very short forms of the Children’s Behavior Questionnaire. *Journal of personality assessment*. 2006 Aug;87(1):102–12.

57. Rothbart MK, Ahadi SA, Hershey KL, Fisher P. Investigations of temperament at three to seven years: the Children's Behavior Questionnaire. *Child development*. 2001;72(5):1394–408.
58. Putnam SP, Gartstein MA, Rothbart MK. Measurement of fine-grained aspects of toddler temperament: The Early Childhood Behavior Questionnaire. *Infant Behavior and Development*. 2006;29(3):386–401.
59. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(3):21.
60. Stoffel MA, Nakagawa S, Schielzeth H.
61. Lüdecke D. sjmisc: Data and Variable Transformation Functions. *Journal of Open Source Software*. 2018;754.
62. Asghar M, Bensch S, Tarka M, Hansson B, Hasselquist D. Maternal and genetic factors determine early life telomere length. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015;282(1799):20142263.
63. Factor-Litvak P, Susser E, Kezios K. Leukocyte Telomere Length in Newborns: Implications for the Role of Telomeres in Human Disease. *Pediatrics*. 2016;137(4):20153927.
64. Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet*. 2004 Feb 14;363(9408):507–10.
65. Nordfjäll K, Svenson U, Norrback KF, Adolfsson R, Roos G. Large-scale parent–child comparison confirms a strong paternal influence on telomere length. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18(3):385–9.
66. Grey KR, Davis EP, Sandman CA, Glynn LM. Human milk cortisol is associated with infant temperament. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(7):1178–85.
67. Leppänen MH, Sääksjärvi K, Vepsäläinen H. Association of screen time with long-term stress and temperament in preschoolers: results from the DAGIS study. *European Journal of Pediatrics*. 2020;179(11):1805–12.
68. Rouse MH, Goodman SH. Perinatal depression influences on infant negative affectivity: Timing, severity, and co-morbid anxiety. *Infant Behavior and Development*. 2014;37(4):739–51.
69. M BE, KL D, KJ B, LR L, BA C, RJ W. Maternal Lifetime Trauma Exposure, Prenatal Cortisol, and Infant Negative Affectivity. *Infancy*. 2017;22(4):492–513.
70. Davis EP, Glynn LM, Schetter CD, Hobel C, Chicz-Demet A, Sandman CA. Prenatal Exposure to Maternal Depression and Cortisol Influences Infant Temperament. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2007;46(6):737–46.
71. C W, Y H, JK B. Prenatal maternal cortisol levels and infant behavior during the first 5 months. *Early human development*. 2003;74(2):139–51.
72. Graham AM, Rasmussen JM, Entringer S, Ben Ward E, Rudolph MD, Gilmore JH, et al. Maternal Cortisol Concentrations During Pregnancy and Sex-Specific Associations With

- Neonatal Amygdala Connectivity and Emerging Internalizing Behaviors. *Biological Psychiatry*. 2019;85(2):172–81.
73. Campbell RK, Devick KL, Coull BA. Prenatal cortisol modifies the association between maternal trauma history and child cognitive development in a sex-specific manner in an urban pregnancy cohort. *Stress*. 2019;22(2):228–35.
 74. Giesbrecht GF, Letourneau N, Campbell TS, Alberta Pregnancy O, Nutrition Study T. Sexually dimorphic and interactive effects of prenatal maternal cortisol and psychological distress on infant cortisol reactivity. *Dev Psychopathol*. 2017;29(3):805–18.
 75. Kroenke CH, Epel E, Adler N. Autonomic and Adrenocortical Reactivity and Buccal Cell Telomere Length in Kindergarten Children. *Psychosomatic Medicine*. 2011;73(7):533–40.
 76. Sosnowski DW, Kliewer W, Valrie CR, Winter MA, Serpell Z, Amstadter AB. The Association Between Adverse Childhood Experiences and Child Telomere Length: Examining Self-Regulation as a Behavioral Mediator. *Child Development*. 2021;92(2):746–59.
 77. Dolcini-Catania LG, Byrne ML, Whittle S, Schwartz O, Simmons JG, Allen NB. Temperament and Symptom Pathways to the Development of Adolescent Depression. *Journal of Abnormal Child Psychology*. 2020;48(6):839–49.
 78. Liu W, Guo X, Liu F, Sun Y. The Role of Emotion Regulation Strategies in the Relationship Between Temperament and Depression in Preadolescents. *Child Psychiatry & Human Development*. 2022;
 79. Janssen JA, Kolacz J, Shanahan L. Childhood temperament predictors of adolescent physical activity. *BMC Public Health*. 2017;17(1).
 80. Shiner RL, Masten AS, Roberts JM. Childhood Personality Foreshadows Adult Personality and Life Outcomes Two Decades Later. *Journal of Personality*. 2003;71(6):1145–70.
 81. Schoormans D, Verhoeven JE, Denollet J, Poll-Franse L, Penninx BWJH. Leukocyte telomere length and personality: associations with the Big Five and Type D personality traits. *Psychological Medicine*. 2018;48(6):1008–19.
 82. Suzuki A, Matsumoto Y, Enokido M, Shirata T, Goto K, Otani K. Relationship between interpersonal sensitivity and leukocyte telomere length. *BMC Medical Genetics*. 2017;18(1).
 83. Beijers R, Daehn D, Shalev I, Belsky J, Weerth C. Biological embedding of maternal postpartum depressive symptoms: The potential role of cortisol and telomere length. *Biological Psychology*. 2020;150:107809.
 84. Denham J, Sellami M. Exercise training increases telomerase reverse transcriptase gene expression and telomerase activity: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*. 2021;70:101411.
 85. Fu W, Lu C, Mattson MP. Telomerase Mediates the Cell Survival-Promoting Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Secreted Amyloid Precursor Protein in Developing Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22(24):10710–9.
 86. Saretzki G. Telomerase and neurons: an unusual relationship. *Neural Regen Res*. 2022;17(11):2364–7.

87. Innes KE, Selfe TK, Brundage K. Effects of Meditation and Music-Listening on Blood Biomarkers of Cellular Aging and Alzheimer's Disease in Adults with Subjective Cognitive Decline: An Exploratory Randomized Clinical Trial. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2018;66(3):947–70.
88. Lavretsky H, Epel ES, Siddarth P. A pilot study of yogic meditation for family dementia caregivers with depressive symptoms: effects on mental health, cognition, and telomerase activity. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2013;28(1):57–65.
89. Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Telomere position effect in human cells. *Science*. 2001;292(5524):2075–7.
90. Chevalier R, Pienkowska VM, Jullien N, Caron L, Magdinier F, Robin JD. Telomere Position Effect Over Long Distance acts as a genome-wide epigenetic regulator through a common *cis*-element. Cold Spring Harbor Laboratory; 2022.
91. Bateson M, Nettle D. Why are there associations between telomere length and behaviour? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2018;373(1741):20160438.
92. Thomas P, NJ OC, Fenech M. Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(4):183–90.
93. Xu L, Qiu Z, Cong YS. Comparison of Telomere Length between Buccal Cells and Blood Cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2022;173(5):677–9.
94. Cao-Lei L, de Rooij SR, King S, Matthews SG, Metz GAS, Roseboom TJ, et al. Prenatal stress and epigenetics. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2020 Oct;117:198–210.
95. Ceruso A, Martínez-Cengotitabengoa M, Peters-Corbett A, Diaz-Gutierrez MJ, Martínez-Cengotitabengoa M. Alterations of the HPA Axis Observed in Patients with Major Depressive Disorder and Their Relation to Early Life Stress: A Systematic Review. *Neuropsychobiology*. 2020;79(6):417–27.
96. Mikulska J, Juszczak G, Gawrońska-Grzywacz M, Herbet M. HPA Axis in the Pathomechanism of Depression and Schizophrenia: New Therapeutic Strategies Based on Its Participation. *Brain Sci*. 2021 Sep 30;11(10).
97. Juruena MF, Erer F, Cleare AJ, Young AH. The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1191:141–53.
98. Cao-Lei L, van den Heuvel MI, Huse K, Platzer M, Elgbeili G, Braeken MAKA, et al. Epigenetic Modifications Associated with Maternal Anxiety during Pregnancy and Children's Behavioral Measures. *Cells*. 2021;10(9).
99. Wiegand A, Munk MHJ, Drohm S, Fallgatter AJ, Maclsaac JL, Kobor MS, et al. Neural correlates of attentional control in social anxiety disorder: the impact of early-life adversity and DNA methylation. *J Psychiatry Neurosci*. 2021 Dec;46(6):E663–74.
100. Dereix AE, Ledyard R, Redhunt AM, Bloomquist TR, Brennan KJ, Baccarelli AA, et al. Maternal anxiety and depression in pregnancy and DNA methylation of the NR3C1

- glucocorticoid receptor gene. *Epigenomics* [Internet]. 2020 Nov 20 [cited 2021 Feb 2]; Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/epi-2020-0022>
101. Zhu JH, Bo HH, Liu BP, Jia CX. The associations between DNA methylation and depression: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2023 Apr 14;327:439–50.
 102. Azar N, Booij L. DNA methylation as a mediator in the association between prenatal maternal stress and child mental health outcomes: Current state of knowledge. *J Affect Disord*. 2022 Dec 15;319:142–63.
 103. Sélénou C, Brioude F, Giabicani E, Sobrier ML, Netchine I. IGF2: Development, Genetic and Epigenetic Abnormalities. *Cells*. 2022 Jun 10;11(12).
 104. Zhang S, Zhai G, Wang J, Shi W, Zhang R, Chen C. IGF-II expression and methylation in small for gestational age infants. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015 May;28(5–6):613–8.
 105. De Bie HMA, Oostrom KJ, Boersma M, Veltman DJ, Barkhof F, Delemarre-van de Waal HA, et al. Global and regional differences in brain anatomy of young children born small for gestational age. *PLoS One*. 2011;6(9):e24116.
 106. Sakatani T, Wei M, Katoh M, Okita C, Wada D, Mitsuya K, et al. Epigenetic heterogeneity at imprinted loci in normal populations. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001 May;283(5):1124–30.
 107. Choi YJ, Cho J, Hong YC, Lee DW, Moon S, Park SJ, et al. DNA methylation is associated with prenatal exposure to sulfur dioxide and childhood attention-deficit hyperactivity disorder symptoms. *Sci Rep*. 2023 Mar 1;13(1):3501.
 108. Rijlaarsdam J, Cecil CAM, Walton E, Mesirov MSC, Relton CL, Gaunt TR, et al. Prenatal unhealthy diet, insulin-like growth factor 2 gene (IGF2) methylation, and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in youth with early-onset conduct problems. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2017 Jan;58(1):19–27.
 109. Mansell T, Novakovic B, Meyer B, Rzehak P, Vuillermin P, Ponsonby AL, et al. The effects of maternal anxiety during pregnancy on IGF2/H19 methylation in cord blood. *Translational psychiatry*. 2016 Mar;6(3):e765.
 110. Vangeel EB, Izzi B, Hompes T, Vansteelandt K, Lambrechts D, Freson K, et al. DNA methylation in imprinted genes IGF2 and GNASXL is associated with prenatal maternal stress. *Genes Brain Behav*. 2015 Nov;14(8):573–82.
 111. Fransquet PD, Hjort L, Rushiti F, Wang SJ, Krasniqi SP, Çarkaxhiu SI, et al. DNA methylation in blood cells is associated with cortisol levels in offspring of mothers who had prenatal post-traumatic stress disorder. *Stress and health : journal of the International Society for the Investigation of Stress*. 2022 Oct;38(4):755–66.
 112. Stonawski V, Frey S, Golub Y, Rohleder N, Kriebel J, Goecke TW, et al. Associations of prenatal depressive symptoms with DNA methylation of HPA axis-related genes and diurnal cortisol profiles in primary school-aged children. *Development and psychopathology*. 2019 May;31(2):419–31.

113. Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*. 2008;3(2):97–106.
114. Braithwaite EC, Kundakovic M, Ramchandani PG, Murphy SE, Champagne FA. Maternal prenatal depressive symptoms predict infant NR3C1 1F and BDNF IV DNA methylation. *Epigenetics*. 2015;10(5):408–17.
115. Müller S, Moser D, Frach L, Wimberger P, Nitzsche K, Li SC, et al. No long-term effects of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on epigenetic regulation of stress-related genes. *Translational psychiatry*. 2022 Feb;12(1):62.
116. Wadji DL, Morina N, Martin-Soelch C, Wicky C. Methylation of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in dyads mother-child exposed to intimate partner violence in Cameroon: Association with anxiety symptoms. *PloS one*. 2023;18(4):e0273602.
117. Spielberger CD. State-Trait Anxiety Inventory [Internet]. Vol. 19, Anxiety. 1987. 2009 p. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470479216.corpsy0943/full>
118. Putnam SP, Gartstein MA, Rothbart MK. Measurement of fine-grained aspects of toddler temperament: the early childhood behavior questionnaire. *Infant behavior & development*. 2006 Jul;29(3):386–401.
119. van Buuren S, Groothuis-Oudshoorn K. mice: Multivariate imputation by chained equations in R. *Journal of Statistical Software*. 2011 Dec 12;45(3):1–67.
120. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*. 2015;67(1):1–48.
121. Bakusic J, Ghosh M, Polli A, Bekaert B, Schaufeli W, Claes S, et al. Role of NR3C1 and SLC6A4 methylation in the HPA axis regulation in burnout. *Journal of affective disorders*. 2021 Dec;295:505–12.
122. Alisch RS, Barwick BG, Chopra P, Myrick LK, Satten GA, Conneely KN, et al. Age-associated DNA methylation in pediatric populations. *Genome research*. 2012 Apr;22(4):623–32.
123. Murphy SK, Huang Z, Hoyo C. Differentially methylated regions of imprinted genes in prenatal, perinatal and postnatal human tissues. *PloS one*. 2012;7(7):e40924.
124. Dolinko AV, Schultz BM, Ghosh J, Kalliora C, Mainigi M, Coutifaris C, et al. Disrupted methylation patterns at birth persist in early childhood: a prospective cohort analysis. *Clinical epigenetics*. 2022 Oct;14(1):129.
125. Piyasena C, Cartier J, Provençal N, Wiechmann T, Khulan B, Sunderesan R, et al. Dynamic Changes in DNA Methylation Occur during the First Year of Life in Preterm Infants. *Frontiers in endocrinology*. 2016;7:158.
126. Lorgen-Ritchie M, Murray AD, Staff R, Ferguson-Smith AC, Richards M, Horgan GW, et al. Imprinting methylation predicts hippocampal volumes and hyperintensities and the change with age in later life. *Scientific Reports*. 2021 Jan 13;11(1):943.

127. Wu Y, Peterson KE, Sánchez BN, Dolinoy DC, Mercado-Garcia A, Téllez-Rojo MM, et al. Association of blood leukocyte DNA methylation at LINE-1 and growth-related candidate genes with pubertal onset and progression. *Epigenetics*. 2018;13(12):1222–33.
128. Parade SH, Ridout KK, Seifer R, Armstrong DA, Marsit CJ, McWilliams MA, et al. Methylation of the Glucocorticoid Receptor Gene Promoter in Preschoolers: Links With Internalizing Behavior Problems. *Child Dev*. 2016 Feb;87(1):86–97.
129. Cicchetti D, Handley ED. Methylation of the glucocorticoid receptor gene, nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (NR3C1), in maltreated and nonmaltreated children: Associations with behavioral undercontrol, emotional lability/negativity, and externalizing and internalizing symptoms. *Dev Psychopathol*. 2017 Dec;29(5):1795–806.
130. Folger AT, Ding L, Ji H, Yolton K, Ammerman RT, Van Ginkel JB, et al. Neonatal NR3C1 Methylation and Social-Emotional Development at 6 and 18 Months of Age. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2019 Feb 5;13:14.
131. Ostlund BD, Conradt E, Crowell SE, Tyrka AR, Marsit CJ, Lester BM. Prenatal Stress, Fearfulness, and the Epigenome: Exploratory Analysis of Sex Differences in DNA Methylation of the Glucocorticoid Receptor Gene. *Front Behav Neurosci*. 2016;10:147.
132. Na KS, Chang HS, Won E, Han KM, Choi S, Tae WS, et al. Association between glucocorticoid receptor methylation and hippocampal subfields in major depressive disorder. *PLoS One*. 2014;9(1):e85425.
133. Heinrich A, Buchmann AF, Zohsel K, Dukal H, Frank J, Treutlein J, et al. Alterations of Glucocorticoid Receptor Gene Methylation in Externalizing Disorders During Childhood and Adolescence. *Behav Genet*. 2015 Sep;45(5):529–36.
134. Martens DS, Stukken C, Derom C, Thiery E, Bijmens EM, Nawrot TS. Newborn telomere length predicts later life telomere length: Tracking telomere length from birth to child- and adulthood. *EBioMedicine*. 2021;63:103164.

