

Aus der Klinik für Neonatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Zur Wirkung des Xanthins Koffein auf den unreifen  
Organismus im Modell der neonatalen Ratte“

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ulrike Weichelt

aus Freital

Datum der Promotion: 12.09.2014

## Inhalt

1. Abstract.....	1
ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. Eidesstattliche Versicherung.....	3
3. Auszug aus der Journal Summary List.....	5
4. Druckexemplar der ausgewählten Publikation .....	7
5. Lebenslauf .....	15
6. Publikationsliste .....	18
7. Danksagung.....	20

## 1. Abstract

In preterm human infants, briefly elevated concentrations of oxygen are associated with a prolonged increase in blood chemokine concentrations and the development of bronchopulmonary dysplasia (BPD). Caffeine given to preterm infants for the prevention or treatment of apnoea has been shown to reduce the rate of BPD. We tested the hypotheses that infant rats exposed to a combination of caffeine and hyperoxia would be less susceptible to lung injury than those exposed to hyperoxia alone and that caffeine decreases the pulmonary tissue expression of chemokines and leukocyte influx following hyperoxia. Using 6-day-old rat pups, we demonstrated that 24 h of 80 % oxygen exposure caused pulmonary recruitment of neutrophils and macrophages. High levels of oxygen upregulated the expression of: the CXC chemokines, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 and macrophage inflammatory protein-2; the CC-chemokine monocyte chemoattractant protein-1; the pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6, as measured by realtime PCR after the administration of caffeine (10 mg kg<sup>-1</sup> body weight); and attenuated chemokine and cytokine upregulation, as well as the influx of CD11b(+), ED-1(+) and myeloperoxidase(+) leukocytes. These experiments suggest that protective effects of caffeine in the neonatal lung are mediated, at least in part, by reduction of pulmonary inflammation.

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Unreife Frühgeborene, die für kurze Zeit mit hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen behandelt werden, weisen langanhaltend erhöht Chemokin-Konzentrationen im Blut und eine erhöhte Rate von bronchopulmonaler Dysplasie (BPD) auf. Die Anwendung von Koffein zur Prävention von Apnoen bei Frühgeborenen geht dabei mit einer verminderten BPD-Rate einher. In unserer *in-vivo* Studie an neugeborenen Wistar-Ratten im Hyperoxie-Schädigungsmodell testeten wir die Hypothese, dass Koffein eine Sauerstoff-induzierte pulmonale Expression von Chemokinen und Leukozyteninfiltration vermindert. Bei 6 Tage alten Wistar-Ratten konnten wir zeigen, dass bereits nach 24 Stunden Hyperoxie (80 % O<sub>2</sub>) eine pulmonale Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen im Lungengewebe stattfindet. Parallel dazu steigen die mittels quantitativer *real-time* PCR gemessenen Expressionen der CXC-Chemokine CINC-1 (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1*) und MIP-2

(*macrophage inflammatory protein-2*), des CC-Chemokins MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  (*tumour necrosis factor- $\alpha$* ) und IL-6 (*interleukin-6*). Die Applikation von Koffein (10 mg/kg) verminderte die Infiltration von CD11b-, ED-1- und Myeloperoxidase-positiven Leukozyten sowie die Chemokin- und Zytokin-Expression maßgeblich. Diese Ergebnisse weisen auf protektive Effekte von Koffein in der Lunge Neugeborener durch Reduktion der pulmonalen Entzündung.

## 2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ulrike Weichelt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Zur Wirkung des Xanthins Koffein auf den unreifen Organismus im Modell der neonatalen Ratte“* 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

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

11. 11. 2013

---

Unterschrift

### **Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation**

Publikation :

Weichelt, Ulrike; Cay, Ruhuye; Schmitz, Thomas; Strauss, Evelyn; Sifringer, Marco; Bührer, Christoph; Endesfelder, Stefanie

**„Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine.“**

European Respiratory Journal, 2013, Apr;41(4):966-73.

Epub 2012 Aug 9., Charité University Medical Centre, Berlin, Germany.

