

Aus dem CharitéCentrum Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum
und Humangenetik
Klinik für Neonatologie
Direktor: Professor Dr. Christoph Bühner

Habilitationsschrift

Schädigung des unreifen Gehirns der Maus und der Ratte durch neonatale Hyperoxie

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Kinder- und Jugendmedizin

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité Universitätsklinikum Berlin

Von Dr. med. Thomas Schmitz

Eingereicht: 15. Dezember 2015

Öffentlicher wiss. Vortrag: 13. Juni 2016

Antrittsvorlesung: 07. Juli 2016

Dekan: Professor Dr. Axel R. Pries

1. Gutacherin: Prof. Dr. med. Jutta Gärtner, Göttingen

2. Gutachterin: Prof. Dr. Ingeborg Krägeloh-Mann, Tübingen

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	3
1.1 Neurologische Folgen von Frühgeburt durch Schädigung der weißen Substanz	
1.2 Sauerstoffschädigung bei Frühgeborenen und im Tiermodell	
1.3 Strategien zur pharmakologischen Neuroprotektion bei Frühgeborenen	
Eigene Arbeiten	7
2.1 Neonatale Hyperoxie im Mausmodell	
2.1.1 Hypomyelinisierung und astrozytäre Dysregulation	7
2.1.2 Motorische Hyperaktivität in juvenilen Mäusen nach neonataler Hyperoxie	28
2.2 Neonatale Hyperoxie im Rattenmodell	36
2.2.1 Partielle Aktivierung von Mikroglia als sekundärer Schädigungsmechanismus und Protektion der oligodendroglären Entwicklung durch Minozyklin	36
2.2.2 Vermindertes Wachstum des Kleinhirns	51
2.2.3 Koffein als Neuroprotektivum	68
Diskussion	84
3.1 Experimentelle Daten und translationale Aspekte	84
3.2 Wege der Neuroprotektion	88
Zusammenfassung	91
Referenzen/Literatur	92
Danksagung	101
Erklärung	102

Abkürzungen: **ADHS** = Aufmerksamkeits-Defizit/Hyperaktivitäts-Syndrom, **ADC** = apparent diffusion coefficient“, **BrdU** = Bromodeoxyuridin, **Casp** = Caspase, **CBL** = cerebellum, **CC** = Corpus callosum, **CNP** = 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase, **DTI** = diffusion tensor imaging, **CG** = Cingulum, **EC** = externe Kapsel, **DCX** = double cortin, **eGFP** = enhanced green fluorescent protein, **EM** = Elektronenmikroskopie, **GFAP** = glial fibrillary acidic protein, **GLAST** = Glutamat Aspartat Transporter, **GLT-1** = Glutamat Transporter 1, **GS** = Glutamin Synthase, **IL** = interleukin, **IGF** = Insulin-like growth factor, **MBP** = myelin basic protein, **MRI** = magnet resonance imaging, **NeuN** = neuronal nuclei, **NG2** = neural/glial antigen 2, **OL** = Oligodendroglia, **NMDA** = N-Methyl-D-Aspartat, **Olig2** = Oligodendrocyte transcription factor 2, **OPC** = oligodendroglial precursor cells, **Pax6** = paired box 6, **PDGF** = platelet-derived growth factor, **Prox1** = prospero homeo box 1, **PVL** = periventriculäre Leukomalazie, **PWMD** = periventricular white matter damage, **Sox2** = sex-determining region y-box, **Tbr2** = t-box brain protein 2, **TNF** = Tumor Nekrose Faktor, **TUNEL** = terminal deoxynucleotidyl-transferased UTP nick end labeling, **VLBW** = very low birth-weight, **Vmax** = maximale Geschwindigkeit, **Vmittel** = mittlere Geschwindigkeit.

Einleitung

1.1 Neurologische Folgen von Frühgeburt durch Schädigung der weißen Substanz

Während die Mortalität in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten erheblich verbessert werden konnte, ist insbesondere bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm (*very low birth-weight*) = VLBW) oder unter 32 Gestationswochen die Anfälligkeit für eine Schädigung der neurologischen und psychomotorischen Entwicklung weiterhin sehr ausgeprägt. Allerdings ist in einigen jüngeren Studien zuletzt auch von einer Abnahme der Inzidenz von Zerebralpareesen bei sehr unreifen Frühgeborenen auf 4 per 100 Lebendgeburten gesunken^{1 2}. Eine vergleichbare Verbesserung wurde für die zystische periventrikuläre Leukomalazie als wichtige zentralnervöse Ursache einer Zerebralparese erzielt. Dem entgegen steht die hohe Inzidenz von geringer ausgeprägten Lernstörungen, motorischen Schwächen und von Verhaltensauffälligkeiten bei ehemaligen Frühgeborenen, die bis zur Adoleszenz persistieren können³. Sowohl kognitive Defizite als auch motorische Störungen und ADHS sind bei ehemaligen VLBW Frühgeborenen mit diffusen Veränderungen der periventrikulären weißen Substanz (*white matter damage* = WMD) assoziiert^{4 5 6}, welche histologisch durch Hypomyelinisierung zu charakterisieren und im MRT mit *diffusion tensor imaging* (DTI) zu diagnostizieren ist^{4 7}.

Die Zellen der oligodendroglären Reihe gehen durch einen Reifungsprozess, der von verschiedenen Stadien gekennzeichnet ist: 1) Oligodendrogläre Vorläuferzellen (*oligodendroglial precursor cells* = OPC), 2) prä-Oligodendrozyten (prä-OL), 3) unreife Oligodendroglia und 4) reife Oligodendrozyten^{8 9}. Unter Verwendung der zellulären Marker Olig2 für die gesamte oligodendrogläre Reihe und CC1 für reife Oligodendrozyten können zelluläre Veränderungen in Abhängigkeit des Reifestadiums identifiziert werden. In der weißen Substanz des unreifen Gehirns ist die besondere Empfänglichkeit der Hirnzellen für apoptotischen Zelltod durch Hyperoxie belegt worden³⁶. In Rattenmodellen für neonatale Hirnschädigung sind vor allem die unreifen Stadien der oligodendroglären Reihe empfindlich für oxidativen Stress^{37 38}. *In vitro* Versuche haben ergeben, dass unreife Oligodendrozyten sehr vulnerabel gegen pro-apoptotische Stimuli sind, während reife Oligodendrozyten erheblich resistenter sind¹⁶.

Bei der Untersuchung einer Schädigung der weißen Substanz sind funktionelle Veränderungen von Mikroglia und Astroglia als weitere Glia-Zellarten in Betracht zu ziehen, die als zusätzliche Faktoren die Entwicklung von Oligodendroglia beeinträchtigen können, etwa

durch Störung der Proliferation und der Reifung. Astrozyten können sowohl eine Schädigung des Gehirns^{10 11} als auch Mechanismen der Protektion und der Reparatur beeinflussen¹². Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität spielt eine bedeutende Rolle bei Schädigungen des unreifen Gehirns nach Hypoxie/Ischämie¹³ und nach Hirntrauma¹⁴. Darüber hinaus kann eine Überaktivierung von non-NMDA Glutamat Rezeptoren (GluR) in Oligodendroglia zu Zelltod¹⁵, verminderter Proliferation und verzögerter Reifung führen¹⁶. In der unreifen weißen Substanz erfolgt die vesikuläre Freisetzung von Glutamat sowohl von myelinisierten¹⁷ als auch von nicht-myelinisierten Axonen¹⁸. Dabei ist die Wiederaufnahme von Glutamat über membranständige Transporter entscheidend für dessen Beseitigung aus dem Extrazellularraum¹⁹. Astrozyten stellen das größte Reservoir an Glutamat im Gehirn dar und haben die größte Aktivität an aktivem Glutamat-Transport in die Zelle²⁰. Veränderungen dieses astrozytären Glutamat-Transportes sind in verschiedenen Modellen neuraler Dysfunktion²¹ und für Down Syndrom²² beschrieben worden.

Die Pathologie der diffusen PVL entsteht bei Frühgeborenen durch erhöhten Zelltod sowie durch gestörte Reifung von Oligodendroglia. Bei Frühgeborenen mit PVL findet als Resultat des verminderten Überlebens und der verzögerten Reifung von Oligodendroglia die Bildung von Myelinscheiden um neuronale Axone durch reife Oligodendrozyten in geringerem Ausmaß statt^{23 24}. Während für das Auftreten von zystischer periventrikulärer Leukomalazie vor allem perinatale Infektionen und Ischämien verantwortlich gemacht werden, legen einige Beobachtungen nahe, dass Hyperoxie für die Pathogenese von PWMD oder diffuser PVL eine Rolle spielen könnte^{25 26 27}.

Ehemalige Frühgeborene weisen oft Defizite des Lernverhaltens auf, insbesondere in Form des Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitäts-Syndroms (ADHS) - einhergehend mit Aufmerksamkeitsstörung, motorischer Hyperaktivität und mangelnder Impulskontrolle - wird bei ehemaligen Frühgeborenen im Schulalter bis zu fünffach häufiger diagnostiziert als bei Reifgeborenen^{28 29 30}. Neben einer genetischen Grundlage für ADHS, wie etwa Daten aus Zwillingsstudien und aus Genom-weiten Korrelationsstudien belegen³¹, sind auch Umweltfaktoren mit ADHS vergesellschaftet, darunter solche der Pränatalperiode und in der frühen postnatalen Entwicklung, wie etwa Alkoholgebrauch, Asphyxie und zu geringes Geburtsgewicht^{32 33 34}. In MRT Studien wurde sowohl bei termingerecht als auch bei zu früh geborenen Kindern ein Zusammenhang zwischen Pathologien der weißen Hirnsubstanz und Hyperaktivität bzw. ADHS beschrieben^{35 36}. Es ist daher denkbar, dass das bekanntermaßen

erhöhte Risiko von Frühgeborenen für ADHS mit der hohen Inzidenz für Schädigung der weißen Substanz vergesellschaftet ist.

1.2 Sauerstoffschädigung bei Frühgeborenen und im Tiermodell

Vor der Geburt ist der Fetus an eine niedrige Sauerstoff-Konzentration adaptiert, die einem arteriellen O_2 Partialdruck von etwa 20-25 mmHg entspricht. Bei einem reifen Neugeborenen nach rund 40 Gestationswochen steigt der arterielle O_2 -Partialdruck rasch auf 70-80 mmHg an und erreicht im weiteren Verlauf etwa 100 mmHg³⁷. Dieser Anstieg der O_2 -Konzentration im Blut sowie im Gewebe geht mit einer erhöhten Exposition gegen Sauerstoffradikale und oxidativen Stress einher. Die körpereigene Abwehr des oxidativen Stresses und der Radikale wird durch hohe Aktivitäten etwa von Glutathion und Peroxidasen gewährleistet. Diese Mechanismen der O_2 -Detoxifizierung werden erst im Laufe des dritten Trimenon hochreguliert und erreichen bis zur Geburt die maximale Aktivität. Ein sehr unreifes Frühgeborenes hat noch keine oder nur unzureichende anti-oxidative Kapazitäten entwickelt und ist den schädlichen Wirkungen von O_2 im Gewebe somit in weitaus höherem Maße ausgesetzt als ein reifes Neugeborenes³⁷. Aufgrund der Unreife der Lungen von Frühgeborenen fällt der postnatale Anstieg des O_2 -Gehaltes im Blut geringer aus als bei reifen Neugeborenen. Die erfolgreiche moderne medizinische Behandlung mit Lungenreife-Induktion pränatal und Anwendung von Surfactant postnatal ermöglicht dabei immerhin einen Anstieg des Sauerstoffes auf ca. 65 mmHg, was dem 2- bis 3-fachen der fetalen O_2 -Konzentration entspricht²⁶. Der erhöhte O_2 -Bedarf durch die postnatalen Lebensbedingungen, etwa durch Schwerkraft, Verdauung, Atmung, Temperaturregulation, u.a., kann dadurch besser gedeckt werden, es bleibt jedoch die verminderte anti-oxidative Abwehr beim Frühgeborenen als Dilemma.

Sauerstoff gilt bei der Entstehung der Retinopathie sowie der bronchopulmonalen Dysplasie von Frühgeborenen anerkanntermaßen als etablierter Risiko-Faktor. Anhand von experimentellen sowie klinischen Daten ist anzunehmen, dass erhöhte Sauerstoff-Konzentrationen ebenfalls die Entwicklung des unreifen Gehirns beeinträchtigen kann^{38 39}. In dem Hyperoxie-Tiermodell mit neugeborenen Ratten führt die Exposition gegen 80 % O_2 über 24 Stunden im Alter von 7 bis 8 Tagen (P7-P8) zu apoptotischem Zelltod in der grauen wie auch in der weißen Substanz⁴⁰. Zu einem späteren Zeitpunkt im Alter von 10 oder 14 Tagen hatte Hyperoxie-Exposition in Ratten keinen Effekt mehr auf die Anzahl von Hirnzellen, die

apoptotischen Zelltod aufwiesen. In weiteren *in vivo* Studien wurde gezeigt, dass die Myelinisierung im neonatalen Gehirn nach neonataler Hyperoxie verzögert war⁴¹. In Zellkulturversuchen war erkennbar, dass 80 % Sauerstoff in O4-positiven unreifen Oligodendroglia *in vitro* zu Caspase-abhängigem Zelltod führte, während reifere Oligodendrozyten mit Expression des Markes O1 und des Myelin-Bestandteils MBP („myelin basic protein“) resistent waren⁴¹.

1.3. Strategien zur pharmakologischen Neuroprotektion bei Frühgeborenen:

Verschiedene Substanzgruppen wurden bereits in Tierexperimenten verwendet, um deren potentiell protektive Eigenschaften für eine verbesserte Entwicklung des unreifen Gehirns zu nutzen. Darunter befinden sich anti-oxidative Substanzen (wie etwa Melatonin und Acetylcystein), Wachstumsfaktoren (insbesondere Insulin-like growth factor; IGF), und auch Antibiotika, die als Nebeneffekte neuroprotektive Auswirkungen zu haben scheinen, darunter vor allem Cephalosporine und Minozyklin. Einige dieser Substanzen wurden darüber hinaus auch in einem Konsensus-Statement einer internationalen Expertenrunde für die Verwendung bei Neugeborenen im Rahmen von kontrollierten klinischen Studien vorgeschlagen⁴². Daneben sind aber auch in klinischen Studien an Frühgeborenen für Koffein positive Effekte für die neurologische Entwicklung beschrieben worden^{43 44}, was auch deshalb von besonderer Bedeutung ist, da Koffein in der Behandlung von Apnoen bereits zur Routine-Anwendung bei Frühgeborenen zugelassen ist. In experimentellen Studien reichen die durch Koffein getriggerten protektiven Mechanismen von anti-inflammatorischen⁴⁵ bis zu anti-oxidativen⁴⁶ und Adenosin-Rezeptor-vermittelten Effekten⁴⁷. Eine eindrucksvoll hohe Zahl an experimentellen Studien liegen zum neuroprotektiven Einsatz von Minozyklin vor, das aufgrund von pleiotropen Eigenschaften inklusive Mikroglia-Stabilisierung mit Hemmung von pro-inflammatorischen Reaktionen^{48 49}, anti-apoptotischen⁵⁰ und anti-oxidativen⁵¹ Wirkungen in verschiedensten Schädigungsmodellen Einsatz gefunden hat. Darüber hinaus ist Minozyklin im Rahmen von Studien bei Patienten mit Multipler Sklerose^{52 53}, Schlaganfall⁵⁴ und bei Kindern mit Autismus⁵⁵ angewendet worden. Ein Einsatz von Minozyklin bei Neugeborenen wird oft kritisch eingeschätzt, da es bei bekannten Toxizitäten auf Zahnbildung und Gaumenleiste für pädiatrische Patienten kontraindiziert ist. In der amerikanischen Fachliteratur wird der kurzzeitige Einsatz zur Neuroprotektion bei Neugeborenen dennoch diskutiert⁵⁶. Aufgrund der mannigfaltigen protektiven Eigenschaften auf das ZNS ist Minozyklin gewiss von

experimentellem Interesse, um Mechanismen der Protektion zu charakterisieren und verbesserte Strategien zur Neuroprotektion von Frühgeborenen zu definieren.

Eigene Arbeiten

Um eine Veränderung der Entwicklung des unreifen Gehirns durch Sauerstoff zu untersuchen, wurde das postnatale Hyperoxie-Tiermodell verwendet, bei dem neugeborene Ratten 80 % O₂ über 24 Stunden vom Tag 6 (P6) bis Tag 7 (P7) ausgesetzt werden. Danach werden die Jungtiere gemeinsam mit ihren Müttern wieder an Raumluft gesetzt bis zu den weiteren Untersuchungszeitpunkten P9, P11, P15, 30, P60. Gemeinsam mit dem Labor von Dr. Gallo des Children's National Medical Center in Washington DC, USA, wurde die Anwendung von 48 Stunden 80% O₂ bei neugeborenen Mäusen im Alter von Tag 6 (P6) bis Tag 8 (P8) etabliert, weitere Untersuchungszeitpunkte während der Erholung an Raumluft sind entsprechend P10, P12, P15, P30, P60. In Blutgas-Analysen war bei diesem Vorgehen im Blut der neugeborenen Mäuse ein Anstieg des O₂-Partialdruckes um das 2,3-Fache unter Hyperoxie im Vergleich zu den Kontrolltieren an Raumluft zu verzeichnen.

Im Alter der ersten Lebenswoche besitzen Mäuse wie auch Ratten einen unreifen zerebralen Entwicklungsstand insbesondere der weißen Substanz und der Zellen der oligodendroglären Reihe, der denen von Frühgeborenen von etwa 24 bis 28 Gestationswochen ähnelt³¹. In diesem Stadium ist die Myelinisierung von Axonen allenfalls in sehr geringem Ausmaß zu finden, und in der oligodendroglären Zellreihe dominieren insbesondere Stadien der unreifen Oligodendroglia und der oligodendroglären Vorläuferzellen. Für verschiedene Versuche und Analysen wurden sowohl Ratten als auch Mäuse verwendet, wie im Weiteren aufgeführt.

2.1 Neonatale Hyperoxie im Mausmodell

2.1.1 Hypomyelinisierung und astrozytäre Dysregulation

Publikation: Schmitz, T. et al. Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *J. Neurosci.* 31, 4327–4344 (2011),

<http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3942-10.2011>.⁴⁰

Myelin basisches Protein (MBP) gehört zur Familie der Myelinproteine^{8,9}, welches den Beginn der Myelinisierung während der Hirnentwicklung markiert. In den Hyperoxie-Versuchen wurde in der weißen Substanz daher MBP mittels Immunfluoreszenz und Western Blot quantifiziert. In der Immunfluoreszenz zeigten Tiere nach postnataler Hyperoxie im Vergleich zu Kontrolltieren an Raumluft eine signifikant verminderte MBP Intensität in den Altersstufen P8, P10 und P12. In den Western Blot Analysen war die Reduktion der MBP Expression zu bestätigen. Die MBP Expression war jedoch in den Altersstufen P15 und P30 sowohl in der Immunhistochemie als auch in den Western Blot nahezu kompensiert.

Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung der Proliferation von NG2+ oligodendroglären Vorläuferzellen in der weißen Substanz von neugeborenen Mäusen mit Bromodeoxyuridin (BrdU), welches nach Injektion in den Zellkernen von sich teilenden Zellen eingebaut wird und daraufhin immunhistologisch nachweisbar ist. Nach Hyperoxie im Alter von P8 bei war in der weißen Substanz eine signifikante Abnahme von proliferierenden oligodendroglären Vorläuferzellen (NG2+BrdU⁺) zu sehen. Im Alter von P10 war dieser Unterschied nicht zu finden. Nach weiterer Erholung in Raumluft im Alter von P12 war hingegen eine Zunahme von proliferierenden oligodendroglären Vorläuferzellen im Vergleich zu Kontrollen zu erkennen. Um den apoptotischen Effekt von Hyperoxie in der weißen Substanz des unreifen Hirns *in vivo* zu beschreiben, wurde die Nachweisbarkeit von aktiverer Caspase3 mittels Immunhistochemie und mit „terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“ (TUNEL) ausgewertet. In Wildtyp-Mäusen bewirkt 48 Stunden Hyperoxie demnach einen signifikanten Anstieg von Caspase3+ Zellen bis zum Alter von P12. In den Altersstufen P15 und P30 war nahezu keine Apoptose in der weißen Substanz nachweisbar. In transgenen CNP-eGFP Mäusen mit grün fluoreszierenden Oligodendroglia konnte ein ähnlicher Anstieg der Apoptose durch Hyperoxie bis P12 nachgewiesen werden.

In dem Mausmodell führte neonatale Hyperoxie zudem zu einer biphasischen Antwort von Astrozyten der weißen Substanz. In der Immunhistochemie war zu erkennen, dass die Expression von *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) im Alter von P8 nach Hyperoxie deutlich geringer war als bei den Kontrolltieren in Raumluft. In Western Blot Untersuchungen konnte die Reduktion von GFAP nach Hyperoxie bestätigt werden. Im Gegensatz dazu war in den Hyperoxie-Mäusen nach vier Tagen Erholung in Raumluft eine signifikante Zunahme der die GFAP Immunfluoreszenz und in den Western Blot zu finden. Dieser zeitliche Verlauf ähnelt den zeitlichen Veränderungen von Oligodendroglia nach Hyperoxie. Es ist daher zu vermuten, dass

die astrozytären Veränderungen für die Schädigung als auch für die Erholung von oligodendroglären Vorläuferzellen eine Rolle spielen. Ein Einfluss von Hyperoxie der auf den durch Astrozyten regulierten Glutamat-Haushalt war ebenfalls zu finden, da die Expression des Glutamat-Transporters GLAST in der weißen Substanz ebenfalls verändert war. Eine verminderte Aufnahme-Kapazität des Glutamat-Transporters in Astrozyten durch Hyperoxie war in Kulturversuchen nachzuweisen, in denen die Affinität zu Tritium-markierten Aspartat deutlich reduziert war. Da eine erhöhte Glutamat-Konzentration im Gewebe der weißen Substanz schädliche Auswirkungen auf Überleben und Reifung von oligodendroglären Vorläuferzellen haben kann⁵⁷, ist von einer Beteiligung der Astrozyten für die verschlechterte Entwicklung der Oligodendroglia nach Hyperoxie auszugehen.

Diese Ergebnisse zeigen insgesamt, dass temporäre postnatale Hyperoxie in der unreifen weißen Substanz zur Schädigung von Oligodendroglia und zur Hypomyelinisierung führt, bei der eine Veränderung von Astrozyten zur Fehlentwicklung beizutragen scheint.

2.1.2 Motorische Hyperaktivität in juvenilen Mäusen nach neonataler Hyperoxie

Publikation: Schmitz, T. et al. Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia. *Exp. Neurol.* 235, 374–379 (2012), <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.03.002>.⁵⁸

Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) ist bei Frühgeborene drei- bis fünffach häufiger zu diagnostizieren als bei Reifgeborenen^{28 29 30}. Die Ursachen dafür sind weitgehend unbekannt. In MRT Studien wurde sowohl bei termingerecht als auch bei zu früh geborenen Kindern ein Zusammenhang zwischen Pathologien der weißen Hirnsubstanz und Hyperaktivität bzw. ADHS beschrieben^{35 36}. Zur Untersuchung des motorischen Verhaltens von Mäusen nach neonataler Exposition gegen Hyperoxie wurde ein Laufradsystem verwendet, das bei Mäusen zur Bestimmung von Laufverhalten und motorischem Lernen etabliert worden ist^{59 60}. Zusätzlich wurden MRT/DTI Messungen herangezogen, um die Diffusivität im Corpus callosum zu messen.

Die Laufleistungen gemessen als Geschwindigkeit (Vmax, Vmittel) und als zurückgelegte Distanz (Distac) nahmen mit Dauer des Lauftrainings signifikant zu, lediglich die Anzahl der Läufe in dem Rad (Nrun) veränderte sich nicht signifikant. Darüber hinaus war der Gruppenfaktor (Normoxie versus Hyperoxie) für Vmax und Vmittel signifikant. Die Interaktionen von Zeit und Gruppe waren nach ANOVA für keinen der Parameter signifikant, was darauf hinweist, dass Trainingseffekte innerhalb der Gruppen vergleichbar waren und mit der Beobachtung übereinstimmt, dass sich die Leistungen Vmax, Vmittel und Distac innerhalb der ersten Woche bei allen Mäusen verbessert hat und in der zweiten Woche ein Plateau erreicht hat.

Die signifikanten Unterschiede der Geschwindigkeitsparameter in Abhängigkeit der experimentellen Gruppe weisen darauf, dass neonatale Hyperoxie diese Laufeigenschaften bei Mäusen beeinflusst. In den *post hoc* Tests haben die juvenilen Mäuse nach Hyperoxie höhere Werte für Vmax und Vmittel in der Trainingsphase erreicht und sind demnach schneller gelaufen als Kontrolltiere, die stets an Raumluft waren.

Nach Austausch des konventionellen Laufrades gegen ein komplexes Laufrad mit unterschiedlichen Sprossen-Abständen ist ein drastischer Einbruch in allen Laufparametern zu erkennen. Im weiteren Verlauf haben die Mäuse jedoch Ihre Laufleistungen in den komplexen Rädern täglich verbessert. In der ANOVA dieser Laufphase der Aufzeichnungstage 14 bis 24 war

ein Effekt des Zeitverlaufes für Vmax, Vmittel, Distac und Nrun zu verzeichnen. Somit tritt auch in dieser Testphase eine signifikante Verbesserung der Ausgangswerte ein.

In dem *post hoc* zeigten sich signifikant niedrigere Werte für Vmax bei Tieren nach Hyperoxie. Dieser Ergebnisse weisen auf eine verminderte Fähigkeit der Mäuse hin, die motorischen Herausforderungen des komplexen Laufrades zu bewältigen.

Um herauszufinden, ob die motorischen Symptome bei Mäusen nach neonataler Hyperoxie mit Veränderungen der Diffusionseigenschaften der weißen Substanz einher gehen, wurde die fraktionale Anisotropie (FA) im Corpus callosum im Alter von P30 und P53 bestimmt. Im MRT wurden erst in der T2 Wichtung koronare Sequenzen durchgeführt, um anschließend mit DTI Messungen und *directionally encoded color* (DEC) Kartierungen die Anisotropie in der lateral-medialen Ausrichtung zu bestimmen. So waren die Werte der FA im Corpus callosum von Hyperoxietieren signifikant niedriger als die FA Werte der Kontrolltiere, sowohl bei P30 als auch bei P53.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass unphysiologisch hohe Sauerstoffkonzentrationen im unreifen Hirn in der späteren Entwicklung zu motorischer Hyperaktivität und vermindertem motorischen Lernvermögen führen. Die veränderte Diffusivität der weißen Substanz ist dabei ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei den Befunden in der Mauspopulation nach Hyperoxie um eine ADHS-ähnliche Symptomatik handeln kann.

2.2 Neonatale Hyperoxie im Rattenmodell

2.2.1 Partielle Aktivierung von Mikroglia als sekundärer Schädigungsmechanismus und Protektion der oligodendroglären Entwicklung durch Minozyklin

Publikation: Schmitz, T. et al. Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia. *Exp. Neurol.* 254, 153–165 (2014),
<http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.017>.⁶¹

Eine genauere Untersuchung der Mechanismen der Sauerstoff-induzierten Schädigung von Oligodendroglia und Myelinisierung kann von Nutzen sein, um auch Rückschlüsse auf Möglichkeiten der Protektion ziehen zu können. Zelluläre Schäden und Fehlentwicklungen des unreifen Gehirns werden laut Literatur insbesondere durch oxidativen Stress und durch Inflammation ausgelöst oder begünstigt^{62 63 64}. In den Versuchen von neugeborenen Ratten wurden daher Analysen im Großhirn durchgeführt, die eine Aussage über die Entstehung von oxidativem Stress und auch von pro-inflammatorischen Reaktionen ermöglichen. Eine generelle Erfassung von so genannten „reaktive oxygen species“ (ROS) ist mittels Western Blot Methode unter Verwendung des Oxyblot™ Versuchskit möglich. In den Hirnlysaten der P7 Ratten fand sich in der OxyBlot™ Auswertung ein signifikanter Anstieg der ROS Intensität im Vergleich zu den Lysaten von Kontrolltieren in Raumluft. Bei Hyperoxie-Ratten mit Minozyklin-Behandlung war die ROS Aktivität signifikant niedriger als nach Hyperoxie ohne Behandlung.

Um die Charakteristika der Entwicklungsstörung der weißen Substanz nach Hyperoxie, wie sie für Mäuse vorstehend bereits beschrieben worden ist, in die Effekte der Protektion durch Minozyklin einzubeziehen, wurden Proliferation, Zelltod und Reifung von oligodendroglären Zellen in den Ratten ab P7 analysiert. Es zeigte sich, dass die Hyperoxie-bedingte Minderung der Proliferation und der Reifung von Oligodendroglia, wie auch die erhöhte Rate von apoptotischem Zelltod, durch eine Behandlung mit Minozyklin signifikant abgeschwächt oder gar verhindert wird. Ebenso wird die Verzögerung der Myelinsierung in Hyperoxie-exponierten neugeborenen Tieren, gemessen an der Synthese von MBP, mit der Minozyklin-Behandlung abgewendet.

Die Entwicklung und Reifung von Zellen der oligodendroglären Reihe wird von verschiedenen Transkriptionsfaktoren auf genetischer Ebene gesteuert. Sox10 etwa ist für die Differenzierung von Oligodendroglia essentiell, Olig2 ist ebenfalls ein für Oligodendroglia charakteristischer Transkriptionsfaktor. In den Versuchen zur Genexpressionsanalyse der

Hirngewebe von neugeborenen Ratten im Alter von P7 war die Expression von Sox10 nach Hyperoxie um mehr als 50 % geringer als in den Kontrolltieren in Raumluft. Im Alter von P9 nach zwei Tagen Erholung in Raumluft persistierte diese Reduktion in den Tieren nach voriger Hyperoxie, allerdings war Sox10 in der Gruppe mit Minozyklin signifikant verbessert⁶⁵. Die Expression von Olig2 war zum Zeitpunkt P9 nach Hyperoxie ebenfalls signifikant vermindert, und auch hier verbessert Minozyklin die Genexpression deutlich⁶⁵. Im Alter von P11 war diese Herabsetzung der Transkriptionsfaktoren nicht mehr nachweisbar. Insgesamt ist eine Protektion von Oligodendroglia gegen Hyperoxie auch anhand verbesserter Genregulation erkennbar.

Eine Aktivierung von Mikroglia wird in der Regel durch eine rundliche, amöboide Form gekennzeichnet, dagegen wird der ruhende Zustand durch eine verzweigte, ramifizierte Morphologie charakterisiert. In den neugeborenen Ratten im Alter von P7, die als Kontrolltiere stets in Raumluft waren, zeigten Iba1+ Mikroglia eine ramifizierte Struktur, während die Mehrzahl der Mikroglia in P7 Ratten nach 24 Stunden Hyperoxie eine amöboide Form aufwies. Die Messung der Pixel-Repräsentation per Computer-Software (ImageJ) ergab eine signifikante Zunahme der Iba1 Färbungsintensität was zusätzlich für eine Aktivierung der Mikroglia spricht. Dagegen waren die Induktion der amöboiden Form und die Erhöhung der Pixel-Intensität durch Hyperoxie nicht zu sehen, wenn die Tiere Minozyklin verabreicht bekamen. Im Alter von P9 waren die Unterschiede in Hyperoxie-Tieren nicht mehr nachweisbar. Da zur Aktivierung von Mikroglia auch eine erhöhte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen gezählt wird^{66 67 68} wurden mittels ELISA Zytokinkonzentrationen aus Proteinlysaten von Hirngewebe bestimmt, inklusive Interleukin-1 β (IL-1 β), Interferon (IFN)- γ , Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α . Demnach war IL-1 β in den Hirnen von P7 Tieren nach Hyperoxie signifikant um 7-fach höher als bei Kontrolltiere. Dieser Anstieg wurde durch Minozyklin verhindert. Im Gegensatz dazu waren die Werte für TNF- α wie auch für IFN- γ nicht durch Hyperoxie-Exposition verändert. In der realtime PCR für MHC-II und induzierbarer NO Synthetase (iNOS) mit RNA aus Hirnen von Ratten nach Hyperoxie über jeweils 3, 6 und 24 Stunden im Alter von P6 bis P7 gab es keine relevanten Veränderungen. Insgesamt scheint Hyperoxie im postnatalen Gehirn eine partielle mikrogläre Antwort auszulösen, die mit einem Anstieg von IL-1 β einhergeht, nicht jedoch mit Veränderungen von iNOS oder TNF- α .

2.2.2 Vermindertes Wachstum des Kleinhirns

Publikaton: Scheuer, T. et al. Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline: Cerebellar injury after hyperoxia. *Glia* 63, 1825–1839 (2015), <http://doi.org/10.1002/glia.22847>.⁶⁹

In Studien zur Entwicklung von ehemaligen Frühgeborenen wird neben der Schädigung der weißen Substanz des Großhirns auch von einer gestörten Reifung des Kleinhirns berichtet, allerdings sind zugrunde liegende Ursache und Mechanismen kaum beschrieben⁷⁰. Eine Verminderung des Kleinhirn-Volumens scheint einher zu gehen mit neurologischen Defiziten im Alter des reifen Geburtstermins⁷¹, mit geringerem IQ im Schulalter⁷² und mit Verhaltensauffälligkeiten im jugendlichen Alter⁷³.

In den Experimenten zu Kleinhirnschädigung durch neonatale Hyperoxie wurde der Einfluss von Sauerstoff auf die oligodendrogläre Reifung im Kleinhirn analysiert, sowie der Einfluss auf Mikroglia und Astroglia, die zu Veränderungen des Kleinhirns beitragen können. Zusätzlich wurde eine protektive Wirkung von Minozyklin auf weitere Glia-Populationen im Kleinhirn analysiert, da die Entwicklung von Oligodendroglia auch von komplexen Glia-Glia Interaktionen reguliert wird^{74–76}. In den Western Blot Analysen der Protein-Lysate war zu erkennen, dass die Intensität von Nitrotyrosin als Anzeichen von oxidativem Stress nach Hyperoxie signifikant zunahm. Im Gegensatz dazu war dieser Anstieg nicht zu sehen, wenn die Hyperoxie-Tiere mit Minozyklin behandelt wurden.

Um Effekte von hoher Sauerstoff-Exposition postnatal auf Kleinhirn-Volumina zu messen, wurden Ratten im Alter von P30 und P60 im Kleintier-MRT untersucht. In Kontroll-Tieren war eine ausgeprägtes zerebelläres Wachstums im Alter von P30 bis P60 zu erkennen. In den Ratten nach neonataler Hyperoxie waren die Volumina der Kleinhirne dagegen deutlich reduziert was den Befunden ähnelt, die von ehemaligen Frühgeborenen berichtet werden⁷⁷. Die Behandlung mit Minozyklin verbesserte dagegen die Entwicklung des Kleinhirns signifikant, so dass keine Differenz im Vergleich zu Kontrolltieren erkennbar war. Eine Zunahme von Apoptose durch Hyperoxie war in den immunohistochemischen Analysen von NG2+TUNEL+ oligodendroglären Vorläuferzellen in den Regionen der zerebellären weißen Substanz nach Hyperoxie zu verzeichnen. Die Behandlung mit Minozyklin hat den Anstieg der Apoptose im Alter von P7 und P8 verhindert, nicht jedoch im Alter P11.

Die Analyse von oligodendroglärer Genexpression mittels qPCR wurde für den Transkriptionsfaktor Olig2 und für den Reifungsmarker 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) durchgeführt. Beide Faktoren waren im Kleinhirn von P7 Ratten nach Hyperoxie reduziert, im Alter von P11 aber von den Kontrolltieren nicht wesentlich zu unterscheiden. Bemerkenswert ist, dass mit Minozyklin behandelte Tiere im Alter von P7 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen in Raumluft einen signifikanten Anstieg der Genexpression von Olig2 und CNP zeigten.

Mittels Western Blot wurde die MBP Expression im Alter von P7, P9, P11, P15 und P30 gemessen. Ab dem Alter P9 war die Menge des MBP in Kontrolltieren signifikant stärker als in den Hyperoxie-Tieren, und diese Differenz persistierte bis zum jugendlichen Alter von P30. Während der Entwicklung bis P30 war eine dynamische Zunahme der Myelinisierung des Kleinhirnes zu erkennen, die Gesamtmenge an MBP blieb in den Tieren nach neonataler Hyperoxie jedoch stets geringer als die der Kontrolltiere. In allen untersuchten Altersstufen führte die Anwendung von Minozyklin zur deutlich verbesserten MBP Synthese. Die temporäre Hyperoxie führt demnach zu einer anhaltenden Reifungsstörung der Oligodendroglia und letztlich zur Hypomyelinisierung der zerebellären weißen Substanz.

Die Untersuchungen auf mikrogläre Reaktionen im Kleinhirn mittels morphologischer Analysen und Zytokinmessungen ergab keine wesentlichen Anzeichen einer inflammatorischen Aktivierung durch Hyperoxie. Eine Beteiligung von Mikroglia an einer Schädigung der zerebellären weißen Substanz ist somit unwahrscheinlich.

Der Wachstumsfaktor „platelet-derived growth factor“ (PDGF)-A reguliert unter anderem die Proliferation und das Überleben von oligodendroglären Vorläuferzellen^{74,75,78,79}, und Astrozyten gelten als wichtige Quelle einer PDGF-A Sekretion zur Stimulierung der Proliferation von oligodendroglären Vorläuferzellen^{74,80-83}. Die PDGF-A Expression war im Kleinhirn unmittelbar nach Hyperoxie aber auch mehrere Tage nach Erholung in Raumluft deutlich reduziert. Die Hemmung der PDGF-A Expression durch hohe Sauerstoffkonzentrationen konnte zudem in Kulturversuchen mit purifizierten Astrozyten des Kleinhirns reproduziert werden. Minozyklin verbesserte die PDGF-A Expression in Ratten bei P7 und P11 *in vivo* wie auch in den Astrozyten *in vitro*. Anhand dieser Daten ist insgesamt zu sehen, dass die postnatale Toxizität von Sauerstoff im Kleinhirn zu einer persistierenden Schädigung von Oligodendroglia und Myelin des Kleinhirns führt.

Koffein als Neuroprotektivum

Publikation: Endesfelder, S., Zaak, I., Weichelt, U., Bührer, C. & Schmitz, T. Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. *Free Radic. Biol. Med.* **67**, 221–234 (2014), <http://doi.org/10.3390/ijms18010187>.⁴⁶

In dem Hyperoxie-Modell des unreifen Gehirns sind insbesondere zwei Mechanismen für die schädigende Wirkung verantwortlich zu machen: oxidativer Stress⁸⁴ mit der Produktion so genannter reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS), und die Veränderung von Proteinen, die den Zellzyklus und Zellüberleben während der Entwicklung steuern⁸⁵. Da bei Säugetieren wie auch beim Menschen die Neurogenese in den Regionen des Hippocampus bis ins hohe Erwachsenenalter persistiert^{86 87} kann eine früh postnatale Änderung neuronaler Programm von besonders großer Tragweite sein.

Frühgeborenen erhalten Koffein regelmäßig zur Behandlung von Apnoen^{88 89}. Einige Daten weisen auf präventive Effekte zur Vermeidung von Zerebralparese bei Frühgeborenen⁸⁹. In einem Rattenmodell mit chronischer Hypoxie mindert die Gabe von Koffein die Ausprägung einer Hypomyelinisierung der Gehirns⁹⁰.

Der Einfluss von postnataler Hyperoxie auf die neuronale Zelllinie im Hippocampus wurde durch immunhistologische Färbung bestimmt, mit Nestin als Marker für neuronale Vorläuferzellen, mit doublecortin (DCX) als Marker für unreife Neurone und mit NeuN für reife Neurone. Die Analyse bezog sich dabei auf die Region des DG in P7 Ratten nach 24 Stunden Hyperoxie (P6 bis P7). Bei der Auswertung Fluoreszenz-Färbung war die Anzahl der der Zellen aller drei neuronalen Reifungsstufen signifikant reduziert⁴⁶. Bei Tieren mit Hyperoxie-Exposition, die eine Einzeldosis Koffein erhielten, war die Anzahl der Neurone dagegen vergleichbar zu denen der Kontrolltiere in Raumluft. Diese Protektion durch Koffein war dabei in allen drei untersuchten Reifungsstufen der neuronalen Zellen zu finden⁴⁶. Bemerkenswerter Weise führte die Einmalgabe des Koffeins bei einer Hyperoxiedauer von 48 Stunden zu einer ähnlichen Protektion neuronaler Zellen wie bei der 24-stündigen Hyperoxie.

Die Proliferation unreifer Neurone gilt als wesentliche Eigenschaft des unreifen Gehirns für die weitere Entwicklung. Der Einfluss von Hyperoxie auf die neuronale Proliferation wurde mit immunhistologischen Färbungen für Ki67 als Proliferationsmarker in Co-Färbung mit Nestin, DCX und NeuN in den Regionen Gyrus dentatus (DG) und Hilus des Hippocampus untersucht. Demnach waren Ki67-positive Zellen in beiden Regionen durch Hyperoxie deutlich reduziert.

Die Behandlung mit Koffein hat jedoch zur deutlich verbesserten Anzahl der Ki67-positiven Zellen geführt. Dies traf für alle drei neuronale Zelltypen zu, die mit den Immunfärbungen erfasst wurden, sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden Hyperoxie. Eine Schädigung von Neuronen war auch in den Analysen auf Protein-Ebene mit Hilfe von Western Blot zu finden. Die Quantifizierung des von DCX als Marker für unreife Neurone ergab eine signifikante Reduktion nach 24 Stunden Hyperoxie. Calretinin als Marker für reife Neurone war sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden Hyperoxie deutlich reduziert. Erneut zeigte sich die Anwendung von Koffein auch bei dieser Methode als protektiv. Hyperoxie führte zudem zur signifikanten Verminderung der Expression von für die neuronale Entwicklung wichtigen Transkriptionsfaktoren wie etwa Sox2, Tbr2, Prox1, Pax6 und Tbr1. Die Behandlung mit Koffein verhinderte diese Abnahme neuronaler Transkriptionsfaktoren.

Insgesamt ist anhand dieser experimentellen Daten zu erkennen, dass neonatale Hyperoxie die Entwicklung unreifer Neurone im Hippocampus erheblich stören kann. Die Anwendung von Koffein zeigt sich dabei als ein vielversprechendes Medikament zur Protektion gegen eine neuronale Schädigung im unreifen Hirn.

Diskussion

3.1 Experimentelle Daten und translationale Bedeutung

Die Ursachen für eine Hirnschädigung der veränderten neurologischen Entwicklung von Frühgeborenen sind oft schwierig zu identifizieren. In dem experimentellen Model unter Anwendung von Hyperoxie kann daher untersucht werden, welche Wirkung Sauerstoff im unreifen Gehirn entfalten kann und welche zellulären, strukturellen und funktionellen Veränderungen daraus resultieren können. Insgesamt zeigen die Ergebnisse in neugeborenen Mäusen und Ratten Schäden der weißen Substanz inklusive einer Hypomyelinisierung, wie sie auch in anderen Schädigungsmodellen beschrieben worden sind ^{91 92 93}. Der Verlust myelinisierender Oligodendrozyten ist dabei als wesentlicher Faktor anzusehen, der ebenfalls bei ehemaligen Frühgeborenen mit WMD oder PVL zentrale pathogenetische Bedeutung hat ⁹¹.

In Übereinstimmung mit vorigen *in vitro* Daten ⁴¹ war die Vulnerabilität von Oligodendroglia abhängig vom Entwicklungsstatus: reife Oligodendrozyten mit Expression des Markers CC1 zeigten keine erhöhte Apoptose, wie etwa durch immunhistologische Färbung mit Caspase3a oder mit TUNEL zu sehen war. Dagegen wiesen insbesondere NG2+ oligodendrogläre Vorläuferzellen auch zu den Zeitpunkten während der Erholung nach Hyperoxie eine verminderte Proliferationsaktivität wie auch erhöhten Zelltod auf. Der frühe Verlust von oligodendroglären Vorläuferzellen ist somit als eine Ursache für den nachfolgenden Mangel an reifen CC1+ Oligodendrozyten nach Hyperoxie verantwortlich zu machen, wie sowohl in dem Rattenmodell als auch in dem Mausmodell zu finden war. Durch die verringerte Anzahl reifer Oligodendrozyten kommt es dabei letztlich zum Defizit der Myelin-Synthese in der weißen Substanz. Die Expression von MBP durch Oligodendrozyten war in der weißen Substanz von Mäusen insbesondere in den Zeitstufen P10 und P12 reduziert, während sie im jungen adulten Alter von P30 wieder das Niveau der Kontrolltiere erreicht hat.

Die scheinbare Kompensation des Myelin-Defizits der weißen Substanz nach Hyperoxie geht jedoch nicht mit vollständiger funktionaler Erholung einher, wie etwa in den MRT-Diffusionsmessungen im Alter von P30 bis P60 zu erkennen ist. Milde oder subtile Veränderungen der weißen Substanz, die dennoch funktionelle Relevanz haben können, sind im MRT mittels „diffusion tensor imaging“ (DTI) zu bestimmen, insbesondere durch Messung der fraktionalen Anisotropie (FA) im Corpus callosum^{94 95}. Veränderungen der FA können demnach mit Demyelinisierung, Axonenschädigung und Verhaltensauffälligkeiten assoziiert sein ^{96 97}. Mittels DTI Messungen im Corpus callosum (CC) von Mäusen nach neonataler

Hyperoxie im Vergleich zu Kontrolltieren war zu belegen, dass die kurzzeitige postnatale Exposition in einer kritischen Zeit der oligodendroglären Entwicklung zu langfristigen Veränderungen der Diffusionseigenschaften des CC führen, im Alter von P30 wie auch von P60. Diese Befunde deuten auf nachhaltige Störung der Ultrastruktur und Organisation der weißen Substanz hin, die trotz der Normalisierung reifer (CC1+) Oligodendrozyten und der Myelinsynthese bestehen bleibt.

Eine fortdauernde funktionelle Veränderung neurologischer bzw. motorischer Funktionen war ebenfalls in den Laufradtests mit jungen erwachsenen Mäusen im Alter von P30 bis P54 zu finden. Die Mäuse nach Hyperoxie zeigten schnellere Laufgeschwindigkeit (V_{max} wie auch V_{mittel}) in konventionellen Laufrädern als Kontrolltiere, die immer an Raumluft gelebt haben, was als motorische Hyperaktivität zu interpretieren ist. Die höhere Laufgeschwindigkeit war bereits initial in der Trainingsphase zu sehen. Bei dem folgenden Wechsel des Laufradtyps zu Rädern mit unregelmäßigen Abständen zwischen den Sprossen haben die Mäuse nach Hyperoxie diese motorische Herausforderung weniger gut kompensiert als die Kontrolltiere, was auf vermindertes motorisches Lernvermögen hinweist. Eine motorische Hyperaktivität gepaart mit reduzierter Koordinationsfähigkeit ähnelt dem Phänotyp, der oftmals bei ehemaligen Frühgeborenen beschrieben wird ^{28 98}. Diese Symptomatik kann zudem als Teil einer ADHS-artigen Problematik gesehen werden, die bei ehemaligen Frühgeborenen erheblich häufiger diagnostiziert wird als bei zum Termin geborenen Kindern ^{28 29}. Ob defizitäre Aufmerksamkeit für die Mäuse nach Hyperoxie ebenfalls charakteristisch ist, muss in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden.

Eine Beteiligung astroglärer Reaktionen bei der Schädigung der unreifen weißen Substanz wurde in verschiedenen Schädigungsmodellen beschrieben, so etwa bei Ischämie ⁹⁹, Trauma¹⁰⁰ und Infektion ¹⁰¹. Veränderungen der GFAP Expression in reaktiven Astrozyten wurde mit verminderter Glutamat Clearance aus dem umliegenden Gewebe assoziiert ¹⁰². Unter den Hyperoxie-bedingten Reaktionen von Astrozyten sind ebenfalls Veränderungen der Expression von GFAP wie auch des Glutamat-Transporters GLAST zu finden, welche zeitlich zu den Schädigungen der Oligodendroglia in der weißen Substanz korrelieren. Die Transportermoleküle GLAST und GLT-1 werden beide in Astrozyten exprimiert, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ^{103 104}, darüber hinaus konnte GLT-1 auch in kultivierten Oligodendroglia nachgewiesen werden ¹⁰⁵. Ob Oligodendroglia zugleich GLAST exprimieren ist noch unbekannt. Es ist nicht auszuschließen, dass oligodendrogläre GLAST und GLT-1 Expression in der weißen

Substanz zur Glutamat Homeostase beitragen, in den immunhistologischen Färbungen in der weißen Substanz war jedoch die GLAST Expression in den Altersstufen P8 und P12 vorrangig in den Astrozyten zu lokalisieren ⁴⁰.

Auch Mikroglia tragen zur gesunden oligodendroglären Entwicklung bei ^{74,76,106}. Mikrogläre Aktivierung dagegen kann das Überleben wie auch die Reifung von Oligodendroglia stören, wie es etwa in inflammatorischen Modellen für neonatale Hirnschädigung als auch im adulten Modell für Multiple Sklerose charakterisiert worden ist ^{107,108}. Die Ergebnisse in den Studien zur Rolle von mikroglärer Aktivierung zeigen interessanter Weise eine Abhängigkeit von der Region des ZNS: Während in den Gebieten der weißen Substanz des Großhirns eine Veränderung der Morphologie von Mikroglia wie auch eine Induktion wichtiger Zytokine wie IL-1 β zu beobachten war, konnten anhand der gleichen Parameter im Kleinhirn keine Anzeichen einer mikroglären Aktivierung gefunden werden ⁶¹. Eine indirekte Beteiligung von Mikroglia bei der Hyperoxie-bedingten oligodendroglären Schädigung durch pro-inflammatorische Reaktionen ist somit für die zerebrale weiße Substanz anzunehmen, nicht jedoch für das Kleinhirn. Dabei war auch im Zerebrum die Mikroglia-Antwort nur von temporärer Natur und verlor sich während der Erholungszeit in Raumluft.

Während des Zeitraumes von 24 bis 40 Gestationswochen erfährt das menschliche Kleinhirn eine dynamische Entwicklung, während der das Volumen um das 5-fache zunimmt. Das Kleinhirn eines sehr unreifen Frühgeborenen ist während dieser sensitiven Entwicklungsphase einer drastischen Änderung der Umgebungsbedingungen ausgesetzt, die Einfluss auf kurzfristige Entwicklungsschritte und auf langfristige Funktionen haben können. Dementsprechend ist Frühgeburt mit einem Risiko für zerebelläre Fehlentwicklung assoziiert, wenngleich die zugrunde liegenden Mechanismen bisher kaum definiert worden sind ^{70,77,109,110}. Während das Kleinhirn in der Vergangenheit nahezu ausschließlich für Aufgaben der motorischen Koordination verantwortlich gemacht wurde¹¹¹, ist aufgrund neuerer wissenschaftlicher heutzutage ersichtlich, dass die funktionellen Bahnen des Kleinhirns in nahezu alle komplexen Aufgaben des Großhirns involviert sind, inklusive Kognition, Gedächtnis, Emotion ^{112,113}. Es scheint zudem bei psychiatrischen Erkrankungen wie ADHS und Autismus zur Symptomatik beizutragen ^{111,114,115}. Bei den Untersuchungen zum Einfluss von 24 Stunden postnataler Hyperoxie auf das unreife Kleinhirn von Ratten war eine Verringerung des Kleinhirnvolumens bis ins junge Erwachsenenalter zu belegen. Zudem konnten im Kleinhirn erhöhter Zelltod, verminderte Proliferation und verzögerte Reifung von oligodendroglären

Vorläuferzellen identifiziert werden. Für eine physiologische Entwicklung von Oligodendroglia ist die gelungene Interaktion zwischen glären Zellen eine zentrale Bedingung⁷⁴. Überleben, Proliferation und Reifung von oligodendroglären Vorläuferzellen wird von einer großen Anzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen beeinflusst^{76,91,116}, und Astrozyten fördern über die Produktion von PDGF-A die Proliferation von oligodendroglären Vorläuferzellen^{74,75,79}. In den Hyperoxie-Experimenten war eine ausgeprägte Reduktion der PDGF-A Expression im Kleinhirn zu verzeichnen. Die Tatsache, dass dies ebenfalls in reinen Astrozyten-Kulturen nach Hyperoxie *in vitro* zu finden war, legt die Schlussfolgerung nahe, dass die PDGF-A Abnahme im Kleinhirngewebe *in vivo* ebenfalls durch astrozytäre Dysfunktion zustande kommt. Somit scheint eine gestörte astrogläre-oligodendrogläre Interaktion bei der zerebellären Schädigung nach Hyperoxie involviert zu sein. Die verbesserte Entwicklung der weißen Substanz des Kleinhirns durch Minozyklin ging ebenfalls mit höherer PDGF-A Konzentration im Gewebe wie auch in den Astrozyten-Kulturen einher, was zusätzliche für eine Rolle von astrozytärem PDGF-A bei der Schädigung wie auch bei der Protektion des unreifen Kleinhirns spricht.

Die Möglichkeiten der Reparatur oder Kompensation scheint im Kleinhirn weniger ausgeprägt zu sein als im Großhirn. Die durch Hyperoxie bedingte Hypomyelinisierung wird im Großhirn nach Erholung bis ins junge Erwachsenenalter der Tiere bis P30 kompensiert zu werden, bleibt jedoch im Kleinhirn mangelhaft. Dies bestätigte sich auch in der Ultrastruktur-Analyse mittels Elektronenmikroskopie, in der die Veränderungen der Myelinscheiden im Kleinhirn auch bis ins junge Erwachsenenalter der Ratten persistierten, im erwachsenen Großhirn jedoch nicht mehr zu detektieren waren⁶¹. Direkte Schädigungen von Axonen waren in diesen Untersuchungen im Hyperoxiemodell nicht zu finden, dagegen ist von Axonopathien in einem neonatalen Schädigungsmodell mittels inflammatorischer Injektion mit IL-1 β berichtet worden¹¹⁷. Die Rolle von axonalen Veränderungen bei Frühgeborenen mit neurologischer Schädigung wird in der Literatur noch kontrovers diskutiert¹¹⁸. Insgesamt ist festzuhalten, dass die Veränderungen, die neonatale Hyperoxie im Kleinhirn der Ratten verursacht, den pathologischen Kennzeichen des Kleinhirns von ehemaligen Frühgeborenen ähneln^{77,110}.

Insgesamt zeigen die Daten deutlich, dass die Schädigung des unreifen Gehirns durch postnatale Hyperoxie auf relativ milde Art und Weise verläuft, bei der verschiedenartige Mechanismen und zelluläre Antwort interagieren. Die Befunde in Histologie und MRT wie auch die Verhaltensänderungen ähneln dabei in hohem Maße den Veränderungen wie sie bei Frühgeborenen beschrieben sind, weshalb das Hyperoxie-Modell insgesamt als wertvoll und

nützlich angesehen werden kann, um Einblicke in die Mechanismen der Schädigung wie auch der Protektion des Gehirns von Frühgeborenen zu erhalten.

3.2 Wege der Neuroprotektion

In der internationalen Fachliteratur sind zahlreiche Substanzen in Tiermodellen getestet worden, um eine pharmakologische Protektion des Gehirns von Neugeborenen und Frühgeborenen zu ermöglichen. Darunter gelten insbesondere anti-oxidative Substanzen wie Melatonin, Acetylcystein, aber auch Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin, Vitamin A und C und auch Edelgase wie Xenon als vielversprechend^{119 42}. In den Arbeiten mit dem Hyperoxie-Modell wurden neuroprotektive Strategien mit Minozyklin und Koffein untersucht.

Neben der bekannten antibakteriellen Aktivität besitzt Minozyklin auch neuroprotektive Eigenschaften, was bereits in neonatalen Modellen mit Asphyxie (Hypoxie-Ischämie)^{120–122} und mit perinataler Inflammation/Infektion^{123,124} gezeigt wurde. Die Gründe dieser protektiven Eigenschaften für neuronale und gläre Zellen sind insbesondere in der Stabilisierung von Mikroglia zu sehen, wodurch deren toxische Aktivierung verhindert oder gemindert wird. In den Untersuchungen zur postnatalen Hyperoxie scheint oxidativer Stress ein zentraler Weg der Zellschädigung im Gehirn zu sein, während eine Aktivierung von Mikroglia nur mild und passager sowie regional verschieden zu sein scheint⁶¹. Die günstigen Eigenschaften von Minozyklin gegen Hyperoxie sind daher vor allem in der anti-oxidativen sowie der anti-apoptotischen Kapazität¹²⁵ zu sehen.

Koffein wird bei Frühgeborenen seit mehr als 30 Jahren angewendet, um den Atemantrieb zu stimulieren und Apnoen zu verhindern^{88 89}. In einer randomisierten, kontrollierten Multicenter-Studie⁸⁹ wurde eine Abnahme von Zerebralparese und neurologischer Schädigung bei Frühgeborenen mit Koffeinbehandlung belegt¹²⁶. Neuroprotektive Eigenschaften von Koffein wurden zudem in Beobachtungsstudien berichtet^{89 126}. Positive Auswirkungen von Koffein auf das Gehirn konnten auch in Tiermodellen nachgewiesen werden, etwa für Morbus Parkinson⁴⁷, Schlaganfall¹²⁷ und Alzheimer¹²⁸. Bei neugeborenen Ratten mit chronischer Hypoxie verminderte Koffein das Ausmaß von Hypomyelinisierung und Ventrikulomegalie⁹⁰.

Schützende Auswirkungen hatte auch die einmalige Anwendung von Koffein in dem Hyperoxie-Modell, wie in den Analysen der hippocampalen Neurogenese und Neurodegeneration zu sehen war. Neuronaler Zelltod und DNA-Schäden nach Hyperoxie waren

geringer ausgeprägt, wenn die neugeborenen Tiere eine Einzeldosis Koffein zu Beginn der Hyperoxie-Exposition erhielten. Dabei scheint Koffein insbesondere durch anti-oxidative Effekte einen Vorteil für unreife und reife Neurone des Hippocampus zu haben¹²⁹. Koffein kann in Neuronen apoptotischen Zelltod verhindern, indem es die pro-apoptotische Aktivierung von Caspase3 blockiert¹³⁰.

Daneben kann Koffein aber intrazelluläre Signalwege beeinflussen, indem es bei kompetitiver Rezeptor-Bindung Adenosin von A1 und A2A Rezeptoren verdrängt¹³¹. Zahlreiche pharmakologische und biochemische Eigenschaften von Koffein sind in der Literatur ausführlich charakterisiert¹³², allerdings sind Wirkungen auf den Zellzyklus und Zelltod-Signalwege weniger bekannt^{133 134 135}. Koffein kann die Zellproliferation über p53-abhängige wie auch -unabhängige Mechanismen von Koffein modulieren^{136 137}. In höheren Konzentrationen treten pharmakologische Eigenschaften von Koffein in den Vordergrund, die denen von Phosphodiesterase (PDE) Inhibitoren ähneln und dabei einen Anstieg des *second messenger* cAMP bewirken. Eine Aktivierung der cAMP Kaskade kann bemerkenswerter Weise auch in reifen Neuronen des adulten Hippocampus von Ratten Zellproliferation auslösen¹³⁸.

Obwohl Koffein zu den meistverwendeten Medikamenten auf neonatologischen Intensivstationen gehört, sind die Mechanismen der Wirkung auf das Gehirn bislang sehr wenig untersucht. Die Ergebnisse am Hyperoxie-Modell der Ratte zeigen, dass bereits eine Einzeldosis Koffein zur Protektion von Neuronen führt, was den therapeutischen Stellenwert dieses Medikaments für die Entwicklung des Gehirns und der neurologischen Fähigkeiten von Frühgeborenen unterstreicht.

Zusammenfassung

Ehemalige Frühgeborene zeigen häufig eine beeinträchtigte neurologische Entwicklung, die meist auf einer Schädigung der weißen Hirnsubstanz basiert. Die Ursachen dieser Form der Hirnschädigung ist vor allem in der ausgeprägten Unreife der Oligodendroglia und oligodendroglären Vorläuferzellen zu finden, deren Proliferation, Überleben, Reifung und Funktionalität leicht durch äußere Einflüsse verändert. Als wichtige Faktoren der Schädigung gelten vor allem Hypokapnie und perinatale Infektion bzw. Inflammation, zusätzlich scheint Hyperoxie eine Rolle zu spielen. Frühgeborene sind an das fetale Leben mit geringer O₂-Konzentration angepasst, die Geburt in Raumluft kann bereits eine relative Hyperoxie darstellen. Auswirkungen hoher O₂-Konzentration sind vor allem Radikalbildung und oxidativer Stress, wodurch die Entwicklung unreifer Oligodendroglia gehemmt werden kann.

In den Experimenten mit neugeborenen Mäusen führt neonatale Hyperoxie-Exposition zu oligodendroglärer Schädigung und Hypomyelinisierung der weißen Substanz. Darüber hinaus sind Ultrastruktur und Diffusivität des Myelins bis ins Erwachsenenalter verändert. Eine motorische Hyperaktivität und gestörtes motorisches Lernverhalten weisen auf Hyperoxie-bedingte Symptome hin, die bei Frühgeborenen ebenfalls zu finden sind. Bei der Schädigung der weißen Substanz scheinen zudem Reaktionen von Astrozyten in der weißen Substanz beizutragen; insbesondere die Glutamat-Homöostase der Astrozyten ist in Mitleidenschaft gezogen, die wichtig für eine gesunde Entwicklung und Funktion von Oligodendrozyten ist. Das Kleinhirn ist in der neonatalen Zeit besonders unreif und macht eine äußerst dynamische Entwicklung mit hoher Proliferationsrate neuraler Zellen durch. In den Hyperoxie-Versuchen mit neugeborenen Ratten ist eine deutliche Minderung zerebellären Wachstums durch Hyperoxie zu erkennen, die von Reduktion oligodendroglärer Zellen und Hypomyelinisierung geprägt ist und bis ins Erwachsenenalter anhält. Interessanterweise scheint eine mikrogläre pro-inflammatorische Aktivierung im Großhirn neugeborener Ratten durch Hyperoxie ausgelöst zu werden, die sekundäre Schäden bedingen kann, jedoch ist diese Mikroglia-Antwort nicht im Kleinhirn zu finden. Die Protektion der weißen Substanz wie auch des Kleinhirns gelang in den Hyperoxie-Versuchen mittels Minozyklin, einem Tetrazyklin mit vielseitigen neuroprotektiven Eigenschaften. Die Anwendung von Koffein als gängiges Medikament in der Behandlung von Frühgeborenen mit Apnoe-Syndrom zeigte sich für den Schutz unreifer Neurone im Hippocampus als vorteilhaft.

Insgesamt zeigen die Daten mit dem Hyperoxie-Modell Mechanismen der zellulären, strukturellen und funktionellen Schädigung des unreifen Gehirns auf, die auch bei Frühgeborenen von Relevanz sind. Darüber hinaus werden auch neue Mechanismen der Protektion erkennbar, die helfen könne, die neurologische Entwicklung von Frühgeborenen künftig besser vor Schädigung zu schützen.

Literatur/Referenzen

1. Sellier E, Uldall P, Calado E, et al. Epilepsy and cerebral palsy: characteristics and trends in children born in 1976-1998. *Eur J Paediatr Neurol* 2012;16(1):48–55.
2. Groenendaal F, Termote JUM, van der Heide-Jalving M, van Haastert IC, de Vries LS. Complications affecting preterm neonates from 1991 to 2006: what have we gained? *Acta Paediatr* 2010;99(3):354–8.
3. de Kieviet JF, van Elburg RM, Lafeber HN, Oosterlaan J. Attention problems of very preterm children compared with age-matched term controls at school-age. *J Pediatr* 2012;161(5):824–9.
4. de Kieviet JF, Pouwels PJW, Lafeber HN, Vermeulen RJ, van Elburg RM, Oosterlaan J. A crucial role of altered fractional anisotropy in motor problems of very preterm children. *Eur J Paediatr Neurol* 2014;18(2):126–33.
5. Constable RT, Ment LR, Vohr BR, et al. Prematurely born children demonstrate white matter microstructural differences at 12 years of age, relative to term control subjects: an investigation of group and gender effects. *Pediatrics* 2008;121(2):306–16.
6. Back SA, Miller SP. Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? *Ann Neurol* 2014;75(4):469–86.
7. Cheong JLY, Thompson DK, Wang HX, et al. Abnormal white matter signal on MR imaging is related to abnormal tissue microstructure. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009;30(3):623–8.
8. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001;81(2):871–927.
9. Back SA. Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2006;12(2):129–40.
10. D’Amelio F, Eng LF, Gibbs MA. Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. *Glia* 1990;3(5):335–41.
11. Levine JB, Kong J, Nadler M, Xu Z. Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* 1999;28(3):215–24.
12. Li L, Lundkvist A, Andersson D, et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28(3):468–81.
13. Silverstein FS, Buchanan K, Johnston MV. Perinatal hypoxia-ischemia disrupts striatal high-affinity [3H]glutamate uptake into synaptosomes. *J Neurochem* 1986;47(5):1614–9.
14. Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 1999;45(6):724–35.
15. Deng W, Wang H, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(20):7751–6.
16. Gallo V, Zhou JM, McBain CJ, Wright P, Knutson PL, Armstrong RC. Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block. *J Neurosci* 1996;16(8):2659–70.

17. Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE. Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 2007;10(3):321–30.
18. Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 2004;24(11):2633–42.
19. Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9(3):293–8.
20. Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:102.
21. Zugno AI, Oliveira DL, Scherer EBS, Wajner M, Wofchuk S, Wyse ATS. Guanidinoacetate inhibits glutamate uptake in rat striatum of rats at different ages. *Neurochem Res* 2007;32(6):959–64.
22. Begni B, Brighina L, Fumagalli L, et al. Altered glutamate uptake in peripheral tissues from Down syndrome patients. *Neurosci Lett* 2003;343(2):73–6.
23. Folklerth RD. Periventricular leukomalacia: overview and recent findings. *Pediatr Dev Pathol* 2006;9(1):3–13.
24. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol* 2009;8(1):110–24.
25. Deulofeut R, Dudell G, Sola A. Treatment-by-gender effect when aiming to avoid hyperoxia in preterm infants in the NICU. *Acta Paediatr* 2007;96(7):990–4.
26. Castillo A, Sola A, Baquero H, et al. Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? *Pediatrics* 2008;121(5):882–9.
27. Wellmann S, Bühner C, Schmitz T. Focal necrosis and disturbed myelination in the white matter of newborn infants: a tale of too much or too little oxygen. *Front Pediatr* 2014;2:143.
28. Johnson S, Wolke D, Hennessy E, Marlow N. Educational outcomes in extremely preterm children: neuropsychological correlates and predictors of attainment. *Dev Neuropsychol* 2011;36(1):74–95.
29. Aarnoudse-Moens CSH, Weisglas-Kuperus N, van Goudoever JB, Oosterlaan J. Meta-analysis of neurobehavioral outcomes in very preterm and/or very low birth weight children. *Pediatrics* 2009;124(2):717–28.
30. Delobel-Ayoub M, Arnaud C, White-Koning M, et al. Behavioral problems and cognitive performance at 5 years of age after very preterm birth: the EPIPAGE Study. *Pediatrics* 2009;123(6):1485–92.
31. Sharp SI, McQuillin A, Gurling HMD. Genetics of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropharmacology* 2009;57(7-8):590–600.
32. Biederman J, Faraone SV. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 2005;366(9481):237–48.

33. Neuman RJ, Lobos E, Reich W, Henderson CA, Sun L-W, Todd RD. Prenatal smoking exposure and dopaminergic genotypes interact to cause a severe ADHD subtype. *Biol Psychiatry* 2007;61(12):1320–8.
34. Pineda DA, Palacio LG, Puerta IC, et al. Environmental influences that affect attention deficit/hyperactivity disorder: study of a genetic isolate. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2007;16(5):337–46.
35. Qiu M, Ye Z, Li Q, Liu G, Xie B, Wang J. Changes of brain structure and function in ADHD children. *Brain Topogr* 2011;24(3-4):243–52.
36. Skranes J, Vangberg TR, Kulseng S, et al. Clinical findings and white matter abnormalities seen on diffusion tensor imaging in adolescents with very low birth weight. *Brain* 2007;130(Pt 3):654–66.
37. Saugstad OD, Aune D. Optimal oxygenation of extremely low birth weight infants: a meta-analysis and systematic review of the oxygen saturation target studies. *Neonatology* 2014;105(1):55–63.
38. Ramani M, van Groen T, Kadish I, Bulger A, Ambalavanan N. Neurodevelopmental impairment following neonatal hyperoxia in the mouse. *Neurobiol Dis* 2013;50:69–75.
39. Solberg R, Longini M, Proietti F, Vezzosi P, Saugstad OD, Buonocore G. Resuscitation with supplementary oxygen induces oxidative injury in the cerebral cortex. *Free Radic Biol Med* 2012;53(5):1061–7.
40. Schmitz T, Ritter J, Mueller S, Felderhoff-Mueser U, Chew L-J, Gallo V. Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *J Neurosci* 2011;31(11):4327–44.
41. Gerstner B, Bühner C, Rheinländer C, et al. Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia. *J Neurosci Res* 2006;84(2):306–15.
42. Robertson NJ, Tan S, Groenendaal F, et al. Which neuroprotective agents are ready for bench to bedside translation in the newborn infant? *J Pediatr* 2012;160(4):544–52.e4.
43. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, et al. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* 2007;357(19):1893–902.
44. Doyle LW, Cheong J, Hunt RW, et al. Caffeine and brain development in very preterm infants. *Ann Neurol* 2010;68(5):734–42.
45. Weichelt U, Cay R, Schmitz T, et al. Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine. *Eur Respir J* 2013;41(4):966–73.
46. Endesfelder S, Zaak I, Weichelt U, Bühner C, Schmitz T. Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. *Free Radic Biol Med* 2014;67:221–34.
47. Rivkees SA, Wendler CC. Adverse and protective influences of adenosine on the newborn and embryo: implications for preterm white matter injury and embryo protection. *Pediatr Res* 2011;69(4):271–8.

48. Fan R, Xu F, Previti ML, et al. Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *J Neurosci* 2007;27(12):3057–63.
49. Cai Z-Y, Yan Y, Chen R. Minocycline reduces astrocytic reactivation and neuroinflammation in the hippocampus of a vascular cognitive impairment rat model. *Neurosci Bull* 2010;26(1):28–36.
50. Tang M, Alexander H, Clark RSB, Kochanek PM, Kagan VE, Bayir H. Minocycline reduces neuronal death and attenuates microglial response after pediatric asphyxial cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30(1):119–29.
51. Cai Z, Lin S, Fan L-W, Pang Y, Rhodes PG. Minocycline alleviates hypoxic-ischemic injury to developing oligodendrocytes in the neonatal rat brain. *Neuroscience* 2006;137(2):425–35.
52. Zhang Y, Metz LM, Yong VW, et al. Pilot study of minocycline in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 2008;35(2):185–91.
53. Hu W, Metselaar J, Ben L-H, et al. PEG minocycline-liposomes ameliorate CNS autoimmune disease. *PLoS ONE* 2009;4(1):e4151.
54. Amiri-Nikpour MR, Nazarbaghi S, Hamdi-Holasou M, Rezaei Y. An open-label evaluator-blinded clinical study of minocycline neuroprotection in ischemic stroke: gender-dependent effect. *Acta Neurol Scand* 2015;131(1):45–50.
55. Pardo CA, Buckley A, Thurm A, et al. A pilot open-label trial of minocycline in patients with autism and regressive features. *J Neurodev Disord* 2013;5(1):9.
56. Buller KM, Carty ML, Reinebrant HE, Wixey JA. Minocycline: a neuroprotective agent for hypoxic-ischemic brain injury in the neonate? *J Neurosci Res* 2009;87(3):599–608.
57. Dallas M, Boycott HE, Atkinson L, et al. Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *J Neurosci* 2007;27(15):3946–55.
58. Schmitz T, Endesfelder S, Reinert M-C, et al. Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia. *Exp Neurol* 2012;235(1):374–9.
59. Dowling P, Klinker F, Stadelmann C, Hasan K, Paulus W, Liebetanz D. Dopamine D3 receptor specifically modulates motor and sensory symptoms in iron-deficient mice. *J Neurosci* 2011;31(1):70–7.
60. Liebetanz D, Merkler D. Effects of commissural de- and remyelination on motor skill behaviour in the cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 2006;202(1):217–24.
61. Schmitz T, Krabbe G, Weikert G, et al. Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia. *Exp Neurol* 2014;254:153–65.
62. Dammann O, Leviton A. Inflammatory brain damage in preterm newborns--dry numbers, wet lab, and causal inferences. *Early Hum Dev* 2004;79(1):1–15.
63. Huang T-T, Zou Y, Corniola R. Oxidative stress and adult neurogenesis--effects of radiation and superoxide dismutase deficiency. *Semin Cell Dev Biol* 2012;23(7):738–44.

64. Pistollato F, Chen H-L, Schwartz PH, Basso G, Panchision DM. Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2007;35(3):424–35.
65. Schmitz T, Endesfelder S, Chew L-J, Zaak I, Bühner C. Minocycline protects oligodendroglial precursor cells against injury caused by oxygen-glucose deprivation. *J Neurosci Res* 2012;90(5):933–44.
66. Favrais G, van de Looij Y, Fleiss B, et al. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann Neurol* 2011;70(4):550–65.
67. Fan L-W, Mitchell HJ, Tien L-T, Rhodes PG, Cai Z. Interleukin-1beta-induced brain injury in the neonatal rat can be ameliorated by alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitrone. *Exp Neurol* 2009;220(1):143–53.
68. Chew L-J, King WC, Kennedy A, Gallo V. Interferon-gamma inhibits cell cycle exit in differentiating oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* 2005;52(2):127–43.
69. Scheuer T, Brockmüller V, Blanco Knowlton M, et al. Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline: Cerebellar Injury After Hyperoxia. *Glia* 2015;63(10):1825–39.
70. Volpe JJ. Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important. *J Child Neurol* 2009;24(9):1085–104.
71. Spittle AJ, Doyle LW, Anderson PJ, et al. Reduced cerebellar diameter in very preterm infants with abnormal general movements. *Early Hum Dev* 2010;86(1):1–5.
72. Northam GB, Liégeois F, Chong WK, Wyatt JS, Baldeweg T. Total brain white matter is a major determinant of IQ in adolescents born preterm. *Ann Neurol* 2011;69(4):702–11.
73. Parker J, Mitchell A, Kalpakidou A, et al. Cerebellar growth and behavioural & neuropsychological outcome in preterm adolescents. *Brain* 2008;131(Pt 5):1344–51.
74. Clemente D, Ortega MC, Melero-Jerez C, de Castro F. The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases. *Front Cell Neurosci* 2013;7:268.
75. Hill RA, Patel KD, Medved J, Reiss AM, Nishiyama A. NG2 cells in white matter but not gray matter proliferate in response to PDGF. *J Neurosci* 2013;33(36):14558–66.
76. Wilson HC, Onischke C, Raine CS. Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors. *Glia* 2003;44(2):153–65.
77. Limperopoulos C, Soul JS, Gauvreau K, et al. Late gestation cerebellar growth is rapid and impeded by premature birth. *Pediatrics* 2005;115(3):688–95.
78. Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, et al. Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 1999;126(3):457–67.
79. Funa K, Sasahara M. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014;9(2):168–81.

80. Besnard F, Perraud F, Sensenbrenner M, Labourdette G. Platelet-derived growth factor is a mitogen for glial but not for neuronal rat brain cells in vitro. *Neurosci Lett* 1987;73(3):287–92.
81. Gard AL, Burrell MR, Pfeiffer SE, Rudge JS, Williams WC. Astroglial control of oligodendrocyte survival mediated by PDGF and leukemia inhibitory factor-like protein. *Development* 1995;121(7):2187–97.
82. Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD. Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 1988;333(6173):562–5.
83. Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermarck B, Dubois-Dalcq M. A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 1988;53(2):309–19.
84. Saugstad OD. Hyperoxia in the term newborn: more evidence is still needed for optimal oxygen therapy. *Acta Paediatr Suppl* 2012;101(464):34–8.
85. Saugstad OD, Sejersted Y, Solberg R, Wollen EJ, Bjørås M. Oxygenation of the newborn: a molecular approach. *Neonatology* 2012;101(4):315–25.
86. Laplagne DA, Espósito MS, Piatti VC, et al. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol* 2006;4(12):e409.
87. Lledo P-M, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(3):179–93.
88. Aranda JV, Gorman W, Bergsteinsson H, Gunn T. Efficacy of caffeine in treatment of apnea in the low-birth-weight infant. *J Pediatr* 1977;90(3):467–72.
89. Clark RH, Bloom BT, Spitzer AR, Gerstmann DR. Reported medication use in the neonatal intensive care unit: data from a large national data set. *Pediatrics* 2006;117(6):1979–87.
90. Back SA, Craig A, Luo NL, et al. Protective effects of caffeine on chronic hypoxia-induced perinatal white matter injury. *Ann Neurol* 2006;60(6):696–705.
91. Back SA, Rosenberg PA. Pathophysiology of glia in perinatal white matter injury. *Glia* 2014;
92. Salmaso N, Jablonska B, Scafidi J, Vaccarino FM, Gallo V. Neurobiology of premature brain injury. *Nat Neurosci* 2014;17(3):341–6.
93. Scafidi J, Hammond TR, Scafidi S, et al. Intranasal epidermal growth factor treatment rescues neonatal brain injury. *Nature* 2014;506(7487):230–4.
94. Ward P, Counsell S, Allsop J, et al. Reduced fractional anisotropy on diffusion tensor magnetic resonance imaging after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2006;117(4):e619–30.
95. Dubois J, Dehaene-Lambertz G, Kulikova S, Poupon C, Hüppi PS, Hertz-Pannier L. The early development of brain white matter: a review of imaging studies in fetuses, newborns and infants. *Neuroscience* 2014;276:48–71.
96. Provenzale JM, Liang L, DeLong D, White LE. Diffusion tensor imaging assessment of brain white matter maturation during the first postnatal year. *AJR Am J Roentgenol* 2007;189(2):476–86.

97. Chahboune H, Ment LR, Stewart WB, Ma X, Rothman DL, Hyder F. Neurodevelopment of C57B/L6 mouse brain assessed by in vivo diffusion tensor imaging. *NMR Biomed* 2007;20(3):375–82.
98. de Kieviet JF, Piek JP, Aarnoudse-Moens CS, Oosterlaan J. Motor development in very preterm and very low-birth-weight children from birth to adolescence: a meta-analysis. *JAMA* 2009;302(20):2235–42.
99. Biran V, Joly L-M, Héron A, et al. Glial activation in white matter following ischemia in the neonatal P7 rat brain. *Exp Neurol* 2006;199(1):103–12.
100. Rostworowski M, Balasingam V, Chabot S, Owens T, Yong VW. Astroglial activation in the neonatal and adult murine brain post-trauma: elevation of inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon-gamma. *J Neurosci* 1997;17(10):3664–74.
101. Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, et al. Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatr Res* 2006;59(3):428–33.
102. Cavaliere C, Cirillo G, Rosaria Bianco M, et al. Gliosis alters expression and uptake of spinal glial amino acid transporters in a mouse neuropathic pain model. *Neuron Glia Biol* 2007;3(2):141–53.
103. Domercq M, Etxebarria E, Pérez-Samartín A, Matute C. Excitotoxic oligodendrocyte death and axonal damage induced by glutamate transporter inhibition. *Glia* 2005;52(1):36–46.
104. Regan MR, Huang YH, Kim YS, et al. Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J Neurosci* 2007;27(25):6607–19.
105. DeSilva TM, Kabakov AY, Goldhoff PE, Volpe JJ, Rosenberg PA. Regulation of glutamate transport in developing rat oligodendrocytes. *J Neurosci* 2009;29(24):7898–908.
106. Pang Y, Zheng B, Fan L-W, Rhodes PG, Cai Z. IGF-1 protects oligodendrocyte progenitors against TNF α -induced damage by activation of PI3K/Akt and interruption of the mitochondrial apoptotic pathway. *Glia* 2007;55(11):1099–107.
107. Bannerman P, Hahn A, Soulika A, Gallo V, Pleasure D. Astroglial activation in EAE spinal cord: derivation from radial glia, and relationships to oligodendroglia. *Glia* 2007;55(1):57–64.
108. Pinato L, da Silveira Cruz-Machado S, Franco DG, et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. *Brain Struct Funct* 2013;
109. Haldipur P, Bharti U, Alberti C, et al. Preterm delivery disrupts the developmental program of the cerebellum. *PLoS ONE* 2011;6(8):e23449.
110. Limperopoulos C, Chilingaryan G, Guizard N, Robertson RL, Du Plessis AJ. Cerebellar injury in the premature infant is associated with impaired growth of specific cerebral regions. *Pediatr Res* 2010;68(2):145–50.
111. Wang SS-H, Kloth AD, Badura A. The Cerebellum, Sensitive Periods, and Autism. *Neuron* 2014;83(3):518–32.

112. Steinlin M. Cerebellar disorders in childhood: cognitive problems. *Cerebellum* 2008;7(4):607–10.
113. Stoodley CJ, Valera EM, Schmahmann JD. Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fMRI study. *Neuroimage* 2012;59(2):1560–70.
114. Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Thuras PD. Expression of GABA(B) receptors is altered in brains of subjects with autism. *Cerebellum* 2009;8(1):64–9.
115. Ivanov I, Murrough JW, Bansal R, Hao X, Peterson BS. Cerebellar morphology and the effects of stimulant medications in youths with attention deficit-hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 2014;39(3):718–26.
116. Benn T, Halfpenny C, Scolding N. Glial cells as targets for cytotoxic immune mediators. *Glia* 2001;36(2):200–11.
117. Favrais G, van de Looij Y, Fleiss B, et al. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann Neurol* 2011;70(4):550–65.
118. Leviton A, Allred E, Kuban KCK, et al. Early blood gas abnormalities and the preterm brain. *Am J Epidemiol* 2010;172(8):907–16.
119. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clin Perinatol* 2014;41(1):119–31.
120. Arvin KL, Han BH, Du Y, Lin S, Paul SM, Holtzman DM. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann Neurol* 2002;52(1):54–61.
121. Cai Z, Lin S, Fan L-W, Pang Y, Rhodes PG. Minocycline alleviates hypoxic-ischemic injury to developing oligodendrocytes in the neonatal rat brain. *Neuroscience* 2006;137(2):425–35.
122. Tang M, Alexander H, Clark RSB, Kochanek PM, Kagan VE, Bayir H. Minocycline reduces neuronal death and attenuates microglial response after pediatric asphyxial cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30(1):119–29.
123. Cai Z-Y, Yan Y, Chen R. Minocycline reduces astrocytic reactivation and neuroinflammation in the hippocampus of a vascular cognitive impairment rat model. *Neurosci Bull* 2010;26(1):28–36.
124. Fan L-W, Pang Y, Lin S, et al. Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. *J Neurosci Res* 2005;82(1):71–82.
125. Xue M, Mikliaeva EI, Casha S, Zygun D, Demchuk A, Yong VW. Improving outcomes of neuroprotection by minocycline: guides from cell culture and intracerebral hemorrhage in mice. *Am J Pathol* 2010;176(3):1193–202.
126. Schmidt B, Roberts RS, Davis P, et al. Caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* 2006;354(20):2112–21.
127. Belayev L, Khoutorova L, Zhang Y, et al. Caffeinol confers cortical but not subcortical neuroprotection after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2004;1008(2):278–83.
128. Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, et al. Caffeine protects Alzheimer’s mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* 2006;142(4):941–52.

129. Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin Chim Acta* 2000;295(1-2):141–54.
130. Kim J, Lee S, Shim J, et al. Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons. *Neurochem Int* 2012;60(5):466–74.
131. Fredholm BB. Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol* 1995;76(2):93–101.
132. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999;51(1):83–133.
133. Chavez-Valdez R, Wills-Karp M, Ahlawat R, Cristofalo EA, Nathan A, Gauda EB. Caffeine modulates TNF-alpha production by cord blood monocytes: the role of adenosine receptors. *Pediatr Res* 2009;65(2):203–8.
134. Han M-E, Park K-H, Baek S-Y, et al. Inhibitory effects of caffeine on hippocampal neurogenesis and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;356(4):976–80.
135. Wentz CT, Magavi SSP. Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus. *Neuropharmacology* 2009;56(6-7):994–1000.
136. Hashimoto T, He Z, Ma W-Y, et al. Caffeine inhibits cell proliferation by G₀/G₁ phase arrest in JB6 cells. *Cancer Res* 2004;64(9):3344–9.
137. Lu YP, Lou YR, Li XH, et al. Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p53, p21(WAF1/CIP1), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice. *Cancer Res* 2000;60(17):4785–91.
138. Nakagawa S, Kim J-E, Lee R, et al. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 2002;22(9):3673–82.

Danksagung

Ich danke meinem Chef Professor Dr. med. Christoph Bühner für seine konstante Unterstützung und Inspiration. Seine Ideen und seine Begeisterung für die Forschung waren für mich großer Anreiz, immer wieder nach Antworten und Lösungen zu suchen.

Ich danke Stefanie Endesfelder für Ihre Freundschaft, für die unermüdliche Unterstützung im Labor, für ihre exzellente methodische Kompetenz und für die tolle Zusammenarbeit.

Ich danke Till Scheuer für seine freundschaftliche Zusammenarbeit, seinen wohlthuenden Humor und Optimismus und für seine exzellenten methodischen Fertigkeiten.

Ich danke Evelyn Strauß für Ihre großartige Hilfe im Labor, für alle ELISAs, für ihre exzellenten histologischen Arbeiten, und für Ihre Kochkünste.

Ich danke Ruth Herrmann für ihr Fingerspitzengefühl mit den Kulturen, für Ihre große Geduld, für Ihre Art, immer wieder Neues zu lernen.

Ich danke Professor Dr. Helmut Kettenmann für seine Offenheit, seine Unterstützung und seinen Rat.

Ich danke Dr. Vittorio Gallo für die Zeit in Washington DC, für die Möglichkeit, in seinem Labor das Feld der Neurowissenschaften zu erlernen.

Ich danke meiner Frau für Ihre Abenteuerlust, gemeinsam in die USA zu gehen, für Ihr beständiges Interesse an dieser Arbeit, für Ihren Zuspruch, für Ihre gute Laune, für Ihre Liebe.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift