

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

## **Habilitationsschrift**

# **Protektive Strategien im Hyperoxie-Schädigungsmodell der neonatalen Ratte**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
Experimentelle Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. rer.nat. Stefanie Endesfelder**

Eingereicht:	Februar 2018
Dekan:	Professor Dr. Axel R. Pries
1. Gutachter:	Prof. Dr. Steffen Kunzmann, Frankfurt
2. Gutachter:	Prof. Dr. Andreas Müller, Bonn

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	3
<b>1. Einleitung</b> .....	5
1.1 Problematik der Frühgeburtlichkeit .....	5
1.2 Sauerstofftoxizität .....	6
1.3 Koffein-Therapie bei Frühgeborenen .....	7
1.4 Dexmedetomidin – eine Alternative in der Anästhesie für Frühgeborene? .....	8
1.5 Hyperoxie-Schädigungsmodell der juvenilen Ratte .....	9
<b>2. Eigene Arbeiten</b> .....	11
2.1 Koffein im Hyperoxie-Schädigungsmodell der Ratte .....	12
2.1.1 Koffein und Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn .....	12
2.1.2 Koffein und Inflammation/Apoptose im sich entwickelnden Gehirn .....	28
2.1.3 Koffein in der unreifen Lunge .....	54
2.2 Dexmedetomidin im Hyperoxie-Schädigungsmodell der Ratte .....	63
2.2.1 Dexmedetomidin und Inflammation/Apoptose im sich entwickelnden Gehirn .....	63
2.2.2 Dexmedetomidin und Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn .....	75
<b>3. Diskussion</b> .....	97
3.1 Sauerstofftoxizität .....	97
3.1 Koffein .....	100
3.2 Dexmedetomidin .....	103
3.3 Klinische Relevanz .....	106
<b>4. Zusammenfassung</b> .....	109
<b>5. Literatur</b> .....	111
<b>Danksagung</b> .....	124
<b>Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charité</b> .....	125

**Abkürzungen**

ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätssyndrom
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BPD	Bronchopulmonalen Dysplasie
CINC-1	<i>chemokine-induced neutrophil chemoattractant-1</i>
CPAP	<i>continuous positive airway pressure</i>
DCX	Doublecortin
DEX	Dexmedetomidin
DG	Gyrus dentatus
ELBW	<i>extremely low birth weight</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
GABA <sub>A</sub>	γ-Aminobuttersäure; <i>gamma-aminobutyric acid</i>
GCLC	<i>Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit</i>
GSH	Glutathion
GZS	granuläre Zellschicht
HFOV	<i>high frequency oscillation ventilation</i>
HO-1	Hämoxigenase-1
IFN <sub>γ</sub>	Interferon γ
IL-18	Interleukin 18
IL1-β	Interleukin 1-β
IL-8	Interleukin 8
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KGW	Körpergewicht
LBW	<i>low birth weight</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDA	Malondialdehyd
MIP-2	<i>macrophage inflammatory protein-2</i>
MPO	Myeloperoxidase
MRT	Magnetresonanztomographie
MZL	molekulare Zellschicht
NeuN	<i>neuronal nuclear antigen</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nrf2	<i>NFE2-related factor</i>
Nrg1	Neuregulin 1
Nrp1	Neuropilin 1
8-oxodG	8-Hydroxydesoxyguanosin

P	postnataler Tag
PARP-1	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase-1
Pax6	<i>paired box 6</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
Prox1	<i>prospero homeobox 1</i>
Prx	Peroxiredoxin
PS	polymorphe Schicht
PSA-NCAM	<i>polysialylated neuronal cell adhesion molecule</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
Sema3a	Semaphorin 3A
Sema3f	Semaphorin 3F
SGZ	subgranuläre Zone
SOD	Superoxiddismutase
Sox2	<i>sex determining region Y-box 2</i>
Srx	Sulfiredoxin
SSW	Schwangerschaftswoche
Syp	Synaptophysin
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
Tbr1/2	<i>T-box brain gene 1/2</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
VLBW	<i>very low birth weight</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, <i>World Health Organization</i>

## 1. Einleitung

### 1.1 Problematik der Frühgeburtlichkeit

Frühgeburt ist weltweit die Hauptursache für die Kindersterblichkeit und Morbidität, aufgrund der strukturellen und funktionellen Unreife der meisten Organe und des anti-oxidativen Enzymsystems [1-3]. Die WHO definiert Frühgeborene als lebende Neugeborene, die vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) mit einem Geburtsgewicht über 500 g zur Welt kommen [4]. Dementsprechend sinken die Gestationsalters- und Geburtsgewichtsgrenzen der überlebenden Frühgeborenen stetig weiter. Mit dieser Entwicklung wurden neue Patientengruppen hinsichtlich des Geburtsgewichtes und des Gestationsalters definiert: Neben dem Begriff der *low birth weight*-Kinder (LBW, Geburtsgewicht < 2500 g, 28 bis 36 SSW) und der *very low birth weight*-Kinder (VLBW, Geburtsgewicht < 1500 g, 24 bis 27 SSW), entstand der Begriff der *extremely low birth weight*-Kinder (ELBW, Geburtsgewicht < 1000 g, <24 SSW) [2, 5]. Trotz der Fortschritte in der Perinatalmedizin, wodurch die Überlebenschancen von Frühgeborenen erheblich gesteigert werden konnten [6], sind bei sehr und extrem Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g oft lebenslange Beeinträchtigungen der motorischen und kognitiven Fähigkeiten sowie ein erhöhtes Risiko von Zerebralpareesen und chronische Erkrankungen festzustellen [7-9]. Zunehmendes Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge und neue klinische Therapieoptionen führten in den vergangenen Jahren zu deutlich verbesserten Überlebensraten bei sehr kleinen Frühgeborenen. Sinkende Mortalitätsraten von Frühgeborenen gehen jedoch mit hohen Morbiditätsraten einher, was den Anlass für eine intensiviertere Forschung ergibt [10, 11]. Eines der Hauptziele der Neonatologie, beim Frühgeborenen ein extrauterines Überleben mit einem akzeptablem medizinischen Outcome sicherzustellen, wird mit jedem Jahr der zunehmenden klinischen Erfahrung und Forschung realistischer.

Das Risiko für Kurz- und Langzeitfolgen für zu früh geborene Kinder nimmt mit abnehmendem Geburtsgewicht zu. So steigt das Risiko für respiratorische Erkrankungen, wie dem Atemnotsyndrom oder der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD). Die BPD ist gekennzeichnet durch eine Verzögerung der weiteren Lungenentwicklung hinsichtlich der Alveolarisierung und der Kapillarisierung [12, 13]. Die Inzidenz der BPD korreliert eng mit der Unreife der Lunge, die sowohl auf vermindert ausgeprägte anatomische Strukturen als auch funktionelle Systeme, wie das Surfactant-System und Enzyme zur Sauerstoffdetoxifikation, zurückzuführen ist [14]. Die Ätiologie ist multifaktoriell und umfasst genetische Prädispositionen, Baro- und Volutrauma aufgrund der notwendigen mechanischen Beatmung, oxidativen Stress durch den genutzten Sauerstoff und die hohen Sauerstoffkonzentrationen sowie Infektionen [15, 16]. Die Wirkung hoher Sauerstoffkonzentrationen und der daraus resultierende oxidative Stress ist eine wichtige Ursache für die BPD [17-19]. Viele ELBW und VLBW Säuglinge haben einen erhöhten Sauerstoffbedarf in den ersten Tagen oder Wochen ihres Lebens auf medizinisch-induzierter Basis. Die zusätzliche Verabreichung von Sauerstoff in dieser vulnerablen Phase der Lungenentwicklung der frühgeborenen Kinder resultiert auch in der Expression von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und den daraus resultierenden

Entzündungsprozessen. Histologische Merkmale der BPD sind gekennzeichnet durch die verschiedenen Stadien der Entzündung [19]. Des Weiteren inhibiert und verzögert die BPD die Lungenentwicklung und führt zu wiederkehrenden Langzeit-Komplikationen [20-22]. Die BPD betrifft etwa 40% der VLBW-Kinder und 70% der ELBW-Kinder [23, 24] und stellt die häufigste chronische Erkrankung der Lunge des Frühgeborenen, mit serieller Rehospitalisierung während des ersten Lebensjahres, einem erhöhtem Risiko an pulmonalen Erkrankungen im Kleinkind- und Erwachsenenalter dar und ist mit neurologischen Spätfolgen assoziiert [21, 25-30].

Mit der Verbesserung der neonatalen Intensivversorgung ist die Inzidenz der Zerebralparese rückläufig [31, 32], dem gegenüber bleiben aber die kognitiven und motorischen Beeinträchtigungen bei sehr und extrem Frühgeborenen weiterhin unverändert hoch [33-36]. Die kausalen Pathologien sind bislang unvollständig verstanden und klinisch schwer zu prognostizieren. Die Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns, vor allem im letzten Trimester der Schwangerschaft, begründet sich auf der Phase des schnellen Hirnwachstums (*rapid brain growth spurt*), gekennzeichnet durch eine schnelle Gewichtszunahme und essentielle neuronale Prozesse, wie der Neurogenese, der Synaptogenese und der physiologischen Apoptose [37]. In Abhängigkeit der Entwicklung und des Entwicklungszeitpunktes des unreifen Gehirns können exogene Noxen, wie Hypoxie-Ischämie, Hyperoxie oder pharmakologische Substanzen, wie Anästhetika, zu neuronalen Schädigungen und Reifeverzögerungen führen [38, 39] und das Risiko für intraventrikuläre Blutungen, periventrikuläre Leukomalazie, neuropsychiatrische Störungsbilder, wie das Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) und Autismus-Spektrum-Störungen, sowie kognitive und motorische Defizite erhöhen [40-44].

## 1.2 Sauerstofftoxizität

Eine relative Hyperoxie leitet sich durch den Anstieg des intrauterinen Sauerstoffpartialdruckes von 25 mmHg auf extrauterin 70 mmHg ab [45-47] und wird durch additive Sauerstoffsubstitutionen zur Behandlung respiratorischer Instabilitäten potenziert [48]. Toxische Eigenschaften von hohen Sauerstoffkonzentrationen auf den unreifen Organismus sind beschrieben [49, 50]. Die durch oxidativen Stress und freie Radikale vermittelten Zell- und Gewebeschäden führen zu dem Begriff "*oxygen radical disease of the prematurity*" [51-53]. Oxidativer Stress kann als gestörtes Gleichgewicht zwischen ROS und intra- und extrazellulären anti-oxidativen Schutzmechanismen definiert werden. Die hohe Vulnerabilität der Frühgeborenen gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen begründet sich auf der drastischen Veränderung vom hypoxischen zum hyperoxischen Milieu während der Geburt [54, 55], die höhere Infektanfälligkeit [52], der allgemeinen Unreife des Organsystems und dem unzureichend entwickelten anti-oxidativen Enzymsystems [56]. Das anti-oxidative Abwehrsystem unterliegt während der neonatalen Phase entwicklungsbedingten Veränderungen, die bei Frühgeborenen zu einer signifikant geringeren intrazellulären Abwehr im Vergleich zu reif geborenen Kindern führen [57].

Experimentelle Tiermodelle unterstützen diese Aspekte und zeigen apoptotische Neurodegeneration, Neuroinflammation, Veränderungen während der postnatalen, hippocampalen Neurogenese [58-62] sowie pulmonale Entzündungsreaktionen und strukturelle/funktionelle Veränderungen der unreifen

Lunge [63-65]. Ausgehend von den Erkenntnissen zu den Auswirkungen der Sauerstofftoxizität auf den unreifen Organismus wird Sauerstoff als therapeutisches Mittel in der Neonatologie kritischer eingesetzt [66]. Neben dem Verständnis der pathologischen Auswirkungen der Sauerstofftoxizität bei dem oft unverzichtbaren Einsatz therapeutischen Sauerstoffs zur Behandlung Frühgeborener, müssen neue protektive Strategien, wie der prophylaktische Einsatz von Erythropoetin [67], Estradiol [68] oder Koffein [60, 69], erforscht werden, die die Folgen der Sauerstofftoxizität mindern könnten.

### 1.3 Koffein-Therapie bei Frühgeborenen

Der Versuch, frühe Stadien der BPD durch systemische oder inhalierte Kortikosteroide zu behandeln, zeigt nur vorübergehende Verbesserungen, ist aber verbunden mit schweren Nebenwirkungen [70]. Es existieren vielfältige pharmakologische und nicht-pharmakologische therapeutische Ansätze zur Prävention oder Behandlung der Lungenerkrankungen von Frühgeborenen, wie die exogene Surfactant-Applikation, Vitamin A, verschiedene Beatmungsstrategien und eine verbesserte parenterale Ernährung. Diese Therapiestrategien zeigen ebenfalls Nebenwirkungen [71-73]. Einen vielversprechenden Therapieansatz stellt die Behandlung mit Koffein dar.

Das Methylxanthin Koffein wird seit über 40 Jahren in der neonatalen Intensivmedizin zur Prävention und Behandlung von Apnoen den Frühgeborenen verabreicht und reduziert nachweislich die BPD-Inzidenz, wobei bis heute unklar ist, ob dies auf die Reduktion der mechanischen Beatmungsdauer oder auf eine direkte pulmonale Wirkung zurückzuführen ist. In einer großen randomisierten Placebo-kontrollierten, klinischen Studie (*Caffeine for Apnea of Prematurity*, CAP-Studie, [74]) konnte neben der Verkürzung der mechanischen Beatmung und der Reduktion der Sauerstoffsupplementierung durch Koffein auch eine Reduktion der psychomotorischen Entwicklungsdefizite festgestellt werden, korrelierend mit einer hohen Effektivität bei sehr frühem Beginn der Koffein-Therapie bis zum postnatal dritten Tag [75]. Die direkten pharmakologischen Wirkungen von Koffein auf das unreife Lungengewebe sowie auf das sich entwickelnde Gehirn blieben dabei unbeantwortet.

Methylxanthine, wie Koffein und Theophyllin, sind unselektive Adenosinrezeptor-Antagonisten. Viele Wirkungen der Methylxanthine sind denen des Adenosins konträr. Adenosin entfaltet seine Wirkung über die Bindung an Adenosinrezeptoren, die an der äußeren Zellmembran lokalisiert sind. Es werden die Subtypen A1, A2a, A2b und A3 unterschieden, wobei Koffein seine Wirkung hauptsächlich über die Rezeptorsubtypen A1 und A2a vermittelt [76, 77]. Methylxanthine besitzen eine große Anzahl an pharmakologischen Wirkungen, wie die Stimulierung des zentralen Atemantriebs und eine Verbesserung der Zwerchfellkontraktilität. Sie können aber auch bei toxischen Dosen zu Tachykardie und Herzrhythmusstörungen führen sowie Krampfanfälle auslösen [78]. Experimentelle Studien zeigen für Koffein in verschiedenen Schädigungsmodellen anti-inflammatorische [64, 79], anti-apoptotische und anti-oxidative Eigenschaften [60, 69], wobei der zentrale Mechanismus bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt ist. Da heutzutage immer mehr Frühgeborene spontan unter nasaler Überdruckbeatmung (*continuous positive airway pressure*, CPAP) oder nasaler Hochfrequenzbeatmung (*high frequency oscillation ventilation*, HFOV) atmen, erhalten auch extrem

Frühgeborene (< 28 SSW) Koffein zur Behandlung von Apnoen, wobei die prävalente Behandlung nicht durch klinische Studien unterstützt werden kann [80].

#### **1.4 Dexmedetomidin – eine Alternative in der Anästhesie für Frühgeborene?**

Trotz der Fortschritte in der Perinatalmedizin sind operative oder unter Sedierung stattfindende medizinische Eingriffe nicht immer vermeidbar. Zur Anwendung kommen dabei adaptierte Anästhetika und Sedativa aus der adulten Medizin, wie Ketamin, Isofluran oder Propofol [81]. Insbesondere Früh- und Neugeborene weisen neben einem signifikant erhöhten Anästhesie-Risiko auch eine höhere Anfälligkeit für perioperative Morbidität und Mortalität auf [82, 83].

Mit der Zulassung von Dexmedetomidin 2011 in Deutschland eröffnet sich jetzt die Möglichkeit, ein für die Sedierung geeignetes Medikament zu untersuchen, welches möglicherweise neuroprotektive Eigenschaften [84-87] und somit Vorteile gegenüber herkömmlichen Medikamenten aufweist [88]. Nicht nur, dass dadurch das neurologische Outcome der notwendigen Sedierung im Gegensatz zu anderen Medikamenten, wie Propofol, an sich verbessert werden könnte, auch die Anwendung von Dexmedetomidin unter kritischen klinischen Bedingungen, wie der mechanischen Beatmung und eine mögliche Minderung der Hyperoxie-induzierten Folgeschäden bei Frühgeborenen, können im Fokus der Forschung liegen.

Dexmedetomidin ist ein hochselektiver  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist, welches ein potenziell günstigeres pharmakologisches Profil zeigt als andere eingesetzte Substanzen [89]. Neben den sedierenden, anxiolytischen und analgesierenden Eigenschaften, gibt es auch Hinweise auf neuroprotektive Effekte [84-87]. Dexmedetomidin birgt neben den möglichen neuroprotektiven Eigenschaften Vorteile für Frühgeborene im Vergleich zu herkömmlichen Sedativa und Analgetika aufgrund der minimalen Nebenwirkungen auf die Atemwege und die Magen-Darm-Funktion und minimiert die Exposition gegenüber anderen Betäubungsmitteln und Benzodiazepinen [84, 90-93], die zur Behandlung von Agitation während der mechanischen Beatmung Frühgeborener häufig zum Einsatz kommen. Die Sedierung bei beatmeten Neu- und Frühgeborenen stellt ein therapeutisches Dilemma dar, in dem man die richtige Balance zwischen einer guten Sauerstoffsättigung und dem Einsatz potentiell neurodegenerativer Sedativa finden muss. Unerwünschte Effekte sind Atemwegdepression, gastrointestinale Komplikationen und neurologische Dysfunktionen, die in der Summe zu einer erhöhten Morbidität des Frühgeborenen führen können [94, 95]. Atemwegdepressionen verlängern die Dauer der mechanischen Beatmung und dies erhöht das Risiko für chronische Lungenerkrankungen und der erhöhten Exposition von unphysiologisch hohen Sauerstoffkonzentrationen für den unreifen Organismus [96, 97]. Die Anwendung von Narkotika und Sedative in der Neonatologie werden auch oft begleitet durch eine höhere Inzidenz für die intraventrikuläre Hämorrhagie und die periventrikuläre Leukomalazie [98]. Vorteile von Dexmedetomidin sind eine kürzere Beatmungszeit und eine Reduktion von Hypertonie und Tachykardie. Insbesondere scheint die Verkürzung der Beatmungsdauer im Zusammenhang mit der höheren Sauerstofftoxizität bei längerer Beatmung und der damit verbundenen Entwicklung chronischer Lungenerkrankungen und den damit einhergehenden motorischen und kognitiven



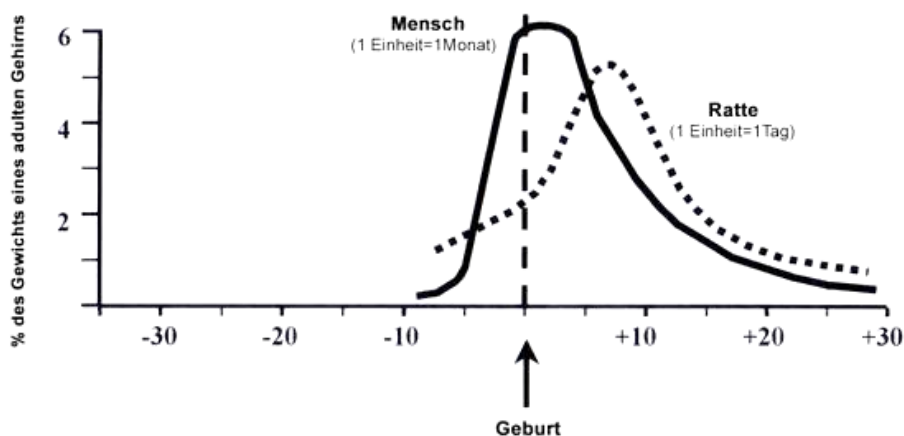
Defiziten bei Frühgeborenen relevant zu sein. Erste Ergebnisse klinischer Studien bei Frühgeborenen zeigten eine Abnahme der Beatmungsdauer ohne zusätzliche Sedierung [99, 100].

Aufgrund der Datenlage verschiedener klinischer und tierexperimenteller Studien zeigte Dexmedetomidin unterschiedliche pharmakokinetische, dynamische und klinische Vorteile in der pädiatrischen Medizin auf. Aber um feststellen zu können, ob die Vorteile einer Sedierung mit Dexmedetomidin die Risiken überwiegen und möglicherweise neuroprotektive Eigenschaften bestätigt werden können, müssen neben der klinischen Bewertung des Outcomes frühgeborener Kinder auch molekularbiologische tier- und zellexperimentelle Studien zur Aufklärung beitragen.

### 1.5 Hyperoxie-Schädigungsmodell der juvenilen Ratte

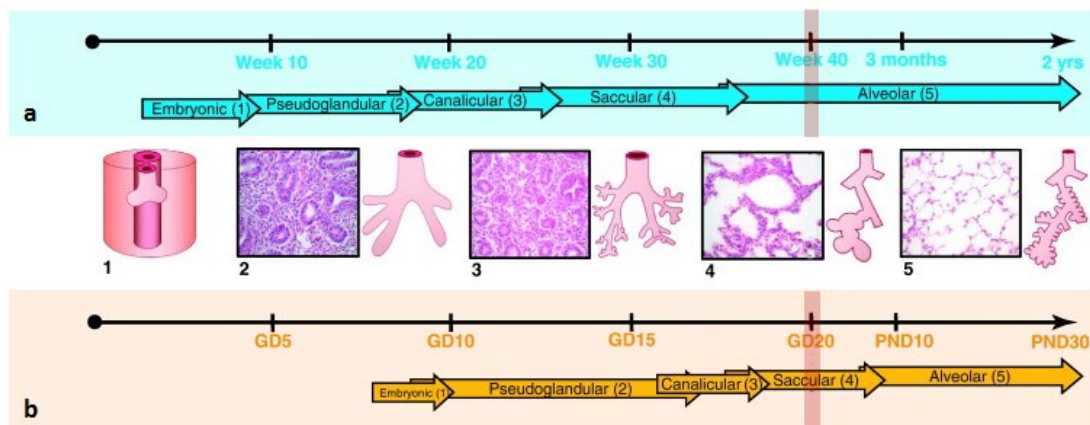
Untersuchungen an geeigneten, entsprechend der humanen Entwicklung adäquaten Tiermodellen, stellen eine gute Möglichkeit dar, molekulare Mechanismen der Sauerstofftoxizität im unreifen Organismus per se, aber auch therapeutische Strategien genauer untersuchen zu können, zumal in tierexperimentellen Studien progressive Lungenpathologien, die denen der BPD bei Frühgeborenen ähneln, nach frühen Expositionen gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen ebenso beschrieben [101, 102] werden, wie eine Zunahme der neurodegenerativen Prozesse einhergehend mit Beeinträchtigungen in der Kognition im unreifen Gehirn [58, 62, 103].

Die Phase des rapiden Hirnwachstums, human beginnend im letzten Trimester der Schwangerschaft, mit einem Maximum zum Zeitpunkt der terminierten Geburt, zeigt einen sigmoidalen Verlauf und findet bei der Ratte innerhalb der ersten zwei Lebenswochen, mit einem Maximum zwischen dem vierten und zehnten postnatalen Tag, statt (siehe Abb. 1) [104].



**Abb. 1.** Hirnwachstumsschübe von Mensch und Ratte, dargestellt als Geschwindigkeitskurven erster Ordnung der Gewichtszunahme mit dem Alter als Prozentsatz des Erwachsenengewichts je Einheit für Mensch in Monaten und für Ratte in Tagen (modifiziert nach [104]).

Ebenso ist die pulmonale Entwicklung von Nagern sehr gut mit der humanen Reifung vergleichbar, durchläuft diese aber im Gegensatz zum Menschen postnatal (siehe Abb. 2) [101, 105].



**Abb. 2.** Humane (a) und murine (b) Stadien der Lungenentwicklung in Bezug zum Gestationsalter und terminierten Geburtszeitpunkt (roter Balken) mit assoziierten histologischen Aufnahmen und schematischen Darstellungen von Lungengewebe der Maus (modifiziert nach [106]).

Aufgrund der Vergleichbarkeit sowohl der Lungen- als auch Gehirnentwicklung der infantilen Ratte postnatal zur humanen Frühgeborenen-situation, begründet sich damit die sechs-Tage alte Ratte als ein geeignetes Tiermodell.

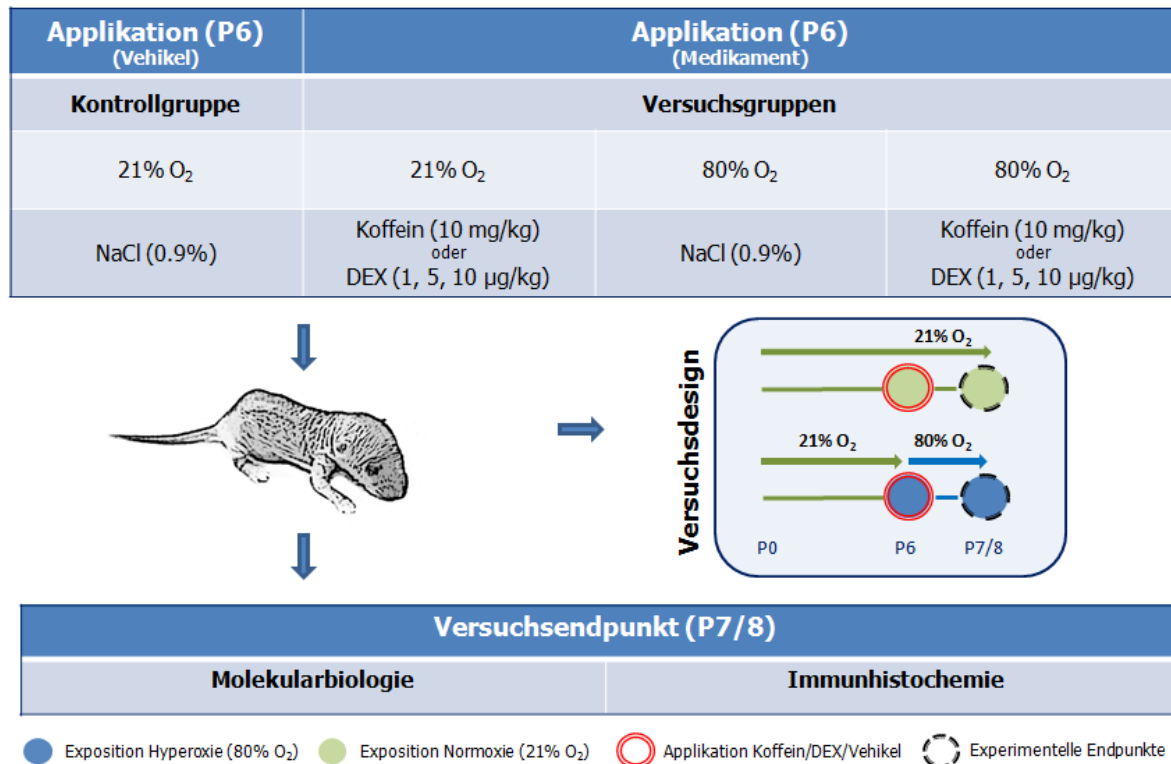
Darüber hinaus basiert das Hyperoxie-Schädigungsmodell der Ratte auf einer Exposition von 80% Sauerstoff, die klinisch in der neonatalen Situation eher vermieden wird. Die natürliche fetale Situation während des letzten Trimesters der Schwangerschaft stimmt physiologisch mit einer niedrigen Sauerstoffkonzentration überein, bis die Geburt in Raumluft eine mehrfache Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes von 20-25 mmHg auf 60-80 mmHg verursacht [107]. Das Hyperoxie-Modell von Nagetieren bietet exogen eine 4-fache Erhöhung des Sauerstoffgehalts und verursacht einen Anstieg des *in vivo* Sauerstoffpartialdruckes von 55-165 mmHg bei neugeborenen Mäusen [46]. Daher ahmt eine 80%ige Sauerstoffexposition eine starke Zunahme der Sauerstoffkonzentration bei einem Neugeborenen mit einem sehr unreifen Stadium der Gehirn- und Lungenentwicklung nach. Interessanterweise ähnelt die Hirnschädigung, die in diesem akuten Sauerstofftoxizitätsmodell verursacht wird, ziemlich genau der Hirnschädigung, die typischerweise bei früheren Frühgeborenen zu finden ist, einschließlich einer diffusen Form der Schädigung der weißen Substanz ohne zystische Läsionen [46], motorische Hyperaktivität [103], verringerte fraktionelle Anisotropie in MRT-Diffusionstensor-Bildgebungs-Messungen bei jungen Erwachsenen [103] und ein verringertes Kleinhirnwachstum [108], ebenso ähneln die nachweislichen pulmonalen Pathologien denen der BPD, wie inflammatorische Prozesse und strukturelle Veränderungen der Lungenarchitektur [109].

Mit allen Einschränkungen von Nagetiermodellen für den direkten Rückschluss auf die humane Situation bietet das Sauerstofftoxizitätsmodell ein breites Spektrum an Untersuchungsmöglichkeiten, um kausale Ursachen neurodegenerativer und pulmonaler Veränderungen im unreifen Organismus und deren Prävention besser verstehen zu können.

## 2. Eigene Arbeiten

Die medizinisch-induzierte Anwendung von Medikamenten, Anästhetika oder Sauerstoff bei Frühgeborenen kann oft nicht vermieden werden. Die Erforschung der Pathomechanismen und möglicher Präventionen ist in der neonatologischen Grundlagenforschung ein wichtiger Aspekt, um zelluläre und molekularbiologische Prozesse zu verstehen und in klinisch-relevante Zusammenhänge zu bringen.

Klinische Studien belegen bereits die protektive Wirkung von Koffein für das Langzeit-Outcome von Frühgeborenen und auch die möglichen neuroprotektiven Effekte von Dexmedetomidin, da aber subtile Störungen der neurologischen Entwicklung im Umfeld von Frühgeburtlichkeit, neonatalen Adaptationsstörungen und intensivmedizinische Maßnahmen Einfluss nehmen können, können standardisierte Tierversuche dazu beitragen, potentiell protektive Effekte von Koffein und Dexmedetomidin im sich entwickelnden Gehirn und/oder der unreifen Lunge zu identifizieren. Dazu wurden Untersuchungen der infantilen Ratte in einem akuten Hyperoxie-Schädigungsmodell durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war, ob die Präkonditionierung mit Koffein oder Dexmedetomidin unter postnataler, akuter Hyperoxie (6, 24 und/oder 48 Stunden), die durch oxidativen Stress assoziierten zellulären Veränderungen reduzieren kann [60, 63, 69, 110, 111]. Das Versuchsdesign im Sauerstofftoxizitätsmodell ist Versuchs-übergreifend in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 3).



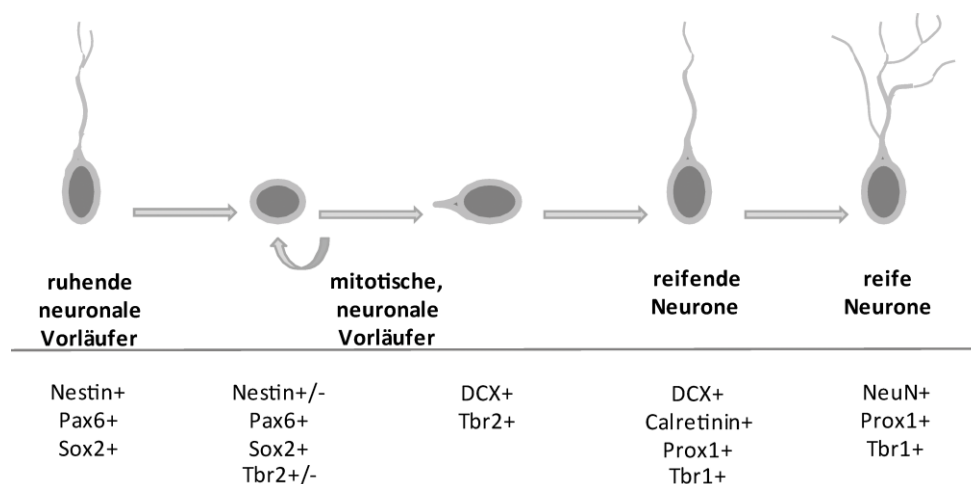
**Abb. 3.** Schematische Darstellung des Versuchsdesign und der Versuchsgruppen. Am sechsten postnatalen Tag (P6) werden die Ratten intraperitoneal (i.p.) mit Koffein (10 mg/kg), mit Dexmedetomidin (DEX; verschiedene Konzentrationen 1, 5, 10 µg/kg) oder mit Vehikel (0,9% NaCl) 15 Minuten vor der Exposition mit 21% O<sub>2</sub> (Normoxie) oder 80% O<sub>2</sub> (Hyperoxie) behandelt. Am P7 bzw. P8 werden die Jungtiere narkotisiert und transkardial perfundiert sowie die Organe für die weiteren Analysen entnommen.

## 2.1 Koffein im Hyperoxie-Schädigungsmodell der Ratte

### 2.1.1 Koffein und Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn

Publikation: Endesfelder, S., I. Zaak, U. Weichelt, C. Bühner, T. Schmitz. *Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain*. *Free Radic Biol Med*, 2014. 67: p. 221-34. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.026 [60]

Die postnatale Neurogenese im Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus beinhaltet die Generierung hippocampaler Körnerzellen und ist in der Prozessierung der neuronalen Reifung und Differenzierung ähnlich der adulten Neurogenese [112], welche konstitutiv im gesamten adulten Leben andauert [113]. Bei Ratten findet dieser Prozess während der vulnerablen Phase des schnellen Hirnwachstums zwischen dem postnatalen Tag P4 und P10, mit einem Maximum um P6/7, statt [114]. Physiologische und pathophysiologische Noxen können diesen sensiblen Prozess beeinflussen [115], der durch einen kaskadenartigen Ablauf von Proliferation, Differenzierung, Migration und synaptische Integration gekennzeichnet ist. Die unterschiedlichen Stadien der Differenzierung von neuronalen, mitotischen Vorläuferzellen, über reifende Intermediärneurone, zu reifen, postmitotischen Neuronen werden durch spezifische Transkriptionsfaktoren, wie Pax6, Sox2, Tbr1, Tbr2 und Prox1, reguliert und sind durch die Expression relevanter neuronaler Marker, wie Nestin, Doublecortin (DCX), Calretinin sowie NeuN (*neuronal nuclear antigen*), gekennzeichnet [116-118] (siehe Abb. 4).



**Abb. 4.** Schematische Darstellung der sequenziellen Reifung von mitotischen neuronalen Vorläuferzellen zu postmitotischen reifen Neuronen während der postnatalen hippocampalen Neurogenese mit den Expressionsmustern relevanter, selektiver neuronaler Marker und Transkriptionsfaktoren (modifiziert nach [60]). NeuN, neuronal nuclear antigen; Pax6, paired box 6; Sox2, sex determining region Y-box2; Tbr1/2, T-box brain gene 1/2; DCX, Doublecortin, Prox1, prospero homeobox 1.

Die quantitative Analyse der Anzahl der neuronalen Marker-exprimierenden Zellen im DG der infantilen Ratte zeigte, dass durch die Exposition gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen sich diese sowohl nach 24 Stunden (P7) als auch nach 48 Stunden (P8) in allen Differenzierungsstadien drastisch reduzierte. Aber auch Koffein unter normoxischen Bedingungen zeigte hier signifikante Differenzierungs-inhibierende Effekte. In Western Blot-Untersuchungen des Gesamt-Hirnlisates konnte eine Reduktion der neuronalen Marker DCX, ein Marker für mitotische reifende Neurone, und Calretinin, ein Marker für postmitotische unreife Neurone, bestätigt werden, wohingegen inhibierende

Effekte von Koffein im Vergleich zu den immunhistochemischen Färbungen allein nicht nachgewiesen werden konnten. Die Proliferationsfähigkeit der neuronalen Vorläuferzellen ist ein wesentliches Kriterium für die adäquate physiologische Entwicklung des Gehirns [119]. Einhergehend mit den Ergebnissen für die neuronalen Marker wurde durch die Hyperoxie über 24 und 48 Stunden die Proliferationskapazität signifikant reduziert. Koffein konnte dem protektiv entgegen und die Reduktion der Proliferationsraten verhindern, allerdings zeigte Koffein unter Raumluft bei 21%, vor allem bei den proliferierenden Nestin-positiven Vorläuferzellen, eine signifikante negative Beeinflussung der Proliferation. Wenn ruhende, neuronale Vorläuferzellen beginnen zu proliferieren, besitzen sie sowohl neuronales als auch astrozytäres Differenzierungspotential [120]. Die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren reguliert die Differenzierung über verschiedene morphologische Stadien der Vorläuferzellen über die reifenden mitotischen und postmitotischen bis hin zu den reifen Neuronen und können so zur Identifizierung neben den neuronalen Markern beitragen [118, 121, 122] (siehe Abb. 4). Pax6, ein Transkriptionsfaktor der neuronalen Vorläuferzellen, fördert die Expression von Tbr2, ein Transkriptionsfaktor der mitotischen Intermediärneurone, über die Initiierung von Sox2 und mündet in der Expression der Transkriptionsfaktoren Tbr1 und Prox1 zur Differenzierung der postmitotischen unreifen und reifen Neurone. Mittels mRNA-Analysen über Realtime-PCR konnte beeindruckend gezeigt werden, dass die Expression aller untersuchten Transkriptionsfaktoren nach 48 Stunden Hyperoxie signifikant herab reguliert wurde. Die einmalige Vorbehandlung mit Koffein verhinderte die Hyperoxie-vermittelte Expressionsminderung im Vergleich zu den mitgeführten Kontrolltieren, mit einer Ausnahme für *Tbr2*. Die *Tbr2* Expression wurde durch Koffein sowohl unter hyperoxischem als auch normoxischen Insult massiv reduziert.

Es ist bekannt, dass oxidativer Stress und Apoptose neuronale Prozesse im sich entwickelnden Gehirn modulieren. Die oxidative Schädigung der DNA durch ROS kann mittels immunhistochemischer Färbung über den Marker 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-oxodG) [123] und der apoptotische Zelltod über die *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL)-Färbungen nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der 8-oxodG-positiven Zellen im Kortex und DG zeigte nach 24- und 48stündiger Hyperoxie eine signifikante drei- bis vierfache Zunahme gegenüber den Kontrolltieren. Nicht überraschend scheint eine damit assoziierte Zunahme der apoptotischen Zellen im Kortex und der tiefen grauen Substanz, allerdings konnte aufgrund zu geringer TUNEL-positiver Zellen im DG keine statistische Auswertung erfolgen, wobei eine Tendenz erkennbar bleibt. Koffein wirkte diesem Effekt entgegen und reduzierte zum einen die oxidativen Schäden und zum anderen den apoptotischen Zelltod.

Die Ergebnisse der Studie zur postnatalen Neurogenese im Hyperoxie-Schädigungsmodell der Ratte zeigten, dass eine einzige Applikation von Koffein vor der Exposition mit hohen Sauerstoffkonzentrationen nicht nur die durch oxidativen Stress ausgelöste Reifeverzögerung der hippocampalen Neurone, die reduzierte Proliferationskapazität und die erhöhte Zelltodrate effizient verminderte, sondern initial auch anti-oxidativ wirkte.

Link zur Publikation:

[Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain](#)

































### 2.1.2 Koffein und Inflammation/Apoptose im sich entwickelnden Gehirn

Publikation: Endesfelder, S., U. Weichelt, E. Strauss, A. Schlor, M. Sifringer, T. Scheuer, C. Bühner, T. Schmitz. *Neuroprotection by Caffeine in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury*. Int J Mol Sci, 2017. 18(1). DOI: 10.3390/ijms18010187 [69]

Die Vermittlung protektiver Effekte von Koffein neben der Antagonisierung der Adenosinrezeptoren über anti-oxidative Eigenschaften von Koffein wird diskutiert [60, 124, 125]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht vollständig geklärt, ob Koffein als Radikalfänger per se agiert oder der Effekt durch anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften verstärkt wird [60, 126, 127]. In einer weiteren Studie sollten die Effekte einer Einzeldosis Koffein vor dem hyperoxischem Insult hinsichtlich seiner anti-oxidativen, anti-apoptotischen und anti-inflammatorischen Wirkungen untersucht werden.

Wirkt oxidativer Stress auf einen Organismus ein, existieren sehr potente anti-oxidative Systeme, die kaskadenartig programmiert sind. Oxidativer Stress bedeutet, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in einem Übermaß produziert werden oder das intrazelluläre anti-oxidative Abwehrsystem gestört ist. Zu den ROS zählen u.a. sauerstoffhaltige Verbindungen, wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), und sauerstoffhaltige Radikale, wie das Superoxidradikalanion. Freie Radikale oxidieren membranständige Lipide zu Lipidperoxiden [128] und Malondialdehyd (MDA) entsteht daraus als Oxidationsprodukt. Das Superoxidradikalanion kann durch die Superoxiddismutase (SOD) in  $H_2O_2$  umgewandelt werden [129] und anschließend durch die Gluthathionperoxidase in Wasser reduziert werden. Diese systemische anti-oxidative Antwort bietet somit verschiedene Möglichkeiten, oxidativen Stress und deren zelluläre Antwort nachzuweisen.

Um Lipidperoxidation nachzuweisen, wurden Proteinlysate mittels *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) über die Entstehung von MDA untersucht. Hyperoxie erhöhte die Lipidperoxidation signifikant. Der Nachweis von  $H_2O_2$  sowie die Aktivierung von Hämoxigenase-1 (HO-1) zeigte eine deutliche Erhöhung nach Hyperoxie. Diese Daten wurden unterstützt durch die Analyse der Mediatoren des Nrf2-Keap1-Weges. Das Nrf2-Keap1-System spielt neben dem NF $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Signalweg eine essentielle Rolle bei der Implementierung der anti-oxidativen Genregulation in Reaktion auf oxidativen Stress. Die katalytische Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase (GCLC, *Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*), welche die geschwindigkeitsbestimmende Phase des zellulären Antioxidans Glutathion (GSH) katalysiert, wird dabei durch *NFE2-related factor* (Nrf2) hochreguliert. Für den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor *Nrf2* und der katalytischen Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase (GCLC) konnte eine signifikante Zunahme der Expression unter Hyperoxie gezeigt werden. Eine erhöhte Expression von HO-1 deutet auf eine Aktivierung von anti-oxidativen Schutzmechanismen [130], zu denen Enzyme wie Katalase und SOD zählen [131], hin. Die tierexperimentellen Daten zeigten eine Hyperoxie-induzierte Reduktion des *SOD3*-Transkriptes. Es zeigte sich des Weiteren eine Beteiligung von Peroxiredoxin (Prx) und Sulfiredoxin (Srx), als wichtige Proteine der Thioredoxin-Familie und essentielle Mediatoren zur Genantwort auf oxidativen Stress. Diese Daten zeigen zusammengenommen eine adäquate Auslösung der anti-oxidativen Stressantwort im akuten Hyperoxie-Modell der juvenilen Ratte.

Bezugnehmend auf die aktuelle Literatur, kann eine anti-oxidative Wirkung von Koffein, vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen, angenommen werden [124, 125], die in der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte. Eine Konditionierung der Ratten mit Koffein vor dem Anlegen einer hohen Sauerstoffkonzentration führte zu einer Reduktion der zellulären oxidativen Stress-Antworten. Im zeitlichen Verlauf legen die Daten nahe, dass die anti-oxidative Abwehrkapazität während der Exposition gegenüber Hyperoxie vermindert ist und darüber hinaus ein vielversprechendes Ziel für schützende pharmakologische Strategien darstellt. Die Präkonditionierung mit Koffein konnte die durch oxidativen Stress induzierten Stressantworten signifikant reduzieren und wirkte anti-oxidativ.

NF $\kappa$ B ist neben Nrf2 ebenfalls ein essentieller redox-sensitiver Transkriptionsfaktor, der in Abhängigkeit von ROS aktiviert wird [132]. In den vorliegenden Analysen zeigte sich eine nukleäre NF $\kappa$ B-Aktivierung durch 80% Sauerstoff, die einhergeht mit der verstärkten Expression pro-inflammatorischer Zytokine (Tumornekrosefaktor (*TNF*) $\alpha$ , Interferon (*IFN*) $\gamma$ , induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (*iNOS*), Interleukin (*IL*)1- $\beta$  und *IL*-1 $\delta$ ) und sich so mit anderen Studien deckten [111]. Auch hier zeigte Koffein protektive, anti-inflammatorische Effekte, die im Sinne der wissenschaftlichen Fragestellung positiv sind.

Die Aktivierung von verschiedensten, in Abhängigkeit zu einander stehenden Mediatoren des oxidativen Stresses, wird oft mit Zellschädigungen und Zelltod assoziiert [133, 134]. Oxidativer Stress im Zusammenhang mit ROS und Inflammation führt unweigerlich zu der Frage nach apoptotischen Prozessen, die für den hyperoxischen Insult belegt sind [58-60, 111, 135]. Über die Apoptoserate im sich entwickelnden Gehirn hinaus, wie bereits in der Studie Endesfelder *et al.* 2014 [60] gezeigt, sollten hier weiterführende Analysen stattfinden. Neben der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-1, ein DNA-Strangbruch-vermittelndes Enzym, wurden ein Caspase-unabhängiger, *Apoptosis-inducing factor* (AIF), und ein Caspase-abhängiger, prozessierte Caspase-3, als apoptotische Mediatoren untersucht und bestätigten die Zelltod-verstärkende Wirkung von akuter Hyperoxie. Koffein wirkte dem entgegen und zeigte in diesem Schädigungsmodell anti-apoptotische Effekte.

Allerdings sollten auch die negativen Koffein-Effekte unter normoxischen Bedingungen erwähnt werden, da in dieser Arbeit auch unerwünschte Ereignisse detektiert wurden, die einem präventiven klinischen Einsatz nicht zuträglich wären, wie die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und die Induktion pro-apoptotischer Mediatoren.

Mit dieser tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass Koffein oxidative Stressmarker reduzierte, die anti-oxidative Abwehr förderte, redox-sensitive Transkriptionsfaktoren modulierte und pro-inflammatorische Zytokine und pro-apoptotische Mediatoren inhibierte. Koffein ist eine pleiotrope Substanz, welche neuroprotektive Effekte im sich entwickelnden Gehirn über anti-oxidative, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften vermittelt.

Link zur Publikation:

Neuroprotection by Caffeine in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury























































### 2.1.3 Koffein in der unreifen Lunge

Publikation: Weichelt, U., R. Cay, T. Schmitz, E. Strauss, M. Sifringer, C. Bühner, S. Endesfelder. *Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine.* Eur Respir J, 2013. 41(4): p. 966-73. DOI: 10.1183/09031936.00012412 [63]

Eine frühe Exposition der unreifen Lunge mit hohen Sauerstoffkonzentrationen führt zu progressiven Lungenerkrankungen, die der BPD bei Frühgeborenen sehr ähnlich sind [136, 137]. In der vorliegenden tierexperimentellen Studie untersuchten wir die Wirkung von einer einmaligen Koffein-Applikation vor einer akuter Hyperoxie an juvenilen Ratten, die sich in der pulmonalen Entwicklung beim Übergang der sakkulären zur alveolären Phase befanden [101] und zur humanen Situation mit 24 bis 38 SSW den extrem und sehr früh geborenen Kindern adäquat ist [106].

Fokus der molekularbiologischen und immunhistochemischen Analysen lag auf der Immuneinfiltration, der Expression pro-inflammatorischer Zytokine und histologischen Anzeichen für eine Modulation der Gewebearchitektur, die der Pathologien von BPD-erkrankten Kindern ähnlich wäre [109]. Für die unreife Lunge zeigte sich, dass eine einmalige Applikation von Koffein im akuten Hyperoxie-Modell der sechs Tage alten Ratte protektiv wirkte. Insbesondere die mit der histologisch nachweisbaren Hyperoxie-induzierten Infiltration von Leukozyten in das Lungengewebe, wie CD11b für Monozyten und Granulozyten, ED-1 zusätzlich für alveolare Makrophagen und Myeloperoxidase (MPO) für neutrophile Granulozyten, und die damit einhergehende Expression von Chemokinen, wie *macrophage inflammatory protein* (MIP)-2, *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 und *chemokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC)-1, und von pro-inflammatorischen Zytokinen, hier TNF $\alpha$  und IL-6, konnte mit Koffein drastisch gesenkt oder blockiert werden. Die postnatal an P7 und P8 histologisch detektierte, durch akute Hyperoxie ausgelöste Zerstörung der alveolär-kapillaren Barriere der unreifen Lunge, könnte beträchtliche Folgen auf die Lungenfunktion und den Gasaustausch haben. Diese Experimente legen nahe, dass die protektive Wirkung von Koffein in der unreifen Lunge zumindest teilweise durch eine Verringerung der pulmonalen Entzündung vermittelt wird. Weiterführende Analysen in einem chronischen Hyperoxie-Modell würde die klinische Relevanz für Koffein noch unterstützen.

Link zur Publikation:

[Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine](#)



















## 2.2 Dexmedetomidin im Hyperoxie-Schädigungsmodell der Ratte

### 2.2.1 Dexmedetomidin und Inflammation/Apoptose im sich entwickelnden Gehirn

Publikation: Sifringer, M., C. von Haefen, M. Krain, N. Paeschke, I. Bendix, C. Bühner, C.D. Spies, S. Endesfelder. *Neuroprotective effect of dexmedetomidine on hyperoxia-induced toxicity in the neonatal rat brain*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015: p. 530371. DOI: 10.1155/2015/530371 [111]

Trotz der Abnahme der Mortalität von Frühgeborenen bleibt das Risiko für eine höhere Anfälligkeit für Komorbiditäten. Die medizinisch-induzierte Anwendung von Anästhetika und Sedativa ist oft unumgänglich und steht in engem Zusammenhang zu einer guten Sauerstoffsättigung, so dass Sedativa mit einem möglichen neuroprotektivem Potential Aufmerksamkeit erregen. Bis jetzt ist nicht vollständig geklärt, welchen Einfluss Dexmedetomidin auf die neurologische Entwicklung und die neurologischen molekularen Prozesse im sich entwickelnden Gehirn hat. Die Noxen auf das reifende postnatale Gehirn von Frühgeborenen sind sehr verschieden, so dass es unerlässlich ist, die mögliche neuroprotektive Wirkung von Dexmedetomidin in diesen Zusammenhängen zu untersuchen.

Als Tiermodell wurde auch hier die juvenile Ratte im etablierten Hyperoxie-Schädigungsmodell genutzt, um die bereits bestätigten neurodegenerativen Prozesse in der vulnerablen Phase der Hirnentwicklung untersuchen zu können. Dexmedetomidin wurde in drei verschiedenen Konzentrationen einmalig vor der Sauerstoffexposition appliziert. Aufgrund der derzeit hinsichtlich der wissenschaftlichen Fragestellung unzureichenden Datenlage der einzusetzenden Dosis im neonatalen Rattenmodell und der zu erwartenden neuroprotektiven Wirkung wurden verschiedene Konzentrationen untersucht, um den höchstmöglichen protektiven Effekt ermitteln zu können. Die zu testenden Konzentrationen von Dexmedetomidin orientierten sich hier zum einen an den klinischen Konzentrationen (1 µg/kg KGW) aus der Pädiatrie [138] und zum anderen an tierexperimentell detektierten, neuroprotektiven Konzentrationen (5 und 10 µg/kg KGW) [139, 140].

In den initialen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Dexmedetomidin neurodegenerative Veränderungen reduzierte sowie oxidative Stressparameter und pro-inflammatorische Zytokinexpression verminderte. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien dieses Schädigungsmodells [60, 69], führte die akute Hyperoxie zu einer erhöhten Apoptoserate, welche signifikant mit allen untersuchten Dexmedetomidin-Konzentrationen, die teilweise unter den in adulten Tiermodellen angewandten Konzentrationen lag [141], minimiert werden konnte. Dexmedetomidin, in Anwendung unter Normoxie, induzierte keinen oxidativen Stress, allerdings kam es teilweise zur Induktion von apoptotischem Zelltod, vornehmlich im Kortex und im Thalamus. Dies steht konträr zu anderen Studien, die bislang nur protektive, und nicht toxische Effekte beschrieben haben [142, 143]. Interessant scheint, dass Dexmedetomidin auch anti-oxidative Eigenschaften besitzt und die in der Studie analysierten, oxidativen Stress-Parameter reduzierte, eine Tatsache, die bereits in Betracht gezogen wurde [142, 144].

Ebenso reduzierte Dexmedetomidin die durch Hyperoxie verursachte Zytokinexpression von IL-1 $\beta$  und illustrierte die protektive Wirkung auf neuroinflammatorische Prozesse, wie bereits in klinischen und

experimentellen Studien gezeigt [145, 146]. Dexmedetomidin selbst normalisierte somit den durch oxidativen Insult induzierten pro-inflammatorischen Zytokin-Spiegel.

Das essentielle Ergebnis dieser Studie ist, dass eine einmalige Applikation von Dexmedetomidin der oxidativen Stressantwort im Sauerstoffschädigungsmodell entgegenwirkt und sowohl Zelltod als auch Inflammation verhinderte. Weitere Untersuchungen sind unerlässlich, da auch bei den unter Raumluft gehaltenen Rattenwelpen apoptotischer Zelltod durch Dexmedetomidin induziert wurde. Bemerkenswerterweise hat eine einzige Dosis von Dexmedetomidin, vornehmlich bei den Konzentrationen 5 und 10 µg/kg KGW, all diese schädlichen Wirkungen unter hyperoxischen Bedingungen abgeschwächt oder aufgehoben. Die in dieser Studie gezeigten Nebenwirkungen von Dexmedetomidin, mit Fokus auf 10 µg/kg KGW, auf die Kontrolltiere, sollten in weiteren Studien zum Schutz des unreifen Gehirns mit Dexmedetomidin berücksichtigt werden. Basierend auf diesen Daten im Hyperoxie-Modell zeigte sich Dexmedetomidin als potentieller Kandidat für die Anwendung in der pädiatrischen Anästhesie und könnte einen neuroprotektiven Wirkstoff für die Frühgeborenenanästhesie darstellen.

Link zur Publikation:

[Neuroprotective effect of dexmedetomidine on hyperoxia-induced toxicity in the neonatal rat brain](#)

























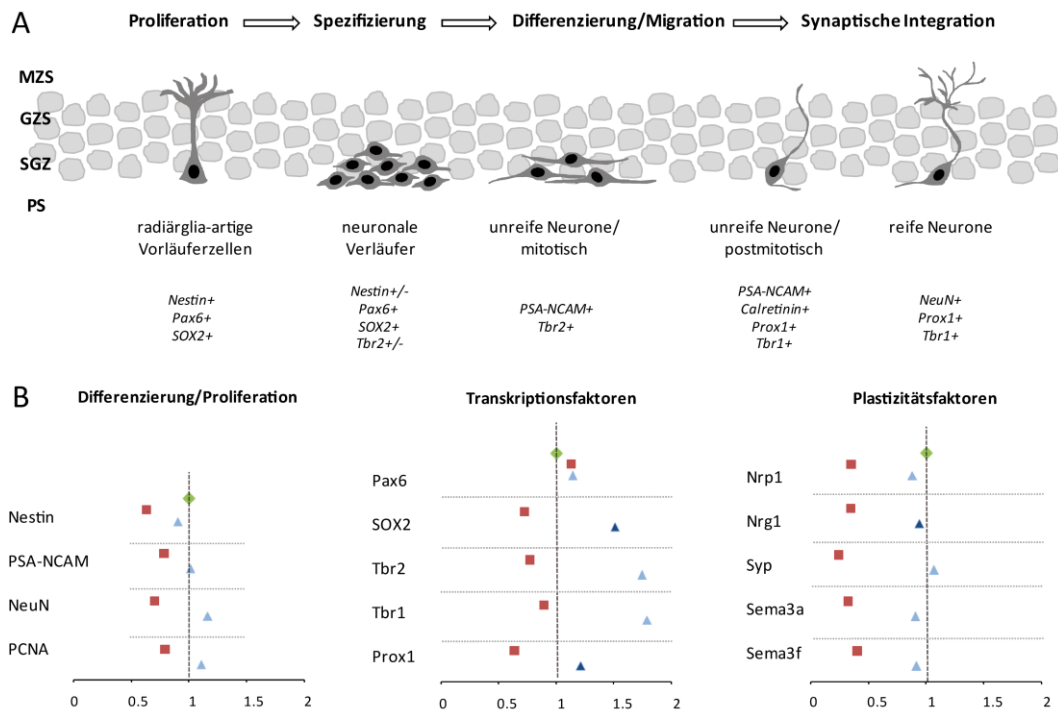
### 2.2.2 Dexmedetomidin und Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn

Publikation: Endesfelder, S., H. Makki, C. von Haefen, C.D. Spies, C. Bühner, M. Sifringer. *Neuroprotective effects of dexmedetomidine against hyperoxia-induced injury in the developing rat brain*. PLoS One, 2017. 12(2): p. e0171498. DOI: 10.1371/journal.pone.0171498 [110]

Postnatale Neurogenese ist, wie bereits ausgeführt (siehe 2.1.1), ein vulnerabler Prozess, der durch exogene Noxen empfindlich gestört werden und zu kognitiven und motorischen Defiziten führen kann. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt wenig über den Einfluss von Dexmedetomidin auf das sich entwickelnde Gehirn bekannt ist, wurden als Folgeuntersuchungen zu Sifringer *et al.* 2015 die Effekte durch die Applikation von Dexmedetomidin auf die postnatale, hippocampale Neurogenese im Hyperoxie-Schädigungsmodell untersucht. Fokus der Analysen lag auf der Proliferationskapazität mitotischer neuronaler Zellen, der neuronalen Reifung im DG und Einfluss auf die neuronale Plastizität durch Dexmedetomidin mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5 oder 10 µg/kg KGW, siehe 2.2.1) unter normoxischen Umgebungsbedingungen sowie als Präkonditionierung vor einem akuten, hyperoxischem Insult im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren.

Die Proliferationskapazität, analysiert über immunhistochemische Färbungen mit *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), und die postnatale neuronale Differenzierungskapazität, ausgewertet über immunhistochemische Färbungen neuronaler Marker (*Nestin*, *polysialylated neuronal cell adhesion molecule* (PSA-NCAM) und NeuN) wurden im DG durch den hyperoxischen Insult drastisch reduziert, einhergehend mit der verminderten mRNA-Expression assoziierter neuronaler Transkriptionsfaktoren (*Pax6*, *Sox2*, *Tbr2/1* und *Prox1*, siehe Abb. 5).

Des Weiteren wurde die Expression der neuronalen Plastizitätsfaktoren Neuregulin 1 (Nrg1), Neuropilin 1 (Nrp1), Semaphorin 3A (Sema3a), Semaphorin 3F (Sema3f) und Synaptophysin (Syn) auf mRNA und Protein-Ebene nach Hyperoxie inhibiert (siehe Abb. 5). Die Applikation von Dexmedetomidin (5 und 10 µg/kg KGW) zeigte konzentrationsabhängig einen signifikanten, protektiven Einfluss auf alle Untersuchungsparameter und verringerte die durch den oxidativen Stress ausgelösten Beeinträchtigungen auf Proliferation, Differenzierung und Plastizität im sich entwickelnden Rattengehirn. Dexmedetomidin angewendet unter normoxischen Bedingungen vermittelte eine höhere Proliferationsrate sowie eine gesteigerte neuronale Reifung, beeinflusste aber nicht die Expression der Plastizitätsfaktoren. Im sich entwickelnden Gehirn kann eigentlich kein Medikament ohne Nebenwirkungen, wie Dexmedetomidin unter Normoxie zeigte, postuliert werden, so dass weiterführende Studien unerlässlich sind, um potentiell schädigende Effekte definieren zu können.



**Abb. 5** Hippocampale Neurogenese im sich entwickelnden Gehirn und Einfluss von Hyperoxie und Dexmedetomidin. A) Neuronale Differenzierung moduliert durch verschiedene intrinsische Faktoren und charakterisiert durch spezifische Transkriptionsfaktoren und neuronale Marker. B) Die Ergebnisse unserer experimentellen Tierstudie zeigten eindrucksvoll die Reduzierung der Genexpression von relevanten Faktoren für die hippocampale Neurogenese und Plastizität durch Hyperoxie (rotes Quadrat) der sechs Tage alten Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren (Normoxie, grüne Raute) und den signifikanten Einfluss von 5 µg/kg (hellblaues Dreieck) und 10 µg/kg (dunkelblaues Dreieck) Dexmedetomidin (modifiziert nach [110]). GZS, granuläre Zellschicht; MZL, molekulare Zellschicht; NeuN, *neuronal nuclear*; Nrg1, Neuregulin 1; Nrp1, Neuropilin 1; Pax6, *paired box 6*; PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*; PS, polymorphe Schicht; Prox1, *prospero homeobox 1*; PSA-NCAM, *polysialylated neuronal cell adhesion molecule*; Sema3a/f, Semaphorin 3a/f; SOX2, *sex determining region Ybox 2*; SGZ, subgranuläre Zone; Syp, Synaptophysin; Tbr1/2, *T-box brain gene 1/2*.

Zusammenfassend zeigte Dexmedetomidin im Hyperoxie-induzierten Schädigungsmodell neuroprotektive Eigenschaften, welche, zurückführend auf den pathogenen Insult des oxidativen Stresses, anti-oxidativ vermittelt sein könnten.

Link zur Publikation:

Neuroprotective effects of dexmedetomidine against hyperoxia-induced injury in the developing rat brain















































### 3. Diskussion

Weltweit werden pro Jahr 15 Millionen Kinder zu früh geboren, wobei etwa 1 Million frühgeborene Kinder an den Folgen der Frühgeburt sterben. Die Frühgeburt zählt somit zu den häufigsten Todesursachen bei Kindern unter 5 Jahren [3, 147]. In Deutschland kommt etwa jedes zehnte Kind zu früh auf die Welt, davon etwa 12% mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g [148].

Die perinatale Mortalität konnte aufgrund der intensivmedizinischen Fortschritte in der Neonatologie gesenkt werden, gehen aber besonders bei Kindern mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g mit steigenden Morbiditätsraten einher [149-151]. Neben der Unreife des zu früh geborenen Kindes, gibt es eine Vielzahl an exogenen Noxen, die in der Pathogenese frühgeburtlicher Erkrankungen eine Rolle spielen können. Neben der Sauerstofftoxizität, resultierend aus den unphysiologisch hohen Sauerstoffkonzentrationen, denen Frühgeborene aufgrund der Geburt und notwendiger Sauerstoff-supplementierung ausgesetzt sind, sind medikamentöse Insulte, wie Anästhetika, als ebenso kausal anzusehen. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung ist essentiell für die Energiebilanz und für die normale Funktionalität des Organismus sowie erforderlich für das Wachstum und die kognitive und motorische Entwicklung. Die Unreife bedingt dabei ein Ungleichgewicht physiologischer Prozesse, wie des respiratorischen Systems und des anti-oxidativen Abwehrsystems. In dieser redox-instabilen Situation können zahlreiche medizinisch notwendige medikamentöse Insulte negativen als auch positiven Einfluss nehmen [60, 67, 69, 110, 152-156].

Sowohl der supplementierte Sauerstoff als auch medikamentöse Therapien zur Verbesserung der klinischen Situation von Frühgeborenen sind mit Nebenwirkungen für die Kurz- und Langzeitentwicklung behaftet. Neben der Klärung der pathologischen Prozesse, ist die Identifizierung möglicher therapeutischer Strategien Ziel der neonatologischen Forschung. Zusätzlich zu klinischen Studien eignen sich tierexperimentelle Arbeiten an entwicklungsadäquaten Modellen zur Untersuchung dieser wissenschaftlichen Fragestellungen.

#### 3.1 Sauerstofftoxizität

Das Überangebot an Sauerstoff im Sinne einer Hyperoxie stellt für den unreifen Organismus eine große Herausforderung dar. Ein Ungleichgewicht zwischen Prooxidanten und Antioxidanten führt zu oxidativem Stress. Oxidativer Stress betrifft alle neugeborenen Kinder aufgrund der Transition von der intrauterinen Hypoxie zur extrauterinen Hyperoxie. Aufgrund des reduzierten anti-oxidativen Abwehrsystems von Frühgeborenen und Neugeborenen kann keine ausreichende Gegenreaktion auf die entstehenden freien Radikale erfolgen, mit dem Ergebnis von zellulären oder Gewebeschäden, die ursächlich für die spezifischen Erkrankungen der Frühgeborenen sein können [51-53]. Das unreife, sich entwickelnde Gehirn und die unzureichend entwickelte Lunge sind gegenüber Störungen sehr anfällig und selbst kurzzeitige pathogene Insulte können zu langfristigen oder irreversiblen Schäden führen [49, 157].

Neuronale Beeinträchtigungen und daraus resultierende neurologische Fehlentwicklung bei Frühgeborenen werden häufig einer perinatalen Infektion mit einhergehender Entzündung und

oxidativem Stress zugeschrieben, der das unreife Gehirn in einer sehr vulnerablen Entwicklungsphase moduliert. In dem hier verwendeten neonatalen Rattenmodell wird oxidativer Stress durch frühzeitige Exposition gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen für einen akuten kurzen Zeitraum induziert und die auftretenden neuronalen Zellschäden sind vergleichbar mit der Situation bei frühgeborenen und neugeborenen Kindern [58].

Bei Untersuchungen der postnatalen Neurogenese führte die akute Hyperoxie zu einer erheblichen Beeinträchtigung der neuronalen Proliferation, zu einer gestörten neuronalen Differenzierung und Reifung im Hippocampus und erhöhte sowohl die oxidative DNA-Schädigung als auch den neuronalen Zelltod [60, 110]. Mitotische neuronale Vorläuferzellen migrieren aus der polymorphen Schicht des DG in die Subgranuläre Zone und in die granuläre Zellschicht, proliferieren und differenzieren sich hier final zum postmitotischen reifen Neurone und vernetzen sich dann in die neuronalen Schaltkreise [158, 159]. Der Hippocampus ist essentiell für die Lern- und Gedächtnisleistung, die durch funktionelle und strukturelle Veränderungen beeinträchtigt werden können [103, 108, 160-162], aber auch neuropathologische Veränderungen können zur Entstehung von Erkrankungen beitragen [163, 164]. Vor allem die Reduktion der Proliferationsfähigkeit der neuronalen Vorläufer und der Intermediärneurone, die sich nicht auf die Molekularschicht erstreckte, deutet primär auf eine Reduktion der neuronalen Stammzellen, die Hauptressource für die neuronalen Vorläuferzellen darstellt, oder auf ein temporäres Ausscheiden aus dem Zellzyklus hin [165, 166]. Unter hyperoxischem Insult werden Expressionsmuster von Zellzyklusregulator-Proteinen verändert [154, 167], die im Zusammenhang mit einer oxidativen Schädigung der DNA, assoziiert mit einer Aktivierung von p53 und p21, das Ausscheiden der neuronalen Stammzellen aus dem Zellzyklus begründen könnten [168, 169]. Nicht nur die neuronale Proliferationsfähigkeit wird beeinträchtigt, auch bezogen auf die Differenzierungskapazität kann eine Verzögerung der Reifung unter oxidativem Stress festgestellt werden [60, 110]. Auffällig ist die reduzierte Anzahl an intermediären Neuronen (DCX- und PSA-NCAM-positive Zellen) und reifen Neuronen (NeuN-positive Zellen), was auf eine verminderte Migrationsfähigkeit und verzögerte Reifung hindeutet [167, 170, 171]. Initial gesteuert und definiert wird die neuronale Differenzierung durch eine kaskadenartig, überlappendes Netzwerk von neuronalen Transkriptionsfaktoren, wie Pax6, Sox2, Prox1, Tbr1 und Tbr2 [118, 121, 172, 173]. Die verzögerte Differenzierung, Migration und Proliferation kann auf Ebene der Transkriptionsfaktoren, die hochspezifisch diese Prozesse steuern, nachvollzogen werden, da auch hier eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression unter hyperoxischer Exposition nachgewiesen werden konnte [60, 110]. Tbr2 ist beispielsweise ein wesentlicher Regulator für die intermediären neuronalen Vorläuferzellen und unverzichtbar für den Fortgang der Neurogenese während der DG-Entwicklung. Tbr2 beeinflusst den neuronalen Stammzellpool grundlegend. Des Weiteren bindet Tbr2 direkt an Sox2, was darauf hindeutet, dass Tbr2 das Fortschreiten der Differenzierung zu intermediären Neuronen beeinflussen kann, indem es mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert [174, 175]. Tbr2 nachgeschaltet ist der Transkriptionsfaktor Prox1, welcher postmitotisch in den reifenden und reifen Neuronen exprimiert wird [176, 177]. In Abwesenheit von Prox1 können zwar neuronale Marker exprimiert werden, allerdings sind die neuronalen Zellen nicht in der Lage, weiter zu differenzieren oder Apoptose wird

induziert [178]. Neurogenese ist postnatal wie auch adult ein sensibler Prozess und ist immer als Gleichgewicht zwischen Proliferation, Migration, Überleben und Differenzierung in allen Stufen der neuronalen hippocampalen Zellentwicklung zu betrachten [179, 180]. Die Veränderung der Sauerstoffspannung ist eine der wichtigsten exogenen Faktoren für die Regulation der Proliferation und Differenzierung [181]. Unsere Daten des akuten Sauerstoffschädigungsmodells ergänzen diese Erkenntnisse und zeigen, dass vierfach höhere Sauerstoffpartialdrücke im unreifen Gehirn der Ratte die Genese und Reifung von Neuronen im Hippocampus beeinträchtigen kann.

Oxidativer Stress bedeutet für das unreife Gehirn auch eine höhere Rate an neurodegenerativen Prozessen [59-61, 111, 182, 183]. Die Exposition mit hohen Sauerstoffkonzentrationen von infantilen Ratten induzierte neben der Oxidierung der DNA [60], abhängig von der lokalen anti-oxidativen Kapazität [184], auch eine Vielzahl an Markern für oxidativen Stress, wie HO-1 und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sowie Mediatoren für eine anti-oxidative zelluläre Antwort [69], in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration [185]. Einhergehend mit dem erhöhten oxidativem Stress werden auch redox-sensitive Transkriptionsfaktoren aktiviert, wie Nrf2, die in Zusammenhang mit einer Initiierung der pro-inflammatorischen Entzündungskaskade durch Aktivierung des NFκB-Signalweges gebracht werden können [132]. Diese Abhängigkeit von oxidativem Stress mit einer Induktion von Nrf2 und einer daraus resultierenden erhöhten Proteinexpression von HO-1, Prx1 und Srx1 sowie erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinspiegeln konnten wir in unseren Studien zeigen [69] und bekräftigen die Ergebnisse vorangegangener Studien [111]. Ebenso kann die Aktivierung von NFκB die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren erhöhen, welche wiederum zur Aktivierung von NFκB führen können [186]. Apoptose ist ein zellulärer Schutz vor langanhaltender Inflammation und kann durch oxidativen Stress im unreifen Gehirn induziert werden [58]. Durch hohe Sauerstoffkonzentrationen wurden Mediatoren wie PARP-1, AIF und prozessierte Caspase 3 aktiviert [69] und begründen einmal mehr die pro-apoptotische Wirkung von oxidativem Stress [59, 60, 111, 135]. In der Summe konnten durch das Hyperoxie-Schädigungsmodell die pro-inflammatorische sowie pro-apoptotische Wirkungen nach Induktion der oxidativen Stress-Kaskade im unreifen Gehirn der Ratte gezeigt werden. Des Weiteren legen die Ergebnisse nahe, dass die anti-oxidative Abwehrkapazität während der Exposition gegenüber Hyperoxie vermindert ist.

Oxidativer Stress betrifft im unreifen Organismus nicht nur das sich entwickelnde Gehirn, sondern spielt bei der Entstehung der BPD eine entscheidende Rolle [14], wobei das Geburtsgewicht und das Gestationsalter gute Prädiktoren darstellen [187]. Frühgeborene, die eine BPD entwickelten, benötigten meist zusätzlichen Sauerstoff und wurden mechanisch beatmet oder zählten zu der Gruppe der sehr oder extrem frühgeborenen Kinder ohne respiratorische Erkrankungen [72]. In einer prospektiven, randomisierten Studie, in der Frühgeborene ab dem 28. Schwangerschaftswoche bis zur Reanimation mit 90% oder 30% Sauerstoff während der ersten 5 Minuten des Lebens zugeordnet wurden, waren die BPD-Raten Frühgeborenen, die mit 30% Sauerstoff reanimiert wurden, signifikant niedriger [188]. Begründet wird die molekulare Pathologie durch inflammatorische Reaktionen durch Zytokine sowie oxidativen Schäden und der strukturellen Unreife der Lunge. Assoziierte Tiermodelle zeigen unter hyperoxischem Insult BPD-ähnliche Pathologien [109]. Eine akute Sauerstoffexposition ist

ausreichend, um massive Immuneinfiltrationen in der sechs Tage alten Ratte beobachten zu können, einhergehend mit einer Induktion der Expression von Chemokinen und pro-inflammatorischen Zytokinen [63]. Werden relevante Chemokine, wie CINC-1 und MIP-2 inhibiert, reduzierte sich der Immuneinflux und durch Hyperoxie induzierte Gewebeschäden der unreifen Lunge werden verhindert [189]. Chemokine spielen eine essentielle Rolle in der Sauerstoff-vermittelten pulmonalen Inflammation [190]. Darüber hinaus waren die Plasmakonzentrationen des CXC-Chemokins IL-8, dem humanen Homolog von CINC-1, in der Studie von Vento *et al.* [188] während der ersten drei Lebenswochen bei Kindern, die mit 90% Sauerstoff randomisiert waren, konsistent höher, verglichen mit 30% Sauerstoff beatmeten Kindern. Eine Induktion dieser Chemokine konnte sowohl in chronischen Hyperoxie-Tiermodellen nachgewiesen werden [191], als auch in Atemwegssekreten von Frühgeborenen mit BPD [192, 193]. Aktivierte Immuneinfiltrationen erhöhen ihren eigenen oxidativen Stoffwechsel und erhöhen zusätzlich den oxidativen Stress [194]. Bei reduzierter Inaktivierung dieser toxischen Produkte, aufgrund des unreifen anti-oxidativen Abwehrsystems, sind pulmonale Zellschädigung und Zelltod die Folge. ROS oxidieren ebenso Surfactant-Proteine, was zu einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion führen kann. Ein erhöhter oxidativer Schaden sowie eine reduzierte anti-oxidative Kapazität konnte in frühgeborenen Kindern mit Atemnotsyndrom assoziiert werden [195].

Sauerstoff, mit seinen spezifischen und physiologischen Effekten, ist eines der am häufigsten genutzten therapeutischen Strategien zur Behandlung von respiratorischen Instabilitäten oder reduzierten Sauerstoffsättigungen, nicht nur bei Frühgeborenen. Resultierende hohe Sauerstoffpartialdrücke führen zu oxidativem Stress, der bei frühgeborenen Kindern mit einem unreifen Organ- und anti-oxidativem Enzymsystem unerwünschte Auswirkungen auf das Kurz- und Langzeit-Outcome haben kann. Der kritische Umgang kann eine komplette Vermeidung einer notwendigen Sauerstoff-Therapie allerdings nicht immer verhindern. Die Verwendung von, zur humanen Entwicklung adäquaten, Hyperoxie-Schädigungsmodelle tragen nicht nur zur Klärung der molekularen Mechanismen bei, sondern können grundlegende Erkenntnisse zu präventiven Strategien liefern. Das hier für die Untersuchungen genutzte Hyperoxie-Schädigungsmodell scheint in Übereinstimmung mit den Daten anderer Studien geeignet, die Effekte möglicher protektiver Substanzen zu untersuchen. Eine Aufschlüsselung der molekularen Mechanismen lässt sich anhand dieser Daten nicht abschließend klären, da extrinsische Faktoren, wie eine Anreicherung der Umgebung, oder intrinsische Faktoren, wie regulatorische miRNAs, in diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden und Ziel für weiterführende Analysen sein muss.

### 3.1 Koffein

Die Risikofaktoren für die Entstehung einer chronischen Lungenerkrankung sind different und stehen doch in engem Zusammenhang. Ein entscheidender Faktor ist die Frühgeburtlichkeit an sich und das Risiko erhöht sich umgekehrt proportional zum Gestationsalter. Neben der maternalen Präeklampsie [196] und dem Surfactantmangel des zu früh geborenen Kindes, können vor allem die Dauer der Sauerstoffgabe, die Intensität der Beatmung und die Konzentration des Sauerstoffes das Risiko einer

BPD-Entstehung erhöhen [197]. Neben der Vermeidung der Frühgeburt per se steht therapeutisch die Vermeidung der möglichen Risikofaktoren an erster Stelle. Therapiestrategien umfassen die frühzeitige Behandlung von pulmonalen Infektionen, die Vitamin A-Supplementierung [198], die Surfactantgabe bei angezeigtem Atemnotsyndrom [199], die bei minimalinvasiver Applikation eine invasive Beatmung vermeiden kann [200], generell die Vermeidung von invasiven Beatmungsstrategien [201] und die Vermeidung hoher Sauerstoffkonzentrationen [202]. Zudem führte die postnatale Gabe von Koffeincitrat zu einer signifikanten Reduktion der BPD-Rate [74], wobei in einer primären Studie positive Effekte auf das neurologische Outcome gezeigt werden konnten, welche sich aber in einer Folgestudie nicht bestätigten [203]. Koffein zeigte in klinischen Studien [74, 203] protektive Effekte und stellt ein relevantes Forschungsziel der Neonatologie dar. Studien, die zeigen, dass Koffein eine anti-oxidative Aktivität besitzt [124, 125] und somit vor oxidativen Stress-assoziierten Erkrankungen schützen könnte, sind dabei wegweisend.

Das Methylxanthin Koffein ist das Mittel der Wahl bei der Behandlung der Frühgeborenen-Apnoen [204] mit einem höheren therapeutischen Index und einer längeren Halbwertszeit als andere Methylxanthine und zeigte in initialen Studien eine wesentliche Verbesserung des klinischen Outcomes von sehr und extrem Frühgeborenen [74, 203, 204]. Es zeigten sich neuroprotektive Effekte im sich entwickelnden Gehirn [60, 205], anti-inflammatorische Effekte [63, 69, 206], Reduzierung von Mortalität und Morbidität, wie Verminderung der BPD-Rate und der Zerebralparese, und vor allem auch eine Verkürzung der Dauer der mechanischen Beatmung [74, 207]. Klinisch wurden auch unerwünschte Effekte beobachtet, wie eine vorübergehende Reduktion des Geburtsgewichtes, einen höheren Sauerstoffbedarf und Tachykardien [208-210]. Neben den primär vermittelten Wirkeffekten über die unspezifische Antagonisierung der Adenosinrezeptoren [76] werden auch anti-oxidative Eigenschaften von Koffein diskutiert [211-213], wie bei der Neuroprotektion von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen [124, 125]. Wir konnten im akuten Sauerstoffschädigungsmodell der juvenilen Ratte essentielle anti-oxidative Eigenschaften von Koffein nachweisen. Eine Einzeldosis Koffein vor dem hyperoxischem Insult führte in erster Linie zu einer Verringerung der oxidativen Schäden und Insulte [69], wie Reduktion der Lipidperoxidation oder Verminderung der Generierung von Wasserstoffperoxid, verstärkte aber auch die anti-oxidative Stressantwort, wie eine höhere SOD-Transkription. Reduzierte anti-oxidative systemische Reaktionen, wie eine verminderte SOD-Expression, könnten auf eine primäre Verminderung der anti-oxidativen Kapazität nach hyperoxischem Insult hinweisen [214], dem durch Koffein entgegengewirkt wird.

In Abhängigkeit der ROS-Generierung werden verschiedene redox-sensitive Transkriptionsfaktoren aktiviert. Eine Aktivierung des Nrf2/Keap1-Weges wird in Zusammenhang mit moderaten, oxidativem Stress gebracht und resultierende intermediäre ROS initiieren über den NF $\kappa$ B-Weg die pro-inflammatorische Zytokin-Kaskade [132]. In unseren Untersuchungen konnten wir mit der erhöhten Nrf2-Expression auch die Induktion der oxidativen Stressantwort assoziieren. Des Weiteren bewirkte Koffein eine Modifizierung der redox-sensitiven Antwort des Nrf2/Keap1-Weges, da daraus eine Verminderung der Hyperoxie-induzierten NF $\kappa$ B-Expression resultierte [69]. Die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Weges kann dabei durch verschiedene exogene Faktoren, durch oxidativen Stress oder Zytokine

initiiert werden [215, 216]. Koffein verhinderte bei den 6 Tage alten Ratten die Aktivierung von NF $\kappa$ B trotz Sauerstoffexposition, einhergehend damit reduzierte sich auch die Expression pro-inflammatorischer Zytokine und wirkte somit effektiv im sich entwickelnden Gehirn anti-inflammatorisch [69]. Diesen anti-inflammatorischen Effekt zeigte Koffein auch in der unreifen Lunge mit einer adäquaten Inhibierung der Immunzellinfiltration, einer Reduktion der pro-inflammatorischen Antwort und Verminderung der Chemokin-Expression [63]. Assoziiert mit den anti-inflammatorischen Eigenschaften sind die anti-apoptischen Effekte, wie Verminderung des neuronalen apoptotischen Zelltodes sowie die Modifizierung relevanter pro-apoptischer Mediatoren durch Koffein, nicht überraschend [60, 69]. Oxidative Stress-Modelle mit Hypoxie-Ischämie zeigten ebenfalls Apoptose-hemmende Koffeineffekte [217, 218] und eine Regulation des neuronalen Zellüberlebens durch Koffein könnte dabei über die direkte Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs erfolgen [219]. Eine vielseitige Modulation differenter zellulärer Mechanismen durch Regulation von Expressionsprofilen verschiedener Gene konnte durch cDNA-Mikroarrays für Koffein gezeigt werden [232]. Ebenso konnte für das Methylxanthin Aminophyllin gezeigt werden, dass es im Hippocampus nach hypoxisch-ischämischen Insult die Zelltodrate reduzierte [220], Koffein-haltiger Kaffee konnte Wasserstoffperoxid-induzierten neuronalen Zelltod über die Inhibierung pro-apoptischer Mediatoren verhindern [221] und Koffein reduzierte die Bilirubin-induzierte Neurotoxizität bei primären Astrozyten der Ratten über anti-apoptische, anti-oxidative, anti-inflammatorische und anti-nitrosative Effekte [222]. Ebenso konnten Hyperoxie-induzierte alveolare Wachstumsretardierungen der neonatalen Ratte durch eine frühe Koffeinbehandlung vermindert werden [65].

Die pharmakologischen Effekte von Koffein sind gut beschrieben [223, 224] und die aktuelle Literatur kann protektive Effekte in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Schädigungsmodellen beschreiben, die auch komplexe Verhaltens- und biochemische Wirkungen im Gehirn mit einschließen und so wahrscheinlich die Neurogenese beeinflussen können [76, 225]. Bei unseren Untersuchungen zum Einfluss von Koffein im hyperoxischem Schädigungsmodell auf die hippocampale Proliferationskapazität und neuronale Reifung konnten neuroprotektive Wirkungen gezeigt werden [60]. Auch diese Effekte können als anti-oxidativ- und/oder Adenosin-Rezeptor-vermittelt diskutiert werden [124, 226, 227], wobei die zellulären Mechanismen hinsichtlich der neuronalen Proliferation, der neuronalen Differenzierung und vor allem auch des Zelluntergangs nicht vollständig verstanden sind [126, 228-232]. Auch die Antagonisierung des Dopamin D2 Rezeptors könnte eine Rolle spielen, welche mit einer verstärkten Neurogenese in Verbindung gebracht wird [233], ebenso wie p53-abhängige und –unabhängige Mechanismen der Modulation von Proliferation durch Koffein [234, 235]. In unphysiologisch hohen Konzentrationen kann Koffein auch als Phosphodiesterase-Inhibitor über die den sekundärer Messenger cAMP fungieren. Bei Untersuchungen mit Rolipram konnte eine verstärkte hippocampale Zellproliferation, die in einer höheren Rate an reifen neuronalen Zellen resultierte, nachgewiesen werden [236].

Neben der Antagonisierung der Adenosinrezeptoren durch Koffein, primär über den inhibitorischen A1-Adenosinrezeptor-Subtyp und den stimulatorischen A2a-Adenosinrezeptor-Subtyp [237, 238], kann die Wirkvermittlung different sein und scheint von Koffein per se sehr vielseitig zu sein. Auch die

Genexpression der Adenosinrezeptoren an sich kann durch exogene Noxen beeinflusst werden und kann je nach Insult konträr sein [239, 240]. Koffein-assoziierte Eigenschaften können nicht eindeutig einem Subtyp zugeordnet werden, da beide im neuronalen Kontext exprimiert werden und diese durch Koffein mit einer ähnlichen Affinität antagonisiert werden [237, 241]. Zusätzlich, wie bereits erwähnt, wird Koffein als Radikalfänger beschrieben [211] und vermittelt die meist eher toxischen Effekte wahrscheinlich durch Ryanodin-Rezeptor-sensitive Kalziumkanäle [242, 243] und kann Einfluss auf GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren-vermittelte Effekte nehmen [244, 245]. Ergänzt werden kann dieser Aspekt dadurch, dass auch eine Heteromerisierung von Adenosin-A1- und -A2a-Rezeptoren Einfluss auf die Modulation der glutamatergen und GABAerger Neurotransmission ausüben kann [246, 247]. Die Vermittlung protektiver Effekte über ko- und heteroexprimierte Adenosinrezeptoren, auch in Abhängigkeit der Konzentration von Agonisten und Antagonisten, ebenso wie die Rezeptorexpression, ist sehr divergent [205, 245, 248] und die Einflussmöglichkeiten sind extrem komplex. Um pharmakokinetische Mechanismen abgrenzen und identifizieren zu können, müssten umfangreichere experimentelle Studien erfolgen.

Allerdings müssen auch Koffein-Effekte ohne pathogenen Insult, wie hier die Sauerstofftoxizität, diskutiert werden, da über einen möglichen präventiven klinischen Einsatz von Koffein in der neonatologischen Intensivmedizin diskutiert wird [249, 250]. So verminderte Koffein auch unter Kontrollbedingungen die Lipidperoxidation, induzierte die SOD-Expression als Mediator des adaptiven Schutzmechanismus gegen toxische Substanzen, induzierte pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine [63, 69] und reduzierte die Proliferationskapazität reifender Neurone im Hippocampus in Korrelation spezifischer neuronaler Transkriptionsfaktoren [60]. Chavez Valdez *et al.* diskutieren dazu den Koffein-Plasmaspiegel, wobei höhere Plasmaspiegel, außerhalb des therapeutischen Bereiches, ebenso wie zu geringe Plasmaspiegel, zur Zunahme inflammatorischer Zytokine führte und dies mit der klinischen Situation Frühgeborener korrelierte [206]. Diese pro- und anti-inflammatorischen und teilweise übermodulierten systemischen Reaktionen auf Koffein weisen noch einmal mehr auf einen sehr komplexen Wirkmechanismus hin und müssen kritisch betrachtet werden, auch wenn in der klinischen Situation die positiven Effekte der präventiven Koffeintherapie überwiegen [207, 250, 251].

### **3.2 Dexmedetomidin**

Eine Allgemeinanästhesie ist für frühgeborene Kinder mit medizinischer Indikation teilweise unerlässlich. In der Kinderanästhesie werden dabei, bei einer Anpassung der Dosis, meistens adäquate Narkosemittel und Adjuvantien wie bei Erwachsenen eingesetzt [83]. Es kommen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor Antagonisten, wie Ketamin, und/oder  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA<sub>A</sub>)-Rezeptor-Agonisten, wie Benzodiazepine, Barbiturate, Isofluran oder Propofol, zum Einsatz [252]. Nicht nur, dass insbesondere Früh- und Neugeborene ein deutlich erhöhtes Narkoserisiko zeigen [253], auch die perioperative Morbidität und Mortalität aufgrund des unreifen Organsystems ist erhöht [254, 255]. Die neurologischen Langzeit-Folgen für das unreife Gehirn sind bis jetzt nicht vollständig geklärt.

Neben Propofol und Midazolam sind in den letzten Jahren die  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonisten in den klinischen und experimentellen Fokus gerückt. Der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonisten Dexmedetomidin stellt eine geeignete Alternative zu bisherigen Narkotika und Sedativa dar [256-258]. Obwohl Dexmedetomidin z.Z. in Deutschland nur zur Anwendung bei Erwachsenen zugelassen ist, gibt es bereits Studien an Kindern, vor allem an pädiatrischen Intensivpatienten [259-261] und Frühgeborenen [99, 100, 262]. Die positiven Effekte einer Dexmedetomidin-Behandlung mit einer Verkürzung der mechanischen Beatmungsdauer bei Frühgeborenen [100], die ebenfalls mit klinischen Studien Erwachsener korreliert [263-266] und die damit verbundene mögliche Minimierung von Folgeerkrankungen, legt nahe, dass Dexmedetomidin protektiv gegenüber anderen Insulten sein könnte.

Bis jetzt ist nicht bekannt, welchen Einfluss Dexmedetomidin auf die neurologische Entwicklung und die neurologischen molekularen Prozesse im sich humanen entwickelnden Gehirn besitzt. Die Noxen auf das reifende postnatale Gehirn von Frühgeborenen sind sehr verschieden, so dass es nahe liegt, die mögliche neuroprotektive Wirkung von Dexmedetomidin in diesen Zusammenhängen zu untersuchen. Neben den erforderlichen medizinischen Eingriffen unter Sedierung, stellen auch hohe Sauerstoffkonzentrationen einer relativen und absoluten Hyperoxie ein großes Problem mit den bereits aufgeführten negativen Auswirkungen auf die Redox-Homöostase und der gestörten neurologischen Entwicklung frühgeborener Kinder [107, 267, 268] sowie der Induktion von oxidativem Stress dar, mit der Folge von Neurodegeneration und gestörter neuronaler Reifung in tierexperimentellen Studien [46, 59-62, 183].

Dexmedetomidin zeigte in verschiedenen tierexperimentellen Studien neuroprotektive Effekte, primär bei anästhetisch-induzierten Zelltod [269, 270] und reduzierte die pulmonale Immunezellinfiltration sowie die pro-inflammatorische Zytokin-Antwort bei hyperoxisch-induzierter Schädigung der unreifen Lunge [271]. In unseren Studien zur Wirkung verschiedener Konzentrationen von Dexmedetomidin unter hyperoxischem Insult konnten wir zeigen, dass Dexmedetomidin signifikant den apoptotischen Zelltod, die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, oxidative Stressmarker und die Lipidperoxidation reduzierte [111]. Dexmedetomidine unter Normoxie induzierte keinen oxidativen Stress, aber bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  erhöhte sich der apoptotische Zelltod im Kortex und Thalamus. Kontrovers dazu zeigten andere experimentelle Studien, auch bei höheren Dexmedetomidin-Konzentrationen, keinen erhöhten Zelltod [272] und es wurde ausschließlich von protektiven Effekten berichtet [142, 143, 269, 272, 273]. Die gezeigten anti-inflammatorischen Dexmedetomidin-Effekte konnten zuvor ebenfalls in klinischen sowie experimentellen Studien gezeigt werden [145, 146]. Durch Dexmedetomidin in Einzelapplikation unter normoxischen Bedingungen wird keine inflammatorische Antwort ausgelöst und inhibiert ausschließlich die durch Hyperoxie-induzierten Zytokinantworten über pleiotrophe Effekte verschiedener neuronaler Zellen [146, 274, 275].

Die erhobenen Daten suggerieren einen anti-oxidativen Effekt von Dexmedetomidin und daraus resultieren möglicherweise anti-inflammatorische Eigenschaften. Eine erhöhte anti-oxidative Kapazität konnte auch durch andere experimentelle Arbeiten belegt werden [142, 276, 277]. Durch diese anti-



oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von Dexmedetomidin scheint die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-Agonisierung eine potente Möglichkeit der Neuroprotektion darzustellen.

Die pathologischen Folgen von oxidativem Stress auf das unreife Gehirn umfassen Neurodegeneration, Neuroinflammation und daraus folgend Reduktion der neuronalen Proliferations- und Differenzierungskapazität [60, 110] sowie der neuronalen Plastizität [67, 110]. Dexmedetomidin, vornehmlich in den Konzentrationen 1 und 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , war in der Lage, die oxidativen Stress-Antworten zu reduzieren und dadurch die Reduktion der neuronalen Proliferation und die Reifeverzögerung aufzuheben [110]. Im Vergleich dazu wirkte die höhere Konzentration von Dexmedetomidin mit 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  eher toxisch auf die reifen Neurone, protektiv dagegen auf die mitotischen Nestin-positiven Vorläuferzellen. Nestin ist kennzeichnend für Vorläuferzellen mit einer hohen Proliferations- und Differenzierungskapazität [278] und wird von neuronalen und glialen Vorläuferzellen gleichermaßen exprimiert [279], wie reaktiven Sox-2 exprimierenden Astrozyten [280]. Die verzögerte neuronale Reifung wird wahrscheinlich durch die reduzierte Expression der spezifischen neuronalen Transkriptionsfaktoren verstärkt [117], die durch die Präkonditionierung mit Dexmedetomidin aufgehoben wird. Einhergehend mit diesen Effekten werden durch die Hyperoxie auch Faktoren moduliert, die ein hohes Potential für die neuronale Plastizität besitzen. Neurogenese kann durch verschiedene Faktoren, wie positive Umwelteinflüssen für Kognition und Verhalten, aber auch negativ, wie verschiedenste Arten von Stress, beeinflusst werden [60, 281]. Es werden Genexpressionsniveaus durch den hyperoxischen Insult und damit unter oxidativem Stress signifikant reduziert, die bei der neuronalen Plastizität, wie Neuregulin oder Synaptophysin, eine essentielle Rolle spielen [282-285]. Dexmedetomidin (5 und 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) inhibiert eindrucksvoll die Reduktion der Plastizitätsfaktoren [110] unter akuter Hyperoxie. Nachvollziehbar gezeigt wurde dieser Effekt in einer Synaptophysin-knockout Maus mit Veränderungen in funktionellen und strukturellen Veränderungen im Gehirn, ebenso wie essentielle Veränderungen der Neurotransmission in Synaptogyrin/ Synaptophysin-knockout Mäusen, mit Beeinträchtigungen der Kurz- und Langzeitplastizität [286]. Oxidativer Stress verringerte den Synaptophysin-Spiegel und führte zu einem Verlust synaptischer Vesikel und damit verbunden zu einer Beeinträchtigung der Neurotransmitter-Freisetzung [286]. Führen Neureguline, als Liganden für epidermale Wachstumsfaktoren, zu einer Aktivierung, findet nachweislich eine Regulation der Proliferation, Migration und Differenzierung statt [287] und ein Neuregulin-Mangel ist assoziiert mit einer gestörten hippocampalen Plastizität sowie einer gestörten Neurotransmission [288]. Ebenso kann eine hippocampale Akkumulation von Semaphorin 3a in frühen Alzheimer-Krankheitsstadien auf neurodegenerative Prozesse hindeuten [297].

Die zu frühe Geburt, vor allem der sehr und extrem zu früh geborenen Kinder, birgt ein erhöhtes Risiko für kognitive und motorische Defizite [287], die durchaus auch auf einer gestörten neuronalen Plastizität basieren könnten und ein zu diskutierendes Effekt darstellt. Es ist bekannt, dass oxidativer Stress zu einem kognitiven Abbau führen kann [288] und neurotrophe Faktoren dem entgegenwirken können [289]. Daher scheint der Diskussionsansatz berechtigt, dass die Neuroprotektion mit Dexmedetomidin nicht nur auf möglichen anti-oxidativen und damit verbundenen anti-inflammatorischen Effekten gegen die Neurodegeneration und -inflammation zur resultierenden

neuronalen Reifung und Differenzierung beiträgt, sondern offensichtlich auch der Erhalt und Schutz der neuronalen Plastizität. So verminderte Dexmedetomidin in einem anästhetisch-induzierten Schädigungsmodell neurokognitive Defizite [87] und in einem intrazerebralen Hirnblutungsmodell konnte die Beeinträchtigung des kurzzeitigen und räumlichen Lerngedächtnisses aufgehoben werden [288].

Die Mechanismen der neuroprotektiven Wirkung von Dexmedetomidin können sehr vielseitig sein und sind abschließend noch nicht geklärt. Zum einen werden  $\alpha$ 2-Adrenorezeptor-abhängige Wege diskutiert, die u.a. zur Erhöhung der Phosphorylierung der Tyrosin-Kinasen führt, ein Schlüsselenzym für Überleben und Plastizität im Gehirn [86]. Dexmedetomidin kann wichtige zelluläre Mechanismen auch  $\alpha$ 2-Adrenorezeptor-unabhängig beeinflussen. So inhibiert es die Natrium und Kalium Homöostase für neuronale Aktivitäten [290]. Dexmedetomidin erhöht sowohl die Phosphorylierung von *extracellular signal-regulated kinases* (ERK)1/2, eine wichtige *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase, die im Zellzyklus involviert ist, als auch die Expression von Wachstumsfaktoren, wie *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), die an neuroprotektiven Mechanismen beteiligt sind und zum Überleben der Neurone beitragen [291]. Andererseits konnten keine Apoptose-fördernden Effekte festgestellt werden [87]. Weiterführende pharmakokinetische Studien sollten sich zum besseren Verständnis anschließen.

Zusammengefasst zeigte Dexmedetomidin neuroprotektive Eigenschaften in unserem Modell der oxidativen Stress-Schädigung im sich entwickelnden Rattenhirn, wobei apoptotischer Zelltod und pro-inflammatorische Zytokininsulte inhibiert und die postnatale Neurogenese und neuronale Plastizität erhalten wurden. Dexmedetomidin erhöhte die Proliferationskapazität von mitotischen Zellen, was letztlich zu höheren Zellzahlen von reifen Neuronen führte, ohne die Apoptoserate bei Kontrolltieren zu beeinflussen. *In-vivo*-Untersuchungen zeigten, dass postnatal-appliziertes Dexmedetomidin nicht zu anhaltenden Lerndefiziten führte, dass das sich entwickelnde Gehirn weder strukturell noch funktionell verändert oder die synaptische Plastizität des Hippocampus beeinträchtigt wurde [140, 292]. Allerdings kann auch aufgrund der hohen Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns kein potenziell nützliches Medikament ohne Nebenwirkungen erwartet werden. Gerade in der Frühgeborenenmedizin ist eine Kombinationstherapie mit Sedative und Sauerstoff oft nicht vermeidbar, so dass Dexmedetomidin einen vielversprechenden Kandidaten für weiterführende Studien darstellt.

### 3.3 Klinische Relevanz

Der unreife Organismus von zu früh geborenen Kindern ist nicht in der Lage, unter extrauterinen Umgebungsbedingungen eine adäquate postnatale physiologische Adaption an die Umgebung im Vergleich zu reif geborenen Kindern zu vollführen. Aufgrund der verbesserten und konsequent umgesetzten intensiv-medizinischen Betreuung in entsprechenden Perinatalzentren von sehr und extrem frühgeborenen Kindern, konnte das Outcome in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert werden. Trotz der Vielzahl an klinischen Studien, sind individuelle Aussagen über prognostizierbare gesundheitliche Folgeschäden, wie neurologische, kognitive oder psychische Defizite, schwer

abschätzbar. Belegt sind Korrelationen von niedrigem Geburtsgewicht mit juvenilen oder adulten Erkrankungen, wie Asthma [293], Bluthochdruck [294], koronare Herzerkrankungen [295] oder auch Schizophrenie [296], ADHS [297], Autismus-Spektrum-Störungen und Depressionen [298]. Ein niedriges Geburtsgewicht allein ist aber nicht schlussfolgernd für eine erhöhte Morbidität, aber durchaus postnatale Komplikationen, wie chronische Lungenerkrankungen oder intraventrikuläre Blutungen [299, 300]. Einen essentiellen Faktor für die Entwicklung von Frühgeborenen spielen allerdings auch das soziale Umfeld [301] und im Besonderen die Eltern-Kind-Beziehung [302], nicht nur in den ersten Wochen der Hospitalisierung.

In der neonatologischen Versorgung werden Maßnahmen ergriffen, um mögliche lebensbedrohliche Komplikationen zu verhindern, diese rechtzeitig zu erkennen, zu behandeln oder vorzubeugen, um damit den frühgeborenen Kindern eine Chance auf eine Entwicklung ohne Einschränkungen und Defizite zu ermöglichen. Die durchgeführten Interventionen können allerdings auch zu Faktoren führen, denen die Frühgeborenen aufgrund ihrer organischen und systemischen Unreife nicht adäquat begegnen können, ebenso wie sie keine vollständige Immunabwehr gegenüber mikrobiotischen Insulten besitzen [150]. Die unreife Lunge und der Surfactantmangel erhöht die Wahrscheinlichkeit für respiratorische Komplikationen [303] und verstärkt durch die mechanische Beatmung steigt das Risiko für die Entstehung einer BPD [15, 16]. Medikamentöse Therapien können ebenso wie die Sauerstoffsupplementierung nicht immer vermeiden werden, in der Maßgabe, dass der Nutzen die möglichen Nebenwirkungen überwiegt. Das Wissen, um mögliche protektive Effekte von bereits in der Neonatologie zugelassenen Substanzen, wie Koffein oder Estradiol, oder möglichen neuroprotektiven Substanzen, wie Dexmedetomidin, per se, sind somit wichtige Forschungsansätze, um bei unvermeidbaren Therapien, die mögliche Schädigung so gering wie möglich zu halten.

Die Behandlungen zur Sedierung bei schmerzhaften Eingriffen und Agitiertheit umfasst nicht nur pharmakologische Maßnahmen, diese stellen aber einen wichtigen Aspekt dar [304]. Sedativa und Analgetika modulieren im sich entwickelnden Gehirn essentielle Signalwege mit assoziierten Kurz- und Langzeitfolgen für die frühgeborenen Kinder [305-307] und einem erhöhten Risiko für beatmete Frühgeborene [88, 308]. Dexmedetomidin stellt nun eine mögliche Therapiealternative für die Sedierung von Frühgeborenen dar. Erste klinische Daten zeigten im Vergleich zu Fentanyl behandelten Frühgeborenen, dass Dexmedetomidin nicht nur die Beatmungszeit reduzieren konnte, sondern auch die Inzidenz von Sepsis und dabei die Inzidenz für Komorbiditäten, wie intraventrikuläre Blutungen, unverändert blieb [100]. Des Weiteren zeigte Dexmedetomidin nur geringe gastrointestinale Auswirkungen [309] und bietet Neugeborenen mit Dexmedetomidin-Behandlung eine kürzere Zeit, um auf enterale Ernährung umgestellt zu werden [100], wobei eine verzögerte Umstellung auf enterale Ernährung zu vielseitigen Komplikationen führen kann [310]. Dexmedetomidin ist bei der Sedierung von Früh- und Neugeborenen effektiv und wird ohne signifikante Nebenwirkungen gut vertragen [311]. Anwendung findet Dexmedetomidin wird seit der Zulassung in Deutschland hauptsächlich bei erwachsenen Intensivpatienten [85]. Die bereits erwähnten neuroprotektiven Wirkungen von Dexmedetomidin scheinen nicht nur relevant für das sich entwickelnde Gehirn zu sein, sondern auch von klinischer Relevanz für das reife Gehirn. So reduziert Dexmedetomidin beim beatmeten

Intensivpatienten die Inzidenz von Koma und Delir [312] und führt überdies zu keiner nennenswerten Atemdepression [92]. Derzeit liegen keine klinischen Studien zur längerfristigen Anwendung von Dexmedetomidin und einem neurologischem Outcome bei Frühgeborenen vor. Die Effekte von Dexmedetomidin scheinen sehr vielseitig zu sein und geben Anlass zu intensiverer Forschung auf protektive Effekte für das sich entwickelnde und das reife Gehirn im Hinblick auf verschiedene pathogene Insulte. Im Fokus ist dies mit dem Untersuchungsschwerpunkten unserer Arbeitsgruppe im *in vivo*-Modell der Sauerstofftoxizität [110, 111] vereinbar und konnte grundlegende Erkenntnisse für molekulare Effekte im sich entwickelnden Gehirn beitragen.

Koffein ist im Gegensatz zu Dexmedetomidin ein Standardtherapeutikum in der Neonatologie mit sehr gut belegten klinischen Effekten, wie Verkürzung der mechanischen Beatmungsdauer, Senkung der BPD-Rate, Reduzierung der Zerebralparese und, initial zumindest, assoziiert mit einem verbesserten neurologischen Outcome [74]. Für die klinische Situation ist es aber auch essentiell zu wissen, welche pharmakologischen und molekularen Effekte Koffein auf das Gehirn und die Lunge ausübt, wenn klinisch ein präventiver Einsatz von Koffein diskutiert wird und sich unter oxidativen Stress-Situationen, ausgelöst durch Sauerstoff oder Medikamente, meist protektive, aber auch negative Effekte zeigen. Durch eine mechanische Beatmung wird initial die pulmonale Inflammationskaskade induziert [313] und die inflammatorische Antwort weitet sich systemisch auf das Gehirn aus [314]. Die immunologische und anti-oxidative Unreife des Organismus, die zerebrale und pulmonale Vulnerabilität und die hämodynamischen Instabilität verstärken den pathogenen Insult [314, 315], so dass die Identifizierung von zusätzlichen Therapieoptionen, die hier protektiv intervenieren könnten, unerlässlich sind. Koffein hat dabei ein sehr hohes Potential, nicht nur durch die etablierte neonatale Anwendung, wobei der initiale Anstieg von Neurodegeneration und neuronaler sowie pulmonaler Inflammation durch Koffein im *in-vivo*-Modell und in der klinischen Situation weiter untersucht werden sollten. Dies kann zum einen dem therapeutischen Plasmaspiegel geschuldet sein [60, 63, 69, 206], aber auch einer Initiierung anti-oxidativer und anti-inflammatorischer Mediatoren durch eine Präkonditionierung vor dem pathogenen Insult [316]. Weiterführende Untersuchungen zu protektiven Medikamenten, wie Melatonin, Allopurinol und Erythropoetin mit anti-oxidativen Eigenschaften, stehen ebenfalls als prä- und postnatale Therapien im Fokus [317-319] und zeigen die Wichtigkeit neuer Therapiestrategien auf, um unumgängliche medizinisch-induzierte Maßnahmen mit einem verbessertem Outcome für frühgeborene Kinder in Einklang zu bringen. Tierexperimentelle Studien können das Verständnis zu molekularen Mechanismen und Effekten von potentiellen Kandidaten ergänzen und wegweisend für klinische Studien sein.

## 4. Zusammenfassung

Die Frühgeburtlichkeit ist ein weltweites Problem und betrifft etwa 10-20% der neugeborenen Kinder und ist die häufigste Todesursache bei Kindern unter 5 Jahren. In Deutschland kommt etwa jedes zehnte Kind zu früh auf die Welt, davon etwa 12% mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g. Ein geringes Geburtsgewicht und postnatale Komplikationen korrelieren dabei mit einem erhöhten Risiko für Mortalität und Morbidität. Präventive und therapeutische Interventionen haben in den letzten Jahrzehnten die Überlebensrate verbessert, gehen aber besonders bei Kindern mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g mit steigenden Morbiditätsraten einher. Abgesehen von der systemischen und organischen Unreife des zu früh geborenen Kindes, gibt es eine Vielzahl an exogenen Noxen, die in der Pathogenese frühgeburtlicher Erkrankungen eine Rolle spielen können. Neben der Sauerstofftoxizität, resultierend aus den unphysiologisch hohen Sauerstoffkonzentrationen, denen Frühgeborene aufgrund der Geburt und notwendiger Sauerstoffsupplementierung ausgesetzt sind, sind medikamentöse Insulte, wie Anästhetika, als ebenso kausal anzusehen. Die Unreife bedingt dabei ein Ungleichgewicht physiologischer Prozesse, wie des respiratorischen Systems und des anti-oxidativen Abwehrsystems. In dieser redox-instabilen Situation können zahlreiche medizinisch notwendige medikamentöse oder therapeutische Insulte modulierend wirken und sind mit Nebenwirkungen für die Kurz- und Langzeitentwicklung behaftet. Oxidativer Stress spielt bei der Pathogenese vieler Erkrankungen der Frühgeborenen eine entscheidende Rolle, wobei die kausalen Pathologien bisher unvollständig verstanden sind. Neben der Klärung der pathologischen Prozesse, ist die Identifizierung möglicher therapeutischer Strategien Ziel der neonatologischen Forschung.

Klinische Studien belegen bereits die protektive Wirkung von Koffein, einem in der Neonatologie eingesetztem Medikament zur Behandlung und Prävention von Frühgeborenen-Apnoen, für das Langzeit-Outcome von Frühgeborenen und auch die möglichen neuroprotektiven Effekte von Dexmedetomidin, einem Sedativa mit vielseitigen pharmakologischen Wirkungen, da aber subtile Störungen der neurologischen Entwicklung im Umfeld von Frühgeburtlichkeit, neonatalen Adaptationsstörungen und intensivmedizinische Maßnahmen Einfluss nehmen können, können standardisierte Tierversuche dazu beitragen, potentiell protektive Effekte von Koffein und Dexmedetomidin im sich entwickelnden Gehirn und/oder der unreifen Lunge zu identifizieren. Dazu wurden Untersuchungen der infantilen Ratte, einem neonatalen entwicklungsadäquaten Tiermodell, in einem akuten Hyperoxie-Schädigungsmodell durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war, ob die Präkonditionierung mit Koffein oder Dexmedetomidin unter postnataler, akuter Hyperoxie (6, 24 und/oder 48 Stunden), die durch oxidativen Stress assoziierten, zellulären Veränderungen reduzieren kann.

Oxidativer Stress im akuten Sauerstoffschädigungsmodell im unreifen Gehirn der Ratte beeinträchtigte die hippocampale Neurogenese und induzierte die oxidativen Stress-Kaskade mit daraus resultierender Neuroinflammation und Neurodegeneration. Des Weiteren scheint die anti-oxidative Abwehrkapazität während der Exposition gegenüber Hyperoxie vermindert zu sein. Eine Präkonditionierung mit einer Einzeldosis Koffein (10 mg/kg KGW) vor dem hyperoxischem Insult verringerte die durch oxidativen Stress ausgelöste Neuroinflammation und Neurodegeneration und verstärkte die anti-oxidative

Stressantwort. Anti-inflammatorische Effekte zeigte Koffein auch in der unreifen Lunge mit einer adäquaten Inhibierung der Immunzellinfiltration, einer Reduktion der pro-inflammatorischen Antwort und Verminderung der Chemokin-Expression. Neben der unselektiven Antagonisierung der Adenosinrezeptoren, scheint Koffein per se anti-oxidative Eigenschaften zu vermitteln.

Das zur Präkonditionierung eingesetzte Dexmedetomidin (1, 5 und 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KGW) zeigte neuroprotektive Eigenschaften in unserem Modell der oxidativen Stress-Schädigung im sich entwickelnden Rattenhirn, wobei apoptotischer Zelltod und pro-inflammatorische Zytokininsulte inhibiert und die postnatale Neurogenese und neuronale Plastizität erhalten wurden. Dexmedetomidin erhöhte die Proliferationskapazität von mitotischen Zellen, was letztlich zu höheren Zellzahlen von reifen Neuronen führte, ohne die Apoptoserate bei Kontrolltieren zu beeinflussen. Die anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von Dexmedetomidin über die  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-Agonisierung scheint eine potente Möglichkeit der Neuroprotektion darzustellen.

Weiterführende Untersuchungen zu protektiven Medikamenten mit anti-oxidativen Eigenschaften, die bereits in der neonatalen Intensivversorgung als Medikament zugelassen sind, sollten weiterhin im Fokus klinischer und experimenteller Studien stehen, um pharmakokinetische und molekulare Mechanismen besser verstehen zu können und die Effektivität und Sicherheit beim klinischen Einsatz zu erhöhen, um nicht-vermeidbare medizinisch-induzierte Maßnahmen mit einem verbessertem Outcome für frühgeborene Kinder in Einklang zu bringen.

## 5. Literatur

1. Liu, L., H.L. Johnson, S. Cousens, J. Perin, S. Scott, J.E. Lawn, I. Rudan, H. Campbell, R. Cibulskis, M. Li, C. Mathers, and R.E. Black, *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000*. Lancet, 2012. 379(9832): p. 2151-61.
2. Blencowe, H., S. Cousens, M.Z. Oestergaard, D. Chou, A.B. Moller, R. Narwal, A. Adler, C. Vera Garcia, S. Rohde, L. Say, and J.E. Lawn, *National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications*. Lancet, 2012. 379(9832): p. 2162-72.
3. *Global, regional, and national under-5 mortality, adult mortality, age-specific mortality, and life expectancy, 1970-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. Lancet, 2017. 390(10100): p. 1084-1150.
4. WHO: *recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1977. 56(3): p. 247-53.
5. Helmer, H. and H. Schneider, *Frühgeburt: Pränatale und intrapartale Aspekte*, in *Die Geburtshilfe*, H. Schneider, P. Husslein, and K.-T.M. Schneider, Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 257-306.
6. Obladen, M., *[Minimum patient volume in care for very low birthweight infants: a review of the literature]*. Z Geburtshilfe Neonatol, 2007. 211(3): p. 110-7.
7. Mwaniki, M.K., M. Atieno, J.E. Lawn, and C.R. Newton, *Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review*. Lancet, 2012. 379(9814): p. 445-52.
8. Van Wassenaer-Leemhuis, A.G., N. Marlow, C. Lees, H. Wolf, and T.i. the, *The association of neonatal morbidity with long-term neurological outcome in infants who were growth restricted and preterm at birth: secondary analyses from TRUFFLE (Trial of Randomized Umbilical and Fetal Flow in Europe)*. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2017. 124(7): p. 1072-1078.
9. Guellec, I., A. Lapillonne, S. Marret, J.-C. Picaud, D. Mitanchez, M.-L. Charkaluk, J. Fresson, C. Arnaud, C. Flamand, G. Cambonie, M. Kaminski, J.-C. Roze, and P.-Y. Ancel, *Effect of Intra- and Extrauterine Growth on Long-Term Neurologic Outcomes of Very Preterm Infants*. The Journal of Pediatrics, 2016. 175(Supplement C): p. 93-99.e1.
10. Glass, H.C., A.T. Costarino, S.A. Stayer, C. Brett, F. Cladis, and P.J. Davis, *Outcomes for Extremely Premature Infants*. Anesthesia and analgesia, 2015. 120(6): p. 1337-1351.
11. Pierrat, V., L. Marchand-Martin, C. Arnaud, M. Kaminski, M. Resche-Rigon, C. Lebeaux, F. Bodeau-Livinec, A.S. Morgan, F. Goffinet, S. Marret, and P.-Y. Ancel, *Neurodevelopmental outcome at 2 years for preterm children born at 22 to 34 weeks' gestation in France in 2011: EPIPAGE-2 cohort study*. BMJ, 2017. 358.
12. Abman, S.H., *Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis"*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 164(10 Pt 1): p. 1755-6.
13. Laughon, M., E.N. Allred, C. Bose, T.M. O'Shea, L.J. Van Marter, R.A. Ehrenkranz, and A. Leviton, *Patterns of respiratory disease during the first 2 postnatal weeks in extremely premature infants*. Pediatrics, 2009. 123(4): p. 1124-31.
14. Jobe, A.J., *The new BPD: an arrest of lung development*. Pediatr Res, 1999. 46(6): p. 641-3.
15. Ambalavanan, N. and W.A. Carlo, *Bronchopulmonary dysplasia: new insights*. Clin Perinatol, 2004. 31(3): p. 613-28.
16. Wright, J.R., *Host defense functions of pulmonary surfactant*. Biol Neonate, 2004. 85(4): p. 326-32.
17. Jobe, A.H. and E. Bancalari, *Bronchopulmonary dysplasia*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 163(7): p. 1723-9.
18. Velten, M., K.M. Heyob, L.K. Rogers, and S.E. Welty, *Deficits in lung alveolarization and function after systemic maternal inflammation and neonatal hyperoxia exposure*. J Appl Physiol, 2010. 108(5): p. 1347-56.
19. Bhandari, V., *Hyperoxia-derived lung damage in preterm infants*. Semin Fetal Neonatal Med, 2010. 15(4): p. 223-9.
20. Brostrom, E.B., P. Thunqvist, G. Adenfelt, E. Borling, and M. Katz-Salamon, *Obstructive lung disease in children with mild to severe BPD*. Respir Med, 2010. 104(3): p. 362-70.
21. Doyle, L.W., B. Faber, C. Callanan, N. Freezer, G.W. Ford, and N.M. Davis, *Bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight subjects and lung function in late adolescence*. Pediatrics, 2006. 118(1): p. 108-13.
22. Filippone, M., G. Bonetto, M. Corradi, A.C. Frigo, and E. Baraldi, *Evidence of unexpected oxidative stress in airways of adolescents born very pre-term*. Eur Respir J, 2012. 40(5): p. 1253-9.
23. Stoll, B.J., N.I. Hansen, E.F. Bell, S. Shankaran, A.R. Laptook, M.C. Walsh, E.C. Hale, N.S. Newman, K. Schibler, W.A. Carlo, K.A. Kennedy, B.B. Poindexter, N.N. Finer, R.A. Ehrenkranz, S. Duara, P.J. Sanchez, T.M. O'Shea, R.N. Goldberg, K.P. Van Meurs, R.G. Faix, D.L. Phelps, I.D. Frantz, 3rd, K.L. Watterberg, S. Saha, A. Das, and R.D. Higgins, *Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network*. Pediatrics, 2010. 126(3): p. 443-56.

24. Farstad, T., D. Bratlid, S. Medbo, and T. Markestad, *Bronchopulmonary dysplasia - prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants*. Acta Paediatr, 2011. 100(1): p. 53-8.
25. Baraldi, E. and M. Filippone, *Chronic lung disease after premature birth*. N Engl J Med, 2007. 357(19): p. 1946-55.
26. Woodward, L.J., S. Moor, K.M. Hood, P.R. Champion, S. Foster-Cohen, T.E. Inder, and N.C. Austin, *Very preterm children show impairments across multiple neurodevelopmental domains by age 4 years*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2009. 94(5): p. F339-44.
27. Smith, V.C., J.A. Zupancic, M.C. McCormick, L.A. Croen, J. Greene, G.J. Escobar, and D.K. Richardson, *Rehospitalization in the first year of life among infants with bronchopulmonary dysplasia*. J Pediatr, 2004. 144(6): p. 799-803.
28. Hacking, D.F., A.M. Gibson, C. Robertson, and L.W. Doyle, *Respiratory function at age 8-9 after extremely low birthweight or preterm birth in Victoria in 1997*. Pediatr Pulmonol, 2012.
29. Roberts, G., P.J. Anderson, C. De Luca, and L.W. Doyle, *Changes in neurodevelopmental outcome at age eight in geographic cohorts of children born at 22-27 weeks' gestational age during the 1990s*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2010. 95(2): p. F90-4.
30. Narang, I., *Review series: What goes around, comes around: childhood influences on later lung health? Long-term follow-up of infants with lung disease of prematurity*. Chron Respir Dis, 2010. 7(4): p. 259-69.
31. Platt, M.J., C. Cans, A. Johnson, G. Surman, M. Topp, M.G. Torrioli, and I. Krageloh-Mann, *Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 European centres: a database study*. Lancet, 2007. 369(9555): p. 43-50.
32. Robertson, C.M., M.J. Watt, and Y. Yasui, *Changes in the prevalence of cerebral palsy for children born very prematurely within a population-based program over 30 years*. Jama, 2007. 297(24): p. 2733-40.
33. Glass, H.C., R.A. Shellhaas, T.N. Tsuchida, T. Chang, C.J. Wusthoff, C.J. Chu, M.R. Cilio, S.L. Bonifacio, S.L. Massey, N.S. Abend, and J.S. Soul, *Seizures in Preterm Neonates: A Multicenter Observational Cohort Study*. Pediatr Neurol, 2017. 72: p. 19-24.
34. Hutchinson, E.A., C.R. De Luca, L.W. Doyle, G. Roberts, and P.J. Anderson, *School-age Outcomes of Extremely Preterm or Extremely Low Birth Weight Children*. Pediatrics, 2013. 131(4): p. e1053.
35. de Kieviet, J.F., R.M. van Elburg, H.N. Lafeber, and J. Oosterlaan, *Attention problems of very preterm children compared with age-matched term controls at school-age*. J Pediatr, 2012. 161(5): p. 824-9.
36. Aarnoudse-Moens, C.S., N. Weisglas-Kuperus, J.B. van Goudoever, and J. Oosterlaan, *Meta-analysis of neurobehavioral outcomes in very preterm and/or very low birth weight children*. Pediatrics, 2009. 124(2): p. 717-28.
37. Stiles, J. and T.L. Jernigan, *The Basics of Brain Development*. Neuropsychology Review, 2010. 20(4): p. 327-348.
38. Archer, T., *Effects of exogenous agents on brain development: stress, abuse and therapeutic compounds*. CNS Neurosci Ther, 2011. 17(5): p. 470-89.
39. Deng, W., *Neurobiology of injury to the developing brain*. Nat Rev Neurol, 2010. 6(6): p. 328-36.
40. Goldin, R.L. and J.L. Matson, *Premature birth as a risk factor for autism spectrum disorder*. Dev Neurorehabil, 2016. 19(3): p. 203-6.
41. Spittle, A.J., K. Treyvaud, L.W. Doyle, G. Roberts, K.J. Lee, T.E. Inder, J.L. Cheong, R.W. Hunt, C.A. Newnham, and P.J. Anderson, *Early emergence of behavior and social-emotional problems in very preterm infants*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2009. 48(9): p. 909-18.
42. Delobel-Ayoub, M., C. Arnaud, M. White-Koning, C. Casper, V. Pierrat, M. Garel, A. Burguet, J.C. Roze, J. Matis, J.C. Picaud, M. Kaminski, B. Larroque, and E.S. Group, *Behavioral problems and cognitive performance at 5 years of age after very preterm birth: the EPIPAGE Study*. Pediatrics, 2009. 123(6): p. 1485-92.
43. Pappas, A., I. Adams-Chapman, S. Shankaran, S.A. McDonald, B.J. Stoll, A.R. Laptook, W.A. Carlo, K.P. Van Meurs, S.R. Hintz, M.D. Carlson, J.E. Brumbaugh, M.C. Walsh, M.H. Wyckoff, A. Das, and R.D. Higgins, *Neurodevelopmental and Behavioral Outcomes in Extremely Premature Neonates With Ventriculomegaly in the Absence of Periventricular-Intraventricular Hemorrhage*. JAMA Pediatr, 2017.
44. Sciberras, E., M. Mulraney, D. Silva, and D. Coghill, *Prenatal Risk Factors and the Etiology of ADHD—Review of Existing Evidence*. Current Psychiatry Reports, 2017. 19(1): p. 1.
45. Castillo, A., A. Sola, H. Baquero, F. Neira, R. Alvis, R. Deulofeut, and A. Critz, *Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range?* Pediatrics, 2008. 121(5): p. 882-9.
46. Schmitz, T., J. Ritter, S. Mueller, U. Felderhoff-Mueser, L.J. Chew, and V. Gallo, *Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development*. J Neurosci, 2011. 31(11): p. 4327-44.
47. Baerts, W., P.M. Lemmers, and F. van Bel, *Cerebral oxygenation and oxygen extraction in the preterm infant during desaturation: effects of increasing FIO<sub>2</sub> to assist recovery*. Neonatology, 2011. 99(1): p. 65-72.
48. Ahn, E.S., C.L. Robertson, V. Vereczki, G.E. Hoffman, and G. Fiskum, *Normoxic ventilatory resuscitation following controlled cortical impact reduces peroxynitrite-mediated protein nitration in the hippocampus*. J Neurosurg, 2008. 108(1): p. 124-31.



49. Deuber, C. and M. Terhaar, *Hyperoxia in very preterm infants: a systematic review of the literature*. J Perinat Neonatal Nurs, 2011. 25(3): p. 268-74.
50. Saugstad, O.D. and D. Aune, *Optimal oxygenation of extremely low birth weight infants: a meta-analysis and systematic review of the oxygen saturation target studies*. Neonatology, 2014. 105(1): p. 55-63.
51. Perrone, S., M.L. Tataranno, G. Stazzoni, and G. Buonocore, *Biomarkers of oxidative stress in fetal and neonatal diseases*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012. 25(12): p. 2575-8.
52. Saugstad, O.D., *Update on oxygen radical disease in neonatology*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2001. 13(2): p. 147-53.
53. Stone, W.L., D. Shah, and S.M. Hollinger, *Retinopathy of prematurity: an oxidative stress neonatal disease*. Front Biosci (Landmark Ed), 2016. 21: p. 165-77.
54. Buonocore, G., S. Perrone, M. Longini, P. Vezzosi, B. Marzocchi, P. Paffetti, and R. Bracci, *Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life*. Pediatr Res, 2002. 52(1): p. 46-9.
55. Vento, M., J. Escobar, M. Cernada, R. Escrig, and M. Aguar, *The use and misuse of oxygen during the neonatal period*. Clin Perinatol, 2012. 39(1): p. 165-76.
56. O'Donovan, D.J. and C.J. Fernandes, *Free radicals and diseases in premature infants*. Antioxid Redox Signal, 2004. 6(1): p. 169-76.
57. Lee, Y.S. and Y.H. Chou, *Antioxidant profiles in full term and preterm neonates*. Chang Gung Med J, 2005. 28(12): p. 846-51.
58. Ikonomidou, C. and A.M. Kaindl, *Neuronal death and oxidative stress in the developing brain*. Antioxid Redox Signal, 2011. 14(8): p. 1535-50.
59. Bendix, I., U. Weichelt, K. Strasser, M. Serdar, S. Endesfelder, C. von Haefen, R. Heumann, A. Ehrkamp, U. Felderhoff-Mueser, and M. Siffringer, *Hyperoxia changes the balance of the thioredoxin/peroxiredoxin system in the neonatal rat brain*. Brain Res, 2012. 1484: p. 68-75.
60. Endesfelder, S., I. Zaak, U. Weichelt, C. Bührer, and T. Schmitz, *Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain*. Free Radic Biol Med, 2014. 67: p. 221-34.
61. Felderhoff-Mueser, U., P. Bittigau, M. Siffringer, B. Jarosz, E. Korobowicz, L. Mahler, T. Piening, A. Moysich, T. Grune, F. Thor, R. Heumann, C. Bührer, and C. Ikonomidou, *Oxygen causes cell death in the developing brain*. Neurobiol Dis, 2004. 17(2): p. 273-82.
62. Reich, B., D. Hoerber, I. Bendix, and U. Felderhoff-Mueser, *Hyperoxia and the Immature Brain*. Developmental Neuroscience, 2016. 38(5): p. 311-330.
63. Weichelt, U., R. Cay, T. Schmitz, E. Strauss, M. Siffringer, C. Bührer, and S. Endesfelder, *Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine*. Eur Respir J, 2013. 41(4): p. 966-73.
64. Nagatomo, T., J. Jimenez, J. Richter, S. De Baere, J. Vanoirbeek, G. Naulaers, K. Allegaert, S. Croubels, J.A. Deprest, and J. Toelen, *Caffeine Prevents Hyperoxia-Induced Functional and Structural Lung Damage in Preterm Rabbits*. Neonatology, 2016. 109(4): p. 274-81.
65. Teng, R.J., 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*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017. 312(5): p. L586-L598.
66. Vento, M., *Oxygen supplementation in the neonatal period: changing the paradigm*. Neonatology, 2014. 105(4): p. 323-31.
67. Hoerber, D., M. Siffringer, Y. van de Looij, J. Herz, S.V. Sizonenko, K. Kempe, M. Serdar, J. Palasz, M. Hadamitzky, S. Endesfelder, J. Fandrey, U. Felderhoff-Muser, and I. Bendix, *Erythropoietin Restores Long-Term Neurocognitive Function Involving Mechanisms of Neuronal Plasticity in a Model of Hyperoxia-Induced Preterm Brain Injury*. Oxid Med Cell Longev, 2016. 2016: p. 9247493.
68. Muller, M.M., J. Middelani, C. Meier, D. Surbek, and R. Berger, *17beta-estradiol protects 7-day old rats from acute brain injury and reduces the number of apoptotic cells*. Reprod Sci, 2013. 20(3): p. 253-61.
69. Endesfelder, S., U. Weichelt, E. Strauss, A. Schlor, M. Siffringer, T. Scheuer, C. Bührer, and T. Schmitz, *Neuroprotection by Caffeine in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury*. Int J Mol Sci, 2017. 18(1).
70. Yi, M., R.P. Jankov, R. Belcastro, D. Humes, I. Copland, S. Shek, N.B. Swezey, M. Post, K.H. Albertine, R.L. Auten, and A.K. Tanswell, *Opposing effects of 60% oxygen and neutrophil influx on alveologenesis in the neonatal rat*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. 170(11): p. 1188-96.
71. Eichenwald, E.C. and A.R. Stark, *Management and outcomes of very low birth weight*. N Engl J Med, 2008. 358(16): p. 1700-11.
72. Kinsella, J.P., A. Greenough, and S.H. Abman, *Bronchopulmonary dysplasia*. Lancet, 2006. 367(9520): p. 1421-31.
73. Laughon, M.M., P.B. Smith, and C. Bose, *Prevention of bronchopulmonary dysplasia*. Semin Fetal Neonatal Med, 2009. 14(6): p. 374-82.
74. Schmidt, B., R.S. Roberts, P. Davis, L.W. Doyle, K.J. Barrington, A. Ohlsson, A. Solimano, and W. Tin, *Caffeine therapy for apnea of prematurity*. N Engl J Med, 2006. 354(20): p. 2112-21.
75. Kua, K.P. and S.W. Lee, *Systematic review and meta-analysis of clinical outcomes of early caffeine therapy in preterm neonates*. Br J Clin Pharmacol, 2017. 83(1): p. 180-191.

76. Fredholm, B.B., 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*. Pharmacol Rev, 1999. 51(1): p. 83-133.
77. Snyder, S.H., J.J. Katims, Z. Annau, R.F. Bruns, and J.W. Daly, *Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(5): p. 3260-4.
78. Zhao, J., F. Gonzalez, and D. Mu, *Apnea of prematurity: from cause to treatment*. European Journal of Pediatrics, 2011. 170(9): p. 1097-1105.
79. Koroğlu, Ö.A., P.M. MacFarlane, K.V. Balan, W.J. Zenebe, A. Jafri, R.J. Martin, and P. Kc, *Anti-Inflammatory Effect of Caffeine Is Associated with Improved Lung Function after Lipopolysaccharide-Induced Amnionitis*. Neonatology, 2014. 106(3): p. 235-240.
80. Henderson-Smart, D.J. and A.G. De Paoli, *Prophylactic methylxanthine for prevention of apnoea in preterm infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(12): p. CD000432.
81. Hall, R.W., *Anesthesia and Analgesia in the NICU*. Clinics in perinatology, 2012. 39(1): p. 239-254.
82. Taneja, B., V. Srivastava, and K.N. Saxena, *Physiological And Anaesthetic Considerations For The Preterm Neonate Undergoing Surgery*. Journal of Neonatal Surgery, 2012. 1(1): p. 14.
83. Nasr, V.G. and J.M. Davis, *Anesthetic use in newborn infants: the urgent need for rigorous evaluation*. Pediatric Research, 2015. 78(1): p. 2-6.
84. Ma, D., M. Hossain, N. Rajakumaraswamy, M. Arshad, R.D. Sanders, N.P. Franks, and M. Maze, *Dexmedetomidine produces its neuroprotective effect via the alpha 2A-adrenoceptor subtype*. Eur J Pharmacol, 2004. 502(1-2): p. 87-97.
85. Mantz, J., J. Jossierand, and S. Hamada, *Dexmedetomidine: new insights*. Eur J Anaesthesiol, 2011. 28(1): p. 3-6.
86. Paris, A., J. Mantz, P.H. Tonner, L. Hein, M. Brede, and P. Gressens, *The effects of dexmedetomidine on perinatal excitotoxic brain injury are mediated by the alpha2A-adrenoceptor subtype*. Anesth Analg, 2006. 102(2): p. 456-61.
87. Sanders, R.D., J. Xu, Y. Shu, A. Januszewski, S. Halder, A. Fidalgo, P. Sun, M. Hossain, D. Ma, and M. Maze, *Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced neurocognitive impairment in neonatal rats*. Anesthesiology, 2009. 110(5): p. 1077-85.
88. McPherson, C., *Sedation and analgesia in mechanically ventilated preterm neonates: continue standard of care or experiment?* J Pediatr Pharmacol Ther, 2012. 17(4): p. 351-64.
89. Weerink, M.A.S., M.M.R.F. Struys, L.N. Hannivoort, C.R.M. Barends, A.R. Absalom, and P. Colin, *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Dexmedetomidine*. Clinical Pharmacokinetics, 2017. 56(8): p. 893-913.
90. Tobias, J.D., *Dexmedetomidine to treat opioid withdrawal in infants following prolonged sedation in the pediatric ICU*. J Opioid Manag, 2006. 2(4): p. 201-5.
91. Tobias, J.D. and J.W. Berkenbosch, *Sedation during mechanical ventilation in infants and children: dexmedetomidine versus midazolam*. South Med J, 2004. 97(5): p. 451-5.
92. Venn, R.M., J. Hell, and R.M. Grounds, *Respiratory effects of dexmedetomidine in the surgical patient requiring intensive care*. Crit Care, 2000. 4(5): p. 302-8.
93. Waurick, K., C. Sauerland, and C. Goeters, *Dexmedetomidine sedation combined with caudal anesthesia for lower abdominal and extremity surgery in ex-preterm and full-term infants*. Paediatr Anaesth, 2017. 27(6): p. 637-642.
94. Bellu, R., K. de Waal, and R. Zanini, *Opioids for neonates receiving mechanical ventilation: a systematic review and meta-analysis*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2010. 95(4): p. F241-51.
95. Ng, E., A. Taddio, and A. Ohlsson, *Intravenous midazolam infusion for sedation of infants in the neonatal intensive care unit*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. 6: p. CD002052.
96. Doyle, L.W. and P.J. Anderson, *Pulmonary and neurological follow-up of extremely preterm infants*. Neonatology, 2010. 97(4): p. 388-94.
97. Zahed-Cheikh, M., V. Brevaut-Malaty, M. Busuttill, A.S. Monnier, M. Roussel, and C. Gire, *Comparative analysis of perinatal and postnatal factors, and general movement in extremely preterm infants*. Brain Dev, 2011. 33(8): p. 656-65.
98. Hall, R.W., S.S. Kronsberg, B.A. Barton, J.R. Kaiser, K.J. Anand, and N.T.I. Group, *Morphine, hypotension, and adverse outcomes among preterm neonates: who's to blame? Secondary results from the NEOPAIN trial*. Pediatrics, 2005. 115(5): p. 1351-9.
99. O'Mara, K., P. Gal, J.L. Ransommd, J.E. Wimmermd, Jr., R.Q. Carlosmd, M.A. Dimaguilamd, C. Davonzomd, and M. Smithmd, *Successful use of dexmedetomidine for sedation in a 24-week gestational age neonate*. Ann Pharmacother, 2009. 43(10): p. 1707-13.
100. O'Mara, K., P. Gal, J. Wimmer, J.L. Ransom, R.Q. Carlos, M.A. Dimaguila, C.C. Davanzo, and M. Smith, *Dexmedetomidine versus standard therapy with fentanyl for sedation in mechanically ventilated premature neonates*. J Pediatr Pharmacol Ther, 2012. 17(3): p. 252-62.
101. Burri, P.H., *Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth*. Biol Neonate, 2006. 89(4): p. 313-22.

102. Kassim, Z., A. Greenough, and G.F. Rafferty, *Effect of caffeine on respiratory muscle strength and lung function in prematurely born, ventilated infants*. Eur J Pediatr, 2009. 168(12): p. 1491-5.
103. Schmitz, T., S. Endesfelder, M.C. Reinert, F. Klinker, S. Muller, C. Buhner, and D. Liebetanz, *Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia*. Exp Neurol, 2012. 235(1): p. 374-9.
104. Dobbing, J. and J. Sands, *Comparative aspects of the brain growth spurt*. Early Hum Dev, 1979. 3(1): p. 79-83.
105. von Mutius, E., M. Grappa, E. Eber, and U. Frey, *Pädiatrische Pneumologie*. Vol. 3. Auflage. 2013.
106. Seaborn, T., M. Simard, P.R. Provost, B. Piedboeuf, and Y. Tremblay, *Sex hormone metabolism in lung development and maturation*. Trends in Endocrinology & Metabolism. 21(12): p. 729-738.
107. Deulofeut, R., G. Dudell, and A. Sola, *Treatment-by-gender effect when aiming to avoid hyperoxia in preterm infants in the NICU*. Acta Paediatr, 2007. 96(7): p. 990-4.
108. Scheuer, T., V. Brockmoller, M. Blanco Knowlton, J.H. Weitkamp, T. Ruhwedel, S. Mueller, S. Endesfelder, C. Buhner, and T. Schmitz, *Oligodendroglial maldevelopment in the cerebellum after postnatal hyperoxia and its prevention by minocycline*. Glia, 2015. 63(10): p. 1825-39.
109. Nardiello, C., I. Mižiková, and R.E. Morty, *Looking ahead: where to next for animal models of bronchopulmonary dysplasia?* Cell and Tissue Research, 2017. 367(3): p. 457-468.
110. Endesfelder, S., H. Makki, C. von Haefen, C.D. Spies, C. Buhner, and M. Sifringer, *Neuroprotective effects of dexmedetomidine against hyperoxia-induced injury in the developing rat brain*. PLoS One, 2017. 12(2): p. e0171498.
111. Sifringer, M., C. von Haefen, M. Krain, N. Paeschke, I. Bendix, C. Buhner, C.D. Spies, and S. Endesfelder, *Neuroprotective effect of dexmedetomidine on hyperoxia-induced toxicity in the neonatal rat brain*. Oxid Med Cell Longev, 2015. 2015: p. 530371.
112. Laplagne, D.A., M.S. Esposito, V.C. Piatti, N.A. Morgenstern, C. Zhao, H. van Praag, F.H. Gage, and A.F. Schinder, *Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus*. PLoS Biol, 2006. 4(12): p. e409.
113. van Praag, H., A.F. Schinder, B.R. Christie, N. Toni, T.D. Palmer, and F.H. Gage, *Functional neurogenesis in the adult hippocampus*. Nature, 2002. 415(6875): p. 1030-4.
114. Altman, J. and S.A. Bayer, *Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods*. J Comp Neurol, 1990. 301(3): p. 365-81.
115. Deng, W., J.B. Aimone, and F.H. Gage, *New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?* Nat Rev Neurosci, 2010. 11(5): p. 339-50.
116. Englund, C., A. Fink, C. Lau, D. Pham, R.A. Daza, A. Bulfone, T. Kowalczyk, and R.F. Hevner, *Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex*. J Neurosci, 2005. 25(1): p. 247-51.
117. Hodge, R.D. and R.F. Hevner, *Expression and actions of transcription factors in adult hippocampal neurogenesis*. Dev Neurobiol, 2011. 71(8): p. 680-9.
118. Kempermann, G., S. Jessberger, B. Steiner, and G. Kronenberg, *Milestones of neuronal development in the adult hippocampus*. Trends Neurosci, 2004. 27(8): p. 447-52.
119. Balu, D.T. and I. Lucki, *Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology*. Neurosci Biobehav Rev, 2009. 33(3): p. 232-52.
120. Encinas, J.M., T.V. Michurina, N. Peunova, J.H. Park, J. Tordo, D.A. Peterson, G. Fishell, A. Koulakov, and G. Enikolopov, *Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus*. Cell Stem Cell, 2011. 8(5): p. 566-79.
121. Hsieh, J., *Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis*. Genes Dev, 2012. 26(10): p. 1010-21.
122. Mu, Y., S.W. Lee, and F.H. Gage, *Signaling in adult neurogenesis*. Curr Opin Neurobiol, 2010. 20(4): p. 416-23.
123. Klein, J.A. and S.L. Ackerman, *Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration*. J Clin Invest, 2003. 111(6): p. 785-93.
124. Prasanthi, J.R., B. Dasari, G. Marwarha, T. Larson, X. Chen, J.D. Geiger, and O. Ghribi, *Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet*. Free Radic Biol Med, 2010. 49(7): p. 1212-20.
125. Ullah, F., T. Ali, N. Ullah, and M.O. Kim, *Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain*. Neurochem Int, 2015. 90: p. 114-24.
126. Chavez-Valdez, R., M. Wills-Karp, R. Ahlawat, E.A. Cristofalo, A. Nathan, and E.B. Gauda, *Caffeine modulates TNF-alpha production by cord blood monocytes: the role of adenosine receptors*. Pediatr Res, 2009. 65(2): p. 203-8.
127. Li, J., G. Li, J.L. Hu, X.H. Fu, Y.J. Zeng, Y.G. Zhou, G. Xiong, N. Yang, S.S. Dai, and F.T. He, *Chronic or high dose acute caffeine treatment protects mice against oleic acid-induced acute lung injury via an adenosine A2A receptor-independent mechanism*. Eur J Pharmacol, 2011. 654(3): p. 295-303.
128. Halliwell, B. and S. Chirico, *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr, 1993. 57(5 Suppl): p. 715S-724S; discussion 724S-725S.

129. Fridovich, I., *Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?* Ann N Y Acad Sci, 1999. 893: p. 13-8.
130. Gozzelino, R., V. Jeney, and M.P. Soares, *Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. 50: p. 323-54.
131. Ho, E., K. Karimi Galougahi, C.C. Liu, R. Bhindi, and G.A. Figtree, *Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice.* Redox Biol, 2013. 1: p. 483-91.
132. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine.* fifth ed. 2015: Oxford University Press.
133. Siffringer, M., D. Brait, U. Weichelt, G. Zimmerman, S. Endesfelder, F. Brehmer, C. von Haefen, A. Friedman, H. Soreq, I. Bendix, B. Gerstner, and U. Felderhoff-Mueser, *Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced oxidative stress in the developing rat brain.* Brain Behav Immun, 2010. 24(5): p. 792-9.
134. Hoehn, T., U. Felderhoff-Mueser, K. Maschewski, C. Stadelmann, M. Siffringer, P. Bittigau, P. Koehne, M. Hoppenz, M. Obladen, and C. Buhner, *Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain.* Pediatr Res, 2003. 54(2): p. 179-84.
135. Schmitz, T., G. Krabbe, G. Weikert, T. Scheuer, F. Matheus, Y. Wang, S. Mueller, H. Kettenmann, V. Matyash, C. Buhner, and S. Endesfelder, *Minocycline protects the immature white matter against hyperoxia.* Exp Neurol, 2014. 254: p. 153-65.
136. Wagenaar, G.T., S.A. ter Horst, M.A. van Gastelen, L.M. Leijser, T. Mauad, P.A. van der Velden, E. de Heer, P.S. Hiemstra, B.J. Poorthuis, and F.J. Walther, *Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress.* Free Radic Biol Med, 2004. 36(6): p. 782-801.
137. Warner, B.B., L.A. Stuart, R.A. Papes, and J.R. Wispe, *Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice.* Am J Physiol, 1998. 275(1 Pt 1): p. L110-7.
138. Siddappa, R., J. Riggins, S. Kariyanna, P. Calkins, and A.T. Rotta, *High-dose dexmedetomidine sedation for pediatric MRI.* Paediatr Anaesth, 2011. 21(2): p. 153-8.
139. Laudénbach, V., J. Mantz, H. Lagercrantz, J.M. Desmonts, P. Evrard, and P. Gressens, *Effects of alpha(2)-adrenoceptor agonists on perinatal excitotoxic brain injury: comparison of clonidine and dexmedetomidine.* Anesthesiology, 2002. 96(1): p. 134-41.
140. Tachibana, K., T. Hashimoto, R. Kato, Y. Uchida, R. Ito, K. Takita, and Y. Morimoto, *Neonatal administration with dexmedetomidine does not impair the rat hippocampal synaptic plasticity later in adulthood.* Paediatr Anaesth, 2012. 22(7): p. 713-9.
141. Engelhard, M.D.K., M.D.C. Werner, B.S.S. Kaspar, M.D.O. Möllenberg, M.D.M. Blobner, C.M.M. Bachl, and M.D.E. Kochs, *Effect of the  $\alpha$ 2-Agonist Dexmedetomidine on Cerebral Neurotransmitter Concentrations during Cerebral Ischemia in Rats.* Anesthesiology, 2002. 96(2): p. 450-457.
142. Eser, O., H. Fidan, O. Sahin, M. Cosar, M. Yaman, H. Mollaoglu, A. Songur, and S. Buyukbas, *The influence of dexmedetomidine on ischemic rat hippocampus.* Brain Res, 2008. 1218: p. 250-6.
143. Cosar, M., O. Eser, H. Fidan, O. Sahin, S. Buyukbas, Y. Ela, M. Yagmurca, and O.A. Ozen, *The neuroprotective effect of dexmedetomidine in the hippocampus of rabbits after subarachnoid hemorrhage.* Surg Neurol, 2009. 71(1): p. 54-9; discussion 59.
144. Li, Y. and S. Liu, *The Effect of Dexmedetomidine on Oxidative Stress Response Following Cerebral Ischemia-Reperfusion in Rats and the Expression of Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and S100B.* Med Sci Monit, 2017. 23: p. 867-873.
145. Tasdogan, M., D. Memis, N. Sut, and M. Yuksel, *Results of a pilot study on the effects of propofol and dexmedetomidine on inflammatory responses and intraabdominal pressure in severe sepsis.* J Clin Anesth, 2009. 21(6): p. 394-400.
146. Tanabe, K., R. Matsushima-Nishiwaki, O. Kozawa, and H. Iida, *Dexmedetomidine suppresses interleukin-1beta-induced interleukin-6 synthesis in rat glial cells.* Int J Mol Med, 2014. 34(4): p. 1032-8.
147. Harrison, M.S. and R.L. Goldenberg, *Global burden of prematurity.* Semin Fetal Neonatal Med, 2016. 21(2): p. 74-9.
148. Bundesamt, S., *Lebendgeborene mit geringem Geburtsgewicht.* Bevölkerung und Erwerbstätigkeit. Natürliche Bevölkerungsbewegung 2013., 2015. Fachserie 1, Reihe 1.1. Destatis, Wiesbaden.
149. Blencowe, H., S. Cousens, D. Chou, M. Oestergaard, L. Say, A.B. Moller, M. Kinney, and J. Lawn, *Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births.* Reprod Health, 2013. 10 Suppl 1: p. S2.
150. Melville, J.M. and T.J. Moss, *The immune consequences of preterm birth.* Front Neurosci, 2013. 7: p. 79.
151. Iacovidou, N., M. Varsami, and A. Syggellou, *Neonatal outcome of preterm delivery.* Ann N Y Acad Sci, 2010. 1205: p. 130-4.
152. Dziętko, M., U. Felderhoff-Mueser, M. Siffringer, B. Krutz, P. Bittigau, F. Thor, R. Heumann, C. Buhner, C. Ikonomidou, and H.H. Hansen, *Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity.* Neurobiol Dis, 2004. 15(2): p. 177-87.
153. Brehmer, F., I. Bendix, S. Prager, Y. van de Looij, B.S. Reinboth, J. Zimmermanns, G.W. Schlager, D. Brait, M. Siffringer, S. Endesfelder, S. Sizonenko, C. Mallard, C. Buhner, U. Felderhoff-Mueser, and B. Gerstner,

- Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage.* PLoS One, 2012. 7(11): p. e49023.
154. Kaindl, A.M., M. Sifringer, A. Koppelstaetter, K. Genz, R. Loeber, C. Boerner, J. Stuwe, J. Klose, and U. Felderhoff-Mueser, *Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes.* Ann Neurol, 2008. 64(5): p. 523-34.
  155. Karen, T., G.W. Schlager, I. Bendix, M. Sifringer, R. Herrmann, C. Pantazis, D. Enot, M. Keller, T. Kerner, and U. Felderhoff-Mueser, *Effect of propofol in the immature rat brain on short- and long-term neurodevelopmental outcome.* PLoS One, 2013. 8(5): p. e64480.
  156. Zacharias, R., M. Schmidt, J. Kny, M. Sifringer, S. Bercker, P. Bittigau, C. Buhner, U. Felderhoff-Muser, and T. Kerner, *Dose-dependent effects of erythropoietin in propofol anesthetized neonatal rats.* Brain Res, 2010. 1343: p. 14-9.
  157. Jobe, A.H. and S.G. Kallapur, *Long term consequences of oxygen therapy in the neonatal period.* Seminars in fetal & neonatal medicine, 2010. 15(4): p. 230-235.
  158. Molna' r, Z., Szele, F.G., Vercelli, A. , *Forebrain neurogenic compartments and cortical neurogenesis: comparative aspects.* , in *Postnatal and Adult Neurogenesis.*, L. Bonfati, Editor. 2009: Research Signpost, Kerala. p. 193-213.
  159. Tanimura, A., J. Liu, T. Namba, T. Seki, Y. Matsubara, M. Itoh, T. Suzuki, and H. Arai, *Prenatal phencyclidine exposure alters hippocampal cell proliferation in offspring rats.* Synapse, 2009. 63(9): p. 729-36.
  160. Johnson, S., C. Hollis, P. Kochhar, E. Hennessy, D. Wolke, and N. Marlow, *Psychiatric disorders in extremely preterm children: longitudinal finding at age 11 years in the EPICure study.* J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2010. 49(5): p. 453-63.e1.
  161. Ment, L.R., B. Vohr, W. Allan, K. Katz, K.C. Schneider, M. Westerveld, C.C. Duncan, and R.W. Makuch, *Change in cognitive function over time in very low-birth-weight infants.* JAMA, 2003. 289(6): p. 705-711.
  162. Eikenes, L., G.C. Lohaugen, A.M. Brubakk, J. Skranes, and A.K. Haberg, *Young adults born preterm with very low birth weight demonstrate widespread white matter alterations on brain DTI.* Neuroimage, 2011. 54(3): p. 1774-85.
  163. Vesoulis, Z.A., T.E. Inder, L.J. Woodward, B. Buse, C. Vavasseur, and A.M. Mathur, *Early electrographic seizures, brain injury, and neurodevelopmental risk in the very preterm infant.* Pediatr Res, 2014. 75(4): p. 564-9.
  164. Holopainen, I.E., *Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization.* Neurochem Int, 2008. 52(6): p. 935-47.
  165. Olariu, A., K.M. Cleaver, and H.A. Cameron, *Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle.* J Comp Neurol, 2007. 501(4): p. 659-67.
  166. Shetty, G.A., B. Hattiangady, and A.K. Shetty, *Neural stem cell- and neurogenesis-related gene expression profiles in the young and aged dentate gyrus.* Age (Dordr), 2013.
  167. Kaindl, A.M., M. Sifringer, C. Zabel, G. Nebrich, M.A. Wacker, U. Felderhoff-Mueser, S. Endesfelder, M. von der Hagen, V. Stefovskaja, J. Klose, and C. Ikonomidou, *Acute and long-term proteome changes induced by oxidative stress in the developing brain.* Cell Death Differ, 2006. 13(7): p. 1097-109.
  168. Burhans, W.C. and N.H. Heintz, *The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate.* Free Radic Biol Med, 2009. 47(9): p. 1282-93.
  169. Nayak, G. and G.M. Cooper, *p53 is a major component of the transcriptional and apoptotic program regulated by PI 3-kinase/Akt/GSK3 signaling.* Cell Death Dis, 2012. 3: p. e400.
  170. Friocourt, G., J.S. Liu, M. Antypa, S. Rakic, C.A. Walsh, and J.G. Parnavelas, *Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration.* J Neurosci, 2007. 27(14): p. 3875-83.
  171. Kappeler, C., Y. Saillour, J.P. Baudoin, F.P. Tuy, C. Alvarez, C. Houbroun, P. Gaspar, G. Hamard, J. Chelly, C. Metin, and F. Francis, *Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice.* Hum Mol Genet, 2006. 15(9): p. 1387-400.
  172. Roybon, L., T. Hjalt, S. Stott, F. Guillemot, J.Y. Li, and P. Brundin, *Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis.* PLoS One, 2009. 4(3): p. e4779.
  173. von Bohlen and Halbach, O., *Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus.* Cell Tissue Res, 2007. 329(3): p. 409-20.
  174. Hodge, R.D., B.R. Nelson, R.J. Kahoud, R. Yang, K.E. Mussar, S.L. Reiner, and R.F. Hevner, *Tbr2 is essential for hippocampal lineage progression from neural stem cells to intermediate progenitors and neurons.* J Neurosci, 2012. 32(18): p. 6275-87.
  175. Lavado, A., 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 Biol, 2010. 8(8).
  176. Galeeva, A., E. Treuter, S. Tomarev, and M. Pelto-Huikko, *A prospero-related homeobox gene Prox-1 is expressed during postnatal brain development as well as in the adult rodent brain.* Neuroscience, 2007. 146(2): p. 604-16.
  177. Lavado, A. and G. Oliver, *Prox1 expression patterns in the developing and adult murine brain.* Dev Dyn, 2007. 236(2): p. 518-24.

178. Liu, M., S.J. Pleasure, A.E. Collins, J.L. Noebels, F.J. Naya, M.J. Tsai, and D.H. Lowenstein, *Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(2): p. 865-70.
179. Gould, E., *How widespread is adult neurogenesis in mammals?* Nat Rev Neurosci, 2007. 8(6): p. 481-8.
180. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. 132(4): p. 645-60.
181. Panchision, D.M., *The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease*. J Cell Physiol, 2009. 220(3): p. 562-8.
182. Yis, U., S.H. Kurul, A. Kumral, S. Cilaker, K. Tugyan, S. Genc, and O. Yilmaz, *Hyperoxic exposure leads to cell death in the developing brain*. Brain Dev, 2008. 30(9): p. 556-62.
183. Siffringer, M., I. Bendix, C. Borner, S. Endesfelder, C. von Haefen, A. Kalb, S. Holifanjaniaina, S. Prager, G.W. Schlager, M. Keller, E. Jacotot, and U. Felderhoff-Mueser, *Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis*. Cell Death Dis, 2012. 3: p. e250.
184. Cooke, M.S., R. Olinski, S. Loft, and A. European Standards Committee on Urinary Lesion, *Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. 17(1): p. 3-14.
185. Solberg, R., J.H. Andresen, R. Escrig, M. Vento, and O.D. Saugstad, *Resuscitation of hypoxic newborn piglets with oxygen induces a dose-dependent increase in markers of oxidation*. Pediatr Res, 2007. 62(5): p. 559-63.
186. Lawrence, T., *The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2009. 1(6): p. a001651.
187. Jobe, A.H., *The new bronchopulmonary dysplasia*. Curr Opin Pediatr, 2011. 23(2): p. 167-72.
188. Vento, M., M. Moro, R. Escrig, L. Arruza, G. Villar, I. Izquierdo, L.J. Roberts, 2nd, A. Arduini, J.J. Escobar, J. Sastre, and M.A. Asensi, *Preterm resuscitation with low oxygen causes less oxidative stress, inflammation, and chronic lung disease*. Pediatrics, 2009. 124(3): p. e439-49.
189. Auten, R.L., R.M. Richardson, J.R. White, S.N. Mason, M.A. Vozzelli, and M.H. Whorton, *Nonpeptide CXCR2 antagonist prevents neutrophil accumulation in hyperoxia-exposed newborn rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. 299(1): p. 90-5.
190. Vozzelli, M.A., S.N. Mason, M.H. Whorton, and R.L. Auten, Jr., *Antimacrophage chemokine treatment prevents neutrophil and macrophage influx in hyperoxia-exposed newborn rat lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. 286(3): p. L488-93.
191. Deng, H., S.N. Mason, and R.L. Auten, Jr., *Lung inflammation in hyperoxia can be prevented by antichemokine treatment in newborn rats*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 162(6): p. 2316-23.
192. Kotecha, S., *Cytokines in chronic lung disease of prematurity*. Eur J Pediatr, 1996. 155 Suppl 2: p. S14-7.
193. Speer, C.P., *Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story*. Semin Fetal Neonatal Med, 2006. 11(5): p. 354-62.
194. Mittal, M., M.R. Siddiqui, K. Tran, S.P. Reddy, and A.B. Malik, *Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury*. Antioxidants & Redox Signaling, 2014. 20(7): p. 1126-1167.
195. Negi, R., D. Pande, K. Karki, A. Kumar, R.S. Khanna, and H.D. Khanna, *A novel approach to study oxidative stress in neonatal respiratory distress syndrome*. BBA Clinical, 2015. 3: p. 65-69.
196. Eriksson, L., B. Haglund, V. Od Lind, M. Altman, and H. Kieler, *Prenatal inflammatory risk factors for development of bronchopulmonary dysplasia*. Pediatr Pulmonol, 2014. 49(7): p. 665-72.
197. Manuck, T.A., P.T. Levy, C. Gyamfi-Bannerman, A.H. Jobe, and C.J. Blaisdell, *Prenatal and Perinatal Determinants of Lung Health and Disease in Early Life: A National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop Report*. JAMA Pediatr, 2016. 170(5): p. e154577.
198. Darlow, B.A., P.J. Graham, and M.X. Rojas-Reyes, *Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long-term morbidity in very low birth weight infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2016(8): p. Cd000501.
199. Stevens, T.P., E.W. Harrington, M. Blennow, and R.F. Soll, *Early surfactant administration with brief ventilation vs. selective surfactant and continued mechanical ventilation for preterm infants with or at risk for respiratory distress syndrome*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. Cd003063.
200. Herting, E., *Less invasive surfactant administration (LISA) - ways to deliver surfactant in spontaneously breathing infants*. Early Hum Dev, 2013. 89(11): p. 875-80.
201. Morley, C.J. and P.G. Davis, *Continuous positive airway pressure: scientific and clinical rationale*. Curr Opin Pediatr, 2008. 20(2): p. 119-24.
202. Moore, T.A., K.K. Schmid, A. Anderson-Berry, and A.M. Berger, *Lung Disease, Oxidative Stress, and Oxygen Requirements in Preterm Infants*. Biol Res Nurs, 2016. 18(3): p. 322-30.
203. Schmidt, B., R.S. Roberts, P. Davis, L.W. Doyle, K.J. Barrington, A. Ohlsson, A. Solimano, and W. Tin, *Long-term effects of caffeine therapy for apnea of prematurity*. N Engl J Med, 2007. 357(19): p. 1893-902.
204. Henderson-Smart, D.J. and A.G. De Paoli, *Methylxanthine treatment for apnoea in preterm infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(12): p. CD000140.
205. Rivkees, S.A. and C.C. Wendler, *Adverse and protective influences of adenosine on the newborn and embryo: implications for preterm white matter injury and embryo protection*. Pediatr Res, 2011. 69(4): p. 271-8.

206. Chavez Valdez, R., R. Ahlawat, M. Wills-Karp, A. Nathan, T. Ezell, and E.B. Gauda, *Correlation between serum caffeine levels and changes in cytokine profile in a cohort of preterm infants*. J Pediatr, 2011. 158(1): p. 57-64, 64 e1.
207. Patel, R.M., T. Leong, D.P. Carlton, and S. Vyas-Read, *Early caffeine therapy and clinical outcomes in extremely preterm infants*. J Perinatol, 2013. 33(2): p. 134-40.
208. Bauer, J., K. Maier, O. Linderkamp, and R. Hentschel, *Effect of caffeine on oxygen consumption and metabolic rate in very low birth weight infants with idiopathic apnea*. Pediatrics, 2001. 107(4): p. 660-3.
209. Steer, P., V. Flenady, A. Shearman, B. Charles, P.H. Gray, D. Henderson-Smart, G. Bury, S. Fraser, J. Hegarty, Y. Rogers, S. Reid, L. Horton, M. Charlton, R. Jacklin, A. Walsh, and G. Caffeine Collaborative Study Group Steering, *High dose caffeine citrate for extubation of preterm infants: a randomised controlled trial*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2004. 89(6): p. F499-503.
210. Henderson-Smart, D.J. and P.A. Steer, *Caffeine versus theophylline for apnea in preterm infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(1): p. CD000273.
211. Shi, X., N.S. Dalal, and A.C. Jain, *Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals*. Food Chem Toxicol, 1991. 29(1): p. 1-6.
212. Devasagayam, T.P., J.P. Kamat, H. Mohan, and P.C. Kesavan, *Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species*. Biochim Biophys Acta, 1996. 1282(1): p. 63-70.
213. Barcelos, R.P., M.A. Souza, G.P. Amaral, S.T. Stefanello, G. Bresciani, M.R. Figuera, F.A. Soares, and N.V. Barbosa, *Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats*. Life Sci, 2014. 96(1-2): p. 40-5.
214. Ahotupa, M., E. Mantyla, V. Peltola, A. Puntala, and H. Toivonen, *Pro-oxidant effects of normobaric hyperoxia in rat tissues*. Acta Physiol Scand, 1992. 145(2): p. 151-7.
215. Trachootham, D., W. Lu, M.A. Ogasawara, R.D. Nilsa, and P. Huang, *Redox regulation of cell survival*. Antioxid Redox Signal, 2008. 10(8): p. 1343-74.
216. Yadav, S., S.P. Gupta, G. Srivastava, P.K. Srivastava, and M.P. Singh, *Role of secondary mediators in caffeine-mediated neuroprotection in maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse*. Neurochem Res, 2012. 37(4): p. 875-84.
217. Kilicdag, H., Y.K. Daglioglu, S. Erdogan, and S. Zorludemir, *Effects of caffeine on neuronal apoptosis in neonatal hypoxic-ischemic brain injury*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2014. 27(14): p. 1470-5.
218. Geraets, L., H.J. Moonen, E.F. Wouters, A. Bast, and G.J. Hageman, *Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 at physiological concentrations*. Biochem Pharmacol, 2006. 72(7): p. 902-10.
219. Barkett, M. and T.D. Gilmore, *Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. 18(49): p. 6910-24.
220. Kumral, A., D.C. Yesilirmak, S. Aykan, S. Genc, K. Tugyan, S. Cilaker, M. Akhisaroglu, I. Aksu, S. Sutcuoglu, O. Yilmaz, N. Duman, and H. Ozkan, *Protective effects of methylxanthines on hypoxia-induced apoptotic neurodegeneration and long-term cognitive functions in the developing rat brain*. Neonatology, 2010. 98(2): p. 128-36.
221. Kim, J., S. Lee, J. Shim, H.W. Kim, J. Kim, Y.J. Jang, H. Yang, J. Park, S.H. Choi, J.H. Yoon, K.W. Lee, and H.J. Lee, *Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H(2)O(2)-induced apoptosis in primary cortical neurons*. Neurochem Int, 2012. 60(5): p. 466-74.
222. Deliktas, M., H. Ergin, A. Demiray, H. Akca, O.M.A. Ozdemir, and M.B. Ozdemir, *Caffeine prevents bilirubin-induced cytotoxicity in cultured newborn rat astrocytes*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2018: p. 1-7.
223. Miller JM, F.A., Martin JR *Respiratory disorders in preterm and term infants.*, in *Neonatal perinatal medicine. Diseases of the fetus and infant.* , M. Fanaroff AA, Editor. 1997: United States: Mosby. p. 1040-1065.
224. Roberts, R., *Methylxanthine therapy: Caffeine and theophylline.*, in *Drug Therapy in Infants: Pharmacological Principles and Clinical Experience*, W. Saunders, Editor. 1984: Philadelphia, United States. p. 19-137.
225. van Praag, H., G. Kempermann, and F.H. Gage, *Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus*. Nat Neurosci, 1999. 2(3): p. 266-70.
226. Lee, C., *Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation*. Clin Chim Acta, 2000. 295(1-2): p. 141-54.
227. Fredholm, B.B., *Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine*. Pharmacol Toxicol, 1995. 76(2): p. 93-101.
228. Han, M.E., K.H. Park, S.Y. Baek, B.S. Kim, J.B. Kim, H.J. Kim, and S.O. Oh, *Inhibitory effects of caffeine on hippocampal neurogenesis and function*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 356(4): p. 976-80.
229. Horrigan, L.A., J.P. Kelly, and T.J. Connor, *Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway*. Int Immunopharmacol, 2004. 4(10-11): p. 1409-17.
230. Kochman, L.J., C.A. Fornal, and B.L. Jacobs, *Suppression of hippocampal cell proliferation by short-term stimulant drug administration in adult rats*. Eur J Neurosci, 2009. 29(11): p. 2157-65.

231. Ohta, A., D. Lukashev, E.K. Jackson, B.B. Fredholm, and M. Sitkovsky, *1,3,7-trimethylxanthine (caffeine) may exacerbate acute inflammatory liver injury by weakening the physiological immunosuppressive mechanism*. J Immunol, 2007. 179(11): p. 7431-8.
232. Wentz, C.T. and S.S. Magavi, *Caffeine alters proliferation of neuronal precursors in the adult hippocampus*. Neuropharmacology, 2009. 56(6-7): p. 994-1000.
233. Ohtani, N., T. Goto, C. Waeber, and P.G. Bhide, *Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence*. J Neurosci, 2003. 23(7): p. 2840-50.
234. Hashimoto, T., Z. He, W.Y. Ma, P.C. Schmid, A.M. Bode, C.S. Yang, and Z. Dong, *Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells*. Cancer Res, 2004. 64(9): p. 3344-9.
235. Lu, Y.P., Y.R. Lou, X.H. Li, J.G. Xie, D. Brash, M.T. Huang, and A.H. Conney, *Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet light-induced increases in epidermal wild-type p53, p21(WAF1/CIP1), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice*. Cancer Res, 2000. 60(17): p. 4785-91.
236. Nakagawa, S., J.E. Kim, R. Lee, J.E. Malberg, J. Chen, C. Steffen, Y.J. Zhang, E.J. Nestler, and R.S. Duman, *Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein*. J Neurosci, 2002. 22(9): p. 3673-82.
237. Fredholm, B.B., *Adenosine receptors as drug targets*. Exp Cell Res, 2010. 316(8): p. 1284-8.
238. Fredholm, B.B., I.J. AP, K.A. Jacobson, K.N. Klotz, and J. Linden, *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, 2001. 53(4): p. 527-52.
239. Castillo, C.A., D. Leon, M.A. Ruiz, J.L. Albasanz, and M. Martin, *Modulation of adenosine A1 and A2A receptors in C6 glioma cells during hypoxia: involvement of endogenous adenosine*. J Neurochem, 2008. 105(6): p. 2315-29.
240. Endesfelder, S., U. Weichelt, C. Schiller, M. Sifringer, I. Bendix, and C. Buhner, *Caffeine Protects Against Anticonvulsant-Induced Neurotoxicity in the Developing Rat Brain*. Neurotox Res, 2017.
241. Cunha, R.A., *Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A(2A) receptor blockade*. Purinergic Signalling, 2005. 1(2): p. 111-134.
242. Fill, M. and J.A. Copello, *Ryanodine receptor calcium release channels*. Physiol Rev, 2002. 82(4): p. 893-922.
243. Kang, S.S., K.S. Han, B.M. Ku, Y.K. Lee, J. Hong, H.Y. Shin, A.G. Almonte, D.H. Woo, D.J. Brat, E.M. Hwang, S.H. Yoo, C.K. Chung, S.H. Park, S.H. Paek, E.J. Roh, S.J. Lee, J.Y. Park, S.F. Traynelis, and C.J. Lee, *Caffeine-mediated inhibition of calcium release channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype 3 blocks glioblastoma invasion and extends survival*. Cancer Res, 2010. 70(3): p. 1173-83.
244. Yang, C., S. Franciosi, and R.E. Brown, *Adenosine Inhibits the Excitatory Synaptic Inputs to Basal Forebrain Cholinergic, GABAergic, and Parvalbumin Neurons in Mice*. Frontiers in Neurology, 2013. 4: p. 77.
245. Ribeiro, J.A. and A.M. Sebastiao, *Caffeine and adenosine*. J Alzheimers Dis, 2010. 20 Suppl 1: p. S3-15.
246. Ciruela, F., V. Casado, R.J. Rodrigues, R. Lujan, J. Burgueno, M. Canals, J. Borycz, N. Rebola, S.R. Goldberg, J. Mallol, A. Cortes, E.I. Canela, J.F. Lopez-Gimenez, G. Milligan, C. Lluís, R.A. Cunha, S. Ferre, and R. Franco, *Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers*. J Neurosci, 2006. 26(7): p. 2080-7.
247. Cristovao-Ferreira, S., G. Navarro, M. Brugarolas, K. Perez-Capote, S.H. Vaz, G. Fattorini, F. Conti, C. Lluís, J.A. Ribeiro, P.J. McCormick, V. Casado, R. Franco, and A.M. Sebastiao, *A1R-A2AR heteromers coupled to Gs and Gi/o proteins modulate GABA transport into astrocytes*. Purinergic Signal, 2013. 9(3): p. 433-49.
248. Gaytan, S.P. and R. Pasaro, *Neonatal caffeine treatment up-regulates adenosine receptors in brainstem and hypothalamic cardio-respiratory related nuclei of rat pups*. Exp Neurol, 2012. 237(2): p. 247-59.
249. Armanian, A.M., R. Iranpour, E. Faghihian, and N. Salehimehr, *Caffeine Administration to Prevent Apnea in Very Premature Infants*. Pediatr Neonatol, 2016. 57(5): p. 408-412.
250. Patel, R.M., K. Zimmerman, D.P. Carlton, R. Clark, D.K. Benjamin, and P.B. Smith, *Early Caffeine Prophylaxis and Risk of Failure of Initial Continuous Positive Airway Pressure in Very Low Birth Weight Infants*. J Pediatr, 2017. 190: p. 108-111.e1.
251. Dobson, N.R. and R.M. Patel, *The Role of Caffeine in Non-Invasive Respiratory Support*. Clinics in perinatology, 2016. 43(4): p. 773-782.
252. Costi, D., A.M. Cyna, S. Ahmed, K. Stephens, P. Strickland, J. Ellwood, J.N. Larsson, C. Chooi, L.L. Burgoyne, and P. Middleton, *Effects of sevoflurane versus other general anaesthesia on emergence agitation in children*. Cochrane Database Syst Rev, 2014(9): p. Cd007084.
253. Soriano, S.G. and K.J. Anand, *Anesthetics and brain toxicity*. Curr Opin Anaesthesiol, 2005. 18(3): p. 293-7.
254. Fanaroff, A.A., B.J. Stoll, L.L. Wright, W.A. Carlo, R.A. Ehrenkranz, A.R. Stark, C.R. Bauer, E.F. Donovan, S.B. Korones, A.R. Laptook, J.A. Lemons, W. Oh, L.A. Papile, S. Shankaran, D.K. Stevenson, J.E. Tyson, and W.K. Poole, *Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants*. Am J Obstet Gynecol, 2007. 196(2): p. 147 e1-8.
255. Varga, P., B. Berecz, A. Gasparics, Z. Dombi, Z. Varga, J. Jeager, Z. Magyar, J. Rigo, Jr., J.G. Joo, and L. Kornya, *Morbidity and mortality trends in very-very low birth weight premature infants in light of recent changes in obstetric care*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2017. 211: p. 134-139.



256. Jakob, S.M., E. Ruokonen, R.M. Grounds, T. Sarapohja, C. Garratt, S.J. Pocock, J.R. Bratty, J. Takala, and I. Dexmedetomidine for Long-Term Sedation, *Dexmedetomidine vs midazolam or propofol for sedation during prolonged mechanical ventilation: two randomized controlled trials*. JAMA, 2012. 307(11): p. 1151-60.
257. Riker, R.R., Y. Shehabi, P.M. Bokesch, D. Ceraso, W. Wisemandle, F. Koura, P. Whitten, B.D. Margolis, D.W. Byrne, E.W. Ely, M.G. Rocha, and S.S. Group, *Dexmedetomidine vs midazolam for sedation of critically ill patients: a randomized trial*. JAMA, 2009. 301(5): p. 489-99.
258. Plambech, M.Z. and A. Afshari, *Dexmedetomidine in the pediatric population: a review*. Minerva Anestesiol, 2015. 81(3): p. 320-32.
259. Buck, M.L., *Dexmedetomidine use in pediatric intensive care and procedural sedation*. J Pediatr Pharmacol Ther, 2010. 15(1): p. 17-29.
260. Buck, M.L. and D.F. Willson, *Use of dexmedetomidine in the pediatric intensive care unit*. Pharmacotherapy, 2008. 28(1): p. 51-7.
261. Potts, A.L., B.J. Anderson, G.R. Warman, J. Lerman, S.M. Diaz, and S. Vilo, *Dexmedetomidine pharmacokinetics in pediatric intensive care--a pooled analysis*. Paediatr Anaesth, 2009. 19(11): p. 1119-29.
262. Hayden, J.C., C. Breatnach, D.R. Doherty, M. Healy, M.M. Howlett, P.J. Gallagher, and G. Cousins, *Efficacy of alpha2-Agonists for Sedation in Pediatric Critical Care: A Systematic Review*. Pediatr Crit Care Med, 2016. 17(2): p. e66-75.
263. Dubois, M.J., N. Bergeron, M. Dumont, S. Dial, and Y. Skrobik, *Delirium in an intensive care unit: a study of risk factors*. Intensive Care Med, 2001. 27(8): p. 1297-304.
264. Marcantonio, E.R., G. Juarez, L. Goldman, C.M. Mangione, L.E. Ludwig, L. Lind, N. Katz, E.F. Cook, E.J. Orav, and T.H. Lee, *The relationship of postoperative delirium with psychoactive medications*. JAMA, 1994. 272(19): p. 1518-22.
265. Pandharipande, P., B.A. Cotton, A. Shintani, J. Thompson, B.T. Pun, J.A. Morris, Jr., R. Dittus, and E.W. Ely, *Prevalence and risk factors for development of delirium in surgical and trauma intensive care unit patients*. J Trauma, 2008. 65(1): p. 34-41.
266. Pandharipande, P., A. Shintani, J. Peterson, B.T. Pun, G.R. Wilkinson, R.S. Dittus, G.R. Bernard, and E.W. Ely, *Lorazepam is an independent risk factor for transitioning to delirium in intensive care unit patients*. Anesthesiology, 2006. 104(1): p. 21-6.
267. Saugstad, O.D., *Hyperoxia in the term newborn: more evidence is still needed for optimal oxygen therapy*. Acta Paediatr Suppl, 2012. 101(464): p. 34-8.
268. Wright, C.J. and P.A. Dennery, *Manipulation of gene expression by oxygen: a primer from bedside to bench*. Pediatr Res, 2009. 66(1): p. 3-10.
269. Perez-Zoghbi, J.F., W. Zhu, M.R. Grafe, and A.M. Brambrink, *Dexmedetomidine-mediated neuroprotection against sevoflurane-induced neurotoxicity extends to several brain regions in neonatal rats*. Br J Anaesth, 2017. 119(3): p. 506-516.
270. Lv, J., Y. Wei, Y. Chen, X. Zhang, Z. Gong, Y. Jiang, Q. Gong, L. Zhou, H. Wang, and Y. Xie, *Dexmedetomidine attenuates propofol-induced neuroapoptosis partly via the activation of the PI3k/Akt/GSK3beta pathway in the hippocampus of neonatal rats*. Environ Toxicol Pharmacol, 2017. 52: p. 121-128.
271. Zhang, Q., D. Wu, Y. Yang, T. Liu, and H. Liu, *Effects of dexmedetomidine on the protection of hyperoxia-induced lung injury in newborn rats*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. 8(6): p. 6466-73.
272. Lee, J.R., E.P. Lin, R.D. Hofacer, B. Upton, S.Y. Lee, L. Ewing, B. Joseph, and A.W. Loepke, *Alternative technique or mitigating strategy for sevoflurane-induced neurodegeneration: a randomized controlled dose-escalation study of dexmedetomidine in neonatal rats*. BJA: British Journal of Anaesthesia, 2017. 119(3): p. 492-505.
273. O'Connor, S.D., O.H. Cabrera, J.D. Dougherty, S. Singh, B.S. Swiney, P. Salinas-Contreras, N.B. Farber, and K.K. Noguchi, *Dexmedetomidine protects against glucocorticoid induced progenitor cell apoptosis in neonatal mouse cerebellum*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2017. 30(18): p. 2156-2162.
274. Zhang, X., J. Wang, W. Qian, J. Zhao, L. Sun, Y. Qian, and H. Xiao, *Dexmedetomidine inhibits tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes by suppression of c-Jun N-terminal kinases*. Inflammation, 2014. 37(3): p. 942-9.
275. Zhang, X., J. Wang, W. Qian, J. Zhao, L. Sun, Y. Qian, and H. Xiao, *Dexmedetomidine inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated microglia by suppression of extracellular signal-regulated kinase*. Neurol Res, 2015. 37(3): p. 238-45.
276. Liu, Y.J., D.Y. Wang, Y.J. Yang, and W.F. Lei, *Effects and mechanism of dexmedetomidine on neuronal cell injury induced by hypoxia-ischemia*. BMC Anesthesiol, 2017. 17(1): p. 117.
277. Chen, Z., T. Ding, and C.G. Ma, *Dexmedetomidine (DEX) protects against hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury by suppressing inflammation and oxidative stress in NLRC5 deficient mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2017. 493(2): p. 1143-1150.
278. Namiki, J., S. Suzuki, T. Masuda, Y. Ishihama, and H. Okano, *Nestin protein is phosphorylated in adult neural stem/progenitor cells and not endothelial progenitor cells*. Stem Cells Int, 2012. 2012: p. 430138.

279. Bonaguidi, M.A., M.A. Wheeler, J.S. Shapiro, R.P. Stadel, G.J. Sun, G.L. Ming, and H. Song, *In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics*. Cell, 2011. 145(7): p. 1142-55.
280. Buffo, A., I. Rite, P. Tripathi, A. Lepier, D. Colak, A.P. Horn, T. Mori, and M. Gotz, *Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(9): p. 3581-6.
281. Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage, *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment*. Nature, 1997. 386(6624): p. 493-5.
282. Falls, D.L., *Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies*. Exp Cell Res, 2003. 284(1): p. 14-30.
283. Gavazzi, I., *Semaphorin-neuropilin-1 interactions in plasticity and regeneration of adult neurons*. Cell Tissue Res, 2001. 305(2): p. 275-84.
284. Raper, J.A., *Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates*. Curr Opin Neurobiol, 2000. 10(1): p. 88-94.
285. Weimer, R.M. and E.M. Jorgensen, *Controversies in synaptic vesicle exocytosis*. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 18): p. 3661-6.
286. Janz, R., T.C. Sudhof, R.E. Hammer, V. Unni, S.A. Siegelbaum, and V.Y. Bolshakov, *Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I*. Neuron, 1999. 24(3): p. 687-700.
287. Allen, M.C., *Neurodevelopmental outcomes of preterm infants*. Curr Opin Neurol, 2008. 21(2): p. 123-8.
288. Popa-Wagner, A., S. Mitran, S. Sivanesan, E. Chang, and A.M. Buga, *ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly*. Oxid Med Cell Longev, 2013. 2013: p. 963520.
289. Buchman, A.S., L. Yu, P.A. Boyle, J.A. Schneider, P.L. De Jager, and D.A. Bennett, *Higher brain BDNF gene expression is associated with slower cognitive decline in older adults*. Neurology, 2016. 86(8): p. 735-41.
290. Chen, B.S., H. Peng, and S.N. Wu, *Dexmedetomidine, an alpha2-adrenergic agonist, inhibits neuronal delayed-rectifier potassium current and sodium current*. Br J Anaesth, 2009. 103(2): p. 244-54.
291. Dahmani, S., D. Rouelle, P. Gressens, and J. Mantz, *Characterization of the postconditioning effect of dexmedetomidine in mouse organotypic hippocampal slice cultures exposed to oxygen and glucose deprivation*. Anesthesiology, 2010. 112(2): p. 373-83.
292. Sanders, R.D., P. Sun, S. Patel, M. Li, M. Maze, and D. Ma, *Dexmedetomidine provides cortical neuroprotection: impact on anaesthetic-induced neuroapoptosis in the rat developing brain*. Acta Anaesthesiol Scand, 2010. 54(6): p. 710-6.
293. Perez Tarazona, S., P. Solano Galan, E. Bartoll Alguacil, and J. Alfonso Diego, *Bronchopulmonary dysplasia as a risk factor for asthma in school children and adolescents: A systematic review*. Allergol Immunopathol (Madr), 2018. 46(1): p. 87-98.
294. Sipola-Leppanen, M. and E. Kajantie, *Should we assess cardiovascular risk in young adults born preterm?* Curr Opin Lipidol, 2015. 26(4): p. 282-7.
295. Nuyt, A.M., J.-C. Lavoie, I. Mohamed, K. Paquette, and T.M. Luu, *Adult Consequences of Extremely Preterm Birth: Cardiovascular and Metabolic Diseases Risk Factors, Mechanisms, and Prevention Avenues*. Clinics in Perinatology, 2017. 44(2): p. 315-332.
296. Nosarti, C., A. Reichenberg, R.M. Murray, S. Cnattingius, M.P. Lambe, L. Yin, J. MacCabe, L. Rifkin, and C.M. Hultman, *Preterm birth and psychiatric disorders in young adult life*. Arch Gen Psychiatry, 2012. 69(6): p. E1-8.
297. Franz, A.P., G.U. Bolat, H. Bolat, A. Matijasevich, I.S. Santos, R.C. Silveira, R.S. Procianny, L.A. Rohde, and C.R. Moreira-Maia, *Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Very Preterm/Very Low Birth Weight: A Meta-analysis*. Pediatrics, 2018. 141(1).
298. Mathewson, K.J., C.H. Chow, K.G. Dobson, E.I. Pope, L.A. Schmidt, and R.J. Van Lieshout, *Mental health of extremely low birth weight survivors: A systematic review and meta-analysis*. Psychol Bull, 2017. 143(4): p. 347-383.
299. Jeschke, E., A. Biermann, C. Günster, T. Böhrer, G. Heller, H.D. Hummler, C. Bühner, and P. for the Routine Data-Based Quality Improvement, *Mortality and Major Morbidity of Very-Low-Birth-Weight Infants in Germany 2008–2012: A Report Based on Administrative Data*. Frontiers in Pediatrics, 2016. 4: p. 23.
300. Patel, R.M., *Short and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants*. American journal of perinatology, 2016. 33(3): p. 318-328.
301. Eryigit Madzwamuse, S., N. Baumann, J. Jaekel, P. Bartmann, and D. Wolke, *Neuro-cognitive performance of very preterm or very low birth weight adults at 26 years*. J Child Psychol Psychiatry, 2015. 56(8): p. 857-64.
302. Feldman, R., Z. Rosenthal, and A.I. Eidelman, *Maternal-preterm skin-to-skin contact enhances child physiologic organization and cognitive control across the first 10 years of life*. Biol Psychiatry, 2014. 75(1): p. 56-64.
303. Johnson, K., S.D. Scott, and K.D. Fraser, *Oxygen use for preterm infants: factors that may influence clinical decisions surrounding oxygen titration*. Adv Neonatal Care, 2011. 11(1): p. 8-14; quiz 15-6.
304. *Prevention and Management of Procedural Pain in the Neonate: An Update*. Pediatrics, 2016. 137(2): p. e20154271.
305. Duerden, E.G., T. Guo, L. Dodbiba, M.M. Chakravarty, V. Chau, K.J. Poskitt, A. Synnes, R.E. Grunau, and S.P. Miller, *Midazolam dose correlates with abnormal hippocampal growth and neurodevelopmental outcome in preterm infants*. Ann Neurol, 2016. 79(4): p. 548-59.

306. McPherson, C., M. Haslam, R. Pineda, C. Rogers, J.J. Neil, and T.E. Inder, *Brain Injury and Development in Preterm Infants Exposed to Fentanyl*. Ann Pharmacother, 2015. 49(12): p. 1291-7.
307. Lammers, E.M., P.N. Johnson, K.D. Ernst, T.M. Hagemann, S.M. Lawrence, P.K. Williams, M.P. Anderson, and J.L. Miller, *Association of fentanyl with neurodevelopmental outcomes in very-low-birth-weight infants*. Ann Pharmacother, 2014. 48(3): p. 335-42.
308. McPherson, C. and R.E. Grunau, *Neonatal pain control and neurologic effects of anesthetics and sedatives in preterm infants*. Clinics in perinatology, 2014. 41(1): p. 209-227.
309. Memis, D., D. Dokmeci, B. Karamanlioglu, A. Turan, and M. Ture, *A comparison of the effect on gastric emptying of propofol or dexmedetomidine in critically ill patients: preliminary study*. Eur J Anaesthesiol, 2006. 23(8): p. 700-4.
310. Hartel, C., B. Haase, K. Browning-Carmo, C. Gebauer, E. Kattner, A. Kribs, H. Segerer, N. Teig, A. Wense, C. Wieg, E. Herting, and W. Gopel, *Does the enteral feeding advancement affect short-term outcomes in very low birth weight infants?* J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009. 48(4): p. 464-70.
311. Chrysostomou, C., S.R. Schulman, M. Herrera Castellanos, B.E. Cofer, S. Mitra, M.G. da Rocha, W.A. Wisemandle, and L. Gramlich, *A phase II/III, multicenter, safety, efficacy, and pharmacokinetic study of dexmedetomidine in preterm and term neonates*. J Pediatr, 2014. 164(2): p. 276-82 e1-3.
312. Pandharipande, P.P., B.T. Pun, D.L. Herr, M. Maze, T.D. Girard, R.R. Miller, A.K. Shintani, J.L. Thompson, J.C. Jackson, S.A. Deppen, R.A. Stiles, R.S. Dittus, G.R. Bernard, and E.W. Ely, *Effect of sedation with dexmedetomidine vs lorazepam on acute brain dysfunction in mechanically ventilated patients: the MENDS randomized controlled trial*. JAMA, 2007. 298(22): p. 2644-53.
313. Hillman, N.H., T.J. Moss, S.G. Kallapur, C. Bachurski, J.J. Pillow, G.R. Polglase, I. Nitsos, B.W. Kramer, and A.H. Jobe, *Brief, large tidal volume ventilation initiates lung injury and a systemic response in fetal sheep*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. 176(6): p. 575-81.
314. Barton, S.K., A.R. McDougall, J.M. Melville, T.J. Moss, V.A. Zahra, T. Lim, K.J. Crossley, G.R. Polglase, and M. Tolcos, *Differential short-term regional effects of early high dose erythropoietin on white matter in preterm lambs after mechanical ventilation*. J Physiol, 2016. 594(5): p. 1437-49.
315. Khwaja, O. and J.J. Volpe, *Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008. 93(2): p. F153-61.
316. Parmar, J. and N.M. Jones, *Hypoxic preconditioning can reduce injury-induced inflammatory processes in the neonatal rat brain*. Int J Dev Neurosci, 2015. 43: p. 35-42.
317. Barton, S.K., M. Tolcos, S.L. Miller, C. Christoph-Roehr, G.M. Schmolzer, T.J. Moss, S.B. Hooper, E.M. Wallace, and G.R. Polglase, *Ventilation-Induced Brain Injury in Preterm Neonates: A Review of Potential Therapies*. Neonatology, 2016. 110(2): p. 155-62.
318. Colella, M., V. Biran, and O. Baud, *Melatonin and the newborn brain*. Early Hum Dev, 2016. 102: p. 1-3.
319. Poggi, C. and C. Dani, *Antioxidant strategies and respiratory disease of the preterm newborn: an update*. Oxid Med Cell Longev, 2014. 2014: p. 721043.

## Danksagung

Mein allererster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Christoph Bühler für seine Inspirationen, das fortwährende Wecken der Neugier an wissenschaftlichen Fragestellungen und seine unermüdliche Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Ich bedanke mich für das in mich gesetzte Vertrauen, als er mir 2009 die Verantwortung für das neonatologische Forschungslabor übergab, und die damit verbundene wissenschaftliche Freiheit zur Bearbeitung von spannenden Projekten. Ich bin an den akademischen und administrativen Herausforderungen gewachsen und habe durch Christoph Bühler gelernt, hartnäckig zu bleiben und nicht aufzugeben, wenn es an der Wissenschaftsfront mal wieder etwas schwieriger wurde.

Den Grundstein für den Weg in die Wissenschaft hat meine Doktormutter, Frau Prof. Dr. Astrid Speer, schon während meines Studiums gelegt. Ich danke ihr für die langjährige Unterstützung als meine Mentorin, Kollegin und die daraus entstandene Freundschaft. Fast ebenso lange kenne ich Dr. Marco Sifringer, der mir während meiner Diplomarbeit die methodischen Grundlagen vermittelt hat und ein sehr langes Stück meines beruflichen und vor allem auch privaten Weges mit mir gegangen ist. Danke für deine Freundschaft, die geniale Zeit in Dresden und die letzten Jahre der engen Zusammenarbeit an der Charité. Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Hrisanthi Ikonomidou und Frau Prof. Dr. Ursula Felderhoff-Müser, die die ersten Schritte in mein Berufsleben unterstützt haben. In der Arbeitsgruppe von Dr. Robert Sabat wurde es mir ermöglicht, erste Projektleitungen für tierexperimentelle Studien zu übernehmen.

Ein ganz herzlicher Dank gilt dem Laborteam, Evelyn Strauß, Ruth Herrmann, Dr. Till Scheuer und PD Dr. Thomas Schmitz, und auch den ehemaligen Mitarbeitern wie Dr. Ulrike Weichelt, die durch Freundschaft, produktive Zusammenarbeit und fachliche Kompetenz den Arbeitsalltag und auch die Freizeit genießen lassen. Ein Dank geht auch an das Klinikteam der Neonatologie. Bedanken möchte ich mich bei Dr. Clarissa von Haefen und Nadine Paeschke aus der Klinik für Anästhesie der Charité sowie Prof. Dr. Ivo Bendix vom Universitätsklinikum Essen für die konstruktive und freundschaftliche Zusammenarbeit. Forschen und Lehren geht nicht immer an einem Ort zusammen. Ein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Monika Gross, Prof. Dr. Astrid Speer, Prof. Dr. Sabine Hagemann und Prof. Dr. Carsten Lübke für Möglichkeit der Lehre und stellvertretend an Sabine Bucher und Dagmar Böhme für die herzliche Zusammenarbeit an der Beuth Hochschule für Technik.

Gewidmet ist diese Arbeit aber den Menschen, denen ich zu tiefst dankbar bin. Das sind meine Eltern Edelgard und Lothar, die mich zeitlebens bei all meinen Entscheidungen grenzenlos unterstützt haben und denen das Glück ihrer Kinder immer an erster Stelle steht sowie meinem Mann Gert und unserer Tochter Renée Elise, die mittlerweile ebenso über PCR, Ratten und Koffein Bescheid wissen, für ihre Liebe, emotionale Unterstützung, das Späßchen-Häschen und vor allem für ihr Verständnis, dass Forschung auch am Wochenende stattfinden kann, wenn der Rattennachwuchs mal wieder mehr Aufmerksamkeit benötigte. Ihr zeigt mir jeden Tag, was wirklich wichtig im Leben ist.

## **Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charité**

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

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

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift