

DISSERTATION

Einfluss von postnatalem Koffein auf das
Sauerstoff-geschädigte Kleinhirn der juvenilen Ratte

Influence of postnatal caffeine on the oxygen-impaired
cerebellum in the neonatal rat

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vivien Gizzas

Erstbetreuer*in: PD Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder

Datum der Promotion: 29. November 2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Frühgeburtlichkeit und ihre Folgen	3
1.1.1 Folgen durch Beeinträchtigung des Kleinhirns	4
1.1.2 Postnatale Hyperoxie als Risikofaktor für Langzeitschäden	5
1.1.3 Antioxidative und neuroprotektive Therapie mit Koffein	7
1.2 Anatomie und Entwicklung des Kleinhirns	10
1.2.1 Neurogenese im Kleinhirn	11
1.3 Fragestellung	14
2 Methodik	15
2.1 Probengewinnung im Tierexperiment	15
2.2 RNA-Präparation und quantitative Analysen der Genexpression	17
2.3 Immunhistochemische Analysen	18
2.4 Statistische Auswertung	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Erfolgreiche Verminderung der Hyperoxie-induzierten Beeinträchtigung der Purkinjenzellen durch Koffein	20
3.2 Koffein wirkt den durch Hyperoxie induzierten Proliferations-hemmenden Effekten entgegen	22
3.3 Koffein kann die Schädigung der frühen zerebellaren Neurogenese durch Hyperoxie nur teilweise auffangen	25

3.4	Durch Hyperoxie stark beeinträchtigte Proliferation kann längerfristig durch Koffein gerettet werden.....	26
3.5	Koffein nimmt nur marginalen Einfluss auf die Hyperoxie-induzierte Beeinträchtigung der granulären Reifung und Migration	29
3.6	Wenig Einfluss von Koffein auf die durch Hyperoxie stark beeinträchtigte Reifung und terminale Differenzierung der GCP	32
4	Diskussion	35
4.1	Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse.....	35
4.2	Implikationen für den klinischen Alltag und zukünftige Forschung	44
5	Schlussfolgerung	50
	Literaturverzeichnis	51
	Eidesstattliche Versicherung	61
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	62
	Druckexemplar der Publikation.....	63
	Lebenslauf.....	84
	Komplette Publikationsliste	86
	Danksagung	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der adulten Kleinhirnrinde.....	11
Abbildung 2	Schematische Darstellung der zerebellaren Neurogenese.	12
Abbildung 3	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.	16
Abbildung 4	Repräsentative Darstellung der Calbindin/DAPI gefärbten immunhistochemischen Schnitte der sich entwickelnden Kleinhirnrinde..	21
Abbildung 5	Quantifizierung der Calbindin/DAPI-positiven Purkinjezellen und der Dendritenlänge	22
Abbildung 6	Repräsentative Darstellung der Pax6, PCNA und DAPI gefärbten immunhistochemischen Schnitte der sich entwickelnden Kleinhirnrinde	23
Abbildung 7	Quantifizierung der Pax6- und PCNA-positiven Körnerzellen.	24
Abbildung 8	Quantifizierung der mRNA-Expression von FGF8 und Pax2 als Mediatoren der frühen zerebellaren Neurogenese mittels qPCR	26
Abbildung 9	Quantifizierung der mRNA- Expression von Calb1, Shh, CycD2 und BDNF mittels qPCR.	28
Abbildung 10	Quantifizierung der mRNA-Expression von Pax6, Prox1, NeuN, Lmx1 α und Sema6a als Marker für reife GCP (Pax6, Prox1, NeuN) und ihrer Migration (Pax6, Lmx1 α , Sema6a) mittels qPCR.....	31
Abbildung 11	Quantifizierung der mRNA-Expression von Chd7, NeuroD1/2, Sox2 und Syp mittels qPCR als Mediatoren für terminale Differenzierung und Überleben der GCP.	34

Abkürzungsverzeichnis

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung
AOP	Frühgeborenenapnoe (<i>apnoea of prematurity</i>)
ASS	Autismus-Spektrum-Störungen
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BG	Bergmann-Gliazellen
bHLH	basische Helix-Schleifen-Helix-Transkriptionsfaktoren (<i>basic helix-loop-helix-transcription factors</i>)
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BSA	bovines Serumalbumin
Calb1	Calbindin 1
CAP	Caffeine for Apnea of Prematurity
CCAS	Kognitiv-affektives Kleinhirnsyndrom (<i>Cerebellar cognitive affective syndrome</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
Chd7	Chromodomain helicase DNA-binding protein 7
CN	Kleinhirnerne (<i>cerebellar nuclei</i>)
CycD2	Cyclin dependent kinase 2
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
EGL	Äußere Körnerzellschicht (<i>external granular layer</i>)
ELBW	Geburtsgewicht <1000 g (<i>extremely low birth weight</i>)
FGF8	Fibroblast Growth Factor 8
GABA	γ -Aminobuttersäure (<i>γ-aminobutyric acid</i>)
GC	Körnerzellen (<i>granular cells</i>)
GCP	Granuläre Vorläuferzellen (<i>granular cell precursors</i>)
GL	Körnerzellschicht (<i>granular layer</i>)
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase
IGL	Innere Körnerzellschicht (<i>internal granular layer</i>)
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung (<i>intrauterine growth restriction</i>)
Lmx1 α	LIM homeobox transcription factor 1 alpha

ML	Molekularschicht (<i>molecular layer</i>)
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NeuroD1/2	Neuronal differentiation 1/2
NeuN	Neuronal nuclei
Pax2/6	Paired box 2/6
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PCL	Purkinje-Zellschicht (<i>Purkinje cell layer</i>)
PDA	Persistierender Ductus Arteriosus
Prox1	Prospero homeobox 1
qPCR	quantitative PCR
RGB	Rot-Grün-Blau Farbraum
RL	Rhombische Lippe
ROP	Frühgeborenenretinopathie (<i>retinopathy of prematurity</i>)
ROS	Sauerstoffradikale (<i>reactive oxygen species</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
Sema6a	Semaphorin 6a
Shh	Sonic hedgehog signaling molecule
Sox2	Sex-determining region Y-box 2
SWW	Schwangerschaftswoche
Syp	Synaptophysin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLBW	Geburtsgewicht <1500 g (<i>very low birth weight</i>)
VZ	Ventrikuläre Zone
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)

Zusammenfassung

Besonders im letzten Trimenon der Schwangerschaft finden wichtige Schritte der zerebellaren Neurogenese und Größenzunahme statt, die durch Frühgeburtlichkeit und die damit verbundene erhöhte Sauerstoffexposition gestört werden. Durch seine zahlreichen Verknüpfungen zu höheren kortikalen Regionen wird dem Kleinhirn immer mehr Einfluss auch auf nicht-motorische Fähigkeiten wie Kognition, Affektion, Sozialverhalten und emotionales Lernen zugeschrieben, welche durch Frühgeburtlichkeit beeinträchtigt werden und in entwicklungsneurologischen Störungen resultieren können. Koffein wirkt als Adenosinrezeptor-Antagonist und vermag durch antioxidative und neuroprotektive Eigenschaften die Auswirkungen der Sauerstofftoxizität bei Frühgeborenen zu reduzieren.

In dieser Studie untersuchten wir die Auswirkungen von Hyperoxie und Koffein auf das sich entwickelnde Kleinhirn der Ratte, indem wir neugeborene *Wistar*-Ratten für die ersten drei (P0-P3) oder fünf (P0-P5) postnatalen Tage entweder 21% (Normoxie) oder 80% Sauerstoff (Hyperoxie) exponierten und alle 48 Stunden entweder mit Koffein (10 mg/kg) oder PBS als Placebolösung behandelten. Die Untersuchungszeitpunkte wurden an P3 und P5 unmittelbar nach Expositionsende oder an P15 nach Erholung an Raumluft definiert. Erhöhter oxidativer Stress, ausgelöst durch Hyperoxie, bewirkte signifikante Verringerungen in der Proliferationskapazität, der Migration und der Differenzierung der zerebellaren Neurone. Koffein konnte der durch Hyperoxie beeinträchtigten Neurogenese der Purkinjezellen erfolgreich entgegenwirken, wohingegen die ebenfalls stark verminderte Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren für die Proliferation, die Migration und die Differenzierung der sich entwickelnden Körnerzellen nur teilweise durch Koffein moduliert werden konnte. Zusammenfassend lässt sich ein protektiver Effekt von Koffein auf die durch oxidativen Stress gestörte zerebellare Neurogenese nachweisen, der sich vor allem auf die Entwicklung der Purkinjezellen beschränkt und in geringerem Ausmaß auch die Neurogenese der Körnerzellen positiv beeinflusst.

Oxidativer Stress ist bei Frühgeborenen unvermeidbar und geht mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von neurologischen Entwicklungsstörungen einher. Die Identifizierung kausaler Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress, der Entwicklung von neurologischen Komplikationen im sich entwickelnden Gehirn sowie die Einflussnahme von in der neonatologischen Intensivmedizin zugelassenen Medikamenten können für die Entwicklung neuer Präventionsstrategien wegweisend sein.

Abstract

Cerebellar growth and neurogenesis happen especially during the last trimester of pregnancy and may be impaired by preterm birth and early exposition to high oxygen levels. Lately, cerebellar functions have increasingly been associated with non-motoric abilities like cognition, affection, emotion and social behavior which are often impacted by preterm birth and can result in neurodevelopmental disabilities. Caffeine acting as adenosine receptor antagonist has been associated with antioxidant and neuroprotective properties and has been shown to reduce oxygen toxicity and improve clinical outcome in preterm infants.

In this study we investigated the effects of hyperoxia and caffeine on the developing cerebellum in rats by exposing newborn *Wistar*-rats to either 21% (normoxia) or 80% oxygen (hyperoxia) for the first three (P3) or five postnatal days (P5) and treating them with either caffeine (10 mg/kg) or PBS (placebo) every 48 hours. Investigation dates were either at P3 or P5 immediately after exposure or at P15 after recovery to room air. Elevated oxidative stress induced by hyperoxia provoked significant disruption in cerebellar proliferation capacity, migration and differentiation. Caffeine was able to significantly reduce disturbances in the development of Purkinje cells. Quantitative expression of important transcription factors for proliferation, migration and terminal differentiation of granular cell precursors however were hardly influenced by caffeine application. In conclusion, caffeine showed protective effects in the hyperoxia-impaired cerebellar development but affected mostly the developing Purkinje cells and only to a lesser extent the evolution of granular cell precursors.

Oxidative stress is unavoidable in preterm infants and is associated with a high risk of neurodevelopmental disorders. The identification of causal relationships between oxidative stress, the development of neurological complications in the developing brain, and the influence of drugs approved for use in neonatal intensive care may lead to the development of new prevention strategies.

1 Einleitung

1.1 Frühgeburtlichkeit und ihre Folgen

Weltweit sind Komplikationen der Frühgeburtlichkeit bis heute die häufigste Ursache für Kindersterblichkeit mit einer globalen Inzidenz von mehr als 13 Millionen frühgeborenen Kindern pro Jahr (Lawn et al., 2023). Trotz der international stark variierenden Inzidenz zwischen 5 und 18%, kommt weltweit im Durchschnitt eins von zehn Neugeborenen zu früh auf die Welt (Sanghera and Yadav, 2023). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert als Frühgeborene alle Lebendgeborenen, die vor Beendigung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) zur Welt kommen, wobei weiter unterschieden wird zwischen einer späten Frühgeburt (32. bis 37. SSW), frühen Frühgeburt (28. bis 32. SSW) und extrem frühen Frühgeburt (<28. SSW) (WHO, 2022). Häufige Ursachen für spontane Frühgeburtlichkeit sind vorzeitige Wehen, Zervixverkürzung, ein früher vorzeitiger Blasensprung, Infektionen und Mehrlingsschwangerschaften. Dazu kommen induzierte Frühgeburten beispielsweise bei intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR), Eklampsie oder Präeklampsie (Khandre et al., 2022).

Durch zunehmende wissenschaftliche Erkenntnisse, klinische Erfahrung und Möglichkeiten der intensivmedizinischen Therapie, konnten die neonatale Morbidität und Mortalität in den vergangenen Jahrzehnten bereits maßgeblich gesenkt werden (Pearlman, 2022).

Da die Gesamtmorbidität allerdings mit niedrigerem Gestationsalter und Geburtsgewicht zunimmt, sind vor allem Frühgeborene mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht unter 1500 g (*very low birth weight*, VLBW) und extrem niedrigen Geburtsgewicht unter 1000 g (*extremely low birth weight*, ELBW) von akuten Komplikationen in der Neonatalphase, wie auch langfristigen Beeinträchtigungen bis ins Erwachsenenalter, betroffen (Pearlman, 2022). Insbesondere durch medizinische sowie technische Fortschritte und gute interdisziplinäre Zusammenarbeit innerhalb der großen Perinatalzentren steigt die generelle Überlebensrate für extreme Frühgeborene, sodass ein Forschungsschwerpunkt vor allem in der Reduzierung der langfristigen Morbidität und Prävention von neurologischen Entwicklungsstörungen liegt (Doyle et al., 2021). Ein niedriges Gestationsalter bei Geburt ist unter anderem langfristig assoziiert mit metabolischen, endokrinen und kardiovaskulären Erkrankungen, was für ehemalige Frühgeborene eine erhöhte Morbidität und Mortalität bis hin ins junge Erwachsenenalter

bedeutet (Crump et al., 2019, Kumar, 2022). Unmittelbare Komplikationen der Neonatalperiode können fast alle Organsysteme betreffen und umfassen bei VLBW Frühgeborenen primär Infektionen, Hyperbilirubinämie, nekrotisierende Enterokolitis (NEC), Frühgeborenenretinopathie (*retinopathy of prematurity*, ROP) und respiratorische Erkrankungen, wie das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen und die bronchopulmonale Dysplasie (BPD). Durch die extreme Unreife des Gehirns zum Zeitpunkt der Geburt sind zudem neurologische Komplikationen wie intrakranielle Blutungen in den ersten Lebensstagen (Starr et al., 2023) und im Verlauf unter anderem Epilepsien und Zerebralparesen von Relevanz (Glass et al., 2015). Neben strukturellen und motorischen neurologischen Störungen nimmt aber auch die Beeinträchtigung von Kognition, Verhalten und Emotion an Bedeutung im klinischen und wissenschaftlichen Kontext zu (Kanel et al., 2021). Diese entwicklungsneurologischen Beeinträchtigungen betreffen ebenfalls mit höherer Inzidenz extreme Frühgeborene mit einem Gestationsalter <28 SSW zum Zeitpunkt der Geburt (Doyle et al., 2021). In einer schwedischen nationalen Kohorte waren 75% der überlebenden vor der 24. SSW geborenen Frühgeborenen von entwicklungsneurologischen Störungen und 96% zusätzlich von somatischen Diagnosen betroffen (Morsing et al., 2022).

1.1.1 Folgen durch Beeinträchtigung des Kleinhirns

Besonders auf Grund seiner zahlreichen Verbindungen zu höhergelegenen kortikalen Arealen, wird dem Kleinhirn immer mehr Einfluss auf nicht-motorische Fähigkeiten wie Kognition, Affektion, Sozialverhalten und emotionales Lernen, eventuell sogar auch Schmerz, Gedächtnis und Sprache zugeschrieben (Adamaszek et al., 2017). Ähnlich zum motorischen Lernen, einer der Hauptfunktionen des Kleinhirns, wird auch eine Beteiligung am sozialen Lernen, also der Interpretation von Handlungen, Gefühlsausdrücken und Persönlichkeitszügen des Gegenübers, beschrieben (Van Overwalle et al., 2020). Zerebellare Funktionsstörungen werden unter anderem mit Autismus-Spektrum-Störungen (ASS), Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und Dyslexie in Verbindung gebracht (Stoodley, 2016). Ein Kleinhirnsyndrom dieser Art mit vorwiegend nicht-motorischen Defiziten wird auch als Kognitiv-affektives Kleinhirnsyndrom (*Cerebellar cognitive affective syndrome*, CCAS) bezeichnet (Brossard-Racine et al., 2015).

Da vor allem frühe Beeinträchtigungen im Vergleich zu zerebellaren Insulten im Erwachsenenalter ein schlechteres Outcome zur Folge haben, lässt sich vermuten, dass

das Kleinhirn besonders in der Entwicklung eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Stoodley, 2016). Insbesondere im letzten Trimester der Schwangerschaft finden wichtige zerebellare Entwicklungs- und Wachstumsprozesse statt, die durch extreme Frühgeburtlichkeit gestört werden (Bouyssi-Kobar et al., 2016). Dabei werden unter anderem Schädigungen des Kleinhirnparenchyms und daraus resultierend eine Beeinträchtigung von Wachstum, der Ausbildung wichtiger zerebro-zerebellarer Bahnen und neuronaler Aktivierung beschrieben (Limperopoulos et al., 2014). Weitere Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass bei Frühgeborenen auch ohne direkte Parenchymschädigung das zerebellare Wachstum eingeschränkt und entwicklungsneurologische Folgen daraus resultieren können (Wu et al., 2020). Externe Noxen wie Medikamente, Sauerstofftherapie sowie iatrogenen Stress durch die Umgebung auf einer neonatologischen Intensivstation können in die vulnerable Wachstumsphase des Kleinhirns eingreifen und das neurologische Outcome beeinflussen (Han-Menz et al., 2023, Yrjölä et al., 2022). Insbesondere für häufig in der Neonatologie verwendete Opioide wie Morphin oder Fentanyl zeigten bisher durchgeführte Studien im Verlauf eine Volumenminderung und ein verlangsamtes zerebellares Wachstum (Zwicker et al., 2016). Zahlreiche weitere Faktoren wie Genmutationen, zerebellare Blutungen, eine perinatale Hypothyreose oder Virusinfektionen können zudem das zerebellare Wachstum einschränken und eine langfristige Hypoplasie verantworten (Leto et al., 2016). Bei Frühgeborenen werden darüber hinaus auch postnatale Infektionen und Stress durch Schmerzempfinden mit einer zerebellaren Volumenminderung und neurokognitiven Einschränkungen im Vorschulalter assoziiert (Ranger et al., 2015). Perrone et al. zeigten, dass schmerzhafte Routineeingriffe, auf die Frühgeborene durch ihr noch unreifes Nervensystem besonders empfindlich reagieren, auch zu einer erhöhten Produktion von Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS) führte (Perrone et al., 2017). Der dadurch ausgelöste oxidative Stress wird ebenso mit einer Parenchymschädigung bei Frühgeborenen in Verbindung gebracht und sollte als Teil der Pathogenese betrachtet werden (Lembo et al., 2021).

1.1.2 Postnatale Hyperoxie als Risikofaktor für Langzeitschäden

Ein großes Problem der Frühgeburtlichkeit bleibt die frühe Sauerstoffexposition in einer besonders vulnerablen Phase der Entwicklung. Während das intrauterine Wachstum unter einer physiologischen Hypoxie mit niedrigen Sauerstoffpartialdrücken von

25-50 mmHg stattfindet, wird das Frühgeborene postnatal mit einer relativen Hyperoxie von 70-80 mmHg konfrontiert (Torres-Cuevas et al., 2017). Bedingt durch die noch unreife Lunge und unzureichende Oxygenierung benötigen vor allem extreme Frühgeborene oft noch eine zusätzliche Sauerstoffsupplementation, die überlebensnotwendig, aber auch mit einer erhöhten Morbidität für zuvor genannte Komplikationen wie der ROP und der BPD assoziiert ist (Glass et al., 2015). Sauerstofftoxisch assoziierte Morbiditäten zu reduzieren, also die richtige Balance zwischen ausreichender Oxygenierung zu finden und dabei starke Schwankungen der Sauerstoffsättigung zu vermeiden, ist oft eine Gratwanderung und bleibt eine der wichtigsten Fragestellungen in der Neonatologie (Perrone et al., 2023).

Der durch die Hyperoxie ausgelöste oxidative Stress lässt sich vereinfacht als ein Mangel an antioxidativen Ressourcen in einer Umgebung, die vermehrt ROS produziert, beschreiben (Tipple and Ambalavanan, 2019). ROS fallen zu jeder Zeit im Rahmen des normalen zellulären Metabolismus an, werden jedoch unter physiologischen Bedingungen mit ausreichenden Kapazitäten verstoffwechselt, bevor sie potentiell Proteinen, Lipiden oder DNA-Bausteinen schaden können (Asikainen and White, 2004). Durch einen erhöhten Energieverbrauch und verminderte antioxidative Ressourcen ist das Gehirn besonders empfindlich für erhöhte Konzentrationen von Sauerstoff (Fatemi et al., 2012). In überschüssigen Mengen können die Sauerstoffradikale in physiologische Signalwege eingreifen und werden für zelluläre und Gewebeschädigungen verantwortlich gemacht, die unter anderem die Grundlage für die erhöhte Morbidität bei Frühgeborenen bilden (Perrone et al., 2023). Diese mit oxidativem Stress assoziierten Erkrankungen bei Frühgeborenen, wie die ROP, NEC oder BPD, werden aus diesem Grund häufig auch als *Oxygen Radical Diseases of Neonatology* zusammengefasst (Perrone et al., 2023). Durch Infektionen, Inflammation, Schmerzempfinden, Ischämie und Hyperoxie sind Frühgeborene nicht nur einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt, sie reagieren zudem besonders empfindlich auf Sauerstofftoxizität, da ihre antioxidativen Abwehrsysteme noch nicht vollständig ausgereift sind und ihre Kapazitäten noch unzureichend sind, um die durch Hyperoxie vermehrt anfallenden ROS zu bewältigen (Tipple and Ambalavanan, 2019). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Expression wichtiger antioxidativer Enzyme wie der Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Hämoxigenase, aber auch die Bildung nicht-enzymatischer Antioxidantien wie Glutathion, Chelatbildnern und Vitamin C/E erst in den letzten Wochen der Schwangerschaft ansteigt (Torres-Cuevas et al., 2017).

Interessanterweise scheint dieses Ungleichgewicht auch in der Pathogenese von Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) eine Rolle zu spielen. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten Kinder und junge Erwachsene mit ASS in postmortalen Untersuchungen des Kleinhirns eine verminderte Kapazität des antioxidativen Glutathion-Redox-Systems und erhöhte Marker für oxidativen Stress (Rose et al., 2012). Diese Daten können zu der Annahme führen, dass eine frühe antioxidative Therapie auch die Prognose einer ASS positiv beeinflussen könnte (Bjørklund et al., 2020), wobei die aktuelle Datenlage hierfür noch keine wegweisenden Schlussfolgerungen zulässt.

Zur Reduktion der Sauerstoff-toxischen Morbiditäten spielt neben der Reduktion bekannter Trigger die antioxidative Therapie bei Frühgeborenen in der Klinik eine zentrale Rolle. Melatonin werden antioxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben und wird darüber hinaus auch im Zusammenhang mit neuroprotektiven Eigenschaften diskutiert (Falsaperla et al., 2020). Experimentelle Studien weisen außerdem auf einen positiven Einfluss auf den Verlauf einer NEC hin (Xiong et al., 2022), die in ihrer Pathogenese ebenso stark mit oxidativem Stress assoziiert wird (Falsaperla et al., 2020). Lutein besitzt ebenso antioxidative Eigenschaften und wurde wie auch Allopurinol, N-Acetylcystein oder die Vitamine E, C und A zur antioxidativen Therapie und Prävention der ROP in klinischen Studien untersucht (Lembo et al., 2021). So sind verschiedene protektive Strategien bereits zum Einsatz gekommen, jedoch oft ohne starke wissenschaftliche Evidenz. Koffein, das seit vielen Jahrzehnten und zu Beginn auch ohne wissenschaftliche Evidenz in der Neonatologie verabreicht wurde, werden ebenso antioxidative und neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben und stellt durch die stetig zunehmende wissenschaftliche Datengrundlage mittlerweile eine erfolgsversprechende Therapie dar (Kumar and Lipshultz, 2019).

1.1.3 Antioxidative und neuroprotektive Therapie mit Koffein

Koffein wird bereits seit 50 Jahren auf neonatologischen Intensivstationen zur Therapie der Frühgeborenenapnoe (*apnoea of prematurity*, AOP), die fast alle ELBW-Frühgeborenen betrifft (Morton and Smith, 2016), eingesetzt (Saroha and Patel, 2020). Insbesondere aber seit der multizentrischen, Placebo-kontrollierten, randomisierten CAP-Studie im Jahr 2006 hat sich Koffein gegenüber alternativen Strategien als pharmakologische Therapie der AOP durchgesetzt. Neben der Reduktion der Apnoeanfälle konnte auch eine verminderte Indikationsstellung zur mechanischen Beatmung in den ersten Lebenstagen und eine verminderte Sauerstoffbedürftigkeit und

BPD-Inzidenz im Verlauf nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2006). Langzeit-Studien zeigten für VLBW-Frühgeborene nach Koffeintherapie mit 18 bis 21 Monaten ein vermindertes Auftreten von Zerebralpareesen und kognitiven Störungen (Schmidt et al., 2007). Eine Nachuntersuchung der ehemals Frühgeborenen nach 5 Jahren zeigte keine Unterschiede im entwicklungsneurologischen Ausgang nach Koffeintherapie (Schmidt et al., 2012), wohingegen das 11-Jahres Follow-Up der CAP-Studie geringere motorische Beeinträchtigungen nach Koffeintherapie aufzeigte (Schmidt et al., 2017). Vor allem aber macht diese Studie sichtbar, dass die Koffeintherapie auch langfristig sicher ist (Schmidt et al., 2017). Koffein wird als risikoarmes und nur selten mit arzneimittelbedingten Nebenwirkungen assoziiertes Medikament beschrieben (Schmidt et al., 2006). Auf Grund der positiven Auswirkungen wird Koffein bei extremen Frühgeborenen nicht nur therapeutisch, sondern zunehmend auch prophylaktisch eingesetzt (Szatkowski et al., 2023). Aktuelle Studien zeigen, dass eine prophylaktische Koffeintherapie bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter <32 SSW die Dauer der Sauerstofftherapie verkürzte, weniger Indikationen zur nicht-invasiven oder invasiven Beatmung gestellt wurden, die BPD-Inzidenz im Verlauf gesenkt wurde und die neonatologischen Patienten früher entlassen werden konnten (Elmowafi et al., 2022). Die frühe Koffeingabe innerhalb von 48 Stunden scheint zudem das Risiko für neonatale Hirnschädigungen zu vermindern (Szatkowski et al., 2023) und bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter <29 SSW das entwicklungsneurologische Outcome zu verbessern (Lodha et al., 2019). Dies lässt die Frage aufkommen, wann der optimale Zeitpunkt zum Beginn einer Koffeintherapie ist und ob Koffein bei extremen Frühgeborenen mit erhöhtem Risikoprofil nicht immer zum frühestmöglichen Zeitpunkt gegeben werden sollte. Weitere positive Nebeneffekte der Koffeintherapie sind die verbesserte Lungenfunktion und Compliance, erfolgreichere Extubationen und vermutlich auch eine geringere Inzidenz für einen behandlungsbedürftigen PDA (Yuan et al., 2022). Als relevante Nebenwirkungen der Koffeintherapie werden ein erhöhter Sauerstoff- und Energieverbrauch sowie eine verzögerte Gewichtszunahme beschrieben (Parikka et al., 2015).

Pharmakologisch gehört Koffein zur Gruppe der Methylxanthine und übt seine Wirkung als nicht-spezifischer Inhibitor der A1- und A2a-Adenosinrezeptoren aus, welche im Gehirn vor allem an GABAergen-Neuronen im Neocortex, Hippocampus und im Kleinhirn exprimiert werden (Kumar and Lipshultz, 2019, Fredholm, 1995). So wird die Sekretion verschiedener Neurotransmitter beeinflusst und die zentral stimulierende Wirkung von Koffein vermittelt (Fredholm, 1995). Daraus resultiert unter anderem ein erhöhter

Atemantrieb, eine verbesserte Kontraktilität des Zwerchfells und eine erhöhte Sensibilität für Hyperkapnie (Morton and Smith, 2016). In höheren Konzentrationen nimmt der regulierende Einfluss auf die Apnoe zu, die pharmakodynamischen Folgen werden jedoch unübersichtlicher und können dann auch eine Inhibierung an GABA- oder cholinergen Rezeptoren und Störungen der Calcium-Homöostase beinhalten (Aranda and Beharry, 2020). Adenosin unterdrückt durch den A1-Rezeptor mitunter die neuronale Aktivität im Atemzentrum der *Medulla oblongata*, was im Tiermodell durch Theophyllin, ebenfalls ein Methylxanthin, antagonisiert werden konnte (Herlenius et al., 1997). In der klinischen Anwendung hat sich jedoch Koffein gegenüber anderen Methylxanthinen durchgesetzt, da klinische Studien therapeutische Vorteile und, bei gleicher Auswirkung auf die Apnoerate der Frühgeborenen, insgesamt weniger Arzneimittelnebenwirkungen wie intermittierende Tachykardien nachweisen konnten (Henderson-Smart and Steer, 2010).

Gleichzeitig wird durch experimentelle Studien versucht, im Detail nachzuvollziehen, wie Koffein auf metabolischer und genetischer Ebene seine Wirkung vermittelt. Endesfelder et al. konnten im neugeborenen Rattenmodell anti-inflammatorische Effekte von Koffein in der Sauerstoff-geschädigten Lunge durch eine Verminderung pro-inflammatorischer Mediatoren sowie eine Inhibierung einer Chemokin- und Zytokin-vermittelten Immunzell-Infiltration nachweisen (Endesfelder et al., 2020). Zudem zeigten sich verminderte oxidative DNA-Schäden nach Koffeintherapie und eine verbesserte Reaktion auf oxidativen Stress (Endesfelder et al., 2019). Zusammen betrachtet können diese Ergebnisse dazu beitragen, die Pathogenese und protektiven Eigenschaften von Koffein gegenüber der Sauerstoff-geschädigten unreifen Lunge als Modell der BPD besser zu verstehen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden experimentellen Studie sind grundlegend die neuroprotektiven Eigenschaften von Koffein im sich entwickelnden Gehirn wegweisend. So zeigten *in-vivo* Studien an juvenilen und neugeborenen Ratten, dass Koffein über die Modulierung neuronaler Signalwege, die durch hohe Sauerstoffkonzentrationen eingeschränkte Proliferations- und Differenzierungskapazität im Großhirn signifikant verbessern konnte (Heise et al., 2023). Vermeintlich scheinen diese neuroprotektiven Effekte im Zusammenhang mit einer verbesserten antioxidativen Antwort durch Koffein, als auch anti-inflammatorischen und anti-apoptotischen Eigenschaften von Koffein zu stehen (Endesfelder et al., 2017). Raoofi et al. zeigten ebenfalls anti-apoptotische, anti-inflammatorische und antioxidative Eigenschaften von Koffein in ihrer tierexperimentellen Studie mit erwachsenen *Wistar*-Ratten (Raoofi et al.,

2022). Potter et al. untersuchten die Effekte von Koffein in einem hypoxisch-ischämischen Modell und fanden neuroprotektive Eigenschaften, die sich vor allem auf behavioristischer Ebene der neonatalen Ratten widerspiegeln, nicht aber auf neuropathologischer Ebene (Potter et al., 2018). Abreu et al. untersuchten die Auswirkungen von Koffein in erwachsenen Ratten und zeigten neben positiven Auswirkungen auf das Langzeitgedächtnis auch antioxidative Eigenschaften von Koffein im Gehirn sowie eine Modulierung des antioxidativen Systems (Abreu et al., 2011).

1.2 Anatomie und Entwicklung des Kleinhirns

Das Kleinhirn befindet sich in der hinteren Schädelgrube und lässt sich makroskopisch in die beiden Kleinhirnhemisphären, den dazwischenliegenden Wurm (*Vermis*) und den paarigen, ventrokaudal gelegenen *Flocculus* einteilen. Vor allem das *Pontocerebellum*, welches sich aus den beiden Hemisphären zusammensetzt, steht in enger Beziehung zum Großhirn und beherbergt in seiner Rinde die größte Anzahl zerebellarer Neurone (Trepel, 2021). Im letzten Trimenon der Schwangerschaft bis zum Geburtstermin durchläuft das Kleinhirn eine Phase besonders schnellen Wachstums, die durch eine Frühgeburt, auch ohne nachweisbare zerebro-zerebellare Insulte, eingeschränkt wird (Clouchoux et al., 2012). In Reifgeborenen zeichnet sich diese Phase durch einen 3 bis 5-fachen Volumenzuwachs und durch exponentielle Zunahme der Furchung mit einer 30-fachen Oberflächenvergrößerung bis zur 40. SSW aus (Volpe, 2009). Die Kleinhirnentwicklung endet aber nicht abrupt mit der Geburt. Während das Größenwachstum anschließend nur noch langsam stattfindet, ist das gesamte erste Lebensjahr kennzeichnend für wichtige neuronale Differenzierungs- und Reifungsprozesse (Volpe, 2009). Im Gegensatz dazu findet in der Ratte eine vergleichbare, exponentielle Volumenzunahme und Proliferation erst postnatal in den ersten drei Lebenswochen (bis etwa P21) statt (Bandeira et al., 2009).

Mikroskopisch ist die Kleinhirnrinde im ausgereiften Zustand von außen nach innen in drei Schichten gegliedert: die Molekularschicht (*molecular layer*, ML), die Purkinje-Zellschicht (*Purkinje cell layer*, PCL) und der Körnerzellschicht (*granular layer*, GL); die zellreichste Schicht bestehend hauptsächlich aus Körnerzellen (Abbildung 1). Die GABAergen Purkinjezellen nehmen im Kleinhirn eine besondere Funktion ein, denn sie sind die einzigen Efferenzen, also die einzigen Projektionsneurone, die Informationen aus der Kleinhirnrinde in andere Regionen vermitteln können. Charakteristisch für die

Purkinjezellen sind ihre großen Dendritenbäume mit mehreren tausend Synapsen pro Neuron, über die sie exzitatorische und inhibitorische Signale erhalten (Hirano, 2018). Umgeben werden sie von Bergmann-Gliazellen (BG). Die darunterliegende Körnerzellschicht enthält neben den inhibitorischen Golgi-Zellen vor allem die Glutamatergen Körnerzellen (Hayes et al.), welche über die in die Molekularschicht ziehenden Parallelfasern ihre Informationen direkt an die Purkinjezellen weitergeben (Chadderton et al., 2004). Die Molekularschicht ist die zellärmste Schicht, die neben den Parallelfasern der Körnerzellen und den Dendriten der Purkinjezellen nur wenige inhibitorische Interneurone enthält (Trepel, 2021).

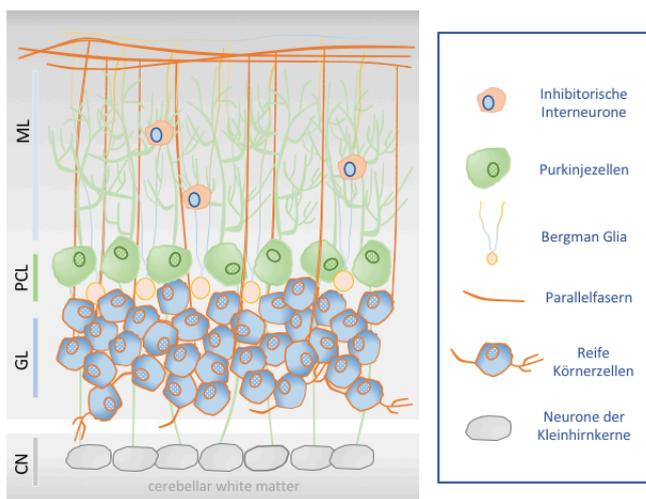


Abbildung 1 Schematische Darstellung der adulten Kleinhirnrinde. Von außen nach innen: Molekularschicht (*molecular layer*, ML), Purkinje-Zellschicht (*Purkinje cell layer*, PCL), Körnerzellschicht (*granular layer*, GL) und außerhalb der Kleinhirnrinde die Kleinhirnrinde (*cerebellar nuclei*). Rechts: Legende, zelluläre Bestandteile der Kleinhirnrinde. Eigene Darstellung.

1.2.1 Neurogenese im Kleinhirn

Während der Entwicklung des Kleinhirns imponieren Proliferations- und Migrationsprozesse, organisiert durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren, um die adulte, hochorganisierte Architektur der Kleinhirnrinde zu erschaffen (Abbildung 2, siehe ergänzend Übersichtsartikel (Consalez et al., 2021)). Die GABAergen zerebellaren Neurone wie die Purkinjezellen, Interneurone der ML und Golgi-Zellen entstehen aus Vorläuferzellen der ventrikulären Zone (Kolevzon et al., 2007) und wandern schon während der frühen Embryogenese in Richtung ihres Zielortes (Galas et al., 2017). Die Projektionsneurone der Kleinhirnrinde (*cerebellar nuclei*, CN) und die exzitatorischen Körnerzellen hingegen entstehen aus einer Keimzone der rhombischen Lippe (RL) im Hirnstamm, von wo aus sie ins Kleinhirn migrieren und sich dort zunächst in der äußeren Körnerzellschicht (*external granular layer*, EGL) ansiedeln (De Luca et al., 2016, Vaillant and Monard, 2009). Bei der EGL handelt es sich um eine proliferative Zone, die nur während der Kleinhirnentwicklung zu beobachten ist und bis zum Ende des ersten

Vorläuferzellen. Auch die Proliferation der paired box 2 (Pax2)-positiven Vorläufer der inhibitorischen Interneurone wird maßgeblich durch Shh induziert (De Luca et al., 2016), wie auch die Differenzierung der BG (Vaillant and Monard, 2009). Die BG spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Purkinjezellen insbesondere für die typische Morphologie der Dendritenbäume und das Wachstum der einzelnen Dendriten (Lordkipanidze and Dunaevsky, 2005). Die Migration der GCP entlang der BG wird vor allem chemotaktisch durch den neurotrophen Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-Konzentrationsgradienten gesteuert (Borghesani et al., 2002).

Zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren sind an der Proliferation, Migration und Differenzierung während der zerebellaren Neurogenese beteiligt (Abbildung 2). Pax6, Prospero homeobox 1 (Prox1) und Neuronal nuclei (NeuN) sind Marker für reifende Körnerzellen zu verschiedenen Zeitpunkten (Lavado et al., 2010, Gusel'nikova and Korzhevskiy, 2015) und Semaphorin 6a (Sema6a), LIM homeobox transcription factor 1 alpha (Lmx1 α) und Pax6 steuern die Migration der GCP (Leto et al., 2016). BDNF spielt eine Schlüsselrolle für sowohl Proliferation und Reifung als auch Migration der GCP (Camuso et al., 2022). Calbindin (Calb1) ist der wichtigste Marker für sich entwickelnde und später auch reife Purkinjezellen, während Pax2 die weiteren GABAergen Neurone markiert, die von der VZ abstammen (Leto et al., 2016). Weitere relevante Akteure für die Entwicklung und das Überleben der unreifen Vorläuferzellen sind Chromodomain helicase DNA-binding protein 7 (Chd7), Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8), Neuronal differentiation 1/2 (NeuroD1/2), Sex-determining region Y-box 2 (Sox2) und Synaptophysin (Syp).

Die menschliche Kleinhirnneurogenese ist vom Embryonalstadium bis zum Beginn des dritten Lebensjahres ein sensibel gesteuerter Prozess. Wird vor allem die Phase des schnellen Hirnwachstums (*brain growth spurt*) (Dobbing and Sands, 1979), verortet im letzten Trimester der Schwangerschaft, durch exogene Faktoren gestört, besteht ein hohes Risiko für Beeinträchtigung der Kleinhirnentwicklung. Diese experimentelle Arbeit in einem *in vivo*-Modell des Sauerstoff-geschädigten Kleinhirns der neugeborenen Ratte soll dazu beitragen, die molekularen Mechanismen im Hinblick auf die zerebellaren Auswirkungen von oxidativem Stress besser zu verstehen.

1.3 Fragestellung

Der regelmäßige Einsatz von Koffein im klinischen Alltag erfordert sichere und valide Daten, um kurz- und langfristige Nebenwirkungen weiter zu vermindern und die Auswirkungen von Koffein auf die vulnerablen und Sauerstoff-geschädigten Organsysteme bei Frühgeborenen besser verstehen zu können. Auf der Grundlage klinischer und experimenteller Studien liegt ein gut fundiertes Basiswissen vor, dass Koffein bei Frühgeborenen neuroprotektive Effekte aufweist, wobei der langfristige Einfluss auf die motorische Koordination ehemaliger Frühgeborener diskutabel bleibt. Trotz einer Vielzahl an tierexperimentellen Studien in assoziierten Schädigungsmodellen zur humanen Frühgeburtlichkeit existieren bislang wenig Daten zum Einfluss einer Koffeintherapie auf das sich entwickelnde Kleinhirn. Das Ziel dieser *in vivo*-Studie war, im Hyperoxie-Schädigungsmodell der neonatalen Ratte aufzuzeigen, wie sich eine perinatale Hyperoxie, als auch mit präventiv-applizierten Koffein, auf die zerebellare Neurogenese auswirken und, ob Koffein der Sauerstofftoxizität durch die antioxidativen Eigenschaften akut und nachhaltig im Kleinhirn entgegenwirken kann.

2 Methodik

2.1 Probengewinnung im Tierexperiment

Alle durchgeführten Experimente wurden durch die zuständige lokale Tierschutzbehörde (LAGeSo, Genehmigungsnummer G-0088/16) genehmigt und entsprechend der Tierschutz-Richtlinie der Charité und den ARRIVE-Richtlinien für Tierversuche durchgeführt.

Wie zuvor beschrieben (Gizsas et al., 2022), wurden die trächtigen *Wistar* Ratten von der Abteilung für Experimentelle Medizin (FEM, Charité Universitätsmedizin Berlin) bezogen. Die trächtigen Muttertiere wurden unter kontrollierten Bedingungen, einschließlich eines geregelten 12/12 Stunden- circadianen Rhythmus, *ad libitum* Ernährung sowie Zugang zu Wasser einzeln gehalten. Nach der Geburt wurden die neugeborenen Rattenwelpen innerhalb von 12 Stunden nach dem Zufallsprinzip unter Berücksichtigung des Geschlechtes in die Versuchsgruppen eingeteilt und je nach Gruppe für die ersten 3 oder 5 postnatalen (P) Lebenstage (P0-P3 bzw. P0-P5) entweder unter Raumluft (Normoxie, NO, 21% Sauerstoff) oder in einem speziellen Sauerstoffinkubator mit 80% Sauerstoffangereicherter Luft (OxyCycler BioSpherix, Lacona, New York) gehalten (Hyperoxie, HY), wobei die Muttertiere zur Versorgung mit Muttermilch bei den Jungtieren belassen wurden. Die Muttertiere rotierten alle 24 Stunden zwischen Normoxie und Hyperoxie, um eine Beeinträchtigung durch zu hohe Sauerstoffkonzentrationen und eine damit verbundene mögliche Unterversorgung der Jungtiere zu vermeiden. Zusätzlich erhielten die Rattenwelpen entweder Koffein oder Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) als Trägerlösung, sodass sich folgende vier Versuchsgruppen ergeben: NO (Normoxie, 21% Sauerstoff und Applikation von PBS, Kontrollgruppe); NOC (Normoxie, 21% Sauerstoff und Applikation von Koffein); HY (Hyperoxie, 80% Sauerstoff und Applikation von PBS) und HYC (Hyperoxie, 80% Sauerstoff und Applikation von Koffein). Jede Versuchsgruppe bestand aus 6-8 zufällig zugeteilten Tieren beider Geschlechter und keines der Jungtiere verstarb während der Hyperoxie-Exposition. Koffein und PBS wurden als Einmaldosis je nach Körpergewicht (100 µl/10 g) als intraperitoneale Injektion alle 48 Stunden ab der Geburt verabreicht; bei dreitägiger Sauerstoffexposition (P0-P3) also am Tag der Geburt (P0) und an P2, bei fünftägiger Sauerstoffexposition (P0-P5) an P0, P2 und P4 (Abbildung 1). Die Tiere der Gruppen NOC und HYC erhielten 10 mg/kg Koffein (Sigma, Steinheim), dies entspricht

20 mg/kg Koffeincitrat, wie es in der Anwendung im klinischen Alltag üblich ist (Schmidt et al., 2006).

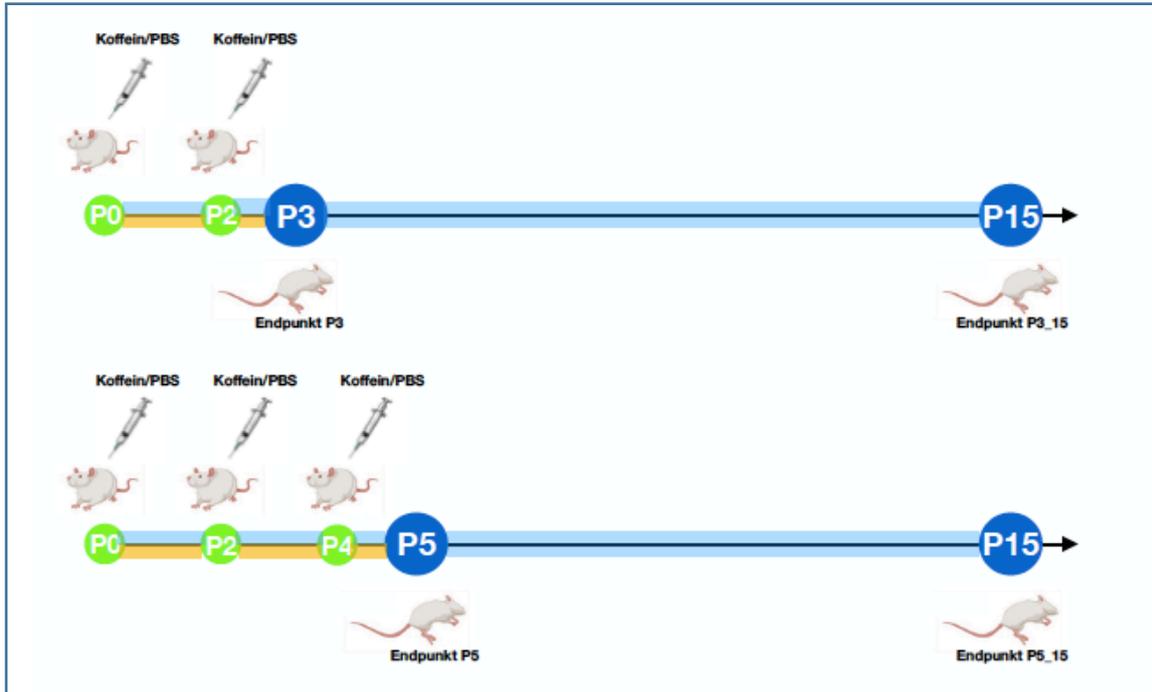


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Interventionszeitpunkte (in grün) an P0, P2 und P4, an denen Koffein oder PBS (Placebo) verabreicht wurde. Endpunkte zur Probenentnahme (in blau) an P3, P5 und P15. In den ersten Lebensstagen bis P3 bzw. P5 waren die Tiere entweder Hyperoxie (gelb) oder Raumluf (hellblau) ausgesetzt, bei späterem Endpunkt anschließend Erholung an Raumluf bis P15 (hellblau). Eigene Darstellung.

Die Probenentnahme erfolgte entweder nach Beendigung der Sauerstoffexposition an P3 bzw. P5 oder nach mehrtätiger Erholung in Raumluf bis P15 (P3_P15 bzw. P5_P15, für beide Sauerstoffexpositionszeiten identisch). Dafür wurden die Tiere mit Ketamin (100 mg/kg), Xylazin (20 mg/kg) und Acepromazin (3 mg/kg) sediert. Anschließend erfolgte nach Eröffnung des Thorax unter tiefer Narkose eine transkardiale Perfusion mit eiskaltem PBS (pH 7.4). Nach dem so erfolgten Entbluten und Feststellung des Todes der Jungtiere, wurden diese dekapitiert, der Schädel eröffnet und die relevanten Hirnanteile zur weiteren Untersuchung entnommen. Die Gewebeanteile für die quantitativen Genanalysen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und umgehend bei -80 °C gelagert. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde eine zweite Perfusion mit eiskaltem 4% Paraformaldehyd (PFA, pH 7.4) durchgeführt, um nach Präparation des Gesamthirnes das Großhirn vom Kleinhirn abzutrennen. Nach einer 24-stündigen Postfixierung mit 4% PFA bei 4 °C, erfolgte eine Umpufferung in PBS. Zur Vorbereitung der Gewebeeinbettung in Paraffin wurden die Kleinhirne mit einer

aufsteigenden Alkoholreihe (70%-100% Ethanol (w/w)) und Chloroform (100%) dehydriert, in flüssigem Paraffin (60 °C) eingebettet und ausgehärtet. Für die anschließenden immunhistochemischen Färbungen wurden 6 µm dicke Gewebeschnitte der Kleinhirne mittels eines Microtoms (Eprexia, Microm International GmbH, Dreieich, Deutschland) angefertigt und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

2.2 RNA-Präparation und quantitative Analysen der Genexpression

Pro Tier wurde, wie in der Veröffentlichung beschrieben (Gizzas et al., 2022), aus jeweils einer gefrorenen Kleinhirnhemisphäre mit Hilfe von säurehaltigem Phenol und Chloroform (peqGOLD RNAPure™, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) die RNA isoliert. Anschließend wurden jeweils 2 µg mittels einer reversen Transkriptase (MMLV-RT, Promega, Madison, USA) unter Stabilisierung mit einem RNase-Inhibitor (RNasin, Promega) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und zuvor mit DNase behandelt. Die so prozessierte cDNA (17 ng) wurde mittels quantitativer PCR (qPCR) für die folgenden Zielgene analysiert: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Calbindin 1 (Calb1), Chromodomain helicase DNA-binding protein 7 (Chd7), Cyclin dependent kinase 2 (CycD2), Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8), Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl-transferase (HPRT), LIM homeobox transcription factor 1 alpha (Lmx1α), Neuronal differentiation 1/2 (NeuroD1/2), Neuronal nuclei (NeuN), paired box 2/6 (pax2/6), Prospero homeobox 1 (Prox1), Semaphorin 6a (Sema6a), Sonic hedgehog signaling molecule (Shh), Sex-determining region Y-box 2 (Sox2), Synaptophysin (Syn). HPRT als Housekeeping-Gen wurde für die Auswertung als interne Referenz herangezogen. Die entsprechenden Primersequenzen sind in Tabelle 1 der zugehörigen Publikation zu finden (Gizzas et al., 2022). Die quantitative PCR wurde in 96-Well-Platten und für jede Probe für eine genauere statistische Auswertung als Triplet durchgeführt. Zu jeder Probe wurde dafür ein Mastermix aus 5 µl qPCRBIO Mix Hi-ROX (NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland), 2,5 µl von 1,25 µM des entsprechenden Oligonukleotid-Primers und 0,5 µl von 5 µM Sondenlösung hinzugegeben. Die DNA-Amplifizierung erfolgte dann in 40 Zyklen á jeweils 94 °C für 5 Sekunden und 62 °C für 25 Sekunden mit Hilfe eines StepOnePlus™ real-time PCR Systems (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA). Für die anschließende Analyse wurde die $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode verwendet (Livak and Schmittgen, 2001).

2.3 Immunhistochemische Analysen

Wie zuvor beschrieben (Gizzas et al., 2022), wurden für die immunhistochemischen Färbungen die in Paraffin eingebetteten Proben geschnitten, anschließend auf Super Frost Plus-beschichtete Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und bei Raumtemperatur gelagert. Diese wurden für die Entparaffinierung zweimal für jeweils 10 min in Roti-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert und mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 90%, 80%, 70% Ethanol) für jeweils 3 min rehydriert. Im nächsten Schritt erfolgte die Antigendemaskierung. Dafür wurden die Objektträger in Citratpuffer (pH 6.0) für 10 min bei 600 Watt in einer Mikrowelle inkubiert. Nach einer 30-minütigen Wartezeit zum Abkühlen der Proben, wurden diese im Anschluss dreimal in PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden im nächsten Schritt die Gewebeproben mit einer Blockierlösung, bestehend aus 3% bovinem Serumalbumin (BSA), 0,05% Tween-20 und 0,1% Triton X-100 in PBS für Calbindin bzw. 3% BSA und 0,2% Triton X-100 für Pax6/PCNA inkubiert, die 60 min bei Raumtemperatur bis zur nächsten Waschung mit PBS einwirkte. Folgend wurde monoklonales Maus-Anti-Calbindin (1:500, ab75524, Abcam, Cambridge, UK) oder polyklonales Kaninchen-Anti-Pax6 (1:200, LS-C179903, LifeSpan Bioscience, Washington, USA) und monoklonales Maus-Anti-PNCA (1:500, Abcam, ab29) jeweils mit einem Antikörper-Verdünnungsmittel (Dako, Zymed Laboratories, San Francisco, Kalifornien, USA) als primärer Antikörper aufgetragen und 24 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden nach dreimaliger Waschung in PBS die sekundären Antikörper aufgetragen und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für Calbindin wurden fluoreszierende Ziege-Anti-Maus-IgG (Alexa Fluor 488, Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Deutschland) und für Pax6/PCNA zusätzlich Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (Alexa Fluor 495, Thermo Fischer Scientific) verwendet, ebenfalls 1:200 verdünnt in Antikörper-Verdünnungsmittel (Dako, Zymed Laboratories). Nach erneuter Waschung in PBS wurden im nächsten Schritt die Zellkerne für 10 min in 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, Sigma), 1:2000 in PBS verdünnt, angefärbt, bevor nach anschließender dreifacher Waschung in PBS die Schnitte auf den Objektträgern eingedeckelt wurden (Shandon Immu-Mount, Thermo Fisher Scientific).

Die Auswertung erfolgte innerhalb von 14 Tagen, jedoch frühestens nach 24 Stunden, mit dem Keyence Fluoreszenzmikroskop BZ 9000 und der BZ-II Betrachter Software sowie der BZ-II Analyse Software (Keyence, Osaka, Japan) mit einem 10x

Vergrößerungsobjektiv. Für jede RGB-Farbe wurde ein separates Bild aufgenommen und die Belichtungseinstellungen wurden zwischen den Aufnahmen nicht verändert. Von jedem Objekt wurden jeweils vier 100 µm (P3 und P5) bzw. 200 µm (P3_P15 und P5_P15) messende Ausschnitte aus dem anterodorsalen, zentralen und posterioren Lappen ausgewählt, wobei darauf geachtet wurde, dass unter den Ausschnitten immer zwei innere und zwei äußere zerebellare Cortices aus verschiedenen Lappen für die Auswertung herangezogen wurden, um abschließend einen repräsentativen Mittelwert bilden zu können. Nach minimaler, identischer Kontrastanpassung aller Aufnahmen wurden die Calbindin-positiven Purkinjezellen, die Pax6-positiven Körnerzellen und die PCNA-positiven, proliferierenden Zellen manuell mittels Adobe Photoshop (Version 22.0.0, Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland) ausgezählt. Dieselben Ausschnitte wurden weiterhin dazu verwendet, die Dendritenlänge der Purkinjezellen in Adobe Photoshop (Adobe Systems Software Ireland Limited) auszumessen, um die Dicke der Molekularschicht zu bestimmen. Mit Hilfe der DAPI-Färbung wurde die Körnerzellschicht definiert. Es wurden 4 Dendriten pro Objekt ausgemessen und anschließend der Mittelwert aus den vier Ausschnitten pro Tier gebildet. Diese wurden dann dafür verwendet, die Anzahl der Purkinjezellen und Körnerzellen sowie die Dendritenlänge der Purkinjezellen zwischen den mit Koffein behandelten Tieren und der Kontrollgruppe zu vergleichen.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen und die Generierung der Abbildungen erfolgte mit GraphPrism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA). Zur statistischen Auswertung wurde die Kontrollgruppe mit den Versuchsgruppen mittels der einseitigen Varianzanalyse ANOVA, Kruskal-Wallis-Test auf der Grundlage einer nicht-Gaußschen Verteilung oder Brown-Forsythe-Test in dem Falle, dass die Gruppen unterschiedliche Varianzen aufzeigen, untersucht. Die Mittelwerte wurden anschließend mit dem Bonferroni-, Dunn- oder Dunnett-T3-Post-Hoc Test verglichen, basierend auf den zuvor verwendeten Tests. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Erfolgreiche Verminderung der Hyperoxie-induzierten Beeinträchtigung der Purkinjezellen durch Koffein

Ein prominenter Marker für reife und sich entwickelnde Purkinjezellen ist Calbindin (Calb1), ein Calcium-bindendes Protein und wichtiger Regulator der intrazellulären Calcium-Homöostase (Bastianelli, 2003). Calb1 wird schon ab einem frühen Zeitpunkt während der Migration und anschließenden Differenzierung (Laure-Kamionowska and Maślińska, 2009) und später in großen Mengen von allen Anteilen der Purkinjezellen im Kleinhirn exprimiert (Leto et al., 2016).

Nach immunhistochemischer Färbung wurden die Auswirkungen von Hyperoxie und Koffein auf die Anzahl der Calbindin-positiven Purkinjezellen und die Tiefe der Molekularschicht anhand der maximalen Länge ihrer Dendritenbäume (Abbildung 4 und 5) untersucht. In allen Hyperoxie-exponierten Gruppen zeigte sich eine drastische Verminderung der Purkinjezellzahl und der Molekularschichttiefe nach drei (P3) oder fünf (P5) Tagen postnataler Exposition mit 80% Sauerstoff (Abbildung 4). Die Reduktion der Purkinjezellen nach akuter Hyperoxie-Exposition konnte durch Koffein erfolgreich verhindert werden. Ebenso konnte die Beeinträchtigungen im Hinblick auf die verminderte Tiefe der Molekularschicht durch hohe Sauerstoffkonzentration nach dreitägiger Exposition (P3) durch Koffein reduziert werden. Nach Erholung der Jungtiere an Raumluft bis zum postnatalen Tag P15 zeigte sich nach dreitägiger Hyperoxie-Exposition kein signifikanter Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrollgruppe und die Anzahl der Purkinjezellen konnte sich regenerieren (Abbildung 5 A). Die fünftägige Exposition hingegen führte zu einer nachhaltigen Schädigung der Purkinjezellen, die sich auch nach 10-tägiger Haltung der Jungtiere unter Normoxie (P5_P15) nicht regenerieren konnte. Koffein konnte der Hyperoxie-induzierten Schädigung der Purkinjezellen entgegenwirken und die Anzahl auf Kontrollniveau halten (Abbildung 5 A). Die Länge der Dendritenbäume wurde nicht langfristig (P3_P15 und P5_P15) durch die Hyperoxie-Exposition geschädigt (Abbildung 5 B).

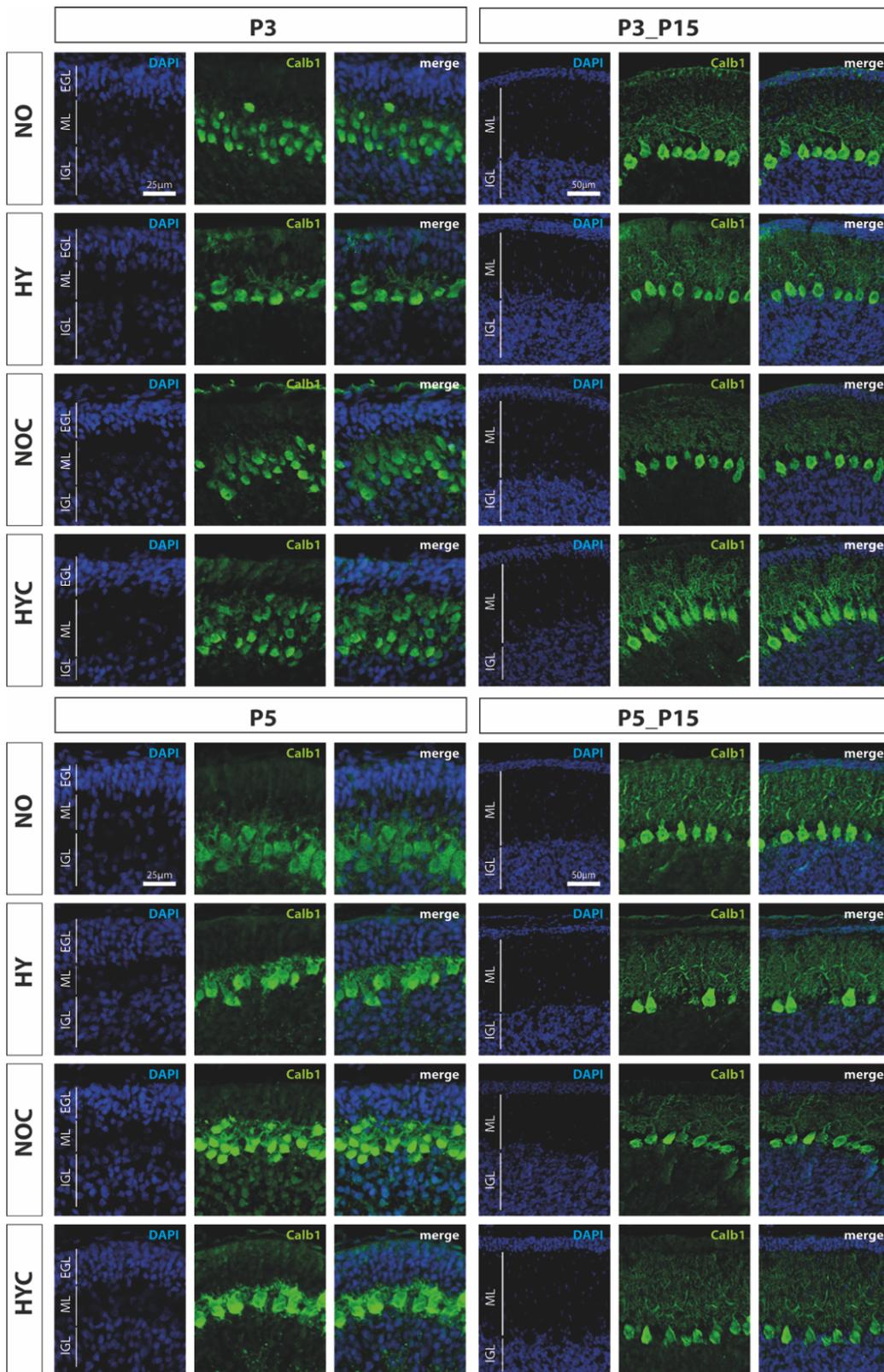


Abbildung 4 Repräsentative Darstellung der Calbindin/DAPI gefärbten immunhistochemischen Schnitte der sich entwickelnden Kleinhirnrinde. Zur Untersuchung wurden die Calbindin-positiven Purkinjezellen und die Molekularschichttiefe unter Normoxie (NO) oder Hyperoxie (HY) im Vergleich mit gleichzeitiger Koffein-Anwendung (NOC/HYC) ausgewertet. Untersuchungszeitpunkte waren am dritten (P3) oder fünften postnatalen Lebenstag (P5) oder an P15, nach anschließender Erholung an Raumluft. Erkennbar sind die durch zwischenzeitliche Migration der granulären Vorläuferzellen (GCP) abnehmende äußere Körnerzellschicht (EGL), die Molekularschicht (Semple et al., 2013), in der die Dendritenbäume der Purkinjezellen liegen, die Purkinje-Zellschicht und die innere Körnerzellschicht (IGL). Durch Hyperoxie zeigte sich eine Abnahme der Purkinjezellzahl und ihrer Dendritenlänge, die durch Koffein aufgehoben werden konnte. Aus Giszas et al., 2022.

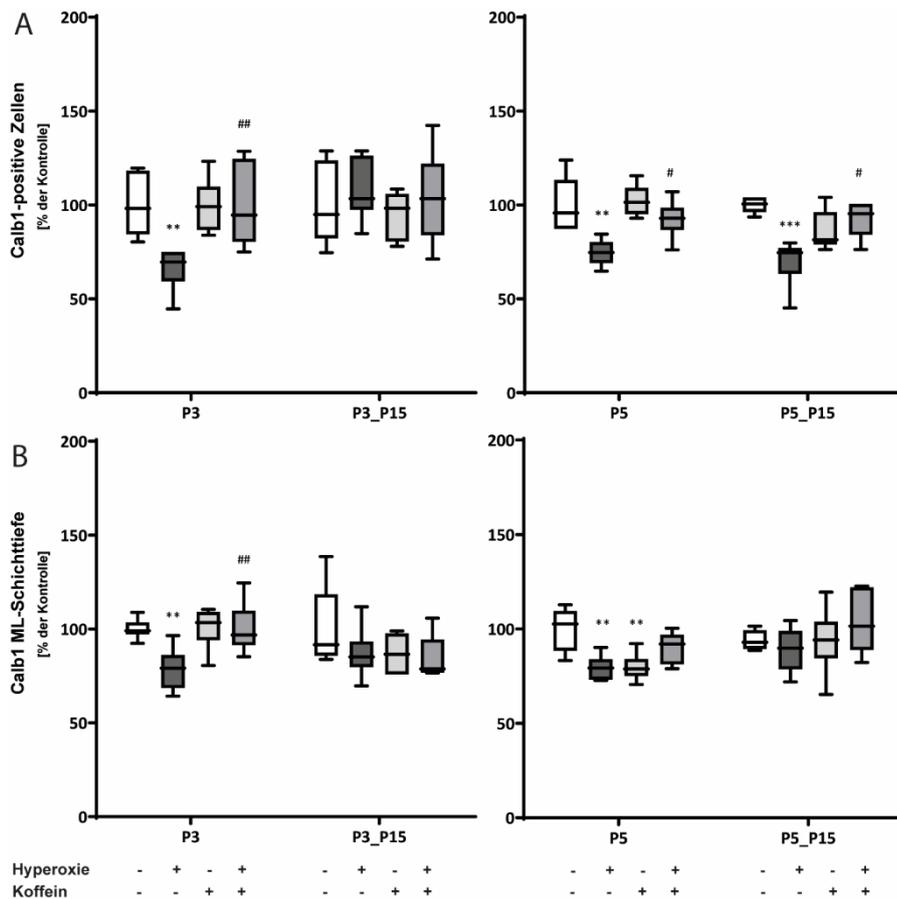


Abbildung 5 Quantifizierung der Calbindin/DAPI-positiven Purkinjezellen und der Dendritenlänge. Folgende Versuchsgruppen wurden analysiert: Normoxie (weiß, NO), Hyperoxie (dunkelgrau) und HY im Vergleich mit gleichzeitiger Koffein-Anwendung (hellgrau, NOC/ mittelgrau, HYC). Untersuchungszeitpunkte waren am dritten (P3) oder fünften postnatalen Lebenstag (P5) oder an P15 nach anschließender Erholung an Raumluft. Hyperoxie beeinträchtigte sowohl die Anzahl der A) Purkinjezellen als auch ihre B) Dendritenlänge. Koffein konnte die akute Reduktion der Zellzahl erfolgreich verhindern, während das Dendritenwachstum nur teilweise geschützt werden konnte. **p < 0.01 und ***p < 0.001 im Vergleich mit der Kontrollgruppe; #p < 0.05 und ##p < 0.01, und im Vergleich mit Hyperoxie-behandelten Tieren (ANOVA, Bonferroni's post hoc Test; Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc Test). Modifiziert aus Giszas et al., 2022.

3.2 Koffein wirkt den durch Hyperoxie induzierten Proliferations-hemmenden Effekten entgegen

Pax6 spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung verschiedener Hirnregionen und ist in der zerebellaren Neurogenese vor allem für Überleben und Migration der glutamatergen Vorläuferzellen verantwortlich (Yeung et al., 2016). In dieser Studie wurde Pax6 als Marker für die unreifen, von der äußeren zur inneren Körnerzellschicht migrierenden GCP verwendet, während PCNA als unverzichtbarer Faktor für die DNA Replikation die Proliferationskapazität anzeigt (Jónsson and Hübscher, 1997). Untersucht wurde nach immunhistochemischer Färbung die Anzahl der Pax6- und PCNA-positiven GCP in der ML unter Normoxie und Hyperoxie und die Auswirkungen von Koffein (Abbildung 6 und 7).

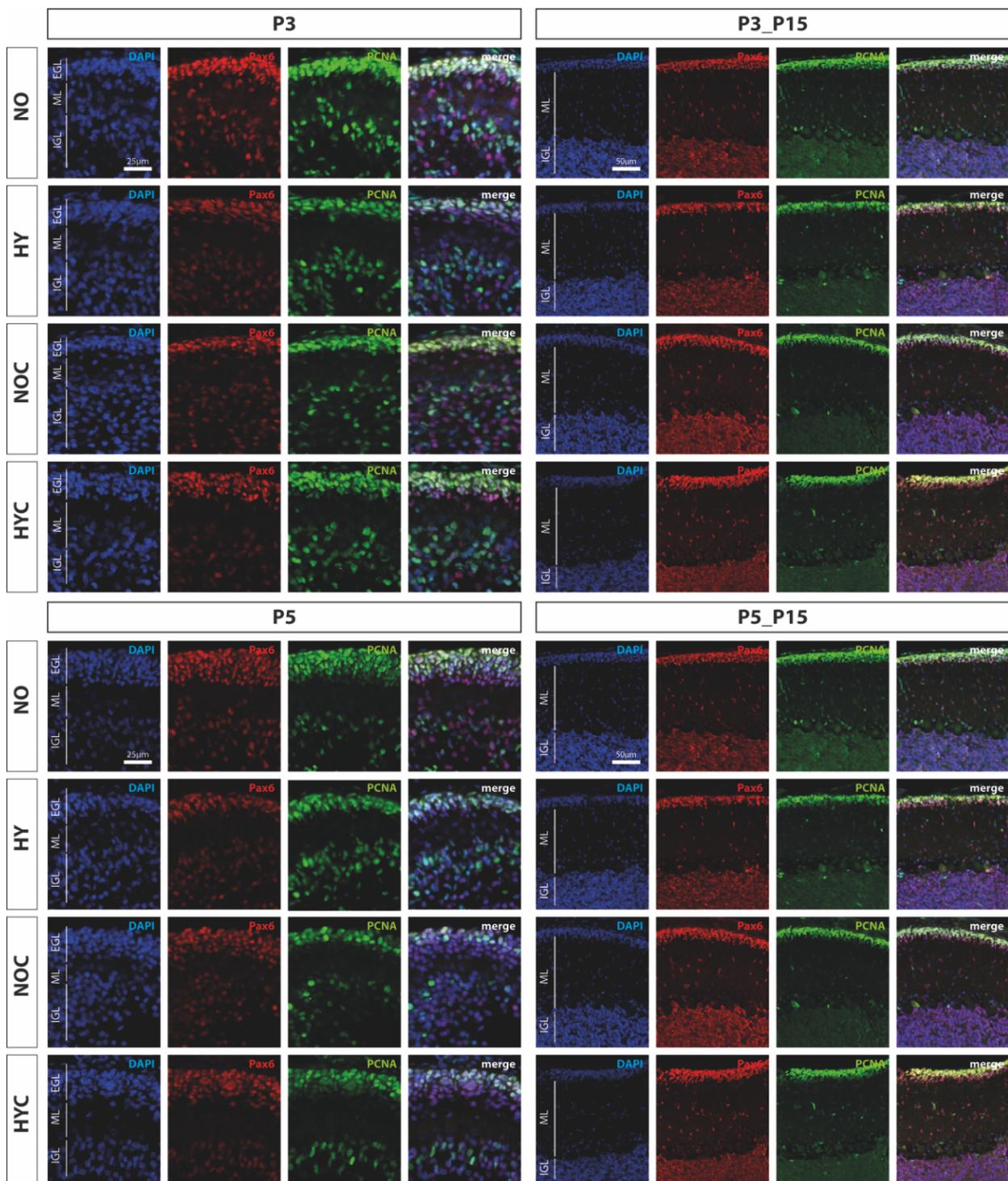


Abbildung 6 Repräsentative Darstellung der Pax6, PCNA und DAPI gefärbten immunhistochemischen Schnitte der sich entwickelnden Kleinhirnrinde. Zur Untersuchung wurde die Anzahl der Pax6-positiven granulären Vorläuferzellen (GCP) und die Proliferationskapazität (PCNA) unter Normoxie (NO) oder Hyperoxie (HY) im Vergleich mit gleichzeitiger Koffein-Anwendung (NOC/HYC) ausgewertet. Untersuchungszeitpunkte waren am dritten (P3) oder fünften postnatalen Lebenstag (P5) oder an P15 nach anschließender Erholung an Raumluft. Erkennbar sind die durch zwischenzeitliche Migration der GCP abnehmende äußere Körnerzellschicht (EGL), die Molekularschicht (Semple et al., 2013) und die innere Körnerzellschicht (IGL). Zudem zeigte sich eine Reduktion der Pax6- und PCNA-positiven GCP nach Hyperoxie-Exposition an P3 und P5, die durch Koffein positiv beeinflusst werden konnte. An P3_P15 war dieser Effekt für die PCNA-positiven Zellen ebenso nachvollziehbar, nach fünfjähriger Hyperoxie-Exposition erholten sich alle Zellpopulationen an Raumluft bis P5_P15. Aus Giszas et al., 2022.

Nach Exposition mit 80% Sauerstoff zeigte sich an P3 und P5 eine signifikante Reduktion der GCP und ihrer Proliferationskapazität, die optisch (Abbildung 6) und quantitativ (Abbildung 7) nachvollzogen werden konnte.

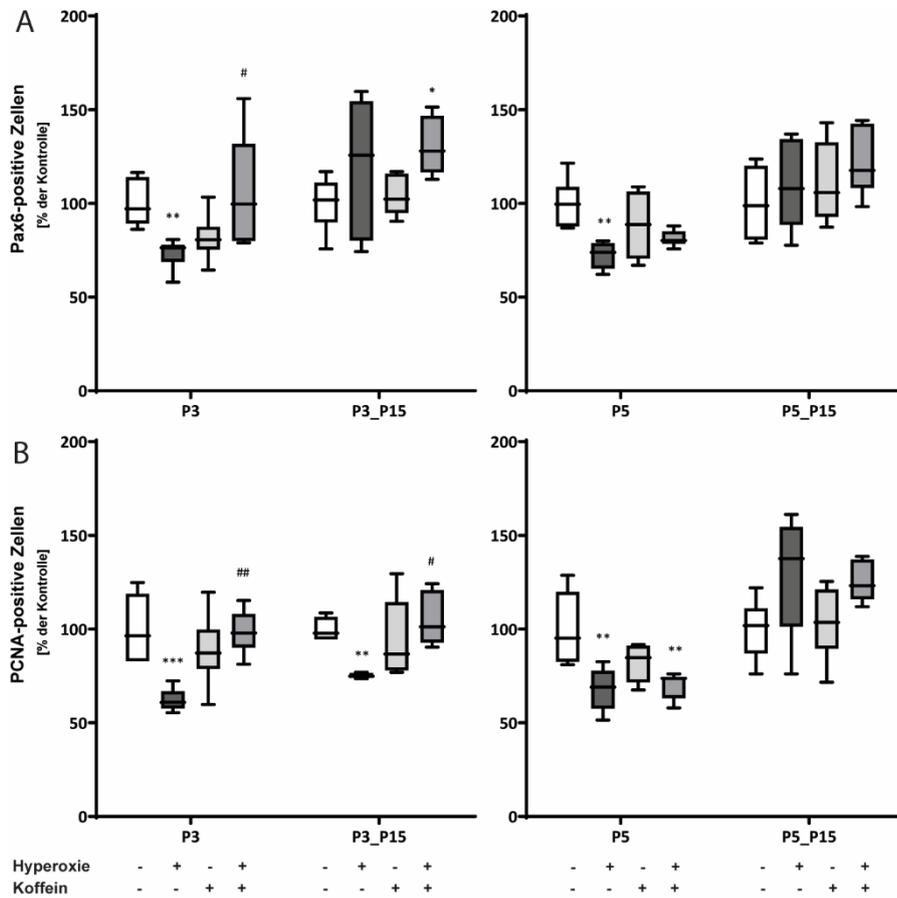


Abbildung 7 Quantifizierung der Pax6- und PCNA-positiven Körnerzellen. Folgende Versuchsgruppen wurden analysiert: Normoxie (weiß, NO), Hyperoxie (dunkelgrau) und HY im Vergleich mit gleichzeitiger Koffein-Anwendung (hellgrau, NOC/ mittelgrau, HYC). Untersuchungszeitpunkte waren am dritten (P3) oder fünften postnatalen Lebenstag (P5) oder an P15 nach anschließender Erholung an Raumluft. Durch Hyperoxie zeigte sich eine signifikante Reduktion der A) Körnerzellen (Pax6) und ihrer B) Proliferationskapazität (PCNA), die für beide im akuten Stadium (P3) und für PCNA auch darüber hinaus (P3_P15) durch Koffein vermindert werden konnte. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ im Vergleich mit der Kontrollgruppe; # $p < 0.05$ und ## $p < 0.01$ im Vergleich mit Hyperoxie-behandelten Tieren (ANOVA, Bonferroni's post hoc Test; Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc Test; Brown-Forsythe, Dunnett's post hoc Test). Modifiziert aus Giszas et al., 2022.

In der akuten Phase konnte Koffein sowohl der GCP- als auch PCNA-Beeinträchtigung an P3 dem erfolgreich entgegenwirken und eine Normalisierung auf Kontrollniveau bewirken, wohingegen dieser Effekt nach fünftätiger Hyperoxie-Exposition an P5 ausblieb. An P3_P15 steigerte Koffein die Anzahl der Pax6-positiven Zellen unter Hyperoxie im Vergleich zur Normoxie-Kontrollgruppe auch ohne nachweisbare, noch persistierende Schädigung der GCP unter Hyperoxie (Abbildung 7 A). Die Proliferationskapazität wurde durch dreitägige Hyperoxie persistierend reduziert und war auch an P3_P15 nach Erholung an Raumluft noch nachweisbar. Hier konnte Koffein der Schädigung erfolgreich entgegenwirken und langfristig die Anzahl der PCNA-positiven

Zellen normalisieren (Abbildung 7B). An P5_P15 zeigten sich keine langfristig schädigenden Sauerstoff-Effekte und die Pax6- wie auch PCNA-positiven GCP konnten sich, trotz starker Beeinträchtigung nach fünftägiger Sauerstoff-Exposition an P5, an Raumluft erholen (Abbildung 7 A und B).

3.3 Koffein kann die Schädigung der frühen zerebellaren Neurogenese durch Hyperoxie nur teilweise auffangen

FGF8 wird als zentrales Signalmolekül für strukturelle Entwicklung und Polarisierung vor allem während der sehr frühen zerebellaren Entwicklung exprimiert und ist deshalb bei den späteren Untersuchungszeitpunkten an P15 schon nicht mehr nachweisbar. Der FGF8-Konzentrationsgradient in dieser Phase spielt dabei eine entscheidende Rolle für sowohl Zellüberleben als auch die Ausrichtung der späteren zerebellaren Regionen (Leto et al., 2016). Gleichzeitig interagiert FGF8 mit der Expression zahlreicher anderer Gene, wie zum Beispiel Shh und Pax2 (Leto et al., 2016). Pax2 markiert in dieser Phase die GABAergen Interneurone, die neben den Purkinjezellen aus der VZ hervorgehen und dann in den zerebellaren Cortex migrieren (Leto et al., 2016).

Wir untersuchten die Expressionsmuster von *FGF8* und *Pax2* mittels qPCR unter Normoxie im Vergleich zu Hyperoxie und die Auswirkungen von Koffein (Abbildung 8). *FGF8* zeigte interessanterweise an P3 kein verändertes Expressionsmuster, während Hyperoxie nach 5 Tagen (P5) zu einer signifikant verminderten mRNA-Expression führte, die auch nicht durch Koffein aufgehoben werden konnte (Abbildung 8 A). Koffein unter normoxischen Bedingungen führte hingegen zu einer *FGF8*-Überexpression, die jedoch nicht statistisch signifikant war. *Pax2* zeigte an P3 und P5 eine signifikant reduzierte Expression nach Hyperoxie, die nach dreitägiger Exposition (P3) nachhaltig durch Koffein normalisiert werden konnte, wenn auch ohne statistische Signifikanz (Abbildung 8 B). Dieser Effekt war auch an P3_P15 nach Erholung an Raumluft noch nachweisbar und Koffein normalisierte die *Pax2*-Expression nach Hyperoxie. Nach fünftägigem hyperoxischen Insult (P5) konnte das stark reduzierte Expressionsniveau von *Pax2* nicht durch Koffein auffangen werden, dafür trat dennoch ein Erholungseffekt bis P5_P15 ein (Abbildung 8 B). Koffein unter normoxischen Bedingungen führte an P5_P15 zu einer Überexpression von *Pax2* (Abbildung 8 B).

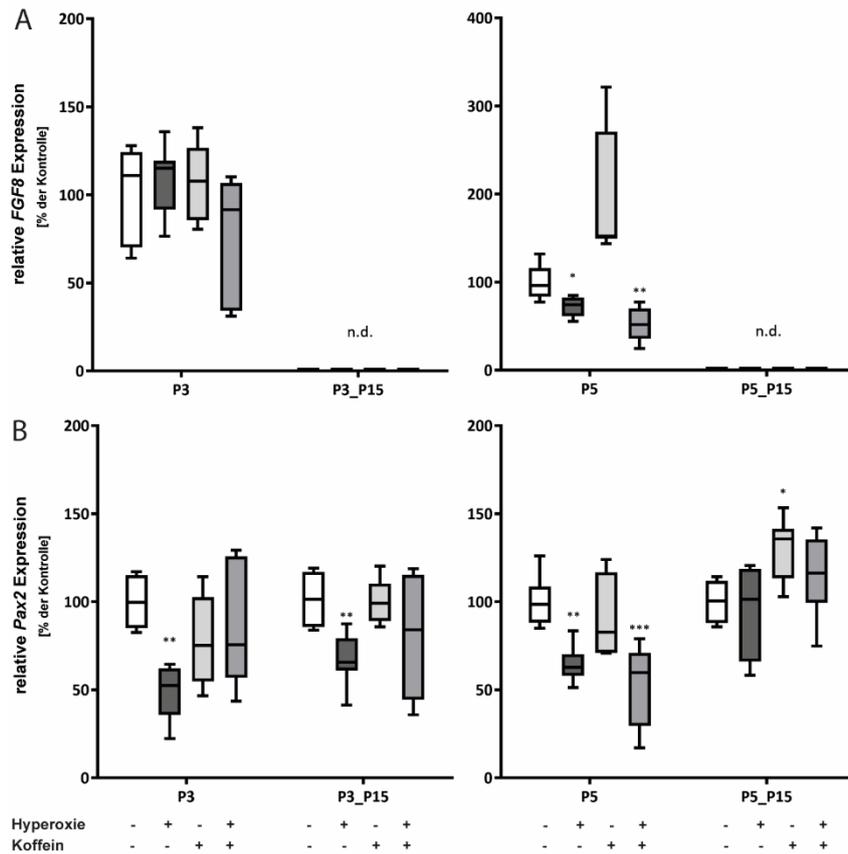


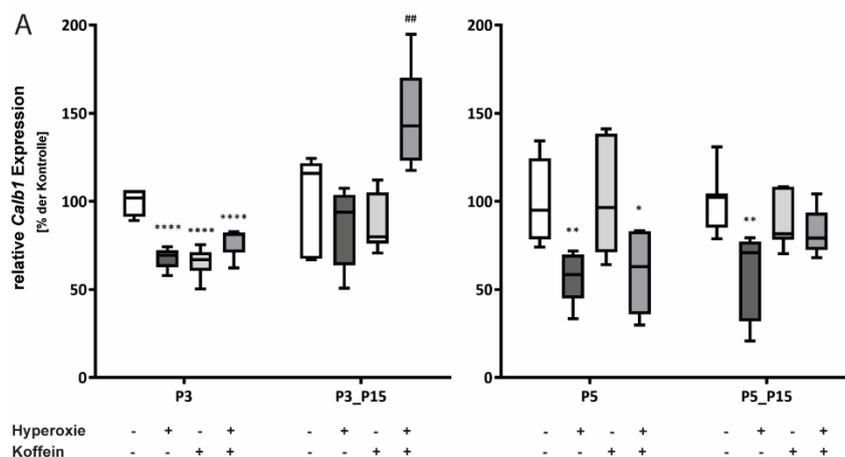
Abbildung 8 Quantifizierung der mRNA-Expression von *FGF8* und *Pax2* als Mediatoren der frühen zerebellaren Neurogenese mittels qPCR. Folgende Versuchsgruppen wurden analysiert: Normoxie (weiß, NO), Hyperoxie (dunkelgrau) und HY im Vergleich mit gleichzeitiger Koffein-Anwendung (hellgrau, NOC/ mittelgrau, HYC). Untersuchungszeitpunkte waren am dritten (P3) oder fünften postnatalen Lebenstag (P5) oder an P15 nach Erholung an Raumluft. Signifikante Reduktion der A) *FGF8*-Expression nach Hyperoxie an P5 unabhängig der Koffeinapplikation, an P3 hingegen keine Beeinflussung des Expressionsmusters. An P15 kein Nachweis von *FGF8* mehr möglich. B) *Pax2* zeigte an P3 und P5 eine signifikant verminderte Expression durch Hyperoxie, die nur an P3 durch Koffein normalisiert wurde. Nach dreitägigem Insult anhaltende Reduktion der *Pax2*-Expression bis P3_P15, hier weiterhin protektiver Effekt von Koffein. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ im Vergleich mit der Kontrollgruppe (ANOVA, Bonferroni's post hoc Test; Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc Test; Brown-Forsythe, Dunnett's post hoc Test). Modifiziert nach Gizzas et al., 2022.

3.4 Durch Hyperoxie stark beeinträchtigte Proliferation kann längerfristig durch Koffein gerettet werden

Während der zerebellaren Neurogenese wird von den Calbindin-exprimierenden Purkinjezellen Shh freigesetzt, welches als Mitogen und zentrales Signalmolekül wiederum die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Cyclin D2 und Pax2, initiiert (De Luca et al., 2016). Durch Induktion der Cycline wird direkt der Zellzyklus und die Proliferation zahlreicher Zellpopulationen stimuliert und dadurch indirekt auch die fortschreitende Furchung des Kleinhirns beeinflusst (De Luca et al., 2016). BDNF ist während der Neurogenese in zahlreichen Hirnregionen als Neurotrophin aktiv. Im sich entwickelnden Kleinhirn spielt BDNF eine Schlüsselrolle für Differenzierung und Überleben der GCP, stimuliert ihre Proliferation und leitet durch seinen

Konzentrationsgradienten die migrierenden GCP durch die ML in die IGL (Camuso et al., 2022).

In dieser Studie untersuchten wir die mRNA- Expression von *Calb1*, *Shh*, *CycD2* und *BDNF* mittels quantitativer PCR unter Normoxie und Hyperoxie und wie sich die Koapplikation von Koffein auf die Expressionsmuster auswirkte (Abbildung 9). Alle Marker zeigten an P3 nach Hyperoxie eine signifikante Verminderung ihrer mRNA-Expression, die durch Koffein nicht verhindert werden konnte. Bis auf *CycD2* zeigten die weiteren Marker ebenfalls eine reduzierte Expression durch alleinige Koffeinanwendung unter Normoxie (Abbildung 9 A, B und D). Nach Erholung an Raumluft an P3_P15 konnte sich die Expression von *Calb1*, *Shh* und *BDNF* erfolgreich erholen und es waren keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen nachweisbar. *CycD2* war weiterhin persistierend durch den hypoxischen Insult vermindert exprimiert, wobei Koffein hier protektive Effekte zeigte (Abbildung 9 C). Ebenso wurde *Calb1* nach Hyperoxie und Koffeinapplikation signifikant überexprimiert (Abbildung 9 A). Eine fünftägige Exposition mit 80% Sauerstoff (P5) bewirkte für *Calb1* und den Proliferationsmarker *CycD2* ebenfalls einen starken Rückgang ihrer Expressionslevel, der auch an P5_P15 nach Erholung an Raumluft auf reduziertem Niveau persistierte. Koffein konnte an P5 die drastische Reduktion von *Calb1* und *CycD2* nicht verhindern, an P5_P15 führte die Koffeinanwendung jedoch zu normalisierten Expressionslevel von *Calb1* und *CycD2* (Abbildung 9 A und C). An P5 führte Koffein unter Normoxie zu einer Überexpression von *CycD2*. Für *Shh* bewirkten erhöhte Sauerstoffkonzentrationen an P5 keine reduzierte mRNA-Expression, dafür zeigte sich an P5_P15 dennoch eine verzögerte Verminderung (Abbildung 9 B). Diese konnte durch Koffein erfolgreich aufgefangen werden (P5_P15). An P5 führte Koffein unter Normoxie zu einer leicht verminderten *Shh*-Expression.



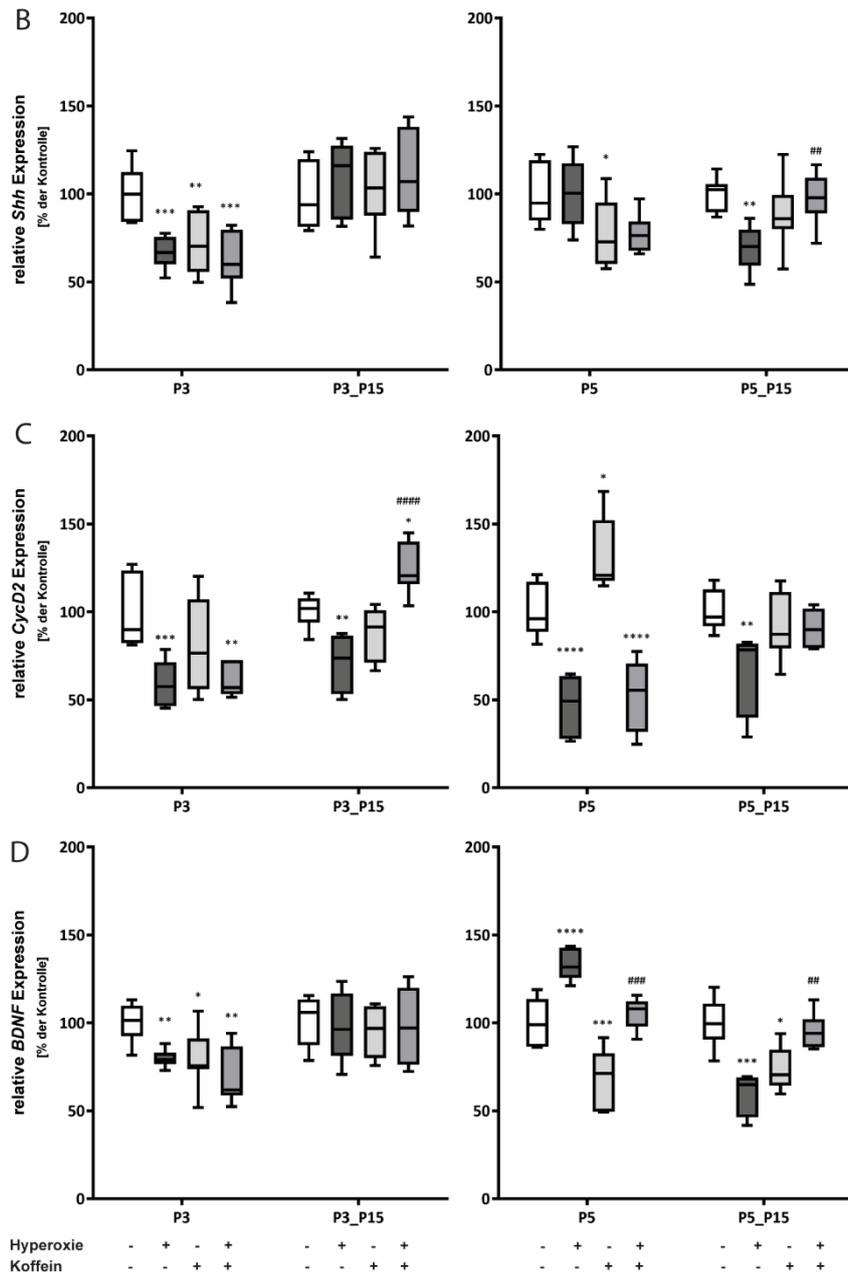


Abbildung 9 Quantifizierung der mRNA- Expression von *Calb1*, *Shh*, *CycD2* und *BDNF* mittels qPCR. Folgende Versuchsgruppen wurden analysiert: Normoxie (weiß, NO), Hyperoxie (dunkelgrau) und HY im Vergleich mit gleichzeitiger Koffein-Anwendung (hellgrau, NOC/ mittelgrau, HYC). Untersuchungszeitpunkte waren am dritten (P3) oder fünften postnatalen Lebenstag (P5) oder an P15 nach Erholung an Raumluft. Alle Marker A) *Calb1*, B) *Shh*, C) *CycD2* und D) *BDNF* zeigten an P3, *Calb1* und *CycD2* ebenso an P5, eine signifikante Reduktion des Expressionsniveaus nach Hyperoxie, die nicht durch Koffein gerettet werden konnte. Bis auf *CycD2* ebenfalls reduzierte Expression durch alleinige Koffeinanwendung unter Normoxie. An P3_P15 für *Shh* und *BDNF* keine Unterschiede mehr nachweisbar, für *CycD2* und *Calb1* signifikante Überexpression bei Koffeinanwendung und Hyperoxie. An P5_P15 weiter reduzierte Expressionslevel nach Hyperoxie für alle Marker, hier erhöhte bzw. normalisierte Expression nach Koffeinanwendung. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ im Vergleich mit Kontrollgruppe; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ im Vergleich mit Hyperoxie (ANOVA, Bonferroni's post hoc Test; Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc Test; Brown-Forsythe, Dunnett's post hoc Test). Modifiziert nach Giszas et al., 2022.

Bei *BDNF* führte die fünftägige Hyperoxie (P5) zu einer starken Überexprimierung, die durch Koffein normalisiert werden konnte. An P5_P15 zeigte sich interessanterweise eine

Umkehr: Die *BDNF*-Expression nach vorheriger Hyperoxie war nun stark reduziert, aber auch diese konnte durch Koffein normalisiert werden. Unter Normoxie führte die Koffeinanwendung an P5 und P5_P15 jedoch zu einer verminderten Expression (Abbildung 9 D).

Erhöhter oxidativer Stress bewirkte einen starken Rückgang der mRNA-Expression wichtiger Marker für die Proliferation im sich entwickelnden Kleinhirn, der nicht im akuten Zustand, dafür aber nach anschließender Erholung an Raumluft (P5_P15) durch Koffein vermindert werden konnte.

3.5 Koffein nimmt nur marginalen Einfluss auf die Hyperoxie-induzierte Beeinträchtigung der granulären Reifung und Migration

Während ihres Heranreifens exprimieren die GCP verschiedene Transkriptionsfaktoren entsprechend ihrer aktuellen Bedürfnisse. So spielt Pax6, exprimiert von den glutamatergen Progenitorzellen der RL, eine wichtige Rolle für deren Migration, Differenzierung und Überleben und markiert vor allem unreife, migrierende GCP (Yeung et al., 2016). Prox1 wird sowohl von prä- als auch postmitotischen GCP während ihrer gesamten Entwicklung exprimiert (Lavado and Oliver, 2007), wohingegen die NeuN-Expression erst mit fortschreitender Reifung zunimmt und vor allem die reifen, postmitotischen GC in der IGL markiert (Gusel'nikova and Korzhevskiy, 2015). Sema6a und Lmx1 α sind wichtige Mediatoren für die Migration der GCP (Leto et al., 2016, Chizhikov et al., 2010).

Um die Auswirkungen von Hyperoxie und Koffein auf das Überleben und die Migration der GCP zu untersuchen, bestimmten wir die mRNA-Expression von Pax6, Prox1, NeuN, Lmx1 α und Sema6a zu verschiedenen Zeitpunkten mittels qPCR (Abbildung 10). Bis auf Prox1 zeigten die untersuchten Marker an P3 und/oder P5 eine signifikant reduzierte Genexpression nach Hyperoxie, die durch Koffein nicht normalisiert werden konnte. Pax6, Prox1 und NeuN zeigten dabei teilweise ebenfalls verminderte Expressionslevel bei alleiniger Koffeinanwendung unter Normoxie, mit Ausnahme von Pax6 an P5 und einer starker Überexpression (Abbildung 10 A, B und C). Nach Hyperoxie und Erholung an Raumluft (P3_P15) persistierte die verminderte Expression von Pax6 und NeuN, wobei Koffein die Auswirkungen der erhöhten Sauerstoffkonzentrationen normalisieren konnte (Abbildung 10 A und C). Koffein unter Normoxie führte ebenfalls zu einer verminderten Expression von Pax6, NeuN und Lmx1 α (P3_P15). Prox1 zeigte nach Erholung an Raumluft eine Überexpression nach Koffeinanwendung bei erhöhtem oxidativem Stress (P3_P15), an P5_P15 waren hingegen keine Unterschiede zwischen

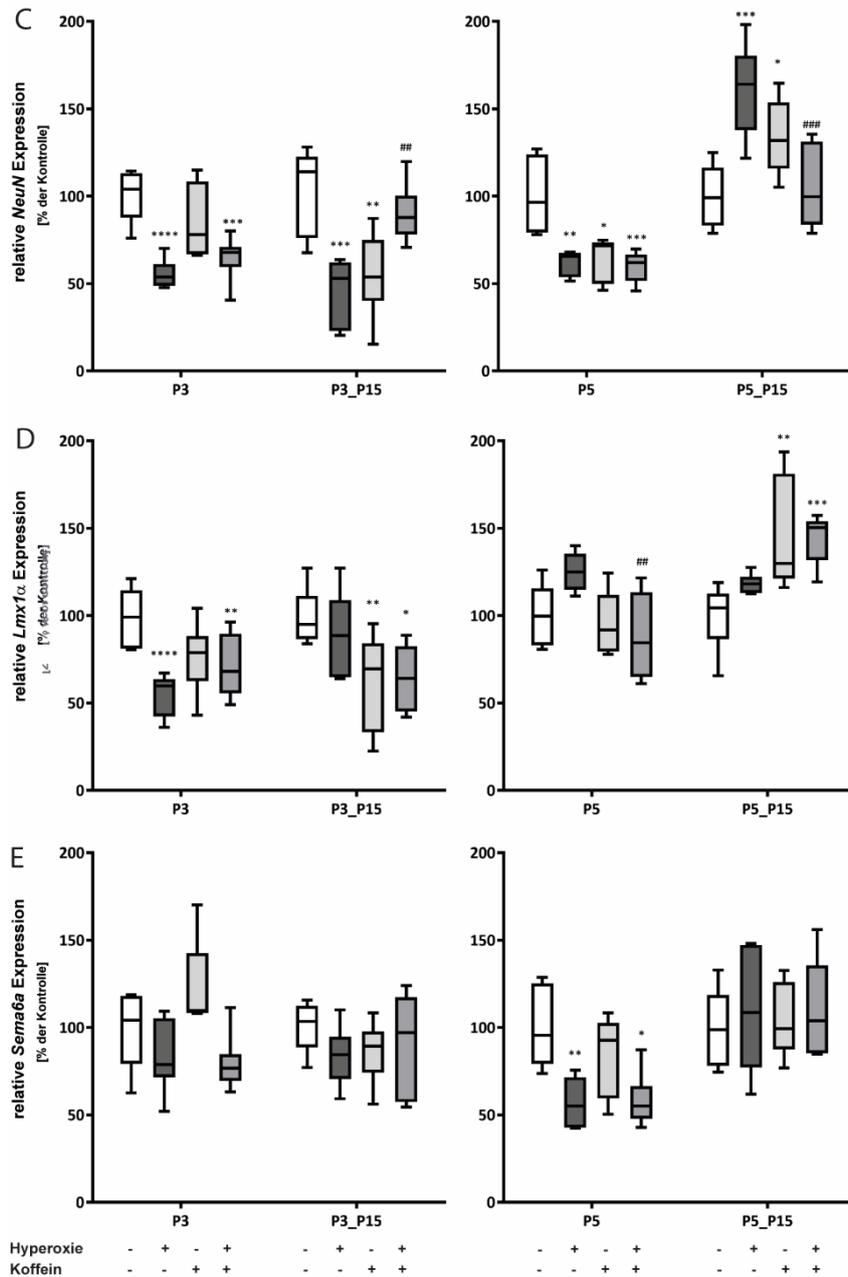


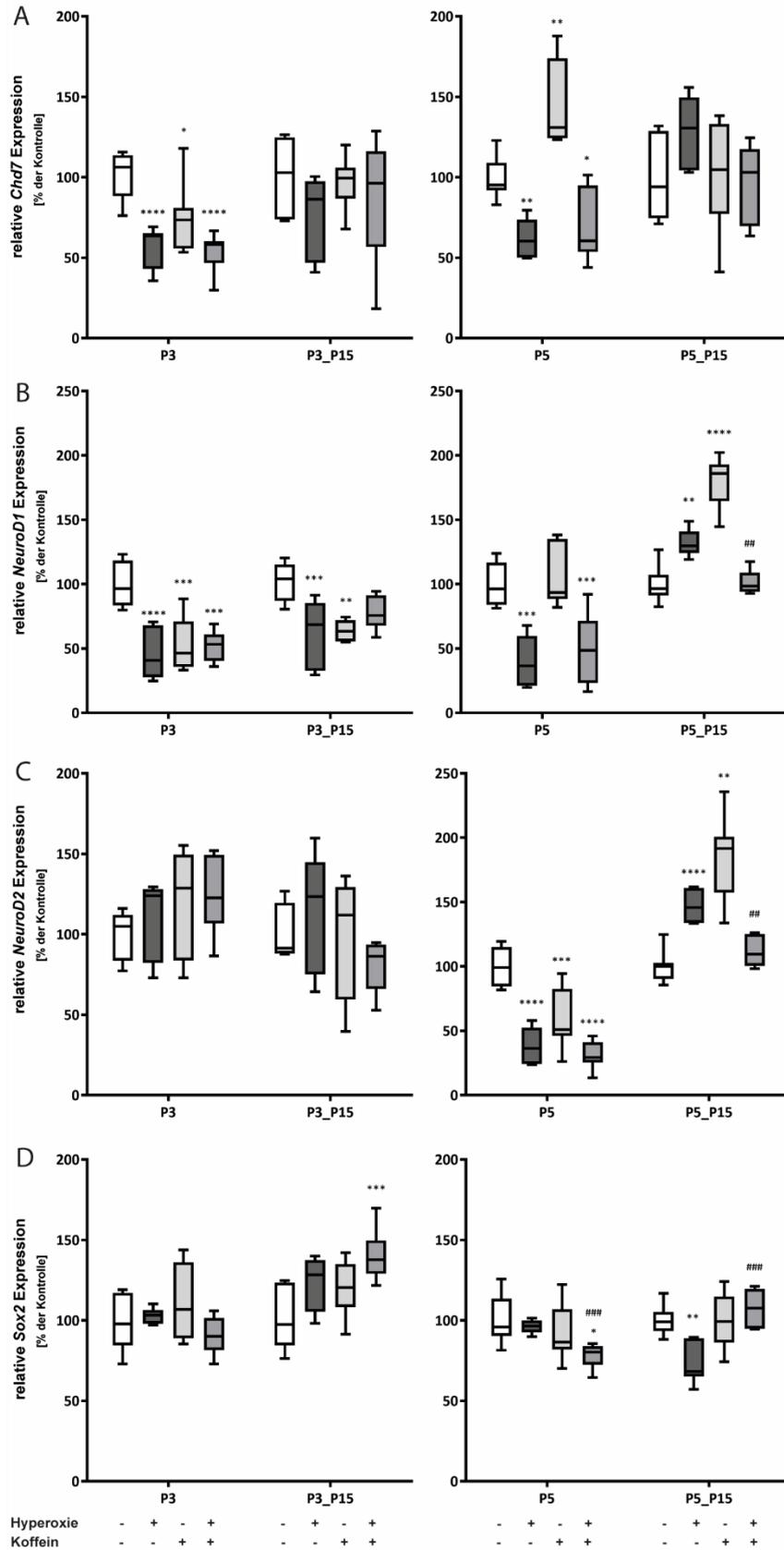
Abbildung 10 Quantifizierung der mRNA-Expression von *Pax6*, *Prox1*, *NeuN*, *Lmx1α* und *Sema6a* als Marker für reife GCP (*Pax6*, *Prox1*, *NeuN*) und ihrer Migration (*Pax6*, *Lmx1α*, *Sema6a*) mittels qPCR. Folgende Versuchsgruppen wurden analysiert: Normoxie (weiß, NO), Hyperoxie (dunkelgrau) und HY im Vergleich mit gleichzeitiger Koffein-Anwendung (hellgrau, NOC/ mittelgrau, HYC). Untersuchungszeitpunkte am dritten (P3) oder fünften postnatalen Lebenstag (P5) oder an P15 nach Erholung an Raumluft. Alle Marker A) *Pax6*, B) *Prox1*, C) *NeuN*, D) *Lmx1α* und E) *Sema6a* wurden moduliert. Bis auf *Prox1* zeigten alle eine verminderte Expression an P3 und/oder P5 durch Hyperoxie, hier kein protektiver Effekt durch Koffein. An P3_P15 teilweise persistierende Reduktion (*Pax6/NeuN*), hier jedoch normalisierte Expressionslevel durch Koffein. An P5_P15 erfolgreiche Erholung ohne veränderte Expression (*Pax6*, *Prox1*, *Sema6a*), bei *NeuN/Lmx1α* hingegen Überexpression durch Koffein nach Hyperoxie und Normoxie. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, und **** $p < 0.0001$ im Vergleich mit Kontrollgruppe; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, und ### $p < 0.001$ im Vergleich mit Hyperoxie (ANOVA, Bonferroni's post hoc Test; Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc Test; Brown-Forsythe, Dunnett's post hoc Test). Modifiziert nach Gizzas et al., 2022.

3.6 Wenig Einfluss von Koffein auf die durch Hyperoxie stark beeinträchtigte Reifung und terminale Differenzierung der GCP

Zuletzt wurden mittels qPCR die Auswirkungen von Hyperoxie und Koffein auf das Überleben und die terminale Differenzierung der GCP, sowie Synaptophysin (Syp) als Marker für Synaptogenese und die Synapsendichte während der Kleinhirnentwicklung (Hami et al., 2017) untersucht. Die proneuralen Transkriptionsfaktoren NeuroD1 und NeuroD2 gelten als wichtige Regulatoren für Überleben und Differenzierung der reifenden, postmitotischen GCP (Consalez et al., 2020), wohingegen Sox2 das Ende des Zellzyklus und die terminale Differenzierung verhindert (Graham et al., 2003). Chd7 wird ebenfalls mit zunehmendem Differenzierungsgrad exprimiert und reguliert das Überleben der postmitotischen GCP der IGL (Feng et al., 2017).

Akuter oxidativer Stress bewirkte vor allem für *Chd7* und *NeuroD1*, in geringerem Maße aber auch für *Syp*, an P3 und/oder P5 eine signifikante Verminderung ihrer Expressionslevel (Abbildung 11 A, B und E). *NeuroD2* zeigte ebenfalls eine starke Reduktion, allerdings nur an P5, wohingegen *Sox2* nach Hyperoxie keinen akuten Einfluss auf die Genexpression vermerken ließ. Für keinen der untersuchten Marker konnte Koffein die akuten Auswirkungen der Hyperoxie ausgleichen (Abbildung 11 C und D). Nach alleiniger Koffeinanwendung bei Normoxie zeigte *Chd7* an P5 eine akute Überexpression, wohingegen Koffein unter Raumluf bei *NeuroD1*, *NeuroD2* und *Syp* an P3 und/oder P5 zu einer reduzierten mRNA-Expression führte (Abbildung 11 B, C und E). Nach zehntätiger Erholung an Raumluf an P5_P15 zeigten *NeuroD1* und *NeuroD2* nach vorheriger reduzierter Expression nun eine signifikante Überexpression durch Hyperoxie im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche durch Koffein auf Normniveau normalisiert werden konnte (Abbildung 11 B und C). Unter Normoxie führte Koffein hingegen zu einer Überexpression von *NeuroD1* und *NeuroD2*. An P3_P15 präsentierte *NeuroD1* eine weiterbestehende verminderte Expression nach Hyperoxie, auch hier konnte Koffein die Effekte der erhöhten Sauerstoffkonzentration reduzieren. *NeuroD2* hingegen zeigte keine langfristige Reaktion auf die dreitägige Hyperoxie-Exposition (P3_P15). Für *Sox2* wurde nur an P5_P15 ein vermindertes Expressionsniveau nach Hyperoxie beobachtet, das durch Koffein normalisiert wurde und an P3_P15 zu einer Überexpression führte (Abbildung 11 E). *Chd7* und *Syp* konnten ihre Expression nach mehrtätiger Erholung an Raumluf wieder auf Kontrollniveau normalisieren und es waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen mehr nachweisbar (P3_P15/P5_P15).

Hohe Sauerstoffkonzentrationen bewirkten stark reduzierte Expressionslevel vor allem von *Chd7* und *NeuroD1* als Marker für die terminale Differenzierung der GCP, die nicht akut, sondern erst nach Erholung an Raumluft durch Koffein aufgehoben werden konnten.



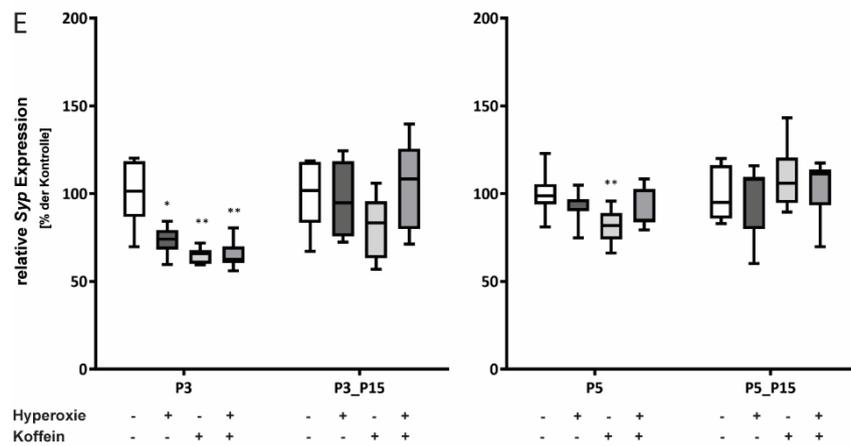


Abbildung 11 Quantifizierung der mRNA-Expression von *Chd7*, *NeuroD1/2*, *Sox2* und *Syp* mittels qPCR als Mediatoren für terminale Differenzierung und Überleben der GCP. Folgende Versuchsgruppen wurden analysiert: Normoxie (weiß, NO), Hyperoxie (dunkelgrau) und HY im Vergleich mit gleichzeitiger Koffein-Anwendung (hellgrau, NOC/ mittelgrau, HYC). Untersuchungszeitpunkte am dritten (P3) oder fünften postnatalen Lebenstag (P5) oder an P15 nach Erholung an Raumluft. Alle Marker A) *Chd7*, B) *NeuroD1*, C) *NeuroD2*, D) *Sox2* und E) *Syp* wurden moduliert. An P3 und/oder P5 starker Einbruch der Expressionslevel aller Transkriptionsfaktoren mit Ausnahme von *Sox2*, kein protektiver Effekt durch Koffein. Nach Erholung an Raumluft (P3_P15/P5_P15) Hyperoxie-induzierte Überexpression (*NeuroD1/NeuroD2*) oder Reduktion (*Sox2*), Normalisierung durch gleichzeitige Koffeinapplikation. Für *Chd7* und *Syp* langfristige Erholung an P3_P15/P5_P15 und keine signifikanten Unterschiede mehr. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, und **** $p < 0.0001$ im Vergleich mit Kontrollgruppe; ## $p < 0.01$, und ### $p < 0.001$ im Vergleich mit Hyperoxie (ANOVA, Bonferroni's post hoc Test; Kruskal-Wallis, Dunn's post hoc Test; Brown-Forsythe, Dunnett's post hoc Test). Modifiziert nach Giszas et al., 2022.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Oxidativer Stress im sich entwickelnden Kleinhirn wirkte sich negativ auf alle untersuchten zerebellaren Zellpopulationen und Transkriptionsfaktoren aus. Die Länge der Dendritenbäume der Purkinjezellen war durch erhöhte Sauerstoffkonzentrationen signifikant reduziert. Relevante Marker für Proliferation, Migration und Differenzierung der granulären Vorläuferzellen im Kleinhirn zeigten sich stark in ihrer Expression beeinträchtigt. Im Rahmen unserer durchgeführten Experimente konnte ein protektiver Effekt von Koffein auf die durch Hyperoxie beeinträchtigte zerebellare Neurogenese nachgewiesen werden. Vor allem scheint Koffein die Anzahl und Entwicklung der Purkinjezellen erfolgreich vor oxidativem Stress schützen zu können. Reifung, Proliferation und Differenzierung der Körnerzellen wurden auf transkriptioneller Ebene bei akuter Sauerstoffexposition unabhängig der gleichzeitigen Koffeinapplikation geschädigt. Koffein zeigte neuroprotektive Effekte meist erst nach einer Erholungsphase der Jungtiere unter normoxischen Umgebungsbedingungen.

Den GCP und späteren Körnerzellen sollte als insgesamt größte neuronale Zellpopulation, die zudem 99% der zerebellaren Neurone ausmacht (Consalez et al., 2020), besondere Beobachtung während der zerebellaren Neurogenese geschenkt werden. Von ihrer primären Keimzone in der RL ausgehend, migrieren die GCP in ihre sekundäre Keimzone, den EGL, welcher zu diesem Zeitpunkt die gesamte zerebellare Oberfläche auskleidet (Consalez et al., 2020). Hier wird durch starke Proliferation in der äußeren Zone des EGL die Generation der postmitotischen GC generiert, die in die innere Zone des EGL und von dort durch die ML in die IGL und bleibende Körnerzellschicht wandern (Consalez et al., 2020). Während ihrer Migration lassen sie ihre sich ausbreitenden Axone zurück, die später als Parallelfasern in der ML erkennbar sind (Abbildung 1) und mit den Dendritenbäumen der Purkinjezellen Synapsen ausbilden (Consalez et al., 2020).

Das Zusammenspiel und die Gegenregulation zahlreicher Transkriptionsfaktoren, Neurotrophine und Mediatoren zu verschiedenen Zeitpunkten regulieren die Entwicklung der GCP, sodass durch quantitative Messung ihrer Expression Rückschlüsse auf spezifische Entwicklungsschritte gezogen werden können. Als Marker für die frühe Entwicklung der unreifen GCP können Pax6 und Sox2 herangezogen werden. Prox1 wird

als genereller Marker für GCP verwendet, der sowohl von prä- als auch postmitotischen Zellen des EGL und des IGL exprimiert wird (Lavado and Oliver, 2007). *Pax6* und *Prox1* zeigten in unserem Experiment signifikant verminderte Expressionslevel als Reaktion auf den hyperoxischen Insult, was die Vulnerabilität der unreifen GCP gegenüber erhöhter Sauerstoffexposition verdeutlicht. Koffein konnte im akuten Zustand nicht die Auswirkungen des oxidativen Stresses vermindern und bewirkte für *Pax6* erst nach zehntätiger Erholung an Raumluft eine Normalisierung der weiter durch Hyperoxie beeinträchtigten Expression. Auch die Anzahl der *Pax6*-positiven, durch die ML migrierenden GCP und ihre Proliferationskapazität waren durch Hyperoxie stark reduziert. Diese beeinträchtigenden sauerstofftoxischen Effekte auf die GCP konnten auf zellulärer Ebene erfolgreich durch Koffein ausgeglichen werden. Langfristig kann sich eine verminderte Proliferationskapazität auf die darauffolgende Migration und Differenzierung und somit auf die zerebellare Zytoarchitektur auswirken (Komuro et al., 2013, Consalez et al., 2021).

Der pluripotente Transkriptionsfaktor *Sox2* wird während der Kleinhirnentwicklung von verschiedenen Zelltypen exprimiert (Cerrato et al., 2018) und reguliert die Proliferation und Differenzierung der neuralen Progenitorzellen (Mandalos et al., 2018). *Sox2* verhindert dabei den Übergang von proliferierender Vorläuferzelle zum sich differenzierenden Neuron. Erst die Herabregulierung bewirkt den Austritt aus dem Zellzyklus und somit einen Proliferationsstop, damit die terminale Differenzierung beginnen kann (Graham et al., 2003). Reife, postmitotische NeuN-positive GC exprimieren demnach kein *Sox2* mehr (Ahlfeld et al., 2017). Die Progenitoren koexprimieren ebenfalls *Sox1* und *Sox3*, sodass ein *Sox2* Verlust durch redundante Expression und Funktionen teilweise aufgefangen werden kann (Graham et al., 2003). Postnatal spielt *Sox2* primär eine wichtige Rolle für den Aufbau und die Organisation der Bergmann-Gliazellen (Cerrato et al., 2018) und wird bis ins Erwachsenenalter in der Purkinje-Zellschicht exprimiert (Mandalos et al., 2018). *Sox2* zeigte im Vergleich zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren eine weniger stark ausgeprägte Sensibilität für erhöhte Sauerstofflevel und nach zehntätiger Erholung an Raumluft zudem ein gutes Ansprechen auf die Koffeintherapie.

NeuroD1 und *NeuroD2* zählen zur großen Gruppe der proneuralen basischen Helix-Schleifen-Helix-Transkriptionsfaktoren (*basic helix-loop-helix- (bHLH) transcription factors*) und gelten als wichtige Regulatoren für das Überleben postmitotischer GCP in der IGL (Pieper et al., 2019). *NeuroD2* spielt darüber hinaus eine entscheidende Rolle für

die terminale Differenzierung der inhibitorischen Interneurone der ML. Pieper et al. zeigten, dass eine Inaktivierung durch unzureichende Differenzierung und Bildung inhibitorischer Synapsen zu einem Ungleichgewicht zwischen exzitatorischem und inhibitorischem Input für die Purkinjezellen und damit zu einer irregulären Neurotransmission im zerebellaren Cortex führte (Pieper et al., 2019). Der strukturell verwandte Transkriptionsfaktor *NeuroD1* ist ebenfalls essentiell für das Überleben und die Differenzierung der postmitotischen GCP und begünstigt ihre Migration in den IGL (Consalez et al., 2020). Beide Faktoren zeigten in unserer Studie signifikant reduzierte Expressionslevel als Reaktion auf oxidativen Stress, die nicht durch Koffein abgewendet werden konnten. Besonders die Beeinträchtigung der *NeuroD1*-Expression verdeutlicht erneut die Vulnerabilität der GCP für die erhöhte postnatale Sauerstoffexposition, welche ihre Migration und terminale Differenzierung langfristig schädigen könnte. Nach Erholung an Raumluft boten beide Faktoren interessanterweise eine Überexpression, möglicherweise eine überaktivierte Gegenregulation, durch Hyperoxie, die jedoch durch Koffein wieder normalisiert werden konnte.

Bylund et al. zeigten, dass vor allem das Gleichgewicht zwischen bHLH-Transkriptionsfaktoren und Sox1-3 entscheidend für die Entwicklung und die Progression der Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen ist. Sox1-3 verhindern dabei durch Inhibierung der bHLH-Aktivität den Übergang in die terminale Differenzierung und diese müssen umgekehrt mit zunehmender Expressionsrate die Aktivität von Sox1-3 hemmen, um letztendlich die Migration und Differenzierung einzuleiten (Bylund et al., 2003).

Um die Beeinträchtigung der granulären Migration zu untersuchen, wurde die Expression von *Lmx1α* und *Sema6a* gemessen. *Lmx1α* wird von Progenitorzellen der RL exprimiert und vermittelt den richtigen Zeitpunkt sowie die Migration in den zerebellaren Cortex (Chizhikov et al., 2010). *Sema6a* funktioniert im späteren Verlauf als Initiator ihrer Migration entlang der BG in den IGL (Leto et al., 2016). Das Neurotrophin BDNF erfüllt während der zerebellaren Neurogenese pleiotrope Funktionen. Neben seiner stimulierenden Funktion für Proliferation und Differenzierung der GCP, leitet es die migrierenden GCP anhand seines Konzentrationsgradienten durch den ML in den IGL (Camuso et al., 2022). Salero und Hatten zeigten zudem, dass BDNF in mitotischen GCP die postmitotische Expression von *NeuroD1* anregte (Salero and Hatten, 2007). BDNF beeinflusst aber nicht nur die granulären Vorläuferzellen. Camuso et al. beschrieben darüber hinaus seine Wichtigkeit für die Entstehung und Aufrechterhaltung GABAerger Synapsen, wohingegen sein Einfluss auf die Differenzierung der Purkinjezellen noch

kontrovers diskutiert wird (Camuso et al., 2022). In unserer Studie zeigten die untersuchten Marker für Migration, *Lmx1α* und *Sema6a*, nur teilweise eine Beeinträchtigung durch Hyperoxie. *Sema6a* wies nach Erholung an Raumluft keine langfristig veränderten zerebellaren Expressionsmuster auf, wohingegen *Lmx1α* mehr auf Koffein zu reagieren schien. Während sich die *Lmx1α*-Expression langfristig gut von dem vorangegangenen hyperoxischen Insult erholen konnte, bewirkte Koffein eine Über- bzw. Unterexpression.

Für *BDNF* bewirkte eine dreitägige Sauerstoffexposition verminderte Expressionslevel, die sich jedoch an Raumluft normalisieren konnten, wohingegen nach fünftägiger Exposition sich die Auswirkungen aggravierten. Unmittelbar nach der längeren Exposition konnte eine signifikante Überexpression gemessen werden, die nach 10 Tagen an Raumluft drastisch unter das Normoxie-Niveau fiel. Hierbei kann nur schwer unterschieden werden, ob die unprozessierte, proneutrophine Form (proBDNF) oder die prozessierte BDNF-Variante detektiert wurde, da auf Transkriptebene analysiert wurde. Dieser Aspekt ist nicht ganz unerheblich, um die Auswirkungen von hohen Sauerstoffspannungen auf die granuläre Migration beurteilen zu können. Als unprozessierte Form übt proBDNF während der zerebellaren Neurogenese gegensätzliche Funktionen aus (Xu et al., 2011). Prozessiertes BDNF besitzt eine GCP-stimulierende Wirkung, wohingegen proBDNF die Migration in den IGL verhindert (Xu et al., 2011). Die Expression von *BDNF* scheint unter der Sauerstofftoxizität positiv durch Koffein reguliert zu werden, da sowohl die Über- als auch die Unterexpression im Vergleich zur Kontrolle normalisiert werden.

Um die spätere Entwicklung der postmitotischen GC und reifen GC in der IGL zu beurteilen, können NeuN und Chd7 als relevante Marker herangezogen werden. Während der zerebellaren Neurogenese wird Chd7 von verschiedenen Zelltypen, vor allem aber GCP mit zunehmendem Differenzierungsgrad, exprimiert. Die höchste Chd7-Expression findet sich postnatal bei postmitotischen GCP der IGL, deren Überleben und Differenzierung Chd7 reguliert, und persistiert anschließend bis ins Erwachsenenalter (Feng et al., 2017). Insgesamt spielt Chd7 eine entscheidende Rolle für die Kleinhirnentwicklung und eine Inaktivierung kann zu einer gestörten Differenzierung der GCP, vermehrter Apoptose, fehlerhafter Lokalisierung der Purkinjezellen und zerebellarer Hypoplasie führen (Feng et al., 2017). In unserer Studie zeigten beide Transkriptionsfaktoren eine stark reduzierte Expression, ausgelöst durch oxidativen Stress. Auch wenn Koffein hier unmittelbar nach Exposition keinen protektiven Effekt

zeigte, konnte sich die *Chd7*-Expression nach Erholung an Raumluft vollständig normalisieren. Wohingegen bei *NeuN* ein akuter wie auch längerer hyperoxischer Insult zu einer langfristigen Beeinträchtigung der Expression führte. Auch hier konnte Koffein protektiv wirken und die Expressionslevel vergleichbar zur Kontrolle normalisieren.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die sich in der Entwicklung befindenden granulären zerebellaren Vorläuferzellen zu jedem Zeitpunkt durch erhöhte postnatale Sauerstoffexposition im Sinne von oxidativem Stress auf Transkriptionsebene in ihrer Reifung und Differenzierung beeinflusst werden. Die gleichzeitige Koffeinanwendung konnte die Expression relevanter Transkriptionsfaktoren wieder normalisieren und zeigte damit antioxidative, neuroprotektive Eigenschaften für die GCP. Interessanterweise erfolgte die Normalisierung nicht unmittelbar nach Beendigung der Sauerstoff- und Koffeinbehandlung, sondern erst nach der Erholungsphase an Raumluft. Dies lässt die Vermutung zu, dass diese für die GCP-relevanten Faktoren der Kleinhirneurogenese nicht direkt durch Koffein moduliert werden, sondern diese Effekte sekundär vermittelt werden.

Wie genau Koffein seine Wirkung vermittelt, ist dahingegen noch nicht final geklärt. Durch seinen pleiotropen Einfluss auf verschiedene Rezeptoren und Transkriptionskaskaden, sind mehrere neuroprotektive Wirkmechanismen denkbar, die sowohl direkt, über die Adenosinrezeptoren (Ribeiro and Sebastiao, 2010, Ciruela et al., 2006), oder indirekt durch Beeinflussung der oxidativen Stressantwort (Endesfelder et al., 2014, Endesfelder et al., 2017, Heise et al., 2023), anti-inflammatorische und anti-apoptische Eigenschaften (Badshah et al., 2019, Hosny et al., 2019, Endesfelder et al., 2017), als auch die Regulierung von Stress im endoplasmatischen Retikulum (Teng et al., 2017), erfolgen könnten. Neben einer Wirkung auf die Genexpression und die neuronale Signaltransduktion, werden auch Effekte von Methylxanthinen auf Membranproteine, Enzyme wie Phosphodiesterasen und cholinerge Rezeptoren beschrieben (Janitschke et al., 2021). Eine wichtige intrazelluläre Signalkaskade scheint hierbei der Nrf2/NfκB-Signalweg zu sein, ein Schlüsselregulator für die antioxidativen Kapazitäten einer Zelle und Induktor für die Expression wichtiger Mediatoren in der oxidativen Stressantwort (Ma, 2013). Badshah et al. zeigten in ihrem Maus-Modell antioxidative, anti-inflammatorische und neuroprotektive Eigenschaften von Koffein durch Modulation der Nrf2-Expression in einem Lipopolysaccharid-induzierten oxidativen Stress-Modell (Badshah et al., 2019). Gleichzeitig wurde die durch ROS verursachte Induktion von NfκB, als wichtige Marker für Neuroinflammation, durch die Koffeintherapie weitestgehend normalisiert (Badshah et

al., 2019). Neben Endesfelder et al. (Endesfelder et al., 2017, Endesfelder et al., 2014) konnten auch Khan et al. neuroprotektive Wirkungen von Koffein auf zellulärer Ebene nachweisen und zeigten eine Modulation der Nrf2- und NFκB-abhängigen Signalkaskaden nach induziertem oxidativem Stress (Khan et al., 2019). Diese Effekte von Koffein vereint die Wirkung auf transkriptioneller Ebene, was eine indirekte Wirkung bedingen würde und zur Erklärung beitragen könnte, warum häufig erst nach Erholung der Jungtiere an Raumluft nach der Hyperoxie Effekte von Koffein sichtbar wurden. Gaytan und Pasaro zeigten darüber hinaus eine erhöhte Expression von Adenosinrezeptoren in relevanten kardiorespiratorischen Arealen des sich entwickelnden Gehirns in einem neonatalen Ratten-Modell nach oraler Koffeintherapie (Gaytan and Pasaro, 2012). Passend dazu zeigte sich bei mit Koffein behandelten Tieren auch eine erhöhte Herzfrequenz, Atemfrequenz und Hämoglobin-Sättigung (Gaytan and Pasaro, 2012). Da das Kleinhirn neben dem Hippocampus die höchste Dichte an Adenosinrezeptoren aufweist (Jarvis et al., 1989), ist auch hier eine Wirkung über die Modulation adenosinerger Stoffwechselwege wahrscheinlich. Adenosin, als neuromodulatorischer Botenstoff, ist omnipräsent und erfüllt zahlreiche Funktionen wie beispielsweise die Modifizierung der synaptischen Signaltransmission (Stockwell et al., 2017). Der A1-Adenosinrezeptor wird mit einer verminderten präsynaptischen Neurotransmitter-Freisetzung und damit einer synaptischen Depression assoziiert, wohingegen A2a-Adenosinrezeptoren mit einer verstärkten Ausschüttung von Neurotransmittern in Verbindung gebracht werden (Stockwell et al., 2017). Benito-Muñoz et al. zeigten, dass über den A1-Adenosinrezeptor auf transkriptioneller Ebene auch die neuronale Differenzierung beeinflusst wird (Benito-Muñoz et al., 2016). Bruzzese et al. zeigten in ihrem Ratten-Modell, dass Hyperoxie zu einer reduzierten Expression von A2a-Adenosinrezeptoren im Gehirn und verminderten Adenosin-Plasmakonzentrationen führte (Bruzzese et al., 2015). Die Herunterregulierung adenosinerger Stoffwechselwege durch erhöhte Sauerstoffkonzentrationen kann auch als Anpassungsmechanismus des Körpers betrachtet werden, um das Gewebe durch Vasokonstriktion vor ROS-induziertem oxidativem Stress und einer Sauerstoffüberlastung zu schützen (Bruzzese et al., 2015). Soontarapornchai et al. konnten zeigen, dass Koffein im neonatalen Gehirn der Ratte unter Hyperoxie ebenfalls die Aktivität der A1- und A2a-Adenosinrezeptoren inhibierte (Soontarapornchai et al., 2021). Interessanterweise wurde zudem ein neuroprotektiver Effekt von Koffein durch verminderten oxidativen Stress und Hypermyelinisierung unter Normoxie nachgewiesen (Soontarapornchai et al., 2021).

Die Entwicklung der Purkinjezellen zeigte in unserer tierexperimentellen Studie ebenfalls eine starke Beeinträchtigung durch akute postnatale Hyperoxie, die jedoch im Gegensatz zur granulären Zellreihe erfolgreich durch Koffein protektiert werden konnte. Sowohl die Anzahl der Purkinjezellen, als auch die Länge ihrer Dendriten, waren durch akuten oxidativen Stress signifikant reduziert. Puls et al konnten bereits zeigen, dass auch eine 24-stündige Exposition mit hohen Sauerstoffkonzentrationen am postnatalen Tag 6 (P6) zu oxidativem Stress und Beeinträchtigung der zerebellaren Neurogenese ausreichen (Puls et al., 2023a, Puls et al., 2023b). Die Neurogenese-inhibierenden Effekte, durch den durch Hyperoxie induzierten oxidativen Stress, konnten in unserem Schädigungsmodell durch die gleichzeitige Koffeinanwendung akut sowie nach Erholung an Raumluft wieder ausgeglichen werden und schützte die Purkinjezellen nachhaltig. Dieser Effekt war vor allem bei der zellulären Entwicklung der Purkinjezellen nach Schädigung über die verschiedenen Zeiten zu beobachten, wobei sich dies für die korrespondierende *Calb1*-mRNA-Expression nicht korrelierend darstellen ließ. So zeigten sich nach zehntägiger Erholung, folgend dem hypoxischen Ereignis, normalisierte *Calb1*-Expressionslevel unter Koffeinapplikation, wohingegen dieser Effekt nicht direkt nach der Beendigung der Sauerstoffexposition detektiert werden konnte. Dieser Effekt ließe sich mit einer verzögerten Translation nach dem sauerstofftoxischen Insult erklären.

Durch die Sekretion von Shh sind die Purkinjezellen zudem maßgeblich am Wachstum und der Proliferation der GCP-Generation beteiligt (Haldipur et al., 2015). Haldipur et al. zeigten, dass eine verminderte Shh-Sekretion auch die Anzahl der PCNA-positiven, also in der EGL proliferierenden Zellen, reduzierte und durch gestörte Proliferation und Differenzierung langfristig auch das zerebellare Volumen verminderte (Haldipur et al., 2015). Salero und Hatten beschreiben zudem, dass Shh im sich entwickelnden Kleinhirn die Expression von *CycD2* anregt (Salero and Hatten, 2007). Auch in unseren tierexperimentellen Studien bewirkten hohe Sauerstoffkonzentrationen neben der reduzierten Anzahl der Purkinjezellen auch einen starken Einbruch der *Shh*- und *CycD2*-Expression, die nach Erholung an Raumluft durch eine antioxidative Therapie mit Koffein ausgeglichen werden konnte. Die Proliferationskapazität und die Pax6- und PCNA-exprimierenden GCP waren ebenso vermindert, was möglicherweise mit der verminderten *Shh*-Expression zusammenhängen könnte. Laut Vogel et al. gibt es eine feste Korrelation zwischen der Anzahl an Körnerzellen und den Purkinjezellen als ihre postsynaptischen Gegenspieler (Vogel et al., 1989), die gegebenenfalls durch einen

Mediator wie Shh hergestellt werden könnte. Ebenso weisen GCP in Nagetieren zum Zeitpunkt P5 sehr hohe Teilungsraten auf, um dann die Migration aus dem EGL zum IGL einzuleiten (Corrales et al., 2006). Da Shh eine essentielle Rolle bei der Steuerung dieses Prozesses einnimmt, scheint eine Verringerung der Shh-Expression mit einer einhergehenden Hemmung der Proliferation folglich richtig. Durch die enge Korrelation zwischen der Anzahl der Purkinjezellen und den GCP (Vogel et al., 1989) sind Beeinträchtigungen beider Zellpopulationen durch externe Noxen, wie auch einer veränderten Shh-Expression erklärbar, wobei die Zusammenhänge noch nicht vollständig geklärt sind (Haldipur et al., 2015).

Synaptophysin (Syp), ein wichtiger Bestandteil der präsynaptischen Vesikelmembran, wird als Marker für die Synaptogenese und Synapsendichte verwendet (Hami et al., 2017). Als Calcium-bindendes Protein in synaptischen Vesikeln wird zudem eine Beteiligung an der Calcium-abhängigen synaptischen Exozytose vermutet (Hami et al., 2017). Während der zerebellaren Neurogenese wird Syp schon früh exprimiert und anschließend während der Entstehung neuer Synapsen zwischen den Purkinjezellen mit den Interneuronen und Parallelfasern in der ML hochreguliert (Hami et al., 2016). Später, mit zunehmender Reifung der GCP, kann Syp auch in der EGL und der IGL verstärkt nachgewiesen werden (Hami et al., 2016). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Syp als Vesikelprotein auch für die synaptische Plastizität und damit für Lernprozesse und Gedächtnis eine wichtige Rolle spielt. Eine fehlerhafte Syp-Expression wird mit neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen assoziiert (Hami et al., 2017). In unserem *in vivo*-Experiment zeigte Syp unter akuten oxidativen Stress eine verminderte Expression, die nicht durch Koffein abgefangen werden konnte. Nach zehntägiger Erholung zeigten sich zur Kontrollgruppe vergleichbare Syp-Expressionslevel, d.h. die reduzierte Syp-Expression hatte keinen Bestand. Lalert et al. beschrieben dennoch, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhtem oxidativem Stress und einer verminderten Expression von synaptischen Proteinen und gestörter synaptischer Integrität angenommen werden kann (Lalert et al., 2020). Jung et al. postulierten zudem einen Zusammenhang zwischen der Proliferationskapazität und der Syp-Expression im Kleinhirn (Jung et al., 2009).

Da in unserer Studie der Fokus primär auf Markern für Proliferation und Differenzierung lag, bleibt die Frage derzeit offen, ob die durch Hyperoxie verminderten Zellpopulationen eventuell auch durch vermehrten Zelluntergang zustande kommen könnten. Puls et al. zeigten, dass oxidativer Stress zerebellare Apoptose und Inflammation induzierte und zu

vermehrtem Zelluntergang während der Neurogenese führte, als auch die zerebellare Neurogenese beeinträchtigen kann (Puls et al., 2023a, Puls et al., 2023b). Laut Scheuer et al. führte Hyperoxie jedoch nicht zu einer unmittelbaren, sondern einer verzögerten pro-apoptotischen Wirkung auf die GCP (Scheuer et al., 2018). Kasala et al. zeigten in ihren Untersuchungen einen neurotoxischen und pro-apoptotischen Effekt von Koffein im sich entwickelnden Gehirn der Ratte (Kasala et al., 2020). Im Kleinhirn adulter Ratten konnten Raoofi et al. jedoch eine neuroprotektive Wirkung von Koffein verzeichnen (Raoofi et al., 2022). In einem ähnlichen durch Tramadol-induzierten oxidativem Stress-Modell zeigte Koffein anti-apoptotische, anti-inflammatorische und antioxidative Eigenschaften und konnte den neurotoxischen Effekt von Tramadol auf die Genexpression relevanter Marker ausgleichen (Raoofi et al., 2022). Auch im sich entwickelnden Gehirn der Ratte zeigten Endesfelder et al. bereits anti-apoptotische, anti-inflammatorische und antioxidative Eigenschaften von Koffein (Endesfelder et al., 2017). In der Studie von Heise et al. wurden die identischen Tiere dieses Versuches für die Analyse der Auswirkungen der postnatalen Hyperoxie und die Protektion mit Koffein in der hippocampalen Neurogenese untersucht (Heise et al., 2023). Koffein konnte in diesem neurogenen Prozess die verringerte Proliferationskapazität im *Gyrus dentatus* normalisieren und schützte gleichzeitig die Hyperoxie-geschädigten hippocampalen intermediären und reifen Neurone während ihrer Differenzierung. Dabei profitierten auf transkriptioneller Ebene eher die Transkriptionsfaktoren der reifen Neurone vom Koffein, als die Neurogenese-assoziierten Mediatoren der neuronalen Vorläuferzellen (Heise et al., 2023). Dies ließe den Diskussionsansatz zu, dass ausdifferenzierte neuronale Zellen, auf Basis der hier untersuchten Mediatoren, einen größeren Benefit aus der Koffeinapplikation ziehen, wobei die Effektvermittlung sehr vielseitig scheint. Mechanistische Studien könnte zukünftig diese Diskussion voranbringen.

In unserer Studie untersuchten wir die postnatale zerebellare Neurogenese in neonatalen Ratten als repräsentatives Modell für die intrauterine Kleinhirnentwicklung beim Menschen, die das Frühgeborene dennoch erst postnatal und unter erhöhten Sauerstoffbedingungen erlebt. Meilensteine der Neurogenese finden bei Menschen im Vergleich zu Nagetieren zwar zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt, sind aber gleichwohl bei Berücksichtigung dessen gut zu vergleichen (Zeiss, 2021). Insgesamt zeigen Nagetiere zum Zeitpunkt der Geburt ein noch unreiferes Nervensystem und der Höhepunkt der Neurogenese wird erst postnatal in den ersten 14 Lebenstagen erreicht, während der größte Wachstumsschub bei einem Reifgeborenen zum Zeitpunkt der

Geburt bereits stattgefunden hat (Zeiss, 2021, Dobbing and Sands, 1979, Semple et al., 2013). Die neuronale Entwicklung eines zum Termin geborenen Kindes entspricht der einer Ratte am siebten postnatalen Tag (P7) und die Schritte der menschlichen Neurogenese im dritten Trimester finden adäquat ab dem Zeitpunkt der Geburt bis etwa zum Ende der zweiten Lebenswoche in der neonatalen Ratte statt (Clancy et al., 2007, Dobbing and Sands, 1979, Semple et al., 2013). Die von uns untersuchten Tiere repräsentieren demnach die Neurogenese eines frühen Frühgeborenen in einer nachgestellten hyperoxischen Umgebung. Interindividuelle Unterschiede zwischen Spezies sind dennoch möglich und Ergebnisse tierexperimenteller Studien können nicht zu 100% auf die menschliche Neurogenese übertragen werden, sind für die Charakterisierung in relevanten Schädigungsmodellen für ein besseres Verständnis der zellulären und molekularen Prozesse aber unabdingbar.

4.2 Implikationen für den klinischen Alltag und zukünftige Forschung

Transkriptionsfaktoren spielen eine fundamentale Rolle für die Differenzierung, Migration und Ausbildung neuronaler Schaltkreise in der zerebellaren Neurogenese und es ist nicht verwunderlich, dass Störungen während dieser vulnerablen Phase klinische Auffälligkeiten und entwicklungsneurologische Folgen nach sich ziehen können (Lv et al., 2021). So werden beispielsweise Mutationen im Pax2-Gen mit entwicklungsneurologischen Störungen, wie einer verzögerten Sprachentwicklung oder mentaler Retardierung assoziiert (Lv et al., 2021) und auch Veränderungen der BDNF-Expression werden mit Autismus-Spektrum-Störungen und ADHS in Verbindung gebracht (Camuso et al., 2022).

Besonders Frühgeborene und das noch unreife Gehirn sind durch die frühe Sauerstoffexposition einem erhöhten Risiko ausgesetzt (Panfoli et al., 2018). Während das generelle Überleben von Frühgeborenen in den vergangenen Jahrzehnten stetig zugenommen hat, sind immer noch viele Frühgeborene von chronischen Lungenerkrankungen und entwicklungsneurologischen Folgen betroffen (Obst et al., 2022, Glass et al., 2015). Es besteht eine hohe Evidenz (Obst et al., 2022, de Almeida et al., 2022, Di Fiore and Vento, 2019, Alva et al., 2023), dass Hyperoxie und die vermehrte Produktion von ROS eine gemeinsame Ursache und der daraus resultierende oxidative und inflammatorische Stress die gemeinsame Endstrecke in der Entstehung dieser Pathologien beschreiben. Dies lässt einer erfolgreichen antioxidativen Therapie immer

mehr Bedeutung zukommen (Melinda and Gabriela, 2019), wofür Koffein eine vielversprechende Option darstellt. Tierexperimentelle Studien legten bereits die neuroprotektiven Eigenschaften von Koffein dar und zeigten, dass oxidativer Stress durch Diminution der ROS und verminderter Lipidperoxidation erfolgreich reduziert werden kann (Raoufi et al., 2022, Endesfelder et al., 2017). Dabei scheint Koffein systemisch in relevanten Tiermodellen für Frühgeburtlichkeit antioxidative Effekte zu vermitteln, wie für die unreife Lunge assoziiert zur BPD gezeigt wurde (Chen et al., 2020, Teng et al., 2017, Endesfelder et al., 2020, Endesfelder et al., 2019). Klinische Studien konnten sehr eindrücklich positive Effekte hinsichtlich der Entwicklung Frühgeborener nachweisen (Schmidt et al., 2007, Schmidt et al., 2017, Szatkowski et al., 2023, Henderson-Smart and De Paoli, 2010).

Obwohl Koffein seit vielen Jahren und mittlerweile als Standardtherapie in der Neonatologie verwendet wird, bleiben jedoch die Auswirkungen auf weitere Organsysteme, langfristige Folgen und anwendungsbezogene Fragen noch offen (Pergolizzi et al., 2022). Es gibt Hinweise, dass Koffein auch durch Beeinflussung der Expressionsmuster der Adenosinrezeptoren im Gehirn langfristig das Verhalten ehemaliger Frühgeborener verändern könnte (Millar and Schmidt, 2004). Da sämtliche Gewebetypen und Organe Adenosinrezeptoren exprimieren, ist davon auszugehen, dass sich Koffein auch auf diese auswirkt und somit auch weitere neonatale Morbiditäten wie die NEC oder ROP beeinflusst (Millar and Schmidt, 2004). Neuere Studien weisen auf einen positiven und prophylaktischen Effekt auf die Progression der ROP hin (Chen et al., 2017), während die Koffeintherapie gleichzeitig mit einer verlängerten Magenentleerungszeit (Gounaris et al., 2020) und eventuell auch mit einem häufigeren Auftreten der NEC assoziiert wird (Cox et al., 2015). Yuan et al. beschreiben zudem diuretische Effekte von Koffein durch Antagonisierung der renalen A1-Adenosinrezeptoren und eventuell auch eine Beeinflussung der intestinalen Flora (Yuan et al., 2022). Unklar bleibt hingegen, wie sich Koffein auf das metabolische und kardiovaskuläre Profil der ehemaligen Frühgeborenen auswirkt (Kumar and Lipshultz, 2019). Eine erhöhte *in utero* Exposition mit Koffein wird mit niedrigem Geburtsgewicht, IUGR und einem erhöhten Abortrisiko sowie im späteren Verlauf mit vermehrtem Auftreten von Adipositas im Kindesalter assoziiert, sodass auch Auswirkungen bei postnataler Exposition möglich sind (Kumar and Lipshultz, 2019). Andererseits verringern prophylaktische Koffeingaben beatmeter Frühgeborener die Dauer der

Sauerstofftherapie, als auch die invasive und nicht-invasive Beatmungszeit sowie die Inzidenz von moderater bis mittelschwerer BPD (Elmowafi et al., 2022).

Darüber hinaus bleibt die Frage des optimalen Dosierungsschemas. Zumindest im amerikanischen und europäischen Raum gilt die Therapieempfehlung: 20 mg/kg Koffeincitrat (entspricht 10 mg/kg Koffein) als Einstiegsdosis und anschließend 5 mg/kg alle 24 Stunden als Erhaltungsdosis (Saroha and Patel, 2020). Bruschetti et al. zeigten in ihrem aktuellen Review, dass höherdosiertes Koffein zwar die BPD-Inzidenz zu reduzieren vermag, jedoch keinen Effekt auf die Mortalität oder die Hospitalisierungszeit nimmt (Bruschetti et al., 2023). Es fehlen jedoch Daten, wie sich höherdosiertes Koffein langfristig auf das neurologische Outcome auswirkt, insbesondere für die Gruppe der ELBW-Frühgeborenen, die einem besonders hohen Risiko ausgesetzt sind (Bruschetti et al., 2023). McPherson et al. führten eine randomisierte klinische Studie mit Frühgeborenen <30 SSW Gestationsalter durch, die eine erhöhte Inzidenz für zerebellare Blutungen in der Gruppe, die mehr Koffein als die Standarddosis von 20 mg/kg erhielt, zeigte (McPherson et al., 2015). Weiterhin gab es Hinweise auf ein vermehrtes Auftreten von Krampfanfällen nach höherdosiertem Koffein (Vesoulis et al., 2016). Firman et al. untersuchten langfristige entwicklungsneurologische Folgen nach hochdosierter Koffeintherapie bei Frühgeborenen <28 SSW Gestationsalter und fanden ebenfalls eine leichte Häufung von zerebellaren Blutungen, jedoch keine Unterschiede in der neurologischen Entwicklung zwei Jahre später (Firman et al., 2019). Saroha und Patel untersuchten in ihrem Review ebenfalls die klinischen Auswirkungen von Koffein in Abhängigkeit der Dosierung und zeigten mit zunehmender Dosis eine verbesserte Wirkung auf Atempausen, Bradykardie und Desaturierungen und erwägen eine Abweichung von der Standarddosierung durch gewichtsadaptierte Dosisanpassung, um den therapeutischen Effekt beizubehalten (Saroha and Patel, 2020).

Ein weiterer Diskussionspunkt in der klinischen Anwendung ist der optimale Zeitpunkt des Therapiebeginns. Dobson et al. verglichen das Outcome einer großen Kohorte VLBW-Frühgeborener, die entweder vor oder erst ab dem dritten Lebenstag Koffein erhielten und zeigten eine verminderte BPD-Inzidenz, weniger behandlungsbedürftige PDA sowie eine signifikant verkürzte Beatmungsdauer nach früherem Start der Koffeintherapie (Dobson et al., 2014). Lodha et al. beobachteten ebenfalls ein vermindertes Auftreten von BPD und PDA, wenn die erste Koffeinhabe innerhalb der ersten 48 Stunden stattfand (Lodha et al., 2015). Für die Mortalität, schwere neurologische Schäden, das Auftreten einer NEC oder einer schweren ROP wurden

jedoch keine Unterschiede bei früherem Therapiebeginn festgestellt (Lodha et al., 2015). Park et al. unterstützen mit ihrem Review diese Ergebnisse und zeigten ebenso einen positiven Einfluss auf das neonatale Outcome durch einen frühen Therapiestart (Park et al., 2015). Dekker et al. untersuchten in ihrer randomisierten, klinischen Studie die Auswirkungen auf Frühgeborene mit einem Gestationsalter <30 SSW, wenn die erste Koffeingabe bereits im Kreißsaal, noch vor Verlegung auf die neonatologische Intensivstation, stattfand (Dekker et al., 2017). Ihre Ergebnisse zeigten eine direkte Auswirkung von unmittelbar postnatal appliziertem Koffein auf Parameter für die Atemanstrengung, wie das Atemminutenvolumen, das Tidalvolumen und die Atemfrequenz (Dekker et al., 2017). Während Atemminutenvolumen und Tidalvolumen schon eine Minute nach Applikation zunahm, wurden hingegen keine Auswirkungen auf das Atemmuster, die Atemfrequenz, die Oxygenierung und den Sauerstoffbedarf beobachtet (Dekker et al., 2017). Kraaijenga et al. zeigten ebenfalls eine Zunahme des Tidalvolumens um ca. 30% nach Koffeinapplikation und eine damit korrelierende erhöhte Aktivität des Zwerchfells (Kraaijenga et al., 2015). Die Notwendigkeit zur Intubation konnte in einer kleinen Kohorte früher Frühgeborener <29 SSW allerdings nicht durch eine frühe erste Koffeingabe innerhalb der ersten 2 Stunden vermindert werden (Katheria et al., 2015) und auch für die Notwendigkeit einer Surfactant-Applikation und das Auftreten intraventrikulärer Blutungen zeigten sich keine Unterschiede (Dekker et al., 2017).

Dies lässt schlussfolgern, dass sich die frühe Gabe von Koffein, wie sie auch die Tiere in unserer Studie erhielten, insgesamt positiv auf den klinischen Verlauf der Frühgeborenen auszuwirken scheint und diese in ausgewählten Fällen auch schon von einer ersten Gabe zur postnatalen Adaptation im Kreißsaal profitieren könnten. Die in einigen Studien vor allem bezüglich der Dosierung beschriebenen unerwünschten Auswirkungen einer Koffeintherapie, wie das erhöhte Blutungsrisiko (McPherson et al., 2015) und ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil (Chavez Valdez et al., 2011) führen dennoch zu Diskussionen zwischen Experten und Unterschieden in der Koffeinanwendung zwischen Perinatalzentren (Chavez and Bancalari, 2022). Darüber hinaus lässt sich die Frage stellen, ob alle Frühgeborenen derart gleichermaßen von der Koffeintherapie profitieren, dass eine einheitliche Indikation für Therapiebeginn und Dosierung gestellt werden kann oder ob dies je nach individuellem Verlauf und Risikoprofil erfolgen sollte.

Ein Ansatz, um die Anwendung von Koffein noch sicherer zu machen und unerwünschte Effekte durch zu hohe Plasmaspiegel zu vermindern, könnte ein therapeutisches

Arzneimittel-Monitoring durch Spiegelkontrollen sein (Moschino et al., 2020). Eine Besonderheit der Koffeintherapie ist die hohe Bioverfügbarkeit, unabhängig der Darreichungsform und der schnelle Anstieg der Plasmakonzentration innerhalb der ersten Stunde (Moschino et al., 2020). Die Halbwertszeit hingegen variiert stark und beträgt bei Frühgeborenen, die das Koffein noch fast ausschließlich renal ausscheiden, je nach Gestationsalter und Komorbiditäten meist mehrere Tage (Moschino et al., 2020). Dennoch hat eine Studie gezeigt, dass bei Frühgeborenen <32 SSW und sogar bei veränderter Nieren- oder Leberfunktion der Koffein-Plasmaspiegel nur sehr selten außerhalb des therapeutischen Bereiches lag und deshalb prinzipiell von der Notwendigkeit regelmäßiger Spiegelbestimmungen abgewichen wird (Natarajan et al., 2007). Besonders bei kritisch kranken Patienten, Patienten mit einer Nierenerkrankung oder bei fehlendem klinischem Ansprechen könnte dennoch eine Spiegelbestimmung sinnvoll sein, um sicherzustellen, dass der Koffeinspiegel im therapeutischen Bereich liegt. Hierbei ist ein großer Vorteil, dass dies nicht nur im Plasma, sondern eine Spiegelbestimmung auch nicht-invasiv im Urin oder Speichel möglich ist (Moschino et al., 2020).

Ein Aspekt, der hier nicht im Fokus der Untersuchungen stand, sollte dennoch kurz in die Diskussion mit eingehen, und dies ist Sauerstoff als essentieller Faktor. Bei der intrauterinen zur extrauterinen Transition sind die dafür notwendigen physiologischen Prozesse sehr gut gesteuert, wobei Sauerstoff, als ein starker Vasodilatator, zur Erweiterung der Lungenarteriengefäße beiträgt und so den pulmonalen Gefäßwiderstand verringert. Ein wichtiger Prozess, da der erhöhte Sauerstoffpartialdruck den Verschluss des PDA bedingt, als auch die daraus resultierende erhöhte Vorlast der Ventrikel mechanisch zum Verschluss des *Foramen ovale* bedingt, assoziiert mit dem Wechsel des Neugeborenen-Kreislaufes von seriell auf parallel (Gao and Raj, 2010). Respiratorische Instabilitäten, wie die AOP oder die perinatale Asphyxie, werden bei Frühgeborenen bedingt durch die generelle Unreife des Atemantriebs, fehlende Surfactant-Produktion und die unreife Lungenzytoarchitektur. Für eine gute postnatale Stabilisierung benötigen die zu früh geborenen Kinder häufig Atemunterstützung, häufig mit einer Sauerstoffsupplementierung (Vento and Lista, 2015). Dies, und in Kombination mit einem unzureichend entwickelten antioxidativen Enzymsystems vor allem bei sehr kleinen Frühgeborenen, verdeutlicht die Unvermeidbarkeit von oxidativem Stress in dieser postnatalen Phase. Das wichtige Thema der optimalen Sauerstoffsättigung wird immer wieder diskutiert (Escrig-Fernández et al., 2023) und in den Leitlinien nach

aktueller Datenlage angepasst (Wyckoff et al., 2020, Madar et al., 2021). Das postnatale murine Hyperoxie-Schädigungsmodell basiert auf einer Exposition von 80% Sauerstoff. Diese inspiratorische Sauerstoffkonzentration wird für Sauerstofftoxizitäts-basierte experimentelle Modelle zum Erreichen eines adäquaten Sauerstoffpartialdruckes im Nagetier benötigt (Schmitz et al., 2011) und bildet sehr gut die oxidative Stresssituation früh- und neugeborener Kinder ab (Deulofeut et al., 2007, Castillo et al., 2008).

Betrachtet man abschließend die Komplexität der physiologischen Faktoren und der Aspekte der postnatalen Intensivbetreuung Frühgeborener, die mit unvermeidlichem oxidativem Stress als auch mit der Unerlässlichkeit notwendiger medikamentöser Therapien einhergehen, sind Beeinträchtigungen auf die Kleinhirnentwicklung, wie übergeordnet entwicklungsneurologische Defizite, fast unvermeidlich. Hinsichtlich einer veränderten zerebellaren Neurogenese kann dies kognitiv-motorische, sozial-emotionale und sprachliche Defizite zur Folge haben. Ein abgestimmtes Zusammenspiel in der Kommunikation zu Proliferation, Differenzierung und Reifung zwischen Neuronen und Gliazellen ist für das Funktionieren des Gehirns essentiell und vor allem während der frühen Neurogenese wesentlich. Der Beeinträchtigung der untersuchten zerebellaren Zellpopulationen durch postnatalen oxidativen Stress konnte durch Koffein effektiv entgegengewirkt werden, wobei die ineffizientere Koffeinwirkung auf die durch Hyperoxie geschädigten GC-relevanten Transkripte weiter untersucht werden sollte, da Koffein selbst keine Auswirkungen auf die Purkinjezellen und GPC hatte. Da Koffein bisher sowohl im klinischen Umfeld von Frühgeborenen als auch in *vitro*- und *in vivo*-Studien gute therapeutische Wirkungen gezeigt hat, überwiegen die schützenden Eigenschaften, obwohl weitere Studien über Koffein im Hinblick auf mögliche pleiotrope Wirkungen notwendig erscheinen. Um jedoch ein umfassendes pharmakologisches Profil zu erstellen und die kurz- und langfristigen Auswirkungen der Koffeinthherapie besser einschätzen zu können, sind viele Daten noch ausstehend und es müssen weitere tierexperimentelle wie auch klinische Arbeiten durchgeführt werden.

5 Schlussfolgerung

Frühgeburtlichkeit führt zu einer nachhaltigen Beeinträchtigung der Kleinhirnentwicklung. Oxidativer Stress, dem alle Frühgeborenen postnatal ausgesetzt sind, wirkt sich negativ auf die Entwicklung der Purkinjezellen sowie die Proliferation, Migration und Differenzierung der granulären Vorläuferzellen aus. Zahlreiche Studien konnten bereits die antioxidativen Eigenschaften von Koffein auf die noch unreifen Organsysteme bei Frühgeborenen nachweisen. Ergänzend dazu zeigte unsere tierexperimentelle Studie protektive Effekte von Koffein auf die Neurogenese im sich entwickelnden Kleinhirn. Die Hyperoxie-induzierte Beeinträchtigung der Purkinjezellen konnte durch Koffein erfolgreich abgewendet werden. Die Expression relevanter Marker für die Entwicklung der granulären Vorläuferzellen wurde hingegen meistens erst nach Erholung in einer normoxischen Umgebung durch eine gleichzeitige Koffeintherapie moduliert. Insgesamt wirkt sich Koffein kurz- wie auch langfristig positiv auf die Entwicklung der Frühgeborenen aus und sollte weiter Anwendung finden, wenn auch weitere Studien ausstehend sind, um das Arzneimittelprofil und die Auswirkungen von Koffein auf klinischer wie auch molekularer Ebene weiter zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

- ABREU, R. V., SILVA-OLIVEIRA, E. M., MORAES, M. F., PEREIRA, G. S. & MORAES-SANTOS, T. 2011. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacol Biochem Behav*, 99, 659-664.
- ADAMASZEK, M., D'AGATA, F., FERRUCCI, R., HABAS, C., KEULEN, S., KIRKBY, K. C., LEGGIO, M., MARIËN, P., MOLINARI, M., MOULTON, E., ORSI, L., VAN OVERWALLE, F., PAPADELIS, C., PRIORI, A., SACCHETTI, B., SCHUTTER, D. J., STYLIADIS, C. & VERHOEVEN, J. 2017. Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. *The Cerebellum*, 16, 552-576.
- AHLFELD, J., FILSER, S., SCHMIDT, F., WEFERS, A. K., MERK, D. J., GLAß, R., HERMS, J. & SCHÜLLER, U. 2017. Neurogenesis from Sox2 expressing cells in the adult cerebellar cortex. *Sci Rep*, 7, 6137.
- ALVA, R., MIRZA, M., BAITON, A., LAZURAN, L., SAMOKYSH, L., BOBINSKI, A., COWAN, C., JAIMON, A., OBIORU, D., AL MAKHOUL, T. & STUART, J. A. 2023. Oxygen toxicity: cellular mechanisms in normobaric hyperoxia. *Cell Biol Toxicol*, 39, 111-143.
- ARANDA, J. V. & BEHARRY, K. D. 2020. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism of caffeine in newborns. *Semin Fetal Neonatal Med*, 25, 101183.
- ASIKAINEN, T. M. & WHITE, C. W. 2004. Pulmonary antioxidant defenses in the preterm newborn with respiratory distress and bronchopulmonary dysplasia in evolution: implications for antioxidant therapy. *Antioxid Redox Signal*, 6, 155-167.
- BADSHAH, H., IKRAM, M., ALI, W., AHMAD, S., HAHM, J. R. & KIM, M. O. 2019. Caffeine May Abrogate LPS-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation by Regulating Nrf2/TLR4 in Adult Mouse Brains. *Biomolecules*, 9, 719.
- BANDEIRA, F., LENT, R. & HERCULANO-HOUZEL, S. 2009. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14108-14113.
- BASTIANELLI, E. 2003. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum*, 2, 242-262.
- BENITO-MUÑOZ, M., MATUTE, C. & CAVALIERE, F. 2016. Adenosine A1 receptor inhibits postnatal neurogenesis and sustains astroglialogenesis from the subventricular zone. *Glia*, 64, 1465-1478.
- BJØRKLUND, G., MEGUID, N. A., EL-BANA, M. A., TINKOV, A. A., SAAD, K., DADAR, M., HEMIMI, M., SKALNY, A. V., HOSNEDLOVÁ, B., KIZEK, R., OSREDKAR, J., URBINA, M. A., FABJAN, T., EL-HOUFEY, A. A., KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA, J., GAȚAREK, P. & CHIRUMBOLO, S. 2020. Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. *Mol Neurobiol*, 57, 2314-2332.
- BORGHESANI, P. R., PEYRIN, J. M., KLEIN, R., RUBIN, J., CARTER, A. R., SCHWARTZ, P. M., LUSTER, A., CORFAS, G. & SEGAL, R. A. 2002. BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development*, 129, 1435-1442.
- BOUYSSI-KOBAR, M., DU PLESSIS, A. J., MCCARTER, R., BROSSARD-RACINE, M., MURNICK, J., TINKLEMAN, L., ROBERTSON, R. L. & LIMPEROPOULOS, C. 2016. Third Trimester Brain Growth in Preterm Infants Compared With In Utero Healthy Fetuses. *Pediatrics*, 138, e20161640.
- BROSSARD-RACINE, M., DU PLESSIS, A. J. & LIMPEROPOULOS, C. 2015. Developmental cerebellar cognitive affective syndrome in ex-preterm survivors following cerebellar injury. *Cerebellum*, 14, 151-164.
- BRUSCHETTINI, M., BRATTSTRÖM, P., RUSSO, C., ONLAND, W., DAVIS, P. G. & SOLL, R. 2023. Caffeine dosing regimens in preterm infants with or at risk for apnea of prematurity. *Cochrane Database Syst Rev*, 4, Cd013873.

- BRUZZESE, L., ROSTAIN, J. C., NÉE, L., CONDO, J., MOTTOLA, G., ADJRIOU, N., MERCIER, L., BERGE-LEFRANC, J. L., FROMONOT, J., KIPSON, N., LUCCIANO, M., DURAND-GORDE, J. M., JAMMES, Y., GUIEU, R., RUF, J. & FENOUILLET, E. 2015. Effect of hyperoxic and hyperbaric conditions on the adenosinergic pathway and CD26 expression in rat. *J Appl Physiol* (1985), 119, 140-147.
- BYLUND, M., ANDERSSON, E., NOVITCH, B. G. & MUHR, J. 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci*, 6, 1162-1168.
- CAMUSO, S., LA ROSA, P., FIORENZA, M. T. & CANTERINI, S. 2022. Pleiotropic effects of BDNF on the cerebellum and hippocampus: Implications for neurodevelopmental disorders. *Neurobiol Dis*, 163, 105606.
- CASTILLO, A., SOLA, A., BAQUERO, H., NEIRA, F., ALVIS, R., DEULOFEUT, R. & CRITZ, A. 2008. 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*, 121, 882-889.
- CERRATO, V., MERCURIO, S., LETO, K., FUCA, E., HOXHA, E., BOTTES, S., PAGIN, M., MILANESE, M., NGAN, C.-Y., CONCINA, G., OTTOLENGHI, S., WEI, C.-L., BONANNO, G., PAVESI, G., TEMPIA, F., BUFFO, A. & NICOLIS, S. K. 2018. Sox2 conditional mutation in mouse causes ataxic symptoms, cerebellar vermis hypoplasia, and postnatal defects of Bergmann glia. *Glia*, 66, 1929-1946.
- CHADDERTON, P., MARGRIE, T. W. & HÄUSSER, M. 2004. Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature*, 428, 856-860.
- CHAVEZ, L. & BANCALARI, E. 2022. Caffeine: Some of the Evidence behind Its Use and Abuse in the Preterm Infant. *Neonatology*, 119, 428-432.
- CHAVEZ VALDEZ, R., AHLAWAT, R., WILLS-KARP, M., NATHAN, A., EZELL, T. & GAUDA, E. B. 2011. Correlation between serum caffeine levels and changes in cytokine profile in a cohort of preterm infants. *J Pediatr*, 158, 57-64.
- CHEN, J. F., ZHANG, S., ZHOU, R., LIN, Z., CAI, X., LIN, J., HUO, Y. & LIU, X. 2017. Adenosine receptors and caffeine in retinopathy of prematurity. *Mol Aspects Med*, 55, 118-125.
- CHEN, S., WU, Q., ZHONG, D., LI, C. & DU, L. 2020. Caffeine prevents hyperoxia-induced lung injury in neonatal mice through NLRP3 inflammasome and NF- κ B pathway. *Respir Res*, 21, 140.
- CHIZHIKOV, V. V., LINDGREN, A. G., MISHIMA, Y., ROBERTS, R. W., ALDINGER, K. A., MIESEGAES, G. R., CURRLE, D. S., MONUKI, E. S. & MILLEN, K. J. 2010. Lmx1a regulates fates and location of cells originating from the cerebellar rhombic lip and telencephalic cortical hem. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 10725-10730.
- CIRUELA, F., CASADO, V., RODRIGUES, R. J., LUJAN, R., BURGUENO, J., CANALS, M., BORYCZ, J., REBOLA, N., GOLDBERG, S. R., MALLOL, J., CORTES, A., CANELA, E. I., LOPEZ-GIMENEZ, J. F., MILLIGAN, G., LLUIS, C., CUNHA, R. A., FERRE, S. & FRANCO, R. 2006. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci*, 26, 2080-2087.
- CLANCY, B., FINLAY, B. L., DARLINGTON, R. B. & ANAND, K. J. 2007. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*, 28, 931-937.
- CLOUCHOUX, C., GUIZARD, N., EVANS, A. C., DU PLESSIS, A. J. & LIMPEROPOULOS, C. 2012. Normative fetal brain growth by quantitative in vivo magnetic resonance imaging. *Am J Obstet Gynecol*, 206, 173.e171-178.
- CONSALEZ, G. G., GOLDOWITZ, D., CASONI, F. & HAWKES, R. 2020. Origins, Development, and Compartmentation of the Granule Cells of the Cerebellum. *Front Neural Circuits*, 14, 611841.
- CONSALEZ, G. G., GOLDOWITZ, D., CASONI, F. & HAWKES, R. 2021. Origins, Development, and Compartmentation of the Granule Cells of the Cerebellum. *Frontiers in Neural Circuits*, 14.

- CORRALES, J. D., BLAESS, S., MAHONEY, E. M. & JOYNER, A. L. 2006. The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development*, 133, 1811-1821.
- COX, C., HASHEM, N. G., TEBBS, J., BOOKSTAVAR, P. B. & ISKERSKY, V. 2015. Evaluation of caffeine and the development of necrotizing enterocolitis. *J Neonatal Perinatal Med*, 8, 339-347.
- CRUMP, C., SUNDQUIST, J., WINKLEBY, M. A. & SUNDQUIST, K. 2019. Gestational age at birth and mortality from infancy into mid-adulthood: a national cohort study. *Lancet Child Adolesc Health*, 3, 408-417.
- DE ALMEIDA, V. O., PEREIRA, R. A., AMANTÉA, S. L., RHODEN, C. R. & COLVERO, M. O. 2022. Neonatal diseases and oxidative stress in premature infants: an integrative review. *J Pediatr (Rio J)*, 98, 455-462.
- DE LUCA, A., CERRATO, V., FUCÀ, E., PARMIGIANI, E., BUFFO, A. & LETO, K. 2016. Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell Mol Life Sci*, 73, 291-303.
- DEKKER, J., HOOPER, S. B., VAN VONDEREN, J. J., WITLOX, R., LOPRIORE, E. & TE PAS, A. B. 2017. Caffeine to improve breathing effort of preterm infants at birth: a randomized controlled trial. *Pediatr Res*, 82, 290-296.
- DEULOFEUT, R., DUDELL, G. & SOLA, A. 2007. Treatment-by-gender effect when aiming to avoid hyperoxia in preterm infants in the NICU. *Acta Paediatr*, 96, 990-994.
- DI FIORE, J. M. & VENTO, M. 2019. Intermittent hypoxemia and oxidative stress in preterm infants. *Respir Physiol Neurobiol*, 266, 121-129.
- DOBBING, J. & SANDS, J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3, 79-83.
- DOBSON, N. R., PATEL, R. M., SMITH, P. B., KUEHN, D. R., CLARK, J., VYAS-READ, S., HERRING, A., LAUGHON, M. M., CARLTON, D. & HUNT, C. E. 2014. Trends in caffeine use and association between clinical outcomes and timing of therapy in very low birth weight infants. *J Pediatr*, 164, 992-998.e993.
- DOYLE, L. W., SPITTLE, A., ANDERSON, P. J. & CHEONG, J. L. Y. 2021. School-aged neurodevelopmental outcomes for children born extremely preterm. *Arch Dis Child*, 106, 834-838.
- ELMOWAFI, M., MOHSEN, N., NOUR, I. & NASEF, N. 2022. Prophylactic versus therapeutic caffeine for apnea of prematurity: a randomized controlled trial. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 35, 6053-6061.
- ENDESFELDER, S., STRAUß, E., BENDIX, I., SCHMITZ, T. & BÜHRER, C. 2020. Prevention of Oxygen-Induced Inflammatory Lung Injury by Caffeine in Neonatal Rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 3840124.
- ENDESFELDER, S., STRAUß, E., SCHEUER, T., SCHMITZ, T. & BÜHRER, C. 2019. Antioxidative effects of caffeine in a hyperoxia-based rat model of bronchopulmonary dysplasia. *Respir Res*, 20, 88.
- ENDESFELDER, S., WEICHEL, U., STRAUSS, E., SCHLOR, A., SIFRINGER, M., SCHEUER, T., BUHRER, C. & SCHMITZ, T. 2017. Neuroprotection by Caffeine in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury. *Int J Mol Sci*, 18, 187.
- ENDESFELDER, S., ZAAK, I., WEICHEL, U., BUHRER, C. & SCHMITZ, T. 2014. Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. *Free Radic Biol Med*, 67, 221-234.
- ESCRIG-FERNÁNDEZ, R., ZEBALLOS-SARRATO, G., GORMAZ-MORENO, M., AVILA-ALVAREZ, A., TOLEDO-PARREÑO, J. D. & VENTO, M. 2023. The Respiratory Management of the Extreme Preterm in the Delivery Room. *Children (Basel)*, 10.
- FALSAPERLA, R., LOMBARDO, F., FILOSCO, F., ROMANO, C., SAPORITO, M. A. N., PUGLISI, F., PIRO, E., RUGGIERI, M. & PAVONE, P. 2020. Oxidative Stress in Preterm Infants: Overview of Current Evidence and Future Prospects. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13, 145.

- FATEMI, S. H., ALDINGER, K. A., ASHWOOD, P., BAUMAN, M. L., BLAHA, C. D., BLATT, G. J., CHAUHAN, A., CHAUHAN, V., DAGER, S. R., DICKSON, P. E., ESTES, A. M., GOLDOWITZ, D., HECK, D. H., KEMPER, T. L., KING, B. H., MARTIN, L. A., MILLEN, K. J., MITTLEMAN, G., MOSCONI, M. W., PERSICO, A. M., SWEENEY, J. A., WEBB, S. J. & WELSH, J. P. 2012. Consensus Paper: Pathological Role of the Cerebellum in Autism. *The Cerebellum*, 11, 777-807.
- FENG, W., KAWAUCHI, D., KÖRKELE-QU, H., DENG, H., SERGER, E., SIEBER, L., LIEBERMAN, J. A., JIMENO-GONZÁLEZ, S., LAMBO, S., HANNA, B. S., HARIM, Y., JANSEN, M., NEUERBURG, A., FRIESEN, O., ZUCKERMANN, M., RAJENDRAN, V., GRONYCH, J., AYRAULT, O., KORSHUNOV, A., JONES, D. T., KOOL, M., NORTHCOTT, P. A., LICHTER, P., CORTÉS-LEDESMA, F., PFISTER, S. M. & LIU, H. K. 2017. Chd7 is indispensable for mammalian brain development through activation of a neuronal differentiation programme. *Nat Commun*, 8, 14758.
- FIRMAN, B., MOLNAR, A. & GRAY, P. H. 2019. Early high-dose caffeine citrate for extremely preterm infants: Neonatal and neurodevelopmental outcomes. *J Paediatr Child Health*, 55, 1451-1457.
- FREDHOLM, B. B. 1995. Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol*, 76, 93-101.
- GALAS, L., BÉNARD, M., LEBON, A., KOMURO, Y., SCHAPMAN, D., VAUDRY, H., VAUDRY, D. & KOMURO, H. 2017. Postnatal Migration of Cerebellar Interneurons. *Brain Sci*, 7, 62.
- GAO, Y. & RAJ, J. U. 2010. Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn. *Physiol Rev*, 90, 1291-1335.
- GAYTAN, S. P. & PASARO, R. 2012. Neonatal caffeine treatment up-regulates adenosine receptors in brainstem and hypothalamic cardio-respiratory related nuclei of rat pups. *Exp Neurol*, 237, 247-259.
- GISZAS, V., STRAUß, E., BÜHRER, C. & ENDESFELDER, S. 2022. The Conflicting Role of Caffeine Supplementation on Hyperoxia-Induced Injury on the Cerebellar Granular Cell Neurogenesis of Newborn Rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 5769784.
- GLASS, H. C., COSTARINO, A. T., STAYER, S. A., BRETT, C. M., CLADIS, F. & DAVIS, P. J. 2015. Outcomes for extremely premature infants. *Anesth Analg*, 120, 1337-1351.
- GOUNARIS, A. K., GRIVEA, I. N., BALTOGIANNI, M., GOUNARI, E., ANTONOGEORGOS, G., KOKORI, F., PANAGIOTOUNAKOU, P., THEODORAKI, M., KONSTANTINIDI, A. & SOKOU, R. 2020. Caffeine and Gastric Emptying Time in Very Preterm Neonates. *J Clin Med*, 9, 1676.
- GRAHAM, V., KHUDYAKOV, J., ELLIS, P. & PEVNY, L. 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39, 749-765.
- GUSEL'NIKOVA, V. V. & KORZHEVSKIY, D. E. 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7, 42-47.
- HALDIPUR, P., SIVAPRAKASAM, I., PERIASAMY, V., GOVINDAN, S. & MANI, S. 2015. Asymmetric cell division of granule neuron progenitors in the external granule layer of the mouse cerebellum. *Biol Open*, 4, 865-872.
- HAMI, J., VAF AEI-NEZHAD, S., IVAR, G., SADEGHI, A., GHAEMI, K., MOSTAFAVIZADEH, M. & HOSSEINI, M. 2016. Altered expression and localization of synaptophysin in developing cerebellar cortex of neonatal rats due to maternal diabetes mellitus. *Metab Brain Dis*, 31, 1369-1380.
- HAMI, J., VAF AEI-NEZHAD, S., SADEGHI, A., GHAEMI, K., TAHERI, M. H., FER EIDOUNI, M., IVAR, G. & HOSSEINI, M. 2017. Synaptogenesis in the Cerebellum of Offspring Born to Diabetic Mothers. *J Pediatr Neurosci*, 12, 215-221.
- HAN-MENZ, C., WHITELEY, G., EVANS, R., RAZAK, A. & MALHOTRA, A. 2023. Systemic postnatal corticosteroids and magnetic resonance imaging measurements of corpus callosum and cerebellum of extremely preterm infants. *J Paediatr Child Health*, 59, 282-287.

- HAYES, W. P., YANGCO, N., CHIN, H., MILL, J. F., PU, L. P., TAIRA, M., DAWID, I. B. & GALLO, V. 2001. Expression and regulation of the LIM-class homeobox gene *rlim-1* in neuronal progenitors of the rat cerebellum. *J Neurosci Res*, 63, 237-251.
- HEISE, J., SCHMITZ, T., BÜHRER, C. & ENDESFELDER, S. 2023. Protective Effects of Early Caffeine Administration in Hyperoxia-Induced Neurotoxicity in the Juvenile Rat. *Antioxidants (Basel)*, 12.
- HENDERSON-SMART, D. J. & DE PAOLI, A. G. 2010. Prophylactic methylxanthine for prevention of apnoea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010, Cd000432.
- HENDERSON-SMART, D. J. & STEER, P. A. 2010. Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd000273.
- HERLENIUS, E., LAGERCRANTZ, H. & YAMAMOTO, Y. 1997. Adenosine modulates inspiratory neurons and the respiratory pattern in the brainstem of neonatal rats. *Pediatr Res*, 42, 46-53.
- HIRANO, T. 2018. Purkinje Neurons: Development, Morphology, and Function. *Cerebellum*, 17, 699-700.
- HOSNY, E. N., SAWIE, H. G., ELHADIDY, M. E. & KHADRAWY, Y. A. 2019. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory efficacy of caffeine in rat model of neurotoxicity. *Nutr Neurosci*, 22, 789-796.
- JANITSCHKE, D., LAUER, A. A., BACHMANN, C. M., GRIMM, H. S., HARTMANN, T. & GRIMM, M. O. W. 2021. Methylxanthines and Neurodegenerative Diseases: An Update. *Nutrients*, 13, 803.
- JARVIS, M. F., JACKSON, R. H. & WILLIAMS, M. 1989. Autoradiographic characterization of high-affinity adenosine A2 receptors in the rat brain. *Brain Res*, 484, 111-118.
- JÓNSSON, Z. O. & HÜBSCHER, U. 1997. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays*, 19, 967-975.
- JUNG, S. H., LEE, S. T., CHU, K., PARK, J. E., LEE, S. U., HAN, T. R. & KIM, M. 2009. Cell proliferation and synaptogenesis in the cerebellum after focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 1284, 180-190.
- KANEL, D., VANES, L. D., PECHEVA, D., HADAYA, L., FALCONER, S., COUNSELL, S. J., EDWARDS, D. A. & NOSARTI, C. 2021. Neonatal White Matter Microstructure and Emotional Development during the Preschool Years in Children Who Were Born Very Preterm. *eNeuro*, 8, ENEURO.0546-0520.2021.
- KASALA, S., BRIYAL, S., PRAZAD, P., RANJAN, A. K., STEFANOV, G., DONOVAN, R. & GULATI, A. 2020. Exposure to Morphine and Caffeine Induces Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in a Neonatal Rat Brain. *Front Pediatr*, 8, 593.
- KATHERIA, A. C., SAUBERAN, J. B., AKOTIA, D., RICH, W., DURHAM, J. & FINER, N. N. 2015. A Pilot Randomized Controlled Trial of Early versus Routine Caffeine in Extremely Premature Infants. *Am J Perinatol*, 32, 879-886.
- KHAN, A., IKRAM, M., MUHAMMAD, T., PARK, J. & KIM, M. O. 2019. Caffeine Modulates Cadmium-Induced Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Cognitive Impairments by Regulating Nrf-2/HO-1 In Vivo and In Vitro. *J Clin Med*, 8, 680.
- KHANDRE, V., POTDAR, J. & KEERTI, A. 2022. Preterm Birth: An Overview. *Cureus*, 14, e33006.
- KOLEVZON, A., GROSS, R. & REICHENBERG, A. 2007. Prenatal and perinatal risk factors for autism: a review and integration of findings. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 161, 326-333.
- KOMURO, Y., FAHRION, J. K., FOOTE, K. D., FENNER, K. B., KUMADA, T., OHNO, N. & KOMURO, H. 2013. Granule Cell Migration and Differentiation. In: MANTO, M., SCHMAHMANN, J. D., ROSSI, F., GRUOL, D. L. & KOIBUCHI, N. (eds.) *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- KRAAIJENGA, J. V., HUTTEN, G. J., DE JONGH, F. H. & VAN KAAM, A. H. 2015. The Effect of Caffeine on Diaphragmatic Activity and Tidal Volume in Preterm Infants. *J Pediatr*, 167, 70-75.

- KUMAR, V. H. S. 2022. Cardiovascular Morbidities in Adults Born Preterm: Getting to the Heart of the Matter! *Children (Basel)*, 9, 1843.
- KUMAR, V. H. S. & LIPSHULTZ, S. E. 2019. Caffeine and Clinical Outcomes in Premature Neonates. *Children (Basel)*, 6, 118.
- LALERT, L., JI-AU, W., SRIKAM, S., CHOTIPINIT, T., SANGUANRUNGSIRIKUL, S., SRIKIATKHACHORN, A. & MANEESRI-LE GRAND, S. 2020. Alterations in Synaptic Plasticity and Oxidative Stress Following Long-Term Paracetamol Treatment in Rat Brain. *Neurotox Res*, 37, 455-468.
- LAURE-KAMIONOWSKA, M. & MAŚLIŃSKA, D. 2009. Calbindin positive Purkinje cells in the pathology of human cerebellum occurring at the time of its development. *Folia Neuropathol*, 47, 300-305.
- LAVADO, A., LAGUTIN, O. V., CHOW, L. M., BAKER, S. J. & OLIVER, G. 2010. Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biol*, 8, e1000460.
- LAVADO, A. & OLIVER, G. 2007. Prox1 expression patterns in the developing and adult murine brain. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 236, 518-524.
- LAWN, J. E., OHUMA, E. O., BRADLEY, E., IDUETA, L. S., HAZEL, E., OKWARAJI, Y. B., ERCHICK, D. J., YARGAWA, J., KATZ, J., LEE, A. C. C., DIAZ, M., SALASIBEW, M., REQUEJO, J., HAYASHI, C., MOLLER, A. B., BORGHINI, E., BLACK, R. E. & BLENCOWE, H. 2023. Small babies, big risks: global estimates of prevalence and mortality for vulnerable newborns to accelerate change and improve counting. *Lancet*, 401, 1707-1719.
- LEMBO, C., BUONOCORE, G. & PERRONE, S. 2021. Oxidative Stress in Preterm Newborns. *Antioxidants (Basel)*, 10, 1672.
- LETO, K., ARANCILLO, M., BECKER, E. B., BUFFO, A., CHIANG, C., DING, B., DOBYNS, W. B., DUSART, I., HALDIPUR, P., HATTEN, M. E., HOSHINO, M., JOYNER, A. L., KANO, M., KILPATRICK, D. L., KOIBUCHI, N., MARINO, S., MARTINEZ, S., MILLEN, K. J., MILLNER, T. O., MIYATA, T., PARMIGIANI, E., SCHILLING, K., SEKERKOVA, G., SILLITOE, R. V., SOTELO, C., UESAKA, N., WEFERS, A., WINGATE, R. J. & HAWKES, R. 2016. Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum*, 15, 789-828.
- LIMPEROPOULOS, C., CHILINGARYAN, G., SULLIVAN, N., GUIZARD, N., ROBERTSON, R. L. & DU PLESSIS, A. J. 2014. Injury to the premature cerebellum: outcome is related to remote cortical development. *Cereb Cortex*, 24, 728-736.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- LODHA, A., ENTZ, R., SYNNESE, A., CREIGHTON, D., YUSUF, K., LAPOINTE, A., YANG, J. & SHAH, P. S. 2019. Early Caffeine Administration and Neurodevelopmental Outcomes in Preterm Infants. *Pediatrics*, 143.
- LODHA, A., SESHIA, M., MCMILLAN, D. D., BARRINGTON, K., YANG, J., LEE, S. K. & SHAH, P. S. 2015. Association of early caffeine administration and neonatal outcomes in very preterm neonates. *JAMA Pediatr*, 169, 33-38.
- LORDKIPANIDZE, T. & DUNAEVSKY, A. 2005. Purkinje cell dendrites grow in alignment with Bergmann glia. *Glia*, 51, 229-234.
- LV, N., WANG, Y., ZHAO, M., DONG, L. & WEI, H. 2021. The Role of PAX2 in Neurodevelopment and Disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 17, 3559-3567.
- MA, Q. 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 401-426.
- MADAR, J., ROEHR, C. C., AINSWORTH, S., ERSDAL, H., MORLEY, C., RÜDIGER, M., SKÅRE, C., SZCZAPA, T., TE PAS, A., TREVISANUTO, D., URLESBERGER, B., WILKINSON, D. & WYLLIE, J. P. 2021. European Resuscitation Council Guidelines 2021:

- Newborn resuscitation and support of transition of infants at birth. *Resuscitation*, 161, 291-326.
- MANDALOS, N. P., KARAMPELAS, I., SARIDAKI, M., MCKAY, R. D. G., COHEN, M. L. & REMBOUTSIKA, E. 2018. A Role for Sox2 in the Adult Cerebellum. *Journal of stem cell research & therapy*, 8.
- MCPHERSON, C., NEIL, J. J., TJOENG, T. H., PINEDA, R. & INDER, T. E. 2015. A pilot randomized trial of high-dose caffeine therapy in preterm infants. *Pediatr Res*, 78, 198-204.
- MELINDA, M. & GABRIELA, Z. 2019. Antioxidants at Newborns. In: EMAD, S. (ed.) *Antioxidants*. Rijeka: IntechOpen.
- MILLAR, D. & SCHMIDT, B. 2004. Controversies surrounding xanthine therapy. *Semin Neonatol*, 9, 239-244.
- MORSING, E., LUNDGREN, P., HÅRD, A. L., RAKOW, A., HELLSTRÖM-WESTAS, L., JACOBSON, L., JOHNSON, M., NILSSON, S., SMITH, L. E. H., SÄVMAN, K. & HELLSTRÖM, A. 2022. Neurodevelopmental disorders and somatic diagnoses in a national cohort of children born before 24 weeks of gestation. *Acta Paediatr*, 111, 1167-1175.
- MORTON, S. U. & SMITH, V. C. 2016. Treatment options for apnoea of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 101, F352-356.
- MOSCHINO, L., ZIVANOVIC, S., HARTLEY, C., TREVISANUTO, D., BARALDI, E. & ROEHR, C. C. 2020. Caffeine in preterm infants: where are we in 2020? *ERJ Open Res*, 6, 00330-02019.
- NATARAJAN, G., BOTICA, M. L., THOMAS, R. & ARANDA, J. V. 2007. Therapeutic drug monitoring for caffeine in preterm neonates: an unnecessary exercise? *Pediatrics*, 119, 936-940.
- OBST, S., HERZ, J., ALEJANDRE ALCAZAR, M. A., ENDESFELDER, S., MÖBIUS, M. A., RÜDIGER, M., FELDERHOFF-MÜSER, U. & BENDIX, I. 2022. Perinatal Hyperoxia and Developmental Consequences on the Lung-Brain Axis. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 5784146.
- PANFOLI, I., CANDIANO, G., MALOVA, M., DE ANGELIS, L., CARDIELLO, V., BUONOCORE, G. & RAMENGI, L. A. 2018. Oxidative Stress as a Primary Risk Factor for Brain Damage in Preterm Newborns. *Frontiers in Pediatrics*, 6.
- PARIKKA, V., BECK, J., ZHAI, Q., LEPPÄSALO, J., LEHTONEN, L. & SOUKKA, H. 2015. The effect of caffeine citrate on neural breathing pattern in preterm infants. *Early Hum Dev*, 91, 565-568.
- PARK, H. W., LIM, G., CHUNG, S. H., CHUNG, S., KIM, K. S. & KIM, S. N. 2015. Early Caffeine Use in Very Low Birth Weight Infants and Neonatal Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Korean Med Sci*, 30, 1828-1835.
- PEARLMAN, S. A. 2022. Advancements in neonatology through quality improvement. *J Perinatol*, 42, 1277-1282.
- PERGOLIZZI, J. V., Jr., FORT, P., MILLER, T. L., LEQUANG, J. A. & RAFFA, R. B. 2022. The limited management options for apnoea of prematurity. *J Clin Pharm Ther*, 47, 396-401.
- PERRONE, S., BELLINI, C. V., NEGRO, S., LONGINI, M., SANTACROCE, A., TATARANNO, M. L., BAZZINI, F., BELVISI, E., PICARDI, A., PROIETTI, F., IANTORNO, L. & BUONOCORE, G. 2017. Oxidative Stress as a Physiological Pain Response in Full-Term Newborns. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 3759287.
- PERRONE, S., MANTI, S., PETROLINI, C., DELL'ORTO, V. G., BOSCARINO, G., CECCOTTI, C., BERTINI, M., BUONOCORE, G., ESPOSITO, S. M. R. & GITTO, E. 2023. Oxygen for the Newborn: Friend or Foe? *Children (Basel)*, 10, 579.
- PIEPER, A., RUDOLPH, S., WIESER, G. L., GOTZE, T., MIESSNER, H., YONEMASU, T., YAN, K., TZVETANOVA, I., CASTILLO, B. D., BODE, U., BORMUTH, I., WADICHE, J. I.,

- SCHWAB, M. H. & GOEBBELS, S. 2019. NeuroD2 controls inhibitory circuit formation in the molecular layer of the cerebellum. *Scientific reports*, 9, 1448.
- POTTER, M., ROSENKRANTZ, T. & FITCH, R. H. 2018. Behavioral and neuroanatomical outcomes in a rat model of preterm hypoxic-ischemic brain injury: Effects of caffeine and hypothermia. *Int J Dev Neurosci*, 70, 46-55.
- PULS, R., VON HAEFEN, C., BÜHRER, C. & ENDESFELDER, S. 2023a. Dexmedetomidine Protects Cerebellar Neurons against Hyperoxia-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in the Juvenile Rat. *Int J Mol Sci*, 24, 7804.
- PULS, R., VON HAEFEN, C., BÜHRER, C. & ENDESFELDER, S. 2023b. Protective Effect of Dexmedetomidine against Hyperoxia-Damaged Cerebellar Neurodevelopment in the Juvenile Rat. *Antioxidants (Basel)*, 12.
- RANGER, M., ZWICKER, J. G., CHAU, C. M., PARK, M. T., CHAKRAVARTHY, M. M., POSKITT, K., MILLER, S. P., BJORNSON, B. H., TAM, E. W., CHAU, V., SYNNESE, A. R. & GRUNAU, R. E. 2015. Neonatal Pain and Infection Relate to Smaller Cerebellum in Very Preterm Children at School Age. *J Pediatr*, 167, 292-298.e291.
- RAOOFI, A., DELBARI, A., NASIRY, D., GOLMOHAMMADI, R., JAVADINIA, S. S., SADRZADEH, R., MOJADADI, M. S., RUSTAMZADEH, A., MOUSAVI KHANEGHAH, A., EBRAHIMI, V. & REZAIE, M. J. 2022. Caffeine modulates apoptosis, oxidative stress, and inflammation damage induced by tramadol in cerebellum of male rats. *J Chem Neuroanat*, 123, 102116.
- RIBEIRO, J. A. & SEBASTIAO, A. M. 2010. Caffeine and adenosine. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 1, S3-15.
- ROSE, S., MELNYK, S., PAVLIV, O., BAI, S., NICK, T. G., FRYE, R. E. & JAMES, S. J. 2012. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. *Transl Psychiatry*, 2, e134.
- SALERO, E. & HATTEN, M. E. 2007. Differentiation of ES cells into cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2997-3002.
- SANGHERA, R. & YADAV, K. 2023. Long-term health consequences of prematurity. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 33, 68-74.
- SAROHA, V. & PATEL, R. M. 2020. Caffeine for preterm infants: Fixed standard dose, adjustments for age or high dose? *Semin Fetal Neonatal Med*, 25, 101178.
- SCHEUER, T., SHARKOVSKA, Y., TARABYKIN, V., MARGGRAF, K., BROCKMOLLER, V., BUHRER, C., ENDESFELDER, S. & SCHMITZ, T. 2018. Neonatal Hyperoxia Perturbs Neuronal Development in the Cerebellum. *Mol Neurobiol*, 55, 3901-3915.
- SCHMIDT, B., ANDERSON, P. J., DOYLE, L. W., DEWEY, D., GRUNAU, R. E., ASZTALOS, E. V., DAVIS, P. G., TIN, W., MODDEMANN, D., SOLIMANO, A., OHLSSON, A., BARRINGTON, K. J. & ROBERTS, R. S. 2012. Survival without disability to age 5 years after neonatal caffeine therapy for apnea of prematurity. *Jama*, 307, 275-282.
- SCHMIDT, B., ROBERTS, R. S., ANDERSON, P. J., ASZTALOS, E. V., COSTANTINI, L., DAVIS, P. G., DEWEY, D., D'ILARIO, J., DOYLE, L. W., GRUNAU, R. E., MODDEMANN, D., NELSON, H., OHLSSON, A., SOLIMANO, A. & TIN, W. 2017. Academic Performance, Motor Function, and Behavior 11 Years After Neonatal Caffeine Citrate Therapy for Apnea of Prematurity: An 11-Year Follow-up of the CAP Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr*, 171, 564-572.
- SCHMIDT, B., ROBERTS, R. S., DAVIS, P., DOYLE, L. W., BARRINGTON, K. J., OHLSSON, A., SOLIMANO, A. & TIN, W. 2006. Caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med*, 354, 2112-2121.
- SCHMIDT, B., ROBERTS, R. S., DAVIS, P., DOYLE, L. W., BARRINGTON, K. J., OHLSSON, A., SOLIMANO, A. & TIN, W. 2007. Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med*, 357, 1893-1902.

- SCHMITZ, T., RITTER, J., MUELLER, S., FELDERHOFF-MUESER, U., CHEW, L. J. & GALLO, V. 2011. Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development. *J Neurosci*, 31, 4327-4344.
- SEMPLE, B. D., BLOMGREN, K., GIMLIN, K., FERRIERO, D. M. & NOBLE-HAEUSSLEIN, L. J. 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 106-107, 1-16.
- SOONTARAPORNCHAI, K., CAI, C. L., AHMAD, T., ARANDA, J. V., HAND, I. & BEHARRY, K. D. 2021. Pharmacodynamic Effects of Standard versus High Caffeine Doses in the Developing Brain of Neonatal Rats Exposed to Intermittent Hypoxia. *Int J Mol Sci*, 22, 3473.
- STARR, R., DE JESUS, O., SHAH, S. D. & BORGER, J. 2023. *Periventricular and Intraventricular Hemorrhage*, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
- STOCKWELL, J., JAKOVA, E. & CAYABYAB, F. S. 2017. Adenosine A1 and A2A Receptors in the Brain: Current Research and Their Role in Neurodegeneration. *Molecules*, 22, 676.
- STOODLEY, C. J. 2016. The Cerebellum and Neurodevelopmental Disorders. *The Cerebellum*, 15, 34-37.
- SZATKOWSKI, L., FATEH, S., ABRAMSON, J., KWOK, T. C., SHARKEY, D., BUDGE, H. & OJHA, S. 2023. Observational cohort study of use of caffeine in preterm infants and association between early caffeine use and neonatal outcomes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 108, 505-510.
- TENG, R. J., JING, X., MICHALKIEWICZ, T., AFOLAYAN, A. J., WU, T. J. & KONDURI, G. G. 2017. Attenuation of endoplasmic reticulum stress by caffeine ameliorates hyperoxia-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 312, L586-L598.
- TIPPLE, T. E. & AMBALAVANAN, N. 2019. Oxygen Toxicity in the Neonate: Thinking Beyond the Balance. *Clinics in Perinatology*, 46, 435-447.
- TORRES-CUEVAS, I., PARRA-LLORCA, A., SÁNCHEZ-ILLANA, A., NUÑEZ-RAMIRO, A., KULIGOWSKI, J., CHÁFER-PERICÁS, C., CERNADA, M., ESCOBAR, J. & VENTO, M. 2017. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol*, 12, 674-681.
- TREPEL, M. 2021. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion.*, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. 8. Edition, Kap. 7.1/2.
- VAILLANT, C. & MONARD, D. 2009. SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum*, 8, 291-301.
- VAN OVERWALLE, F., MANTO, M., CATTANEO, Z., CLAUSI, S., FERRARI, C., GABRIELI, J. D. E., GUELL, X., HELEVEN, E., LUPO, M., MA, Q., MICHELUTTI, M., OLIVITO, G., PU, M., RICE, L. C., SCHMAHMANN, J. D., SICILIANO, L., SOKOLOV, A. A., STOODLEY, C. J., VAN DUN, K., VANDERVERT, L. & LEGGIO, M. 2020. Consensus Paper: Cerebellum and Social Cognition. *Cerebellum*, 19, 833-868.
- VENTO, M. & LISTA, G. 2015. Managing preterm infants in the first minutes of life. *Paediatr Respir Rev*, 16, 151-156.
- VESOULIS, Z. A., MCPHERSON, C., NEIL, J. J., MATHUR, A. M. & INDER, T. E. 2016. Early High-Dose Caffeine Increases Seizure Burden in Extremely Preterm Neonates: A Preliminary Study. *J Caffeine Res*, 6, 101-107.
- VOGEL, M. W., SUNTER, K. & HERRUP, K. 1989. Numerical matching between granule and Purkinje cells in lurcher chimeric mice: a hypothesis for the trophic rescue of granule cells from target-related cell death. *J Neurosci*, 9, 3454-3462.
- VOLPE, J. J. 2009. Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important. *J Child Neurol*, 24, 1085-1104.
- WHO 2022. New WHO recommendations for the care of preterm or low birthweight infants have the potential to transform maternal and newborn health-care delivery. *Lancet*, 400, 1828-1831.

- WU, Y., STOODLEY, C., BROSSARD-RACINE, M., KAPSE, K., VEZINA, G., MURNICK, J., DU PLESSIS, A. J. & LIMPEROPOULOS, C. 2020. Altered local cerebellar and brainstem development in preterm infants. *Neuroimage*, 213, 116702.
- WYCKOFF, M. H., WYLLIE, J., AZIZ, K., DE ALMEIDA, M. F., FABRES, J., FAWKE, J., GUINSBURG, R., HOSONO, S., ISAYAMA, T., KAPADIA, V. S., KIM, H. S., LILEY, H. G., MCKINLAY, C. J. D., MILDENHALL, L., PERLMAN, J. M., RABI, Y., ROEHR, C. C., SCHMÖLZER, G. M., SZYLD, E., TREVISANUTO, D., VELAPHI, S. & WEINER, G. M. 2020. Neonatal Life Support: 2020 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation*, 142, S185-s221.
- XIONG, X., BAO, Z., MI, Y., WANG, X. & ZHU, J. 2022. Melatonin Alleviates Neonatal Necrotizing Enterocolitis by Repressing the Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Gastroenterol Res Pract*, 2022, 6920577.
- XU, Z. Q., SUN, Y., LI, H. Y., LIM, Y., ZHONG, J. H. & ZHOU, X. F. 2011. Endogenous proBDNF is a negative regulator of migration of cerebellar granule cells in neonatal mice. *Eur J Neurosci*, 33, 1376-1384.
- YEUNG, J., HA, T. J., SWANSON, D. J. & GOLDOWITZ, D. 2016. A Novel and Multivalent Role of Pax6 in Cerebellar Development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36, 9057-9069.
- YRJÖLÄ, P., MYERS, M. M., WELCH, M. G., STEVENSON, N. J., TOKARIEV, A. & VANHATALO, S. 2022. Facilitating early parent-infant emotional connection improves cortical networks in preterm infants. *Sci Transl Med*, 14, eabq4786.
- YUAN, Y., YANG, Y., LEI, X. & DONG, W. 2022. Caffeine and bronchopulmonary dysplasia: Clinical benefits and the mechanisms involved. *Pediatr Pulmonol*, 57, 1392-1400.
- ZEISS, C. J. 2021. Comparative Milestones in Rodent and Human Postnatal Central Nervous System Development. *Toxicol Pathol*, 49, 1368-1373.
- ZWICKER, J. G., MILLER, S. P., GRUNAU, R. E., CHAU, V., BRANT, R., STUDHOLME, C., LIU, M., SYNNESE, A., POSKITT, K. J., STIVER, M. L. & TAM, E. W. 2016. Smaller Cerebellar Growth and Poorer Neurodevelopmental Outcomes in Very Preterm Infants Exposed to Neonatal Morphine. *J Pediatr*, 172, 81-87.e82.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Vivien Giszas, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Einfluss von postnatalem Koffein auf das Sauerstoff-geschädigte Kleinhirn der juvenilen Ratte / Influence of postnatal caffeine on the oxygen-impaired cerebellum in the neonatal rat“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere die praktischen Arbeiten) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Textstellen und Abbildungen, die auf der dazugehörigen Publikation „The Conflicting Role of Caffeine Supplementation on Hyperoxia-Induced Injury on the Cerebellar Granular Cell Neurogenesis of Newborn Rats“ beruhen, sind ebenso als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Vivien Gizzas hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Gizzas, V.**, Strauß, E., Bühner, C., & Endesfelder, S.: The Conflicting Role of Caffeine Supplementation on Hyperoxia-Induced Injury on the Cerebellar Granular Cell Neurogenesis of Newborn Rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2022. doi:10.1155/2022/5769784.

Beitrag im Einzelnen:

Konzept und Versuchsaufbau stammen von Frau PD. Dr. Stefanie Endesfelder (Erstbetreuerin) und die Tierversuche zur Probengewinnung wurden bereits 2016 durch sie durchgeführt. 2020 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen (Calbindin, Pax6/PCNA, DAPI) und anschließende Mikroskopie durch Vivien Gizzas. Vivien Gizzas fotografierte alle angefärbten Schnitte und führte die Auswertung durch Auszählung der Zellzahl und Messung der Dendritenlänge durch. Requantifizierung und Verifizierung der Ergebnisse durch Stefanie Endesfelder. Die statistische Auswertung und Auswahl der repräsentativen Fotos der immunhistochemischen Schnitte erfolgte gemeinsam durch Vivien Gizzas und Stefanie Endesfelder. Vivien Gizzas erstellte die Grafiken zur Darstellung der Ergebnisse der Immunhistochemie. Ebenfalls 2020 Durchführung der qPCR (*BDNF, Calb1, Chd7, CycD2, FGF8, HPRT, Lmx1a, NeuroD1/2, NeuN, Pax2/6, Prox1, Sema6a, Shh, Sox2, Syp*) und deren Auswertung über relative Quantifizierung durch Vivien Gizzas. Die statistische Auswertung erfolgte gemeinsam mit Stefanie Endesfelder. Vivien Gizzas erstellte anschließend die Grafiken zur Darstellung der Ergebnisse der Expressionsmuster. Das Manuskript entstand in Zusammenarbeit, dabei schrieb Vivien Gizzas vor allem den Methoden- und Ergebnisteil und Stefanie Endesfelder Einleitung und Diskussion. Vivien Gizzas erstellte die dazugehörigen Abbildungen. Kommunikation mit dem Verlag und den Gutachtern erfolgte durch Stefanie Endesfelder. Die Erstellung des finalen Manuskriptes nach Begutachtung wurde durch Vivien Gizzas und Stefanie Endesfelder verantwortet.

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Druckexemplar der Publikation

Hindawi
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2022, Article ID 5769784, 21 pages
<https://doi.org/10.1155/2022/5769784>



Research Article

The Conflicting Role of Caffeine Supplementation on Hyperoxia-Induced Injury on the Cerebellar Granular Cell Neurogenesis of Newborn Rats

Vivien Giszas , Evelyn Strauß, Christoph Bühner , and Stefanie Endesfelder 

Department of Neonatology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Correspondence should be addressed to Stefanie Endesfelder; stefanie.endesfelder@charite.de

Received 17 January 2022; Revised 4 March 2022; Accepted 28 April 2022; Published 31 May 2022

Academic Editor: Alin Ciobica

Copyright © 2022 Vivien Giszas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Preterm birth disrupts cerebellar development, which may be mediated by systemic oxidative stress that damages neuronal developmental stages. Impaired cerebellar neurogenesis affects several downstream targets important for cognition, emotion, and speech. In this study, we demonstrate that oxidative stress induced with high oxygen (80%) for three or five postnatal days (P3/P5) could significantly damage neurogenesis and proliferative capacity of granular cell precursor and Purkinje cells in rat pups. Reversal of cellular neuronal damage after recovery to room air (P15) was augmented by treatment with caffeine. However, downstream transcripts important for migration and differentiation of postmitotic granular cells were irreversibly reduced by hyperoxia, without rescue by caffeine. Protective effects of caffeine in the cerebellum were limited to neuronal survival but failed to restore important transcript signatures.

1. Introduction

Intensive care of extremely and very prematurely born preterm infants and consequently their survival have changed significantly over the past decades [1]. Preterm birth is one of the main risk factors for surviving with major and minor neurodevelopmental morbidities [2]. This incremental risk correlates with lower gestational age and birth weight [3]. In addition to the major neurodevelopmental morbidities, such as cerebral palsy and motor/cognitive delay, it is above all the supposedly minor neurodevelopmental abnormalities, including intellectual disability, emotional behavioral and neurobehavioral problems, and socioemotional difficulties like attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) or autism spectrum disorder (ASD), that can be responsible for lifelong impairments [4–7].

Preterm birth *per se* as well as brain injuries such as fetal growth restriction [8], intraventricular hemorrhages [9], oxygen toxicity [10], neonatal stroke [11], or inflammatory events [12] may well interrupt brain development and maturation as independent risk factors or in combination and seem to be causative for adverse neuronal developmental disorders. There

is a strong correlation between prematurity and a worse prognosis for the development of neurological impairments [13], but also for reduced regional brain volumes [14, 15]. Decreased cerebellar volumes and delayed growth are associated with noxious perinatal and postnatal factors [16, 17]. The cerebellar development of preterm infants and the crucial function of the cerebellum in terms of complex neurological abilities for cognitive and language development have gained more attention in recent years [18–21]. Impairments of complex functions have been associated with cerebellar injury, which then leads to deficits in language and cognitive skills, as well as altered social, emotional, and behavioral development of preterm infants [19, 22–24].

The mature cerebellum consists anatomically of the vermis (median) and the two hemispheres (lateral). In the last trimester of pregnancy, the cerebellum undergoes fundamental changes in growth and volume increase during the brain growth spurt [25–27]. The most important first events in the development of the cerebellum in humans begin at about 24 weeks' gestation, with a growth peak at term birth and lasting until about the first year of life [26, 28]. In rodents, comparable cerebellar development occurs postnatally until the third week

2

Oxidative Medicine and Cellular Longevity

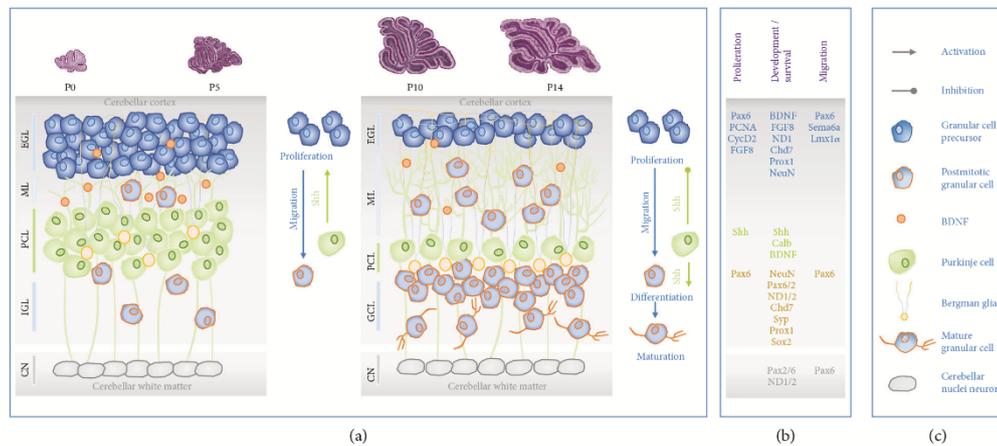


FIGURE 1: Schematic illustration of rodent postnatal granular cell neurogenesis. (a) The major cell type in the cerebellar cortex is the granule cell (GC). GC precursors (GCPs), originating from the rhombic lip, migrate to the mitotically active external granular layer (EGL). GCPs within the EGL are mitotically active from E15 until the third postnatal week. At the time of birth (P0), GCPs begin to differentiate into mature GCs (around P5) and reach their destination (at P20) by radial migration along the Bergmann glia of the GC into the internal granular layer (IGL) over the molecular layer (ML). In rats, the proliferation of cerebellar interneurons and granule cells that arise from the EGL lasts for over 3 weeks after birth. Proliferative activity of GCPs is regulated by extrinsic Purkinje cell- (PC-) derived factor sonic hedgehog (Shh). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), expressed in GCs, regulates survival and migration of GCPs and stimulates own migration of granule cells from EGL to IGL. (b) Cerebellar neurogenesis of granular cells is characterized by the expression of neuronal and proliferative markers and is orchestrated by neuronal transcription factors: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), calbindin 1 (Calb1), chromodomain helicase DNA-binding protein 7 (Chd7), cyclin dependent kinase 2 (CycD2), fibroblast growth factor 8 (FGF8), hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT), LIM homeobox transcription factor 1 alpha (Lmx1 α), neuronal differentiation 1/2 (NeuroD 1/2), neuronal nuclei (NeuN), paired box 2/6 (Pax2/Pax6), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), prospero homeobox 1 (Prox1), semaphoring 6a (Sema6a), sonic hedgehog signaling molecule (Shh), sex-determining region Y-box 2 (Sox2), and synaptophysin (Syp). (c) Cellular players in cerebellar granular cell neurogenesis.

of life [29, 30]. Cerebellar development is characterized by formation of the cerebellar white matter, maturation of the Purkinje cell (PC) layer, maturation of mitotic granule cell (GC) precursors (GCPs) to postmitotic GCs, and their radial migration from external granular cell layer (EGL) along Bergman glial cell fibers to the formation of the internal granular cell layer (IGL) [31]. The cerebellar neurogenesis of granular cells is characterized by the expression of neuronal and proliferative markers and is orchestrated by neuronal transcription factors (see schematic illustration Figure 1).

Due to the long human cerebellar developmental period from the embryonic stage to the second year of life, but especially during the phase of rapid growth during the last third of pregnancy, children born too early may be exposed to a severe impairment of cerebellar development. Necessary intensive medical care and treatment of very preterm (28–32 weeks gestation) and extremely preterm (<28 weeks gestation) infants represent exogenous factors that can likewise sustainably interrupt neuronal cerebellar development [17, 20].

Preterm infants have frequently unstable respiration after birth. Arterial partial pressure of oxygen doubles during the intrauterine to extrauterine transition; additional oxygen supplementation enhanced arterial partial pressure of oxygen four- to fivefold, causing systemic oxidative stress [32]. Oxidative

stress is a critical factor in proven injuries in the immature brain of the preterm infant, which correlates with neurodevelopmental abnormalities of prematurity [33, 34]. Normally, the antioxidant enzyme system can counteract oxidative stress well with a corresponding antioxidant response. However, the antioxidant defense system undergoes significant developmental changes during the neonatal period, resulting in significantly lower antioxidant cellular defense in preterm infants compared to term infants [35]. The therapeutic strategy of reducing the pathological effects of oxidative stress, such as oxidation of biomolecules, inflammation, or cell death [36], through antioxidative therapies, such as melatonin, surfactant, vitamin A, vitamin E, or caffeine, is not new [37].

One of the standard drugs most commonly used in neonatal care for the treatment of apnea in preterm infants is the methylxanthine caffeine. As a nonspecific inhibitor of adenosine receptor subtypes A1 and A2a, caffeine has a broad spectrum of pharmacokinetic activity [38, 39]. In addition to reducing the frequency of respiratory arrest, caffeine showed well-described short- and long-term effects [40]. Demonstrated neuroprotective effects in the developing brain reduced the rate of bronchopulmonary dysplasia (BPD) and death and likewise shortened the duration of mechanical ventilation, thus possibly reducing persistent oxidative stress [40–43]. When used within

the first few days of life, the effects appear to be the most effective [44, 45]. As a potential free radical scavenger [46], as shown in experimental studies, caffeine could be an antioxidant *per se* [47, 48] and also has anti-inflammatory as well as antiapoptotic effects [49–51].

In the current study, we demonstrated that early exposure to high oxygen impairs cerebellar granular cell neurogenesis by analyzing newborn rats with cell type-specific markers. Based on previous experimental studies, we hypothesized that the antioxidant caffeine might minimize the effects of oxidative stress and found conflicting pleiotropic caffeine effects that require further discussion.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Welfare. Time-pregnant *Wistar* rat dams were obtained from the Department of Experimental Medicine (FEM, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany). The adult rats were housed in individual cages under environment-controlled conditions with a constant 12 h/12 h light/dark cycle, ambient temperature, and relative humidity of 60% with *ad libitum* access to the same food and water. After birth, the newborns were maintained with a mother for breast milk feeding. All animal experimental procedures were evaluated and approved by the local animal welfare authorities (LAGeSo, approval number G-0088/16) and followed institutional guidelines as well as ARRIVE guidelines.

2.2. Oxygen Exposure and Drug Administration. As previously described [47, 50], pups from different litters and both sexes were pooled and randomized within 12 h of birth and returned to the dams. Sample size calculation was performed in G*Power V3.1.2 [52]. The newborn rats were randomly assigned to room air (normoxia, NO) or oxygen-enriched atmosphere (hyperoxia, HY) treatment. The pups in hyperoxia subgroups were reared with the dams in an atmosphere containing 80% oxygen (OxyCycler BioSpherix, Lacona, NY) from postnatal day (P)0 to P3 ($n = 6-8$) or P0 to P5 ($n = 6-8$); in parallel, the pups in normoxia groups were reared with the dams under room air conditions. To avoid oxygen toxicity in the nursing mothers, they were rotated between the hyperoxic and normoxic litters every 24 h. The rats were divided into four groups, each for same exposure times to (i) normoxia (NO, control group): 21% oxygen application of vehicle (phosphate-buffered saline, PBS), (ii) normoxia with caffeine (NOC): 21% oxygen with caffeine (10 mg/kg, Sigma, Steinheim, Germany), (iii) hyperoxia (HY): 80% oxygen with vehicle (PBS), and (iv) hyperoxia with caffeine (HYC): 80% oxygen with caffeine (10 mg/kg). 10 mg/kg of pure caffeine is equivalent to 20 mg/kg caffeine citrate, which is used clinically [53]. Rat pups received either caffeine or vehicle injection intraperitoneally (i.p.) as a fixed proportion of their body weight (100 μ l/10 g) every 48 h beginning on the day of birth (P0). Caffeine or vehicle was administered to the pups with a total of three postnatal days of oxygen exposure (P0–P3) on the day of birth (P0) and on P2; and for the rat pups with a total of five days of postnatal oxygen exposure (P0–P5) on the day of birth (P0) and on P2 and P4. The rat pups were examined after the oxygen exposure (P3, P5) either directly or after recovery in room air at P15

(P3_P15, P5_P15). No pups died during hyperoxia. Caffeine plasma concentrations and weight profiles were determined and presented in previous work [47].

2.3. Tissue Preparation. At the experimental endpoints (P3; P3_P15; and P5; P5_P15), rat pups were anaesthetized with an i.p. injection of ketamine (100 mg/kg), xylazine (20 mg/kg), and acepromazine (3 mg/kg) and then transcardially perfused, as previously described [47, 50]. In deep sedation and after perfusion, the rats were decapitated in the cervical region. The whole brain tissues were excised and processed for molecular analysis or histology. For the gene expression studies, cerebellar tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . The perfusion was carried out with PBS (pH 7.4). For immunohistochemical analysis, the PBS perfusion was followed by perfusion with 4% paraformaldehyde (pH 7.4); the cerebellums were postfixed at 4°C for 1 day, embedded in paraffin, and processed for histological staining.

2.4. RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR. Tissue procurement has already been described [50]. Briefly, total RNA was isolated from one snap-frozen cerebellar hemisphere per animal by acidic phenol/chloroform extraction (peqGOLD RNAPure™; PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Germany) and 2 μ g of RNA was DNase treated and reverse-transcribed. The PCR products of *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*, *Calbindin 1 (Calb1)*, *chromodomain helicase DNA-binding protein 7 (Chd7)*, *cyclin dependent kinase 2 (CycD2)*, *fibroblast growth factor 8 (FGF8)*, *hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT)*, *LIM homeobox transcription factor 1 alpha (Lmx1a)*, *neuronal differentiation 1/2 (NeuroD 1/2)*, *neuronal nuclei (NeuN)*, *paired box 2/6 (Pax2/ Pax6)*, *prospero homeobox 1 (Prox1)*, *semaphoring 6a (Sema6a)*, *sonic hedgehog signaling molecule (Shh)*, *sex-determining region Y-box 2 (Sox2)*, and *synaptophysin (Syp)* were quantified in real time with the sequences summarized in Table 1. PCR and detection were performed with qPCR BIO Mix Hi-ROX (NIPPON Genetics Europe, Düren, Germany) with HPRT used as an internal reference. The detection of PCR products was performed in triplicate in 11 μ l reaction mix, each containing 5 μ l of qPCR mastermix, 2.5 μ l of 1.25 μ M of each oligonucleotide primer, 0.5 μ l of 5 μ M of probe, and 3 μ l of cDNA template (17 ng). PCR amplification was performed in 96-well reaction plates for 40 cycles, each cycle at 94°C for 5 s and 62°C for 25 s. The expression of target genes was analyzed with the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) according to the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [54].

2.5. Immunohistochemistry. Paraffin-embedded cerebellar sections were serially cut into 6 μ m sections and mounted onto Superfrost Plus-coated slides (Menzel, Braunschweig, Germany). The sections, as previously described [55], were deparaffinized in Roti-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) twice for 10 min each. The PFA-fixed tissues were dehydrated through incubation in aqueous solutions of decreasing ethanol concentration. The slices were subsequently hydrated in ethanol (100%, 100%, 90%, 80%, and 70%) for 3 min each. To demask intracellular epitopes, sections were fixed in citrate

4

Oxidative Medicine and Cellular Longevity

TABLE 1: Sequences of oligonucleotides.

	Oligonucleotide sequence 5'-3'	Accession No.
<i>BDNF</i>		
Forward	TCAGCAGTCAAGTGCCTTTGG	NM_012513.4
Reverse	CGCCGAACCCTCATAGACATG	
Probe	CCTCCTCTGCTCTTTCTGCTGGAG GAATACAA	
<i>Calb1</i>		
Forward	CGACGCTGATGGAAGTGGTT	NM_031984.2
Reverse	TCCAATCCAGCCTTCTTTTCG	
Probe	AAGGAAAGGAGCTGCAGAA	
<i>Chd7</i>		
Forward	CAAGCTTCTGGAGGGACTGAA	NM_001107906.2
Reverse	AAGAGCTCCTCCACAGTGTCTG	
Probe	TGGAACACAAAGTGTCTG	
<i>CycD2</i>		
Forward	CGTACATGCGCAGGATGGT	NM_199501.1
Reverse	AATTCATGGCCAGAGGAAAGAC	
Probe	TGGATGCTAGAGGCTCTGTGA	
<i>FGF8</i>		
Forward	CCTTCGCAAAGCTCATTGTG	NM_133286.1
Reverse	CCCTTCTGTTCATGCAGATGTAC	
Probe	TTTTGGAAAGCAGAGTCCGAGT	
<i>HPRT</i>		
Forward	GGAAAGAAGCTCTTGATTGTTGAA	NM_012583.2
Reverse	CCAACACTTCGAGAGGTCCTTTT	
Probe	CTTTCCTTGGTCAAGCAGTACAGC CCC	
<i>Lmx1a</i>		
Forward	ACCACTCAGCAGAGGAGAGCAT	NM_001105967.2
Reverse	TGTCCTCCGACCCAGAGTCT	
Probe	AAGTATCCTCCAAGCCCT	
<i>NeuroD1</i>		
Forward	TCAGCATCAATGGCAACTTC	NM_019218.2
Reverse	AAGATTGATCCGTGGCTTTG	
Probe	TTACCATGCACTACCCTGCA	
<i>NeuroD2</i>		
Forward	TCTGGTGTCTACGTGCAGA	NM_019326.1
Reverse	CCTGCTCCGTGAGGAAGTTA	
Probe	TGCCCTGCAGCTGAACTCTC	
<i>NeuN</i>		
Forward	GCTGAATGGGACGATCGTAGAG	NM_001134498.2

TABLE 1: Continued.

	Oligonucleotide sequence 5'-3'	Accession No.
Reverse	CATATGGGTTCCAGGCTTCT	
Probe	AGGTCAATAATGCCACGGC	
<i>Pax2</i>		
Forward	GTACTIONGACTGGCAGCATCAA	NM_001106361.1
Reverse	TCGGTTCTGTCTGCTTGTATT	
Probe	CCAAAGTGGTGGACAAGA	
<i>Pax6</i>		
Forward	TCCCTATCAGCAGCAGTTTCAGT	NM_013001.2
Reverse	GTCTGTGCGGCCCAACAT	
Probe	CTCCTCCTTTACATCGGGTT	
<i>Prox1</i>		
Forward	TGCCTTTTCCAGGAGCAACTAT	NM_001107201.1
Reverse	CCGCTGGCTTGGAAACTG	
Probe	ACATGAACAAAAACGGTGGC	
<i>Sema6a</i>		
Forward	GCCATTGATGCGGTCAATTA	NM_001108430.2
Reverse	GTACGGCTCTTTCAACCACTTTG	
Probe	CTTGGAGACAGTCTACC	
<i>Shh</i>		
Forward	GCTGATGACTCAGAGGTGCAAA	NM_017221.1
Reverse	CCTCAGTCACTCGAAGCTTCACT	
Probe	CAAGTTAAATGCCTTGGCCA	
<i>Sox2</i>		
Forward	ACAGATGCAGCCGATGCA	NM_001109181.1
Reverse	GGTGCCCTGCTGCGAGTA	
Probe	CAGTACAACCTCCATGACCAG	
<i>Syp</i>		
Forward	TTCAGGCTGCACCAAGTGTA	NM_003179.3
Reverse	TTCAGCCGACGAGGAGTAGT	
Probe	AGGGGGCACTACCAAGATCT	

buffer (pH 6.0) in a microwave oven for 10 min at 600 W. All slides were then cooled at room temperature for half an hour before being washed three times in PBS. For calbindin/DAPI staining blocking solution, 3% bovine serum albumin (BSA), 0.05% TW-20, and 0.1% Triton X-100 in PBS were applied to each section for 60 min at room temperature. For Pax6/PCNA/DAPI staining, blocking solution 3% BSA and 0.2% Triton X-100 in PBS were used instead. Primary antibodies were applied after washing once with PBS; slides were incubated overnight at 4°C with either monoclonal mouse anti-calbindin (1:500, Abcam, ab75524) or polyclonal rabbit

anti-Pax6 (1:200, LifeSpan Bioscience, LS-C179903) with monoclonal mouse anti-PCNA (1:500, Abcam, ab29) diluted in antibody diluent (Zymed Laboratories, San Francisco, CA). Slices were washed in PBS three times, and secondary Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) or Alexa Fluor 594-conjugated goat-anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) was applied, with consistent 1:200 dilution in antibody diluent (Zymed Laboratories). Sections were incubated for 1 h at room temperature, were consecutively washed once in PBS, and were incubated for 10 min at room temperature after applying 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) diluted 1:2000 in PBS for counterstaining. We mounted all sections after three final washes with PBS (Shandon Immu-Mount, Thermo Fisher Scientific).

Midsagittal cerebellar sections were analyzed blind using a Keyence compact fluorescent microscope BZ 9000 with BZ-II Viewer software and BZ-II Analyzer software (Keyence, Osaka, Japan) using 10x objective lenses and individual files stitched automatically for each RGB color. Pictures were taken with the same exposure time and contrast/brightness parameters. For analysis, four nonoverlapping separate images of posterior lobules IV/V, VI, and/or VII per animal were obtained, including at least two external cortices and two inner loops of the cerebellar cortex. For quantification of Purkinje cells (calbindin+), granule neuron (Pax6), and proliferation marker (PCNA), four 100 μm (P3 and P5) or 200 μm (P3_P15 and P5_P15) regions of lobules were quantified for each section and were counted manually using Adobe Photoshop software 22.0.0 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Republic of Ireland) with minimal previous manipulation of contrast. The molecular layer thickness was determined on identical digital sections of calbindin count images, and the dendrite length of Purkinje cells was used to evaluate the molecular layer thickness by measuring the primary dendrite from the soma up to the surface of the molecular layer. The values determined in this way of cell counts and molecular layer thickness ensured a more representative result across the whole lobule. DAPI was used to visualize the cell nucleus and to mark the granular layer. Mean values per sample were calculated by averaging the values of all sections of the same animal and were used to compare the cell counts and layer thickness of treated animals versus control animals.

2.6. Statistical Analyses. Box and whisker plots represent the interquartile range (box) with the line representing the median, while whiskers show the data variability outside the upper and lower quartiles. As previously described [50], groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), based on a partially non-Gaussian distribution with the Kruskal-Wallis test or based on the assumption that groups do not have equal variances with the Brown-Forsythe test. Depending on which ANOVA test was used, multiple comparisons of means were carried out using Bonferroni's, Dunn's, or Dunnett's T3 *post hoc* test. A *p* value of <0.05 was considered significant. All graphics and statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Caffeine Reverses Hyperoxia-Induced Impairment of Purkinje Cells. In this experiment, we investigated the changes in the amount of calbindin-positive Purkinje cells and the length of their dendrites in the molecular layer (ML) after exposure to hyperoxia and application of caffeine (Figures 2 and 3). Additionally, cerebellar expression of calbindin (*Calb1*) and *NeuN* was quantified using qRT-PCR (Figure 3). Hyperoxia significantly reduced counts of calbindin-positive Purkinje cells and dendrite length at P3 and P5 compared to normoxic control litters (Figures 2(a), 2(c), 3(a) and 3(b)). After the hyperoxic insult, cell counts and dendrite length decreased at P3 and/or P5 (Figures 3(a) and 3(b)). At P3, caffeine was able to attenuate this effect and maintain cell counts and dendrite growth (Figures 3(a) and 3(b)). At P15 after recovery in normoxic environment, no significant disparities between groups were measurable, besides the calbindin cell counts after five-day hyperoxia at P15 (P5_P15 group), which did not recover from the hyperoxic insult. The complete data are shown in full in a supplementary table (see Table S-1).

Caffeine administered during early high oxygen exposure counteracted the reduced number of Purkinje cells and, to a lesser extent during three-day exposure, their shortened dendrites.

3.2. Caffeine Rescues Pax6-Positive Granule Cells and Proliferation Capacity Damaged by Short-Term Hyperoxia. We investigated the changes of Pax6-positive GCP counts migrating as postmitotic GCs in the ML and proliferation capacity after exposure to hyperoxia with or without application of caffeine (Figures 4–6(a) and 6(b)). As can be clearly seen in optical density (Figure 4) and after quantification (Figure 5), at P3 and P5, Pax6- as well as PCNA-positive cells presented a significant quantitative decrease after exposure to 80% hyperoxia. Pax6 cells as well as PCNA-positive cells were reduced at P3 and P5 (Figures 5(a) and 5(b)) compared to the control group in room air. At P3, caffeine significantly attenuated the negative effect of oxidative stress and maintained cell counts similar to those of control animals for PCNA. Caffeine had no protective effect on Pax6-expressing cells or the number of proliferating cells after 5 days of oxygen exposure (Figures 5(a) and 5(b)). For those groups at P15 following recovery at atmospheric air, at P5_P15, no significant variations between groups were measurable (Figure 5), whereas at P3_P15, Pax6-positive cell counts were significantly increased (Figure 5(a)) compared to control groups. PCNA-positive cell counts were also significantly elevated (Figure 5(b)) compared to the hyperoxic group without caffeine application. The complete data are shown in full in a supplementary table (see Table S-2).

The three-day hyperoxia-induced decreased proliferative capacity of mainly progenitors, which persisted after recovery from oxygen toxicity, was reversed by caffeine at early exposure.

3.3. Caffeine Administration Fails to Rescue Granular Cell Progenitor Impairment Mediated by Acute Hyperoxia. Gene expression of *FGF8* and *CyclinD2* was significantly decreased after acute exposure to hyperoxia at P3 and/or P5. Caffeine

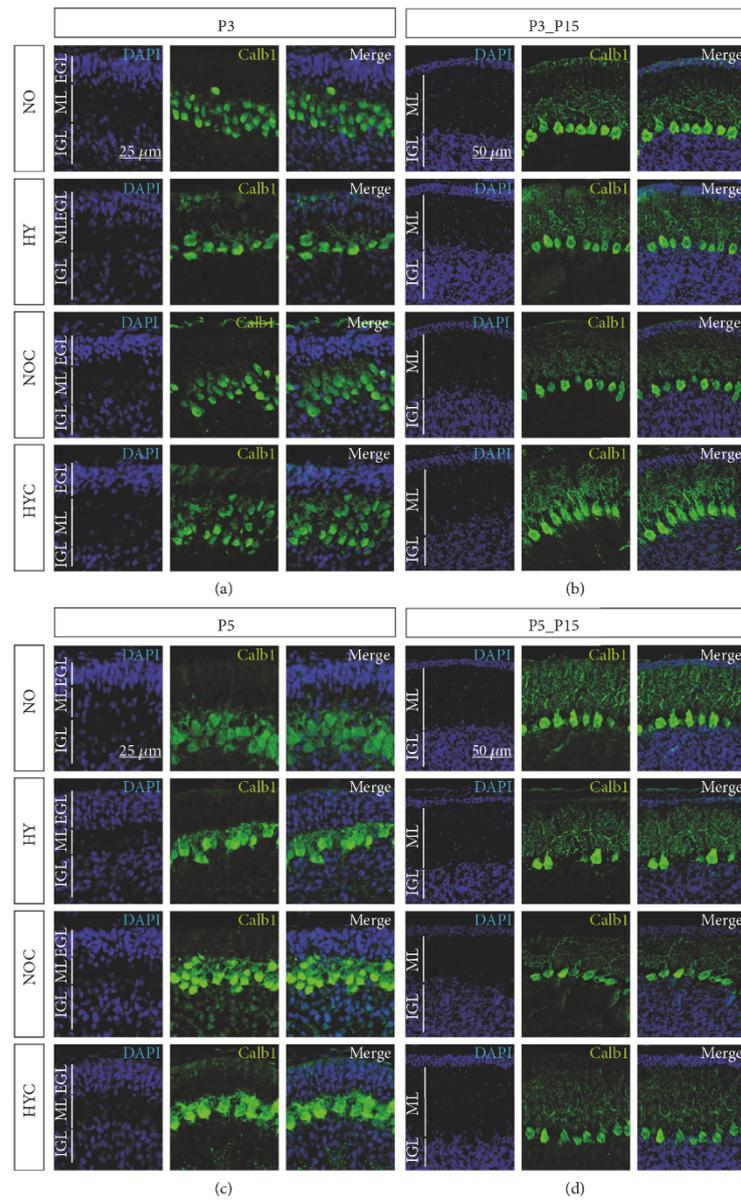


FIGURE 2: Representative cerebellar paraffin sections colabeled with calbindin and DAPI of rat pups exposed to normoxia (NO) or hyperoxia (HY) compared to rat pups treated with caffeine (NOC, HYC). Examinations were performed at postnatal day 3 (P3) (a) and P5 (c) or after recovery after 3-day exposure at P15 (b) or after 5-day exposure at P15 (d). Immunofluorescent images indicated calbindin (green) and nuclei (blue, DAPI). Three- (P3) and five-day (P5) lasting hyperoxia affects the density and length of dendrites of Purkinje cells in the newborn rat cerebellum and persists mainly after 5 day hyperoxia exposure until P15 (P5_P15). Caffeine was found to partly counteract these changes. EGL: external granular layer; ML: molecular layer; IGL: internal granular layer. Scale bar P3/P5 with 25 μm and P3_P15/P5_P15 with 50 μm .

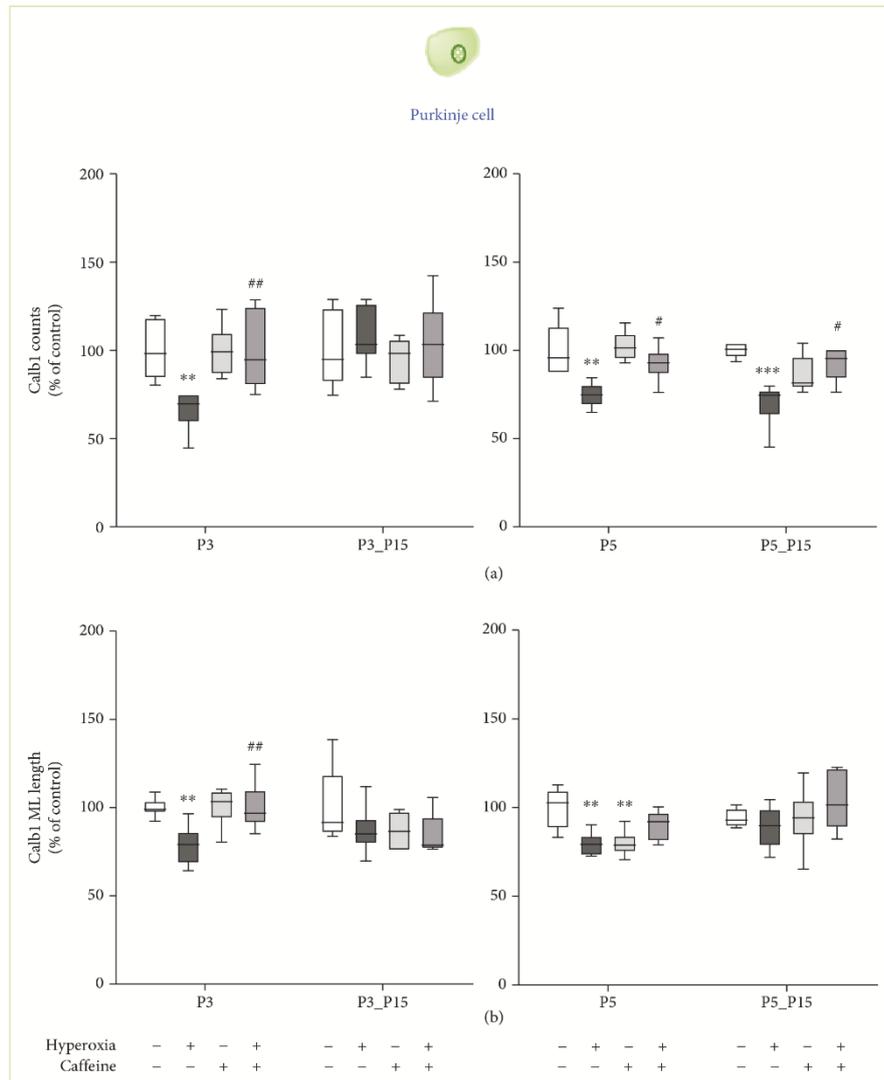


FIGURE 3: Quantification of (a) counts of colabeled calbindin and DAPI-positive Purkinje cells (PC) of the cerebellar molecular layer and (b) molecular layer (ML) length was performed for 3 days' postnatal oxygen exposure (P3) and recovery (P3_P15) and 5 days' postnatal oxygen exposure (P5) and recovery (P5_P15), respectively. Acute hyperoxia exposure (deep dark gray bars) decreased the number of Purkinje cells and depressed the dendrite length. Caffeine administration (gray bars) was a protective effect for calbindin-positive cells, but not for dendrite growth. Caffeine with normoxia (light gray bars) did not influence density and dendrite length of Purkinje cells, except at P5. Data are normalized to the level of rat pups exposed to normoxia at each time point (control 100%, white bars), and the 100% values are 1.4 (P3), 2.8 (P3_P15), 1.4 (P5), and 2.5 (P5_P15) length of the molecular layer or 14 (P3), 7.4 (P3_P15), 8.9 (P5), and 7.2 (P5_P15) cells per regions of lobules, respectively. $n = 6-8/\text{group}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs. control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ vs. hyperoxia (ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; Kruskal-Wallis, Dunn's *post hoc* test).

had no protective effect to mitigate hyperoxia-mediated injury (Figures 6(a) and 6(b)). A reduction of transcription under hyperoxic damage occurred for *FGF8* (Figure 6(a)

at P5 and *CyclinD2* (Figure 6(b)) at P3 and P5, respectively. Caffeine under hyperoxic exposure decreased expression of *CyclinD2* (Figure 6(b)) at P3 and for *FGF8* (Figure 6(a)

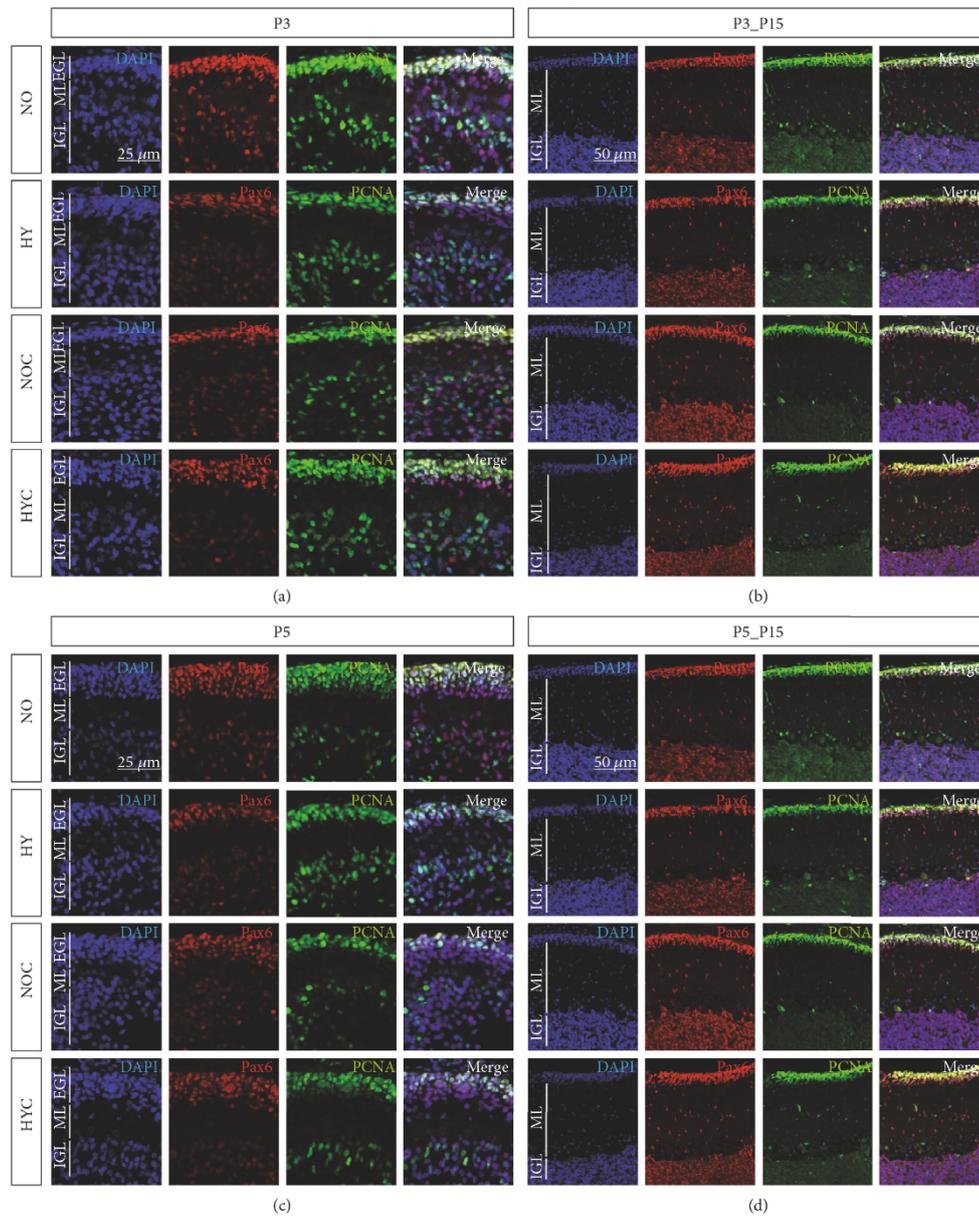


FIGURE 4: Representative cerebellar paraffin sections colabeled with Pax6, PCNA, and DAPI of rat pups exposed to normoxia (NO) or hyperoxia (HY) compared to rat pups treated with caffeine (NOC, HYC). Examinations were performed at postnatal day 3 (P3 (a)) and P5 (c) or after recovery after 3-day exposure at P15 (b) or after 5-day exposure at P15 (d). Immunofluorescent images indicated Pax6 (red), PCNA (green), and nuclei (blue, DAPI). Three - (P3) and five-day (P5) lasting hyperoxia affected the density of granule cells (Pax6), proliferation capacity (PCNA), and thickness of EGL in the newborn rat cerebellum after acute hyperoxia exposure (P3, P5). Caffeine at P3 was partly effective to inhibit the effects of hyperoxia. EGL: external granular layer; ML: molecular layer; IGL: internal granular layer. Scale bar P3/P5 25 μm and P3_P15/P5_P15 50 μm .

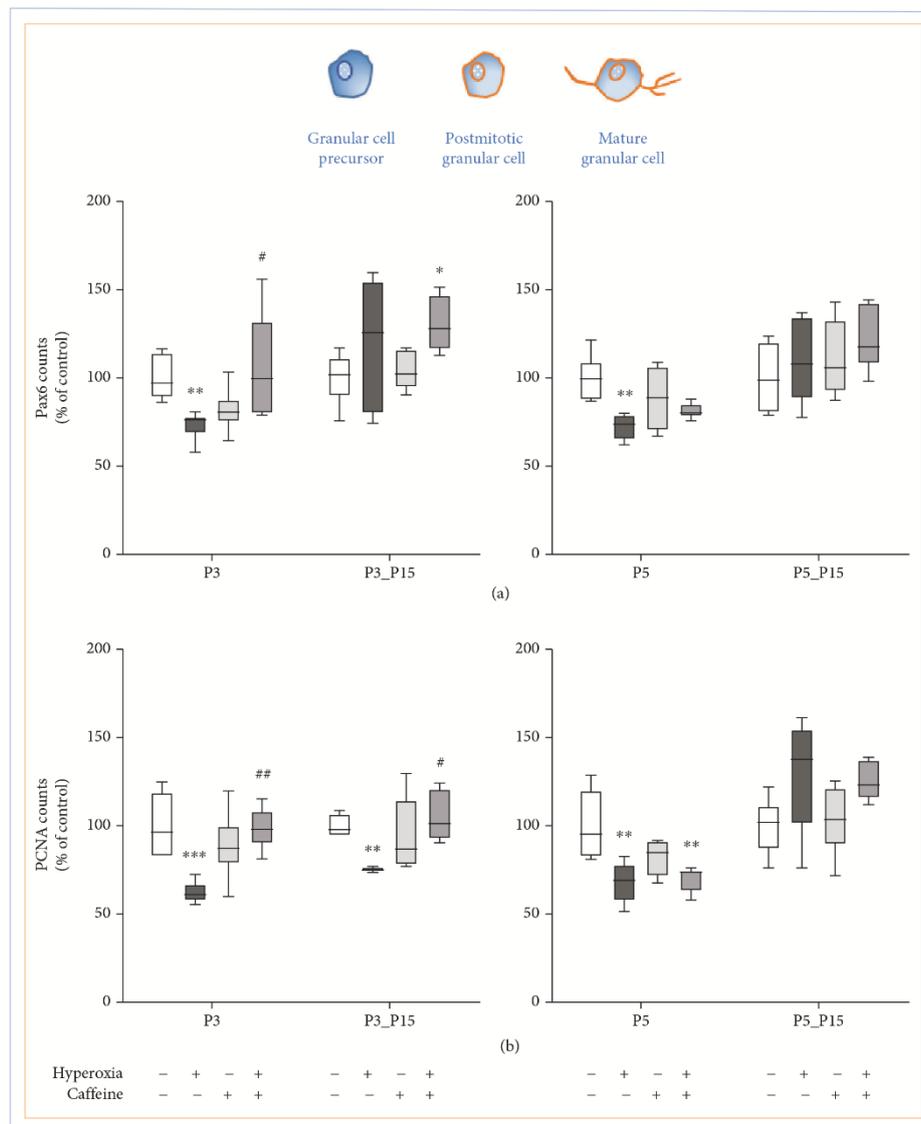


FIGURE 5: Quantification of (a) Pax6 and (b) PCNA counts of colabelled positive cells of the cerebellar molecular layer was performed for 3 days' postnatal oxygen exposure (P3) and recovery (P3_P15) and 5 days' postnatal oxygen exposure (P5) and recovery (P5_P15), respectively. Acute hyperoxia exposure (P3 and P5; deep dark gray bars) decreased the number of granular cells (Pax6) and proliferating cells (PCNA). Caffeine (gray bars) was protective for Pax6-positive cells at P3 and P5 and for proliferating capacity at P3 with recovery until P15 (P3_P15). Caffeine with normoxia (light gray bars) did not influence density of granular cells and proliferation. Data are normalized to the level of rat pups exposed to normoxia at each time point (control 100%, white bars), and the 100% values are 38 (P3), 54.4 (P3_P15), 46.6 (P5), and 41.3 (P5_P15) Pax6+ cells per regions of lobules or 33 (P3), 37.1 (P3_P15), 65.7 (P5), and 22.3 (P5_P15) PCNA+ cells per region of lobules, respectively. $n = 6-8/\text{group}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. control; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. hyperoxia (ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; Kruskal-Wallis, Dunn's *post hoc* test; Brown-Forsythe, Dunnett's *post hoc* test).

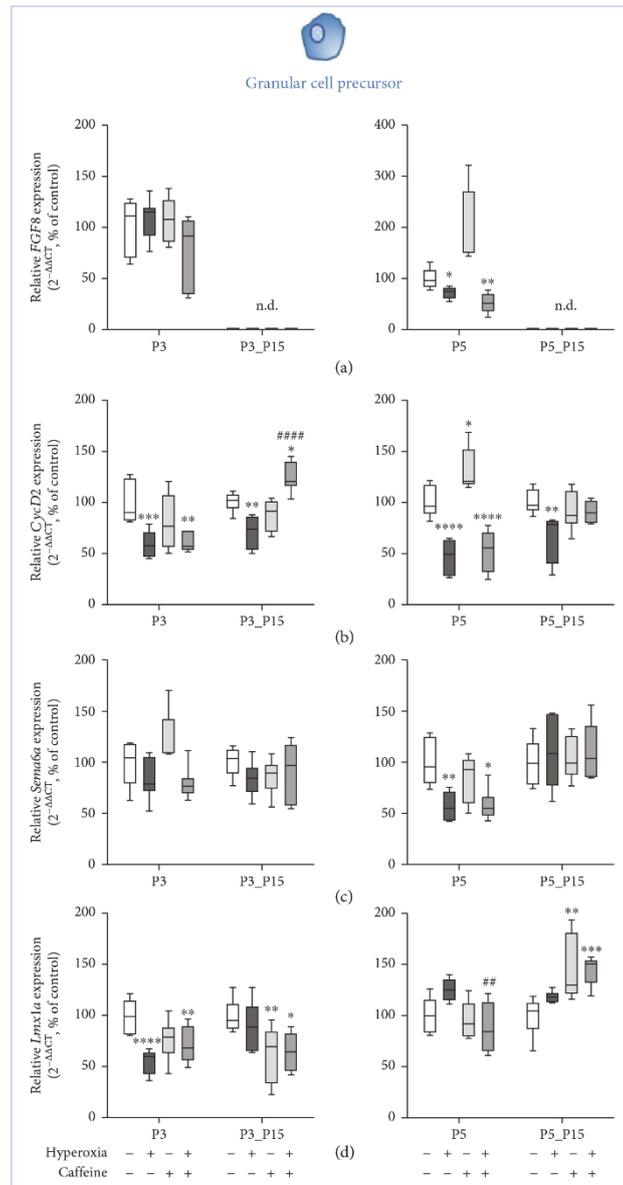


FIGURE 6: Quantification of cerebellar homogenates for granule cell precursor-associated mediators of (a) *FGF8*, (b) *CycD2*, (c) *Sema6a*, and (d) *Lmx1a* was performed with qPCR for 3 days' postnatal oxygen exposure (P3) and recovery (P3_P15) and 5 days' postnatal oxygen exposure (P5) and recovery (P5_P15), respectively. Acute hyperoxia exposure (deep dark gray bars) decreased the mRNA expression at P3 and/or P5. At P15, only the reduction of the proliferation marker *CycD2* persisted. Caffeine failed to reverse the hyperoxia-induced effects (gray bars), except for *CycD2* at P3_P15. Caffeine with normoxia (light gray bars) modulated the expression levels in a more differential manner. Data are normalized to the level of rat pups exposed to normoxia at each time point (control 100%, white bars). $n = 6-8/\text{group}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs. control; # $p < 0.01$ and ### $p < 0.0001$ vs. hyperoxia (ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; Kruskal-Wallis, Dunn's *post hoc* test; Brown-Forsythe, Dunn's *post hoc* test).

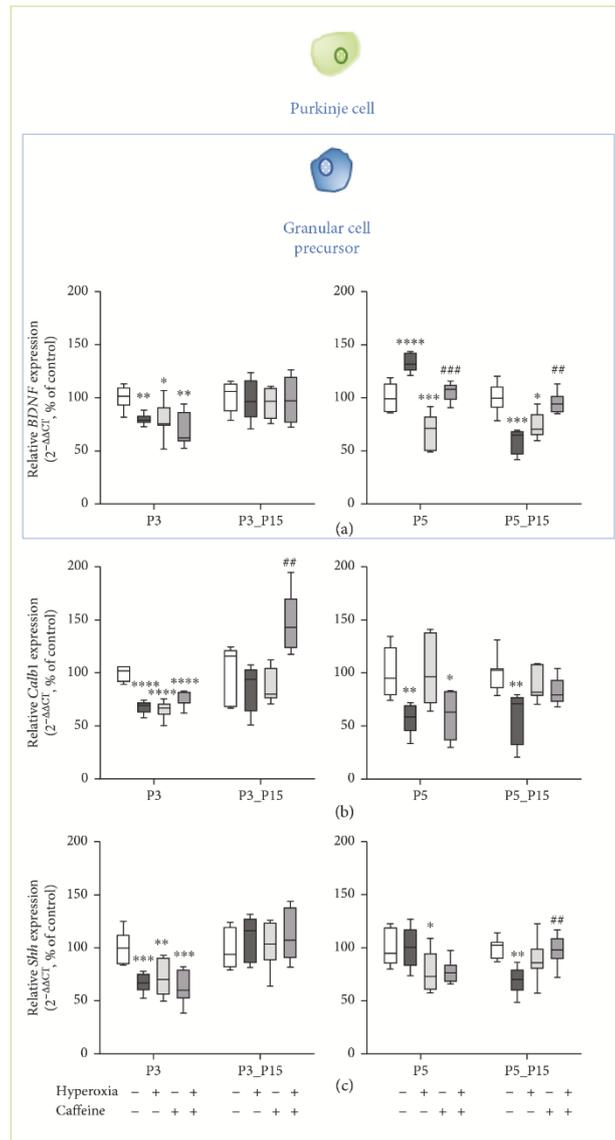


FIGURE 7: Quantification of cerebellar homogenates for granule cell precursor- and/or Purkinje cell-associated mediators of (a) *BDNF*, (b) *Calb1*, and (c) *Shh* was performed with qPCR for 3 days' postnatal oxygen exposure (P3) and recovery (P3_P15) and 5 days' postnatal oxygen exposure (P5) and recovery (P5_P15), respectively. Acute hyperoxia exposure (deep dark gray bars) decreased the mRNA expression at P3 and/or P5, except for *BDNF* with an increase at P5. At P15, the reduction of *Calb1* persisted after three-day oxygen exposure (P3_P15), or the reduction of *BDNF*, *Calb1*, and *Shh* evolved after five-day oxygen exposure (P5_P15). Caffeine most antagonized hyperoxia-induced effects (gray bars) after recovery for *BDNF* and *Shh* at P5_P15 but reduced the overexpressed levels of *BDNF* at P5. Caffeine with normoxia (light gray bars) modulated the expression levels in a more differential manner. Data are normalized to the level of rat pups exposed to normoxia at each time point (control 100%, white bars). $n = 6-8/\text{group}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs. control; # $p < 0.01$ and ## $p < 0.001$ vs. hyperoxia (ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; Kruskal-Wallis, Dunn's *post hoc* test; Brown-Forsythe, Dunnett's *post hoc* test).

and *CyclinD2* (Figure 6(b)) at P5. Decreased expression after hyperoxic injury persisted after recovery until postnatal day 15 (P15) only for *Cyclin D2* at P3_P15 and at P5_P15 (Figure 6(b)), respectively. Caffeine was not able to immediately attenuate the oxidative stress, except for *CyclinD2*. Animals that experienced hyperoxia after application of caffeine even showed higher expression levels (Figure 6(b)). FGF8 plays an important role in early developmental stages and structural polarity prior to cerebellar specification [28], and in conclusion, no expression was detected at P15 time points. The complete data are shown in full in a supplementary table (see Table S-3).

GCP-associated cerebral developmental factors for proliferation and migration were strongly affected by acute hyperoxia, whereas caffeine only restored the proliferation marker after recovery to room air.

3.4. Caffeine Does Not Alter Morphogen and Neurotrophin Granular Cell Progenitor-Associated Downregulation Caused by Acute Hyperoxia. Gene expression of *BDNF* (Figure 7(a)) and *Shh* (Figure 7(c)) was significantly decreased after acute exposure to hyperoxia at P3, as well as gene expression of *Calb1* at P3 and P5 (Figure 7(b)). Three-day hyperoxia did not persist after recovery to room air, whereas five-day exposure to oxygen (P5_P15) significantly decreased *BDNF* (Figure 7(a)) and *Shh* (Figure 7(c)) expression after 10 days of recovery and continued to suppress *Calb1* expression (Figure 7(b)).

No protective caffeine effect to mitigate hyperoxia injury was detected at P3 or P5, but after recovery at P15 and high oxygen exposure for five postnatal days (P5_P15), increased caffeine gene expression of *BDNF* and *Shh* (Figures 7(a) and 7(c)) was found. Caffeine under normoxic exposure decreased significant expression of *BDNF* (Figure 7(a)), *Calb1* (Figure 7(b)), and *Shh* (Figure 7(c)) at P3 and for *BDNF* (Figure 7(a)) and *Shh* (Figure 7(c)) at P5, respectively. The complete data are shown in full in a supplementary table (see Table S-4).

Hyperoxic insult significantly reduced GPC-relevant transcripts of the neurotrophin *BDNF* and the mitogen *Shh* and could be protected by caffeine exclusively after recovery in room air after five days of hyperoxia.

3.5. Caffeine Has Only Minimal Effects on Hyperoxia-Injured Mediators of Cerebral Development of Mitotic and Postmitotic Granular Cells. High oxygen exposures for the first three or five days of life significantly reduced mRNA transcription of *Pax6* (Figure 8(a)), of *Chd7* (Figure 8(b)), and of *NeuroD1* (Figure 8(c)), as well as *NeuN* (Figure 8(d)) at P3 and/or P5. This decreased gene expression persisted after recovery to room air for the three-day exposure period for *Pax6* (Figure 8(a)), for *NeuroD1* (Figure 8(c)), and for *NeuN* (Figure 8(d)) at P3_P15. After five days of oxygen exposure at P5_P15, expression increased significantly for *NeuroD1* (Figure 8(c)) and for *NeuN* (Figure 8(d)). Caffeine did change the effects after acute exposures at P3 and P5 but induced higher expression of *Pax6* (Figure 8(a)), of *NeuN* (Figure 8(d)), and of *Prox1* (Figure 8(e)) at P3_P15 and counteracted with lower transcription levels at P5_P15 (Figures 8(c) and 8(d)). Multiple administration of caffeine under control

conditions also decreased expression at P3 for *Pax6* (Figure 8(a)), for *Chd7* (Figure 8(b)), for *NeuroD1* (Figure 8(c)), and for *Prox1* (Figure 8(e)) at P3, as well as for *NeuN* (Figure 8(d)) and *Prox1* (Figure 8(e)) at P5. This inhibition of transcription with caffeine persisted for *Pax6* (Figure 8(a)), for *NeuroD1* (Figure 8(c)), and for *NeuN* (Figure 8(d)) at P3_P15. Interestingly, under normoxia, caffeine induced the expression of *Pax6* (Figure 8(a)) and *Chd7* (Figure 8(b)) at P5, as well as *NeuroD1* (Figure 8(c)) and *NeuN* (Figure 8(d)) at P5_P15. The complete data are shown in full in a supplementary table (see Table S-5).

Neuronal factors for granular cell development and survival were markedly downregulated by oxygen toxicity, with protective caffeine effects detectable, if at all, after recovery to room air.

3.6. Caffeine Does Not Affect the Hyperoxia-Impaired Expression of Developmental Mediators of Migrating and Mature Granule Cells. *Pax2* mRNA transcription is reduced under hyperoxic conditions after acute hyperoxia at P3 and P5 and persisted until P3_P15 (Figure 9(a)). *NeuroD2* was unaffected by three-day postnatal exposure, but five-day oxygen treatment reduced *NeuroD2* and resulted in aberrant expression (Figure 9(b)) after recovery in room air (P5_P15). High oxygen reduced *Syp* transcription only at P3 (Figure 9(c)), whereas *Sox2* showed downregulation only at P5_P15 (Figure 9(d)). Caffeine under hyperoxic impact did not show counteracting effects but also showed inhibitory effects similar to oxygen alone (*Syp* at P3 (Figure 9(c)), *Pax2* (Figure 9(a)), and *NeuroD2* (Figure 9(b)) at P5) or increased gene expression for *Sox2* at P3_P15 (Figure 9(d)) and P5_P15 (Figure 9(d)) or decreased for *NeuroD2* (Figure 9(b)) at P5_P15. Immediately after multiple applications of caffeine under normoxic conditions, transcription of *Syp* reduced at P3 (Figure 9(c)) and of *NeuroD2* (Figure 9(b)) and *Syp* (Figure 9(c)) at P5, while enhanced *Pax2* (Figure 9(a)) and *NeuroD2* was found at P5_P15 (Figure 9(b)). The complete data are shown in full in a supplementary table (see Table S-6).

Hyperoxia, acute as well as after recovery under normoxia, reduced neuronal factors for further differentiation and survival of mature granule cells, whereas no protective effect of caffeine was detectable.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated the hyperoxic impairment of complex cerebellar neurogenesis of granular cells and essential calbindin expressing Purkinje cells with the neuronal and proliferative markers investigated here, as well as highlighting the protective effects of caffeine (see schematic illustration Figure 10). The number of PCs was greatly reduced in the oxygen-stressed postnatal cerebellum, and the GC precursors of the EGL were also drastically reduced at acute exposure times of 80% oxygen, with the peak of GC precursor proliferation at approximately P6 [29, 56]. This is then accompanied by severely reduced *Shh* transcription due to oxidative stress. Hyperoxia beginning at the time of birth also impaired cerebral proliferative capacity. This was reflected by reductions in factors important for cell cycle

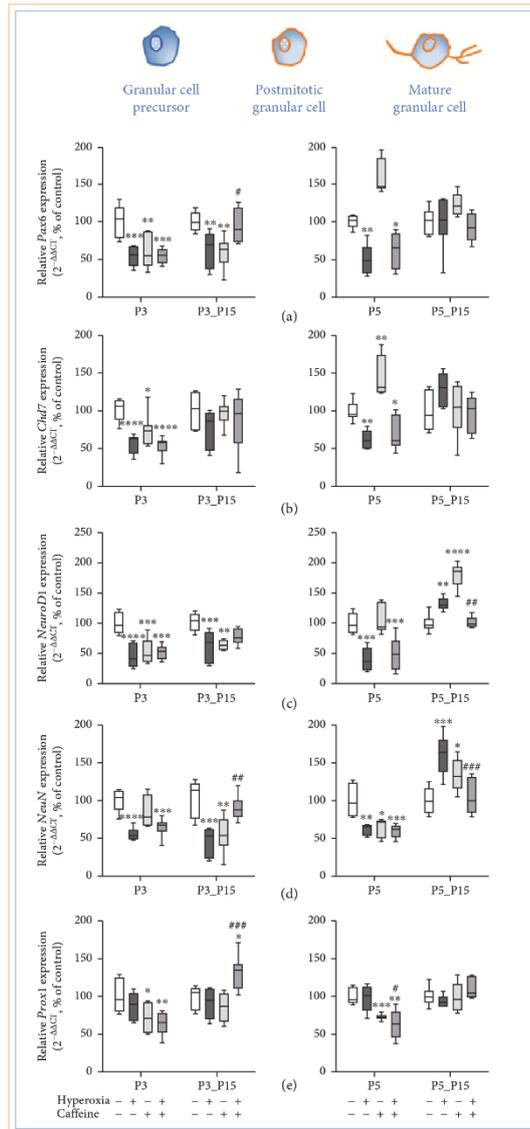


FIGURE 8: Quantification of cerebellar homogenates for granule cell precursor- and granule cell-associated mediators of (a) *Pax6*, (b) *Chd7*, (c) *NeuroD1*, (d) *NeuN*, and (e) *Prox1* was performed with qPCR for 3 days' postnatal oxygen exposure (P3) and recovery (P3_P15) and 5 days' postnatal oxygen exposure (P5) and recovery (P5_P15), respectively. Acute hyperoxia exposure (deep dark gray bars) decreased the mRNA expression at P3 and P5, except for *Prox1*. At P15, the reduction of *Pax6*, *NeuroD1*, and *NeuN* persisted after three-day oxygen exposure (P3_P15), as did the increased expression *NeuroD1* and *NeuN* after five-day oxygen exposure (P5_P15). Caffeine rescued the transcription in comparison to hyperoxia-exposed group (gray bars) for *Pax6*, *NeuN*, and *Prox1* at P3_P15. Caffeine with normoxia (light gray bars) modulated the expression levels in a more differential manner. Data are normalized to the level of rat pups exposed to normoxia at each time point (control 100%, white bars). $n = 6-8/\text{group}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs. control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ vs. hyperoxia (ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; Kruskal-Wallis, Dunn's *post hoc* test; Brown-Forsythe, Dunnett's *post hoc* test).

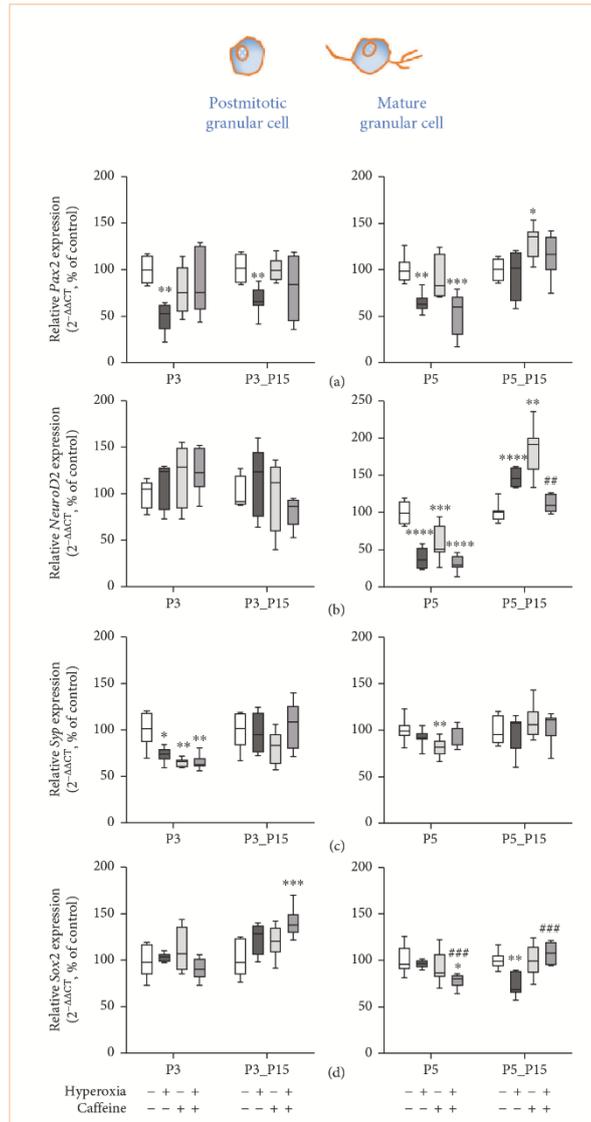


FIGURE 9: Quantification of cerebellar homogenates for postmitotic and mature granule cell-associated mediators of (a) *Pax2*, (b) *NeuroD2*, (c) *Syp*, and (d) *Sox2* was performed with qPCR for 3 days' postnatal oxygen exposure (P3) and recovery (P3_P15) and 5 days' postnatal oxygen exposure (P5) and recovery (P5_P15), respectively. Acute hyperoxia exposure (deep dark gray bars) decreased the mRNA expression for *Pax2* and *Syp* at P3 and for *Pax2* and *NeuroD2* at P5. At P15, the reduction of *Pax2* persisted after three-day oxygen exposure (P3_P15), evolved after five-day oxygen exposure for *Sox2* (P5_P15) or the expression increased of *NeuroD2* (P5_P15). Caffeine reverted the altered transcription in comparison to hyperoxia-exposed group (gray bars) for *NeuroD2* and *Sox2* at P5_P15. Caffeine with normoxia (light gray bars) modulated the expression levels in a more differential manner. Data are normalized to the level of rat pups exposed to normoxia at each time point (control 100%, white bars). n=6-8/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ vs. control; # $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ vs. hyperoxia (ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; Kruskal-Wallis, Dunn's *post hoc* test; Brown-Forsythe, Dunnett's *post hoc* test).

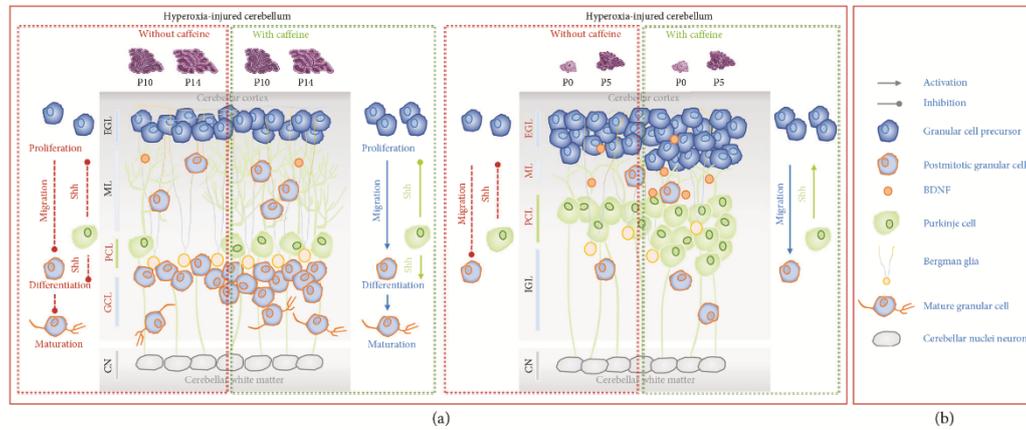


FIGURE 10: Schematic illustration of hyperoxia-injured rodent postnatal granular cell neurogenesis with and without caffeine treatment. (a) Hyperoxia reduced granule cell precursors (GPC) and Purkinje cells (PC) in the external granular layer (EGL) and Purkinje cell layer (PCL), respectively (up to P5, dashed red left box). Due to the influence of the high oxygen concentration, the dendrites of the PC were reduced and this resulted in a thinner molecular layer (ML), also after acute hyperoxia. The morphological changes persisted even after recovery in room air until the end of the second week of life (up to P15) and were expressed in reduced PC counts (dashed red right box). Concomitantly, the transcript levels of granular cell-type- and PC cell-specific markers were reduced (see result section). In addition, due to the reduced proliferative capacity after hyperoxia, it seems very likely that essential processes of cerebellar neurogenesis such as migration, proliferation, differentiation, dendritogenesis, and synaptogenesis are damaged by the early oxygen insult (red dashed lines, inhibition). Caffeine (dashed green left and right boxes) was able to reduce the effects of oxidative stress with respect to PCs, GPCs, and mitotic stages of GCs (green and blue lines, activation) but otherwise showed poor protective effects on granular cell neurogenesis (see Results). (b) Cellular players in cerebellar granular cell neurogenesis.

control, displayed by PCNA and *CycD2*. Postnatal between birth and P5, GPCs divide, increasing in number and thus enlarging the forming cerebellar lobules. Whereas after anatomical cerebellar development is complete, GPC divisions were downregulated until P15 as they exit the cell cycle, differentiate, and migrate [57]. The importance of Shh for cerebellar proliferation was also demonstrated by the work of Haldipur and colleagues [58]. Inhibition of Shh signaling resulted in a thinner EGL and also significantly minimized PCNA-positive cells and hindered further cell divisions [58]. Short-term exposure to high oxygen of newborn rats at P6 for 24 hours was also sufficient to sustainably reduce Shh and *CycD2* through the influence of oxygen toxicity [59]. Our data revealed that GPCs are dramatically decreased in the oxidative stress response situation. The impaired proliferative capacity may affect subsequent processes, such as migration or further differentiation.

In this study, we examined several transcripts that are essential for further GPC development, survival, and GC migration from the EGL to the GCL. Hyperoxia for three days reduced the neurotrophic BDNF transcripts, but normal levels were established after recovery. Meanwhile, five-day hyperoxia first induced BDNF but then led to long-term downregulation. BDNF directly stimulates GPC migration [60] and BDNF forms a concentration gradient from EGL to GCL [61]. It would be possible that BDNF counterregulation at P5 under hyperoxia represents transcripts for proBDNF that are opposite in function to those of mature BDNF [62]. Thus, the absence of

BDNF, only one of regulating factor of GC attraction [63], may affect the integration of GC into MCL. Coworkers of BDNF in GC-migration regulation are factors such as stromal cell-derived factor 1 (SDF1) [64, 65] or Ephrins [66]. NeuroD2 is essential for the survival of mature GC, while NeuroD1 assumes a key role in terminating the proliferation of GCPs to thereby initiate postmitotic GC migration [67, 68]. Depletion of NeuroD2 during the vulnerable postnatal period impaired GC survival and PC formation of synapses [68]. Alongside the decreased BDNF expression under postnatal hyperoxic conditions, we also demonstrated a dramatic reduction in NeuroD1 and NeuroD2 transcripts. Salero and Hatten examined the role of BDNF in *embryonic stem* cells, in which BDNF treatment of mitotic GCP induced postmitotic NeuroD expression [69]. *Chd7* is highly expressed in GCs during cerebellar development and persists in the mature cerebellum, whereas PCs do not express *Chd7* [70]. Mouse studies revealed the mechanism of cerebellar abnormalities caused by loss of function of *Chd7*. Similarly, heterozygous *Chd7* mutation resulted in reduced expression of the key signaling molecule FGF8, which is essential for cerebellar development [70, 71], and FGF8 is able to induce postnatal GCP proliferation in the absence of Shh ligand [72]. In this study, both *Chd7* and *FGF8* were dramatically downregulated by oxygen toxicity, with no detectable changes after recovery to room air.

The initiation of cerebellar neurogenesis from tangential to radial migration along the Bergman glia of postmitotic

GCs is mediated by Sema6a [73]. Functional disruption results in incomplete accumulation of mature GCs in the GCL [74]. The migration-regulating factor Lmx1a [31] is required for cerebellar formation [75] and postnatal development [76]. Cell type-specific markers were used to identify different cerebellar populations: Pax2 (GABAergic molecular layer interneurons [77, 78]), NeuN and Sox2 (differentiating GCPs [79, 80]), Prox1 (GCs [81]), and finally Syp (synaptogenesis, synaptic density [82, 83]). Essential to the underlying functions of the cerebellum are the highly organized circuits through the synaptic systems [84, 85]. All of these transcripts were detected to have decreased expression immediately after oxygen exposure and/or after recovery from exposure to high oxygen concentrations. In the context of cerebellar neurogenesis under the influence of oxygen toxicity, little is currently known about neuronal markers. When Sox2 is expressed in neuronal progenitors, it is postulated that it is downregulated during the start of differentiation and thus during the transition to postmitotic stages [86, 87]. In humans, cerebellar Sox2 expression is strong during pregnancy from week 20 to week 24 and decreases continuously until birth [88]. A rat injured model with cerebral ischemia undergoes the cerebellum specific and dynamic changes at the cellular level including cell proliferation and synaptogenesis. Jung et al. demonstrated a correlation between cerebellar proliferation capacity and expression of Syp [89].

A major factor that plays a predominant role in the molecular architecture of the developing cerebellum, not only for GC, is Pax6 [77]. Pax6 is expressed in granule progenitor cells (GCPs) that can differentiate into cerebellar nuclear neurons and postmitotic and mature granule cells as well as unipolar brush cells [90]. Pax6 regulates the migration and differentiation of GCs [90, 91]. Abnormalities of Pax6 are associated with aberrant organization of EGL or impaired cell cycle regulation [77, 90]. Nonetheless, these are all elementary players in cerebellar neurogenesis during a sensitive period of development. Impairments due to exogenous factors or physiological environmental changes suggest that changes may occur. We have already demonstrated that oxygen toxicity damages these types of processes in hippocampal neurogenesis in the 6-day-old rat model. Oxidative stress thereby reduced the expression of necessary transcription factors such as Pax6 and Prox1 and resulted in delayed neuronal maturation in the dentate gyrus [48, 92].

But ultimately, the results generated for relevant cerebral processes, such as migration or differentiation, or their mediators during cerebellar development were not surprising for hyperoxic injury but were completely unexpected for the hypothesized and expected caffeine effect.

Caffeine was able to reverse the hyperoxia-induced reduction of PCs and GPCs as well as the inhibition of proliferation at the cellular level, especially when oxygen had not acted on the developing cerebellum for more than three days. Caffeine already showed a short-term and transient better outcome for neurodevelopmental disorders in clinical studies of premature infants [42, 43, 93]. Considering the possible underlying mechanisms and properties of caffeine, antioxidant mechanisms of action and downstream probably anti-inflammatory as well as antiapoptotic effects are in the foreground [47–50, 92, 94]. Whether the mediation occurs

directly via adenosine receptors [95] or indirectly through oxidative stress and/or ER stress reduction has not yet been conclusively clarified [48, 96, 97]. However, it has been clearly shown that caffeine has demonstrated this protection during vulnerable phases of brain development and it seems that caffeine has neuromodulatory properties [49, 98].

The complex interplay of diverse mechanisms during brain development and neuronal redox homeostasis determines neuronal susceptibility to oxidative stress in a dynamic dependence [99]. Oxidative stress is an inevitable factor in premature birth due to the transition from intrauterine hypoxia to extrauterine hyperoxia. Redox signaling is a critical aspect and is increasingly discussed in relation to therapeutic approaches in prematurity. Apart from caffeine-driven direct or indirect mechanisms, primarily the Nrf2/NfκB pathway seems to be important for intracellular transduction. Oxidative stress-associated genes, oxidative stress per se but also neuronal signal transduction, transcriptional regulation, and thus neuronal functions may be affected by methylxanthines [100].

Summarizing the generated caffeine effects on the hyperoxia-damaged postnatal cerebellum in this study, we see exclusively counteracting oxygen-damaging effects for the PCs at the cellular level and for the proliferating GCP. All downstream transcripts were hardly affected at all by caffeine. Sometimes, we detected a positive effect after recovery to room air, mainly when the oxygen insult was only three days long. Vogel et al. postulated that there is a constant ratio of GCs for each PC, suggesting that the number of GCs is regulated by the number and duration of Shh secretion by PCs [101]. Under hyperoxia, both PC number and, in correlation with this, the amount of Shh are reduced, from which the reduction of Pax6-positive and proliferating GCP could be explained.

Pax6 itself has neurogenic functions and is closely associated with the modulatory capabilities of the cell cycle; initiating the exit from the cell cycle to begin differentiation and modulate downstream transcripts directly or indirectly [102–104]. Downregulated Pax6 could be rescued by caffeine after three days of hyperoxia, which was maintained until P15. Five-day hyperoxia also reduced Pax6, and caffeine brought it to normoxia levels. Downstream transcripts did not benefit and remained decreased under hyperoxia with caffeine, but this consistently affected factors also expressed by GCP. Mature neuronal markers were more likely to be affected after prolonged injury, possibly based on the Pax6 peak at P6 [104].

Aspects that need to be mentioned in the discussion are the influence of caffeine on other receptors, such as interactions with γ -aminobutyric acid type A receptors; the influence of kinetic/dynamic expression profiles of adenosine receptors and the adenosinergic system during postnatal brain development [105]; varying oxygen environments in neonatal brain areas, which may alter the caffeine pharmacodynamics and even reverse the benefits of caffeine [106, 107]; and dedifferentiation of GCPs into astroglia cells [108], as well as a systemic inflammation from oxidative stress or even caffeine, which is known to have adverse effects on the developing brain, and which, coupled with a proinflammatory cytokine profile in preterm infants treated

with higher doses of caffeine, may be responsible for the deleterious effects on the cerebellum [109, 110].

Similarly, caffeine exhibited inappropriate side effects in clinical and preclinical studies, as well as impaired dendrite length of PCs as well as transcripts mainly of postmitotic and differentiated GCs detected in this study. Early high-dose caffeine demonstrated a higher incidence of cerebellar injury and early motor performance [109]. High caffeine citrate increased total dendritic length and arborization of layer III pyramidal neurons of the prefrontal cortex at P35 and P70 of newborn rat pups when administrated at P1 to P12 [111]. Decreased cerebellar weight and increased saturated fatty acid concentration of the cerebellum were detected after caffeine citrate administration to newborn rats for ten postnatal days [112]. Moderate caffeine administrated to rat pups from P2 until P6 decreased adenosine receptor subtype A1 binding in the molecular layer of cerebellum [113].

PCs and GCs are closely related during cerebellar neurogenesis, and Pax6 plays a central role in regulating differentiation processes. A reduced GCP proliferation capacity would lead one to expect a reduced number of mature GCs, as shown by Iskusnykh and colleagues in preterm pigs compared to term pigs [114].

The survival of premature infants with good quality of life is in focus, and an important aspect is the controlled therapy with oxygen. Due to the imbalance of oxidative stress and the underdeveloped antioxidant enzyme system, the effects of oxygen toxicity as well as the use of drugs on cerebellar development are almost inevitable [17, 59, 115, 116]. Impaired GC neurogenesis is able to reshape and modulate downstream targets, which can lead to cerebellar downstream circulatory dysfunction [117]. Cognitive-motor, social-emotional, and linguistic deficits can be attributed to disorders of the cerebellum during this dynamic phase [26, 118, 119].

Neuron-glia communication is required for brain functioning and essential during early neurodevelopment. PC loss and GCP reduction were recovered with caffeine, but the trailed worse effect of caffeine on hyperoxia-damaged GC-relevant transcripts needs further investigation, as caffeine itself did not affect GCPs and PCs.

Since caffeine has so far demonstrated good therapeutic effects in the clinical setting of preterm infants as well as in *in vitro* and *in vivo* studies, the protective properties predominate, although further studies on caffeine with regard to possible pleiotropic effects appear necessary.

Preterm birth disrupts cerebellar development. Systemic oxidative stress caused by premature birth appears to be a major contributor to damage to neuronal developmental stages. Here, we were able to show that oxidative stress could significantly damage the cerebellar neurogenesis in the postnatal rat brain with regard to GCPs and PCs. The supposed cellular neuronal damage is reversible, whereby it subjectively cancels itself again and can be rationally more effective through the treatment with caffeine. Downstream transcripts classified for migration and differentiation of postmitotic GCs appear to be irreversibly reduced. The hypothesis that caffeine had unlimited neuroprotective effects under oxidative stress in the cerebellum could not be confirmed in comparison to other brain regions. The protection of neurons that we

observed in the postnatal hyperoxic-injured hippocampus after early-life caffeine exposure was not seen in the cerebellum [48, 49]. This difference might be attributable to different oxygen environments, varying levels of vulnerability dependent on the developmental stage, varying transcriptional regulation of redox-sensitive response to oxygen toxicity, varying of receptor density, and/or proinflammatory insult compared to other brain regions.

With regard to the discussion about the preventive use of caffeine in ventilated premature infants, the restrictions that caffeine initiates under control conditions must be taken into account. Differentiated clinical observations on the long-term outcome seem essential to ensure the safe use of this standard therapeutic agent.

5. Conclusions

We show that oxidative stress can damage the cerebellar neurogenesis in the postnatal rat brain with regard to GCPs and PCs. The cellular neuronal damage is partly reversible and rescued by caffeine. However, downstream transcripts important for migration and differentiation of postmitotic GCs are irreversibly reduced by oxidative stress, and this effect is not rescued by caffeine. The protection of neurons that we observed in the postnatal hyperoxic-injured hippocampus after early-life caffeine exposure was not seen in the cerebellum. This difference might be attributable to different oxygen environments, varying levels of vulnerability dependent of developmental stage, varying transcriptional regulation of redox-sensitive response to oxygen toxicity, and varying of receptor density and/or proinflammatory insult compared to other brain regions.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request. The analyzed data used to create the graphs and statistical evaluation are attached in the supplemented material of this work.

Ethical Approval

All animal procedures were approved by the local animal welfare authorities (LAGeSo, approval number G-0088/16) and followed institutional guidelines.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the employer, Department of Neonatology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany, and by one grant by the Förderverein für Frühgeborene an der Charité e.V. and Sonnenfeld Stiftung, Berlin, Germany.

Supplementary Materials

All basic data of the created diagrams are available in the following supplementary tables (Tables S1–S6). (*Supplementary Materials*)

References

- [1] J. L. Y. Cheong, J. E. Olsen, L. Huang et al., "Changing consumption of resources for respiratory support and short-term outcomes in four consecutive geographical cohorts of infants born extremely preterm over 25 years since the early 1990s," *BMJ Open*, vol. 10, no. 9, article e037507, 2020.
- [2] B. J. Stoll, N. I. Hansen, E. F. Bell et al., "Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993–2012," *JAMA*, vol. 314, no. 10, pp. 1039–1051, 2015.
- [3] D. K. Thompson, C. E. Kelly, J. Chen et al., "Early life predictors of brain development at term-equivalent age in infants born across the gestational age spectrum," *NeuroImage*, vol. 185, pp. 813–824, 2019.
- [4] A. Pascal, P. Govaert, A. Oostra, G. Naulaers, E. Ortibus, and C. Van den Broeck, "Neurodevelopmental outcome in very preterm and very-low-birthweight infants born over the past decade: a meta-analytic review," *Developmental Medicine and Child Neurology*, vol. 60, no. 4, pp. 342–355, 2018.
- [5] J. L. Y. Cheong, J. E. Olsen, K. J. Lee et al., "Temporal trends in neurodevelopmental outcomes to 2 years after extremely preterm birth," *JAMA Pediatrics*, vol. 175, no. 10, pp. 1035–1042, 2021.
- [6] D. Kanel, L. D. Vanes, D. Pecheva et al., "Neonatal white matter microstructure and emotional development during the preschool years in children who were born very preterm," *eNeuro*, vol. 8, no. 5, 2021.
- [7] L. W. Doyle, A. Spittle, P. J. Anderson, and J. L. Y. Cheong, "School-aged neurodevelopmental outcomes for children born extremely preterm," *Archives of Disease in Childhood*, vol. 106, no. 9, pp. 834–838, 2021.
- [8] S. L. Miller, P. S. Huppi, and C. Mallard, "The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome," *The Journal of Physiology*, vol. 594, no. 4, pp. 807–823, 2016.
- [9] S. Bolisetty, A. Dhawan, M. Abdel-Latif et al., "Intraventricular hemorrhage and neurodevelopmental outcomes in extreme preterm infants," *Pediatrics*, vol. 133, no. 1, pp. 55–62, 2014.
- [10] N. Boronat, M. Aguar, D. Rook et al., "Survival and neurodevelopmental outcomes of preterms resuscitated with different oxygen fractions," *Pediatrics*, vol. 138, no. 6, 2016.
- [11] M. M. Elgendy, S. Puthuraya, C. LoPiccolo, W. Liu, H. Aly, and S. Karnati, "Neonatal stroke: clinical characteristics and neurodevelopmental outcomes," *Pediatrics & Neonatology*, vol. 63, no. 1, pp. 41–47, 2022.
- [12] N. M. Jiang, M. Cowan, S. N. Moonah, and W. A. Petri, "The impact of systemic inflammation on neurodevelopment," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 24, no. 9, pp. 794–804, 2018.
- [13] C. Sacchi, C. Marino, C. Nosarti, A. Vieno, S. Visentin, and A. Simonelli, "Association of intrauterine growth restriction and small for gestational age status with childhood cognitive outcomes: a systematic review and meta-analysis," *JAMA Pediatrics*, vol. 174, no. 8, pp. 772–781, 2020.
- [14] M. Hammerl, M. Zagler, E. Griesmaier et al., "Reduced cerebellar size at term-equivalent age is related to a 17% lower mental developmental index in very preterm infants without brain injury," *Neonatology*, vol. 117, no. 1, pp. 57–64, 2020.
- [15] M. C. Aisa, A. Barbati, S. Gerli et al., "Brain 3D-echographic early predictors of neuro-behavioral disorders in infants: a prospective observational study," *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, vol. 35, no. 4, pp. 642–650, 2022.
- [16] K. Pieterman, T. J. White, G. E. van den Bosch et al., "Cerebellar growth impairment characterizes school-aged children born preterm without perinatal brain lesions," *American Journal of Neuroradiology*, vol. 39, no. 5, pp. 956–962, 2018.
- [17] E. W. Y. Tam, "Cerebellar injury in preterm infants," *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 155, pp. 49–59, 2018.
- [18] L. M. Hortensius, A. B. C. Dijkshoorn, G. M. Ecury-Goossen et al., "Neurodevelopmental consequences of preterm isolated cerebellar hemorrhage: a systematic review," *Pediatrics*, vol. 142, no. 5, 2018.
- [19] A. F. Duncan, C. M. Bann, A. Dempsey et al., "Behavioral deficits at 18–22 months of age are associated with early cerebellar injury and cognitive and language performance in children born extremely preterm," *The Journal of Pediatrics*, vol. 204, pp. 148–156.e4, 2019.
- [20] J. D. Schmahmann, "The cerebellum and cognition," *Neuroscience Letters*, vol. 688, pp. 62–75, 2019.
- [21] M. J. van Essen, S. Nayler, E. B. E. Becker, and J. Jacob, "Deconstructing cerebellar development cell by cell," *PLoS Genetics*, vol. 16, no. 4, article e1008630, 2020.
- [22] M. Brossard-Racine, A. J. du Plessis, and C. Limperopoulos, "Developmental cerebellar cognitive affective syndrome in ex-preterm survivors following cerebellar injury," *Cerebellum*, vol. 14, no. 2, pp. 151–164, 2015.
- [23] J. Garfinkle, T. Guo, A. Synnes et al., "Location and size of preterm cerebellar hemorrhage and childhood development," *Annals of Neurology*, vol. 88, no. 6, pp. 1095–1108, 2020.
- [24] C. Limperopoulos, G. Chilingaryan, N. Sullivan, N. Guizard, R. L. Robertson, and A. J. du Plessis, "Injury to the premature cerebellum: outcome is related to remote cortical development," *Cerebral Cortex*, vol. 24, no. 3, pp. 728–736, 2014.
- [25] J. Dobbing and J. Sands, "Comparative aspects of the brain growth spurt," *Early Human Development*, vol. 3, no. 1, pp. 79–83, 1979.
- [26] J. J. Volpe, "Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important," *Journal of Child Neurology*, vol. 24, no. 9, pp. 1085–1104, 2009.
- [27] C. H. Chang, F. M. Chang, C. H. Yu, H. C. Ko, and H. Y. Chen, "Assessment of fetal cerebellar volume using three-dimensional ultrasound," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 26, no. 6, pp. 981–988, 2000.
- [28] K. Leto, M. Arancillo, E. B. Becker et al., "Consensus paper: cerebellar development," *Cerebellum*, vol. 15, no. 6, pp. 789–828, 2016.
- [29] J. S. Espinosa and L. Luo, "Timing neurogenesis and differentiation: insights from quantitative clonal analyses of cerebellar granule cells," *The Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 10, pp. 2301–2312, 2008.
- [30] S. M. Zimatkin and O. A. Karnyushko, "Synaptogenesis in the developing rat cerebellum," *Neuroscience and Behavioral Physiology*, vol. 47, no. 6, pp. 631–636, 2017.
- [31] G. G. Consalez, D. Goldowitz, F. Casoni, and R. Hawkes, "Origins, development, and compartmentation of the granule

- cells of the cerebellum,” *Frontiers in Neural Circuits*, vol. 14, no. 88, 2021.
- [32] A. Castillo, A. Sola, H. Baquero 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*, vol. 121, no. 5, pp. 882–889, 2008.
- [33] U. H. Thome, J. Dreyhaupt, O. Genzel-Boroviczeny et al., “Influence of P_{CO}₂ control on clinical and neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants,” *Neonatology*, vol. 113, no. 3, pp. 221–230, 2018.
- [34] S. Perrone, M. L. Tataranno, S. Negro et al., “Early identification of the risk for free radical-related diseases in preterm newborns,” *Early Human Development*, vol. 86, 4 pages, 2010.
- [35] Y. S. Lee and Y. H. Chou, “Antioxidant profiles in full term and preterm neonates,” *Chang Gung Medical Journal*, vol. 28, no. 12, pp. 846–851, 2005.
- [36] C. E. Cross, B. Halliwell, E. T. Borish et al., “Oxygen radicals and human disease,” *Annals of Internal Medicine*, vol. 107, no. 4, pp. 526–545, 1987.
- [37] R. Falsaperla, F. Lombardo, F. Filasco et al., “Oxidative stress in preterm infants: overview of current evidence and future prospects,” *Pharmaceuticals*, vol. 13, no. 7, p. 145, 2020.
- [38] B. B. Fredholm, K. Battig, J. Holmen, A. Nehlig, and E. E. Zvartau, “Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use,” *Pharmacological Reviews*, vol. 51, no. 1, pp. 83–133, 1999.
- [39] G. Faudone, S. Arifi, and D. Merk, “The medicinal chemistry of caffeine,” *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 64, no. 11, pp. 7156–7178, 2021.
- [40] S. B. DeMauro, “Neurodevelopmental outcomes of infants with bronchopulmonary dysplasia,” *Pediatric Pulmonology*, vol. 56, no. 11, pp. 3509–3517, 2021.
- [41] B. Schmidt, “Methylxanthine therapy for apnea of prematurity: evaluation of treatment benefits and risks at age 5 years in the international Caffeine for Apnea of Prematurity (CAP) trial,” *Biology of the Neonate*, vol. 88, no. 3, pp. 208–213, 2005.
- [42] B. Schmidt, R. S. Roberts, P. Davis et al., “Caffeine therapy for apnea of prematurity,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 354, no. 20, pp. 2112–2121, 2006.
- [43] B. Schmidt, R. S. Roberts, P. Davis et al., “Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 357, no. 19, pp. 1893–1902, 2007.
- [44] K. P. Kua and S. W. Lee, “Systematic review and meta-analysis of clinical outcomes of early caffeine therapy in preterm neonates,” *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 83, no. 1, pp. 180–191, 2017.
- [45] A. Lodha, R. Entz, A. Synnes et al., “Early caffeine administration and neurodevelopmental outcomes in preterm infants,” *Pediatrics*, vol. 143, no. 1, 2019.
- [46] X. Shi, N. S. Dalal, and A. C. Jain, “Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 29, no. 1, pp. 1–6, 1991.
- [47] S. Endesfelder, E. Strauß, T. Scheuer, T. Schmitz, and C. Bührer, “Antioxidative effects of caffeine in a hyperoxia-based rat model of bronchopulmonary dysplasia,” *Respiratory Research*, vol. 20, no. 1, p. 88, 2019.
- [48] S. Endesfelder, U. Weichelt, E. Strauss et al., “Neuroprotection by caffeine in hyperoxia-induced neonatal brain injury,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 1, p. 187, 2017.
- [49] S. Endesfelder, I. Zaak, U. Weichelt, C. Bührer, and T. Schmitz, “Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 67, pp. 221–234, 2014.
- [50] S. Endesfelder, E. Strauß, I. Bendix, T. Schmitz, and C. Bührer, “Prevention of oxygen-induced inflammatory lung injury by caffeine in neonatal rats,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2020, Article ID 3840124, 19 pages, 2020.
- [51] T. Nagatomo, J. Jimenez, J. Richter et al., “Caffeine prevents hyperoxia-induced functional and structural lung damage in preterm rabbits,” *Neonatology*, vol. 109, no. 4, pp. 274–281, 2016.
- [52] F. Faul, E. Erdfelder, A. G. Lang, and A. Buchner, “G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences,” *Behavior Research Methods*, vol. 39, no. 2, pp. 175–191, 2007.
- [53] C. McPherson, R. E. Lean, P. E. P. Cyr, T. E. Inder, C. E. Rogers, and C. D. Smyser, “Five-year outcomes of premature infants randomized to high or standard loading dose caffeine,” *Journal of Perinatology*, vol. 42, no. 2, pp. 631–635, 2022.
- [54] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [55] C. Gustorff, T. Scheuer, T. Schmitz, C. Bührer, and S. Endesfelder, “GABAB receptor-mediated impairment of intermediate progenitor maturation during postnatal hippocampal neurogenesis of newborn rats,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 15, no. 295, 2021.
- [56] X. Jiao, M. Rahimi Balaei, E. Abu-El-Rub et al., “Reduced granule cell proliferation and molecular dysregulation in the cerebellum of lysosomal acid phosphatase 2 (ACP2) mutant mice,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 6, p. 2994, 2021.
- [57] J. D. Corrales, S. Blaess, E. M. Mahoney, and A. L. Joyner, “The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation,” *Development*, vol. 133, no. 9, pp. 1811–1821, 2006.
- [58] P. Haldipur, I. Sivaprakasam, V. Periasamy, S. Govindan, and S. Mani, “Asymmetric cell division of granule neuron progenitors in the external granule layer of the mouse cerebellum,” *Biology Open*, vol. 4, no. 7, pp. 865–872, 2015.
- [59] T. Scheuer, Y. Sharkovska, V. Tarabykin et al., “Neonatal hyperoxia perturbs neuronal development in the cerebellum,” *Molecular Neurobiology*, vol. 55, no. 5, pp. 3901–3915, 2017.
- [60] P. R. Borgesani, J. M. Peyrin, R. Klein et al., “BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells,” *Development*, vol. 129, no. 6, pp. 1435–1442, 2002.
- [61] P. Zhou, M. Porcionatto, M. Pilapil et al., “Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors,” *Neuron*, vol. 55, no. 1, pp. 53–68, 2007.
- [62] Z.-Q. Xu, Y. Sun, H.-Y. Li, Y. Lim, J.-H. Zhong, and X.-F. Zhou, “Endogenous proBDNF is a negative regulator of migration of cerebellar granule cells in neonatal mice,” *European Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 8, pp. 1376–1384, 2011.
- [63] B. Rico, B. Xu, and L. F. Reichardt, “TrkB receptor signaling is required for establishment of GABAergic synapses in the

- cerebellum," *Nature Neuroscience*, vol. 5, no. 3, pp. 225–233, 2002.
- [64] T. Yu, H. Huang, and H. F. Li, "Stromal cell-derived factor-1 promotes migration of cells from the upper rhombic lip in cerebellar development," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 88, no. 13, pp. 2775–2786, 2010.
- [65] K. Reiss, R. Mentlein, J. Sievers, and D. Hartmann, "Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer," *Neuroscience*, vol. 115, no. 1, pp. 295–305, 2002.
- [66] T. G. Heintz, R. Eva, and J. W. Fawcett, "Regional regulation of Purkinje cell dendritic spines by integrins and Eph/ephrins," *PLoS One*, vol. 11, no. 8, article e0158558, 2016.
- [67] T. Butts, M. Hanzel, and R. J. Wingate, "Transit amplification in the amniote cerebellum evolved via a heterochronic shift in NeuroD1 expression," *Development*, vol. 141, no. 14, pp. 2791–2795, 2014.
- [68] A. Pieper, S. Rudolph, G. L. Wieser et al., "NeuroD2 controls inhibitory circuit formation in the molecular layer of the cerebellum," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 1448, 2019.
- [69] E. Salero and M. E. Hatten, "Differentiation of ES cells into cerebellar neurons," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 8, pp. 2997–3002, 2007.
- [70] W. Feng, D. Kawauchi, H. Körkel-Qu et al., "Chd7 is indispensable for mammalian brain development through activation of a neuronal differentiation programme," *Nature Communications*, vol. 8, no. 1, article 14758, 2017.
- [71] M. A. Basson, "Epistatic interactions between Chd7 and Fgf8 during cerebellar development: implications for CHARGE syndrome," *Rare Diseases*, vol. 2, no. 1, article e28688, 2014.
- [72] T. Jiwani, J. J. Kim, and N. D. Rosenblum, "Suppressor of fused (Sufu) controls cerebellum granule cell proliferation by suppressing Fgf8 and spatially regulating Gli proteins," *Development*, vol. 147, no. 3, 2020.
- [73] G. Kerjan, J. Dolan, C. Haumaitre et al., "The transmembrane semaphorin Sema6A controls cerebellar granule cell migration," *Nature Neuroscience*, vol. 8, no. 11, pp. 1516–1524, 2005.
- [74] J. Renaud, G. Kerjan, I. Sumita et al., "Plexin-A2 and its ligand, Sema6A, control nucleus-centrosome coupling in migrating granule cells," *Nature Neuroscience*, vol. 11, no. 4, pp. 440–449, 2008.
- [75] M. Kuwamura, T. Muraguchi, T. Matsui et al., "Mutation at the *Lmx1a* locus provokes aberrant brain development in the rat," *Brain Research. Developmental Brain Research*, vol. 155, no. 2, pp. 99–106, 2005.
- [76] H. L. Zou, C. J. Su, M. Shi et al., "Expression of the LIM-homeodomain gene *Lmx1a* in the postnatal mouse central nervous system," *Brain Research Bulletin*, vol. 78, no. 6, pp. 306–312, 2009.
- [77] J. Yeung, T. J. Ha, D. J. Swanson, and D. Goldowitz, "A novel and multivalent role of Pax6 in cerebellar development," *The Journal of Neuroscience*, vol. 36, no. 35, pp. 9057–9069, 2016.
- [78] C. Cadilhac, I. Bachy, A. Forget et al., "Excitatory granule neuron precursors orchestrate laminar localization and differentiation of cerebellar inhibitory interneuron subtypes," *Cell Reports*, vol. 34, no. 13, article 108904, 2021.
- [79] V. V. Guselnikova and D. E. Korzhovskiy, "NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker," *Acta Naturae*, vol. 7, no. 2, pp. 42–47, 2015.
- [80] J. Ahlfeld, S. Filser, F. Schmidt et al., "Neurogenesis from Sox2 expressing cells in the adult cerebellar cortex," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 6137, 2017.
- [81] A. Lavado, O. V. Lagutin, L. M. Chow, S. J. Baker, and G. Oliver, "Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis," *PLoS Biology*, vol. 8, no. 8, article e1000460, 2010.
- [82] N. Leclerc, P. W. Beesley, I. Brown et al., "Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex," *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 280, no. 2, pp. 197–212, 1989.
- [83] J. Hami, S. Vafaei-Nezhad, G. Ivar et al., "Altered expression and localization of synaptophysin in developing cerebellar cortex of neonatal rats due to maternal diabetes mellitus," *Metabolic Brain Disease*, vol. 31, no. 6, pp. 1369–1380, 2016.
- [84] C. I. De Zeeuw, F. E. Hoebeek, L. W. J. Bosman, M. Schonewille, L. Witter, and S. K. Koekkoek, "Spatiotemporal firing patterns in the cerebellum," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 12, no. 6, pp. 327–344, 2011.
- [85] R. Cesa and P. Strata, "Axonal competition in the synaptic wiring of the cerebellar cortex during development and in the mature cerebellum," *Neuroscience*, vol. 162, no. 3, pp. 624–632, 2009.
- [86] P. Ellis, B. M. Fagan, S. T. Magness et al., "SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult," *Developmental Neuroscience*, vol. 26, no. 2–4, pp. 148–165, 2004.
- [87] V. Graham, J. Khudyakov, P. Ellis, and L. Pevny, "SOX2 functions to maintain neural progenitor identity," *Neuron*, vol. 39, no. 5, pp. 749–765, 2003.
- [88] V. Pibiri, A. Ravarino, C. Gerosa, M. C. Pintus, V. Fanos, and G. Faa, "Stem/progenitor cells in the developing human cerebellum: an immunohistochemical study," *European Journal of Histochemistry*, vol. 60, no. 3, p. 2686, 2016.
- [89] S. H. Jung, S. T. Lee, K. Chu et al., "Cell proliferation and synaptogenesis in the cerebellum after focal cerebral ischemia," *Brain Research*, vol. 1284, pp. 180–190, 2009.
- [90] D. J. Swanson and D. Goldowitz, "Experimental Sey mouse chimeras reveal the developmental deficiencies of Pax6-null granule cells in the postnatal cerebellum," *Developmental Biology*, vol. 351, no. 1, pp. 1–12, 2011.
- [91] A. J. Fink, C. Englund, R. A. Daza et al., "Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip," *The Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 11, pp. 3066–3076, 2006.
- [92] S. Endesfelder, H. Makki, C. von Haefen, C. D. Spies, C. Bührer, and M. Sifringer, "Neuroprotective effects of dexmedetomidine against hyperoxia-induced injury in the developing rat brain," *PLoS One*, vol. 12, no. 2, article e0171498, 2017.
- [93] B. Schmidt, R. S. Roberts, P. J. Anderson et al., "Academic performance, motor function, and behavior 11 years after neonatal caffeine citrate therapy for apnea of prematurity: an 11-year follow-up of the CAP randomized clinical trial," *JAMA Pediatrics*, vol. 171, no. 6, pp. 564–572, 2017.
- [94] U. Weichelt, R. Cay, T. Schmitz et al., "Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine," *The European Respiratory Journal*, vol. 41, no. 4, pp. 966–973, 2013.
- [95] J. A. Ribeiro and A. M. Sebastiao, "Caffeine and adenosine," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 20, Supplement 1, pp. S3–15, 2010.

- [96] M. Ikram, T. J. Park, T. Ali, and M. O. Kim, "Antioxidant and neuroprotective effects of caffeine against Alzheimer's and Parkinson's disease: insight into the role of Nrf-2 and A2AR signaling," *Antioxidants*, vol. 9, no. 9, p. 902, 2020.
- [97] R. J. Teng, X. Jing, T. Michalkiewicz, A. J. Afolayan, T. J. Wu, and G. G. Konduri, "Attenuation of endoplasmic reticulum stress by caffeine ameliorates hyperoxia-induced lung injury," *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 312, no. 5, pp. L586–L598, 2017.
- [98] D. Nabbi-Schroeter, D. Elmenhorst, A. Oskamp, S. Laskowski, A. Bauer, and T. Kroll, "Effects of long-term caffeine consumption on the adenosine A₁ receptor in the rat brain: an in vivo PET study with [¹⁸F]CPPFX," *Molecular Imaging and Biology*, vol. 20, no. 2, pp. 284–291, 2018.
- [99] J. N. Cobley, M. L. Fiorello, and D. M. Bailey, "13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress," *Redox Biology*, vol. 15, pp. 490–503, 2018.
- [100] D. Janitschke, A. A. Lauer, C. M. Bachmann, H. S. Grimm, T. Hartmann, and M. O. W. Grimm, "Methylxanthines and neurodegenerative diseases: an update," *Nutrients*, vol. 13, no. 3, p. 803, 2021.
- [101] M. W. Vogel, K. Sunter, and K. Herrup, "Numerical matching between granule and Purkinje cells in lurcher chimeric mice: a hypothesis for the trophic rescue of granule cells from target-related cell death," *The Journal of Neuroscience*, vol. 9, no. 10, pp. 3454–3462, 1989.
- [102] S. N. Sansom, D. S. Griffiths, A. Faedo et al., "The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis," *PLoS Genetics*, vol. 5, no. 6, article e1000511, 2009.
- [103] M. N. Manuel, D. Mi, J. O. Mason, and D. J. Price, "Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 9, pp. 70–70, 2015.
- [104] T. Ha, D. Swanson, M. Larouche et al., "CbGRiTS: cerebellar gene regulation in time and space," *Developmental Biology*, vol. 397, no. 1, pp. 18–30, 2015.
- [105] S. P. Gaytan and R. Pasaro, "Neonatal caffeine treatment up-regulates adenosine receptors in brainstem and hypothalamic cardio-respiratory related nuclei of rat pups," *Experimental Neurology*, vol. 237, no. 2, pp. 247–259, 2012.
- [106] K. Soontarapornchai, C. L. Cai, T. Ahmad, J. V. Aranda, I. Hand, and K. D. Beharry, "Pharmacodynamic effects of standard versus high caffeine doses in the developing brain of neonatal rats exposed to intermittent hypoxia," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 7, p. 3473, 2021.
- [107] J. A. Kullmann, N. Trivedi, D. Howell et al., "Oxygen tension and the VHL-Hif1 α pathway determine onset of neuronal polarization and cerebellar germinal zone exit," *Neuron*, vol. 106, no. 4, pp. 607–623.e5, 2020.
- [108] T. Okano-Uchida, T. Himi, Y. Komiya, and Y. Ishizaki, "Cerebellar granule cell precursors can differentiate into astroglial cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 5, pp. 1211–1216, 2004.
- [109] C. McPherson, J. J. Neil, T. H. Tjoeng, R. Pineda, and T. E. Inder, "A pilot randomized trial of high-dose caffeine therapy in preterm infants," *Pediatric Research*, vol. 78, no. 2, pp. 198–204, 2015.
- [110] A. Atik, R. Harding, R. De Matteo et al., "Caffeine for apnea of prematurity: effects on the developing brain," *Neurotoxicology*, vol. 58, pp. 94–102, 2017.
- [111] S. Juárez-Méndez, R. Carretero, R. Martínez-Tellez, A. B. Silva-Gómez, and G. Flores, "Neonatal caffeine administration causes a permanent increase in the dendritic length of prefrontal cortical neurons of rats," *Synapse*, vol. 60, no. 6, pp. 450–455, 2006.
- [112] M. Yazdani, K. Ide, M. Asadifar, S. Gottschalk, F. Joseph Jr., and T. Nakamoto, "Effects of caffeine on the saturated and monounsaturated fatty acids of the newborn rat cerebellum," *Annals of Nutrition & Metabolism*, vol. 48, no. 2, pp. 79–83, 2004.
- [113] B. A. Etzel and R. Guillet, "Effects of neonatal exposure to caffeine on adenosine A₁ receptor ontogeny using autoradiography," *Developmental Brain Research*, vol. 82, no. 1–2, pp. 223–230, 1994.
- [114] I. Y. Iskusnykh, R. K. Buddington, and V. V. Chizhikov, "Pre-term birth disrupts cerebellar development by affecting granule cell proliferation program and Bergmann glia," *Experimental Neurology*, vol. 306, pp. 209–221, 2018.
- [115] O. Baud and P. Gressens, "Hedgehog rushes to the rescue of the developing cerebellum," *Science Translational Medicine*, vol. 3, no. 105, article 105ps40, 2011.
- [116] V. M. Heine, A. Griveau, C. Chapin, P. L. Ballard, J. K. Chen, and D. H. Rowitch, "A small-molecule smoothed agonist prevents glucocorticoid-induced neonatal cerebellar injury," *Science Translational Medicine*, vol. 3, no. 105, article 105ra104, 2011.
- [117] M. E. van der Heijden and R. V. Sillitoe, "Interactions between Purkinje cells and granule cells coordinate the development of functional cerebellar circuits," *Neuroscience*, vol. 462, pp. 4–21, 2021.
- [118] A. B. C. Dijkshoorn, E. Turk, L. M. Hortensius et al., "Preterm infants with isolated cerebellar hemorrhage show bilateral cortical alterations at term equivalent age," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, p. 5283, 2020.
- [119] S. S. Wang, A. D. Kloth, and A. Badura, "The cerebellum, sensitive periods, and autism," *Neuron*, vol. 83, pp. 518–532, 2014.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Giszas, V., Strauß, E., Bühner, C., & Endesfelder, S. (2021). Auswirkungen von Koffein auf das Hyperoxie-geschädigte Kleinhirn der neonatalen Ratte. 47. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin. Abstract-ID: 46.

Giszas, V., Strauß, E., Bühner, C., & Endesfelder, S. (2022). The Conflicting Role of Caffeine Supplementation on Hyperoxia-Induced Injury on the Cerebellar Granular Cell Neurogenesis of Newborn Rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 5769784. doi:10.1155/2022/5769784. IF: 7.310

Danksagung

Danke an Felix, für deinen immerwährenden emotionalen Support und zahlreiche gemeinsame Pausen im und um das Forum 4.

Danke an Evy, Till und das liebe Team im NeoLab, für eure wertvolle Unterstützung und fachlichen Rat im Rahmen meiner Experimente.

Und zuletzt ein riesengroßes DANKE an Steffi, für jedes unserer Gespräche, für deine unendliche Geduld, deine Zuverlässigkeit und dein Vertrauen von Anfang an. Danke, dass du mir dieses wunderbare Thema überlassen hast und danke, dass ich Teil deines Teams werden durfte. Ich hätte mir keine bessere Doktormutter vorstellen können.