### **Beitrag zu der Studie:**

Das Tierversuchsmodell der Hyperoxie an infantilen Ratten ist seit rund zehn Jahren in unserer Arbeitsgruppe, dem Forschungslabor der Neonatologie Charité Berlin, etabliert und dient der Untersuchung der Effekte und Schädigungsmechanismen von hochkonzentriertem Sauerstoff auf den unreifen Organismus, insbesondere auf das sich entwickelnde Gehirn und die unreife Lunge. Unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. S. Endesfelder wurde das Tierversuchsmodell (behördliche Genehmigungsnummer: G-0307/09) initiiert und durchgeführt. Die tierexperimentellen Arbeiten in Form der intraperitonealen Applikationen von Koffein respektive physiologischer Kochsalzlösung vor der Exposition der Ratten in 80-prozentigem Sauerstoff oder Raumluft, die nach Versuchsende intraperitoneal verabreichte Narkotisierung und die anschließenden Perfusionen, Organpräparationen, Organentnahmen und die Probenasservierung wurden von Frau Dr. S. Endesfelder, Dr. M Sifringer und mir durchgeführt. Die Aufarbeitung der Proben für die molekularbiologischen Analysen und die Durchführung der quantitativen *real-time* PCR Untersuchungen erfolgten durch R. Cay und mich, wobei die Reproduktion der Daten ausschließlich durch mich erfolgte. Die Färbungen für die immunhistochemischen Analysen wurden von E. Strauss durchgeführt und von Dr. S. Endesfelder ausgewertet. Die statistischen Analysen wurden von Dr. S. Endesfelder und mir durchgeführt. Mit Dr. S. Endesfelder habe ich im stetigen Dialog die gewonnenen Ergebnisse diskutiert und interpretiert. Die vorliegende Publikation wurde nach ausführlicher Diskussion und in Rücksprache mit den Koautoren von Dr. S. Endesfelder verfasst, wobei ich wesentlich zum Erstellen des Methodenteils und zur Literaturrecherche beigetragen habe. Nach Revision wurde das Manuskript final von Dr. S. Endesfelder, Dr. T. Schmitz, Prof. Dr. C. Bühner und mir bearbeitet.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

---

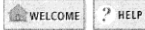
### 3. Auszug aus der Journal Summary List

JCR-Web 4.5 Journal Summary List

http://admin-apps.webofknowledge.com/JCR/JCR



Journal Citation Reports®



2012 JCR Science Edition

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories RESPIRATORY SYSTEM** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 1 - 20 (of 50)



Page 1 of 3

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data <sup>j</sup>						Eigenfactor® Metrics <sup>j</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
<input type="checkbox"/>	1	AM J RESP CRIT CARE	1073-449X	49712	11.041	10.919	2.705	264	8.7	0.10159	3.873
<input type="checkbox"/>	2	THORAX	0040-6376	17786	8.376	7.808	2.371	159	8.3	0.03705	2.679
<input type="checkbox"/>	3	EUR RESPIR J	0903-1936	25962	6.355	6.320	1.820	317	7.3	0.05459	2.002
<input type="checkbox"/>	4	CHEST	0012-3692	44596	5.854	6.420	3.394	307	8.6	0.08096	2.194
<input type="checkbox"/>	5	J HEART LUNG TRANSPL	1053-2498	7139	5.112	3.627	0.975	159	5.6	0.02296	1.309
<input type="checkbox"/>	6	J THORAC ONCOL	1556-0864	6478	4.473	4.458	1.147	258	3.0	0.03232	1.418
<input type="checkbox"/>	7	AM J RESP CELL MOL	1044-1549	10561	4.148	4.294	0.860	193	7.7	0.02373	1.475
<input type="checkbox"/>	8	RESP RES	1465-993X	3894	3.642	3.574	0.319	113	4.7	0.01319	1.182
<input type="checkbox"/>	9	J THORAC CARDIOV SUR	0022-5223	20004	3.526	3.539	0.859	419	8.0	0.04851	1.352
<input type="checkbox"/>	10	AM J PHYSIOL-LUNG C	1040-0605	13277	3.523	4.187	0.652	233	7.4	0.02763	1.343
<input type="checkbox"/>	11	ANN THORAC SURG	0003-4975	28097	3.454	3.664	0.963	510	8.2	0.06180	1.345
<input type="checkbox"/>	12	LUNG CANCER	0169-5002	7698	3.392	3.457	0.812	282	5.3	0.02059	0.978
<input type="checkbox"/>	13	CURR OPIN PULM MED	1070-5287	1984	3.119	2.660	0.721	86	5.0	0.00638	0.900
<input type="checkbox"/>	14	TUBERCULOSIS	1472-9792	1946	3.033	3.036	0.781	73	4.7	0.00647	0.960
<input type="checkbox"/>	15	J AEROSOL MED PULM D	1941-2711	513	2.894	3.048	0.341	44	3.0	0.00185	0.727
<input type="checkbox"/>	16	J CYST FIBROS	1569-1993	1580	2.873	2.734	0.916	83	4.1	0.00565	0.819
<input type="checkbox"/>	17	PAEDIATR RESPIR REV	1526-0542	1091	2.792	3.021	0.429	42	5.6	0.00330	0.979
<input type="checkbox"/>	18	RESPIROLOGY	1323-7799	2874	2.781	2.141	0.684	152	4.3	0.00863	0.587
<input type="checkbox"/>	19	BMC PULM MED	1471-2466	772	2.760		0.127	79	3.2	0.00346	
<input type="checkbox"/>	20	SEMIN RESP CRIT CARE	1069-3424	1358	2.752	2.611	0.159	69	4.8	0.00529	0.912

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

Journals 1 - 20 (of 50)



Page 1 of 3

Acceptable Use Policy  
Copyright © 2013 Thomson Reuters.



ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>

Journal Citation Reports<sup>®</sup>

WELCOME ? HELP

2011 JCR Science Edition

Journal Summary List

Journal Title Changes

Journals from: subject categories RESPIRATORY SYSTEM [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 48)

Navigation icons: [ 1 | 2 | 3 ]

Page 1 of 3

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data <sup>↓</sup>						Eigenfactor <sup>®</sup> Metric	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Artic Influei Scoi
<input type="checkbox"/>	1	AM J RESP CRIT CARE	1073-449X	46471	11.080	10.424	2.631	317	8.4	0.10282	3
<input type="checkbox"/>	2	THORAX	0040-6376	15810	6.840	6.950	2.087	149	8.0	0.03593	2
<input type="checkbox"/>	3	EUR RESPIR J	0903-1936	23009	5.895	5.879	1.725	306	6.9	0.05565	1
<input type="checkbox"/>	4	CHEST	0012-3692	41594	5.250	6.224	1.332	365	8.1	0.08864	2
<input type="checkbox"/>	5	AM J RESP CELL MOL	1044-1549	10677	5.125	4.833	0.831	255	7.5	0.02577	1
<input type="checkbox"/>	6	J HEART LUNG TRANSPL	1053-2498	7129	4.332	3.521	0.965	173	5.5	0.02240	1
<input type="checkbox"/>	7	ANN THORAC SURG	0003-4975	28219	3.741	3.503	0.774	610	7.8	0.06791	1
<input type="checkbox"/>	8	AM J PHYSIOL-LUNG C	1040-0605	12846	3.662	4.290	0.636	206	6.9	0.03194	1
<input type="checkbox"/>	9	J THORAC ONCOL	1556-0864	4653	3.661	3.826	0.991	316	2.9	0.02551	1
<input type="checkbox"/>	10	TUBERCULOSIS	1472-9792	1774	3.474	3.149	0.441	102	4.6	0.00568	C
<input type="checkbox"/>	11	LUNG CANCER	0169-5002	6587	3.434	3.170	0.670	261	5.0	0.01965	C
<input type="checkbox"/>	12	J THORAC CARDIOV SUR	0022-5223	19743	3.406	3.520	0.699	396	8.2	0.05012	1
<input type="checkbox"/>	13	RESP RES	1465-993X	3362	3.360	3.598	0.432	155	4.9	0.01402	1
<input type="checkbox"/>	14	CLIN CHEST MED	0272-5231	1880	3.284	2.900	0.210	62	7.2	0.00505	C
<input type="checkbox"/>	15	J CYST FIBROS	1569-1993	1405	3.190	2.626	0.926	95	3.7	0.00529	C
<input type="checkbox"/>	16	CURR OPIN PULM MED	1070-5287	1814	3.075	2.627	0.526	78	4.9	0.00601	C
<input type="checkbox"/>	17	PULM PHARMACOL THER	1094-5539	1623	2.800	2.333	0.454	97	4.4	0.00538	C
<input type="checkbox"/>	18	INT J TUBERC LUNG D	1027-3719	6147	2.731	2.685	0.588	267	5.6	0.01729	C
<input type="checkbox"/>	19	EUR J CARDIO-THORAC	1010-7940	10224	2.550	2.529	0.556	466	6.3	0.02814	C
<input type="checkbox"/>	20	J BREATH RES	1752-7155	352	2.541	2.448	0.649	37	3.0	0.00101	C

Journals 1 - 20 (of 48)

Navigation icons: [ 1 | 2 | 3 ]

Page 1 of 3

Acceptable Use Policy  
Copyright © 2013 Thomson Reuters.





#### 4. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

**Weichelt U**, Cay R, Schmitz T, Strauss E, Sifringer M, Bühner C, Endesfelder S. *Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine.* Eur Respir J. 2013 Apr;41(4):966-73. doi: [10.1183/09031936.00012412](https://doi.org/10.1183/09031936.00012412). Epub 2012 Aug 9.

















## 5. Lebenslauf

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





## 6. Publikationsliste

Endesfelder S, Zaak I, **Weichelt U**, Bühner C, Schmitz T. *Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain.*

Free Radic Biol Med. 2013 Oct 12. pii: S0891-5849(13)00629-1. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.026. [Epub ahead of print] **IF: 5,271**

Bendix I, **Weichelt U**, Strasser K, Serdar M, Endesfelder S, von Haefen C, Heumann R, Ehrkamp A, Felderhoff-Mueser U, Sifringer M. *Hyperoxia changes the balance of the thioredoxin/peroxiredoxin system in the neonatal rat brain.* Brain Res. 2012 Nov 12;1484:68-75. doi: 10.1016/j.brainres.2012.09.024. Epub 2012 Sep 21. **IF: 2,879**

**Weichelt U**, Cay R, Schmitz T, Strauss E, Sifringer M, Bühner C, Endesfelder S. *Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine.* Eur Respir J. 2013 Apr;41(4):966-73. doi: 10.1183/09031936.00012412. Epub 2012 Aug 9. **IF: 5.922 (2011) bzw 6.320 (2012)**

Sifringer M, Brait D, **Weichelt U**, Zimmerman G, Endesfelder S, Brehmer F, von Haefen C, Friedman A, Soreq H, Bendix I, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. *Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain.* Brain Behav Immun. 2010 Jul;24(5):792-9. doi: 10.1016/j.bbi.2009.08.010. Epub 2009 Sep 1. **IF: 5.061**

Sifringer M, Genz K, Brait D, Brehmer F, Löber R, **Weichelt U**, Kaindl AM, Gerstner B, Felderhoff-Mueser U. *Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases.* Dev Neurosci. 2009;31(5):394-402. doi: 10.1159/000232557. Epub 2009 Aug 11. **IF: 2.966**

### **Poster**

39. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Freiburg im Breisgau, Juni 2013. Titel: „Einfluss von Hyperoxie und Koffein auf die postnatale hippocampale Neurogenese und die Neurodegeneration der Ratte“

38. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin,  
Hamburg, Sept 2012. Titel: „Untersuchung zum Schädigungspotential von  
Isofluran und Fentanyl auf unreife primäre Neuronen“

## 7. Danksagung

Meine Promotionsarbeit habe ich von Mai 2010 bis November 2013 im Forschungslabor der Klinik für Neonatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Christoph Bühner durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Christoph Bühner für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die kompetente Betreuung der Arbeit innerhalb der letzten 3 Jahre.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder für die hervorragende Förderung und ihre stetige Unterstützung meiner Arbeit mit konstruktiven Anregungen, der freudigen Bereitschaft zum gegenseitigen Dialog und die sehr gute Zusammenarbeit. Durch ihre Fürsprache und das entgegengebrachte Vertrauen in meine Fähigkeiten, hat sie maßgeblich zu meinem wissenschaftlichen Werdegang beigetragen.

Hierbei möchte ich ebenfalls sehr Dr. rer. medic. Marco Sifringer und Dr. med. Thomas Schmitz danken, die mich ebenfalls als wissenschaftliche Ansprechpartner unterstützt haben.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen anderen Mitarbeitern des Forschungslabors der Neonatologie für das angenehme Arbeitsklima und das freundschaftliche Miteinander. Hervorheben möchte ich hierbei Frau Evelyn Strauß und Frau Ruth Herrmann, mit denen ich mich zu jeder Zeit über labortechnische Methoden austauschen konnte und die darüber hinaus, stets jedes Mitglied der Arbeitsgruppe mit Geduld und Verständnis sowohl praktisch als auch menschlich unterstützen.

Meine Promotionsarbeit wurde die ersten 2 Jahre durch das Hypatia Programm der Beuth Hochschule für Technik Berlin gefördert, wofür ich mich ausdrücklich bedanken möchte, hier besonders bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Monika Gross, als meiner Hochschulmentorin, und bei Frau Dipl. –Soz. Ulla Ruschhaupt für die kompetente Betreuung. Die anschließende Förderung durch das Promotionsstipendium I der Kommission für wissenschaftliche Nachwuchsförderung der Charité-Universitätsmedizin und der Förderverein für frühgeborene Kinder an der Charité e.V. ermöglichten mir den Abschluss meiner Arbeit, wofür ich mich besonders bedanken möchte.

Darüber hinaus danke ich allen, besonders meinem Vater und meiner Schwester von ganzem Herzen, deren Unterstützung und Ratschläge mich in allen Phasen der Erstellung der vorliegenden Arbeit begleitet haben.