

Aus dem
Institut für Rechtsmedizin der Universität München
Vorstand Prof. Dr. med. W. Eisenmenger

**LEKTINHISTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN DER MIKROGLIA
AN GEHIRNEN VON SIDS-FÄLLEN.**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Alexander Argirov
aus
München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Randolph Penning

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Th. Heinzeller
Prof. Dr. med. W. Müller-Felber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. A. Büttner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 04. November 2004

| | | Seite |
|-----------|--|--------------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | SIDS und Nervensystem | 10 |
| 1.2. | Mikroglia | 17 |
| 1.2.1. | Geschichte, Ontogenese und Reifung | 17 |
| 1.2.2. | Morphologie und Funktion | 23 |
| 1.2.3. | Reaktionsmuster im kindlichen und adulten Gehirn | 26 |
| 1.2.4. | Immunhistochemische Marker | 30 |
| 1.3. | Fragestellung | 33 |
| | | |
| 2. | Material und Methoden | 34 |
| 2.1. | Untersuchungsmaterial | 34 |
| 2.1.1. | Stichprobe | 35 |
| 2.2. | Lektin | 36 |
| 2.3. | Untersuchungen | 37 |
| 2.3.1. | Lektin histochemische Untersuchungen | 37 |
| 2.3.2. | Rating | 40 |
| 2.3.2.1. | Graue Substanz | 40 |
| 2.3.2.2. | Weißer Substanz | 41 |
| 2.3.3. | Statistische Auswertung | 42 |
| | | |
| 3. | Ergebnisse | 43 |
| 3.1. | Lektin histochemische Befunde | 43 |
| 3.1.1. | Telencephalon, Graue Substanz | 43 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.1.2. | Telenzephalon, Weiße Substanz | 44 |
| 3.1.3. | Hippocampus | 46 |
| 3.1.4. | Kleinhirn (Cerebellum) | 47 |
| 3.1.5. | Thalamus | 48 |
| 3.1.6. | Basalganglien und Capsula interna | 49 |
| 3.1.7. | Mittelhirn (Mesenzephalon) und Substantia nigra | 49 |
| 3.1.8. | Regionen und Kerngebiete des Hirnstamms | 50 |
| 4. | Diskussion | 52 |
| 4.1. | Stichprobengröße | 52 |
| 4.2. | Methode | 52 |
| 4.3. | Lektin histochemische Untersuchungen | 54 |
| 4.3.1. | RCA-1 | 54 |
| 4.3.2. | Ergebnisse | 55 |
| 5. | Zusammenfassung | 73 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 75 |
| 7. | Anhang | 96 |
| 8. | Danksagung | 103 |
| 9. | Lebenslauf | 104 |

1. Einleitung

Der plötzliche Säuglings- oder Kindstod, in der internationalen Terminologie als SID oder SIDS (Sudden Infant Death Syndrome) bezeichnet, nimmt unter den plötzlichen Todesfällen eine Sonderstellung ein. Die Inzidenz des SIDS reicht weltweit von weniger als 0,1 bis zu 2,5 von tausend lebendgeborenen Säuglingen, und in den großen Industrieländern stellt SIDS mittlerweile die häufigste kindliche Todesursache nach Ende der Perinatalperiode dar (Dwyer und Ponsonby 1995). In Deutschland waren regelmäßig etwa 2 von 1000 Kindern betroffen (Penning 1996), mit in den letzten Jahren stark abnehmender Tendenz (1999 ca. 0,7 von 1000 Kindern) (Abbildung 1.1.).

Bevor die Definitionskriterien für SIDS vom Nationalen Institut für Kindergesundheit und menschliche Entwicklung (NICHD) in den USA 1991 überarbeitet wurden, wurde das Phänomen in früheren Studien uneinheitlich benannt (Valdes-Dapena 1967). Ein Konsens bei der ersten Konferenz über den plötzlichen Tod bei Kindern 1963 beschloss nicht nur, dass die früheren Bezeichnungen nicht akzeptabel seien, sondern auch, dass der Begriff „sudden death syndrome“ (plötzlicher Tod) eingeführt werden sollte (Wedgewood und Benditt 1965).

Während der zweiten internationalen Konferenz über den plötzlichen Tod bei Kindern 1969 wurden Richtlinien vorgeschlagen, wie der plötzliche, unerwartete und ungeklärte Tod eines Kindes als „Plötzlicher Kindstod“ („Sudden Infant Death Syndrome“, SIDS) definiert werden könnte (Bergmann et al. 1970). Bevor von SIDS gesprochen werden darf, muss dementsprechend eine vollständige Autopsie durchgeführt werden, inklusive einer makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung des ZNS, Blutkulturen auf

pathogene Keime und einer toxikologischen Untersuchung (Bergmann et al. 1970; Jones und Weston 1976).

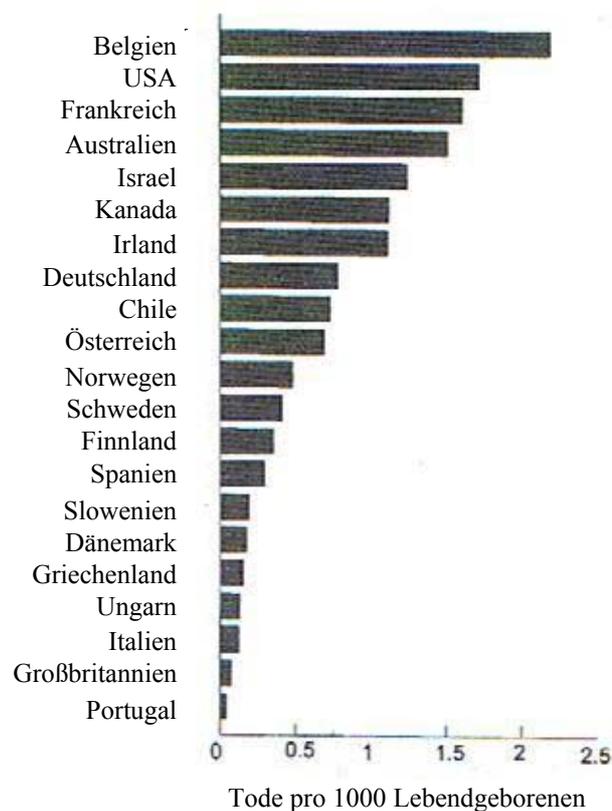


Abbildung 1.1. Häufigkeiten von SIDS in einigen Ländern von 1992-1996 (Quelle: 1996 World Health Statistics Annual, Genf 1998, nach Vege und Rognum 1999)

Seit den frühen neunziger Jahren wird SIDS definiert als der „Plötzliche Tod eines Kindes, das jünger als ein Lebensjahr ist, der auch nach einer genauen Untersuchung des Falles, inklusive vollständiger Autopsie, Untersuchung der Todesumstände und Berücksichtigung der klinischen Anamnese ungeklärt bleibt“ (Willinger et al. 1991). Dies bedeutet, dass die Diagnose SIDS tatsächlich erst nach Ausschluss aller möglichen tödlichen pathologischen Befunde gestellt werden darf, was auch Laboranalysen (Sadler 1998) und die

Untersuchung der Todesumstände (Bass et al. 1986) mit einschließt. Somit bleibt SIDS bis zum heutigen Tag eine Ausschlussdiagnose.

SIDS ereignet sich vorwiegend innerhalb des ersten Lebensjahres, wobei der Altersgipfel im 2. bis 4. Lebensmonat liegt und Jungen etwas häufiger betroffen sind.

Die Kinder werden meist nach dem Schlafen legen und häufig in Bauchlage tot aufgefunden. Teilweise sind sie - offenbar agonal - mit dem Kopf unter eine Decke gekrochen, ohne dass ein Erstickungstod in Frage käme. Vereinzelt findet sich ein agonales Erbrechen oder etwas abgeronnenes, wässriges Sekret um Mund und Nase. Nicht ganz selten sind die Kinder völlig durchgeschwitzt - Temperaturen bis 40°C wurden unmittelbar postmortal beobachtet. SIDS-Fälle treten aber auch in Krankenhäusern bei laufendem Alarmmonitor auf, selbst unmittelbar einsetzende Reanimationsmaßnahmen sind nicht immer erfolgreich. Demgegenüber finden sich auch spontan überlebte Beinahe-Todesfälle („Near-miss-SIDS“) (Penning 1996).

Auch die Jahreszeit scheint eine Rolle zu spielen, da die überwiegende Zahl der SIDS-Fälle in den Herbst- und Wintermonaten diagnostiziert wird, sowohl in der nördlichen als auch in der südlichen Hemisphäre (Douglas et al. 1996), wobei keine enge Beziehung zwischen SIDS und dem Auftreten einer Bronchiolitis gezeigt werden konnte (Gupta et al. 1996).

Darüber hinaus sind bestimmte Risikofaktoren beschrieben worden, die ein Auftreten von SIDS wahrscheinlicher machen. Dazu gehören mütterliche Faktoren wie Zigarettenrauchen während und nach der Schwangerschaft (Schoendorf und Kiely 1992), Anämie und Abruptio placentae (Klonoff-Cohen et al. 2002), niederer sozioökonomischer Status, Alter unter 20 Jahren und mehrere Schwangerschaften (Leach et al. 1999), kurze Abstände

zwischen den Schwangerschaften (Lewak et al. 1979), sowie Harnwegsinfekte (Stewart et al. 1995).

Zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen scheint es gleichfalls Unterschiede zu geben: So sind die Inzidenzen von SIDS am niedrigsten in asiatischen und lateinamerikanischen, mittelhoch in weißen und am höchsten in schwarzen und nativen amerikanischen Populationen (Mathews et al. 2002), wobei es keine Hinweise gibt, dass genetische Faktoren eine Rolle spielen.

Die relativen Risikofaktoren beim Neugeborenen sind männliches Geschlecht und niedriges Geburtsgewicht (<2500g) (Leach et al. 1999), meist verbunden mit vorterminaler Geburt, sowie eine langsame Gewichtszunahme (Blair et al. 2000). Als vermeidbare Risikofaktoren gelten das Schlafen des Kindes im elterlichen Bett (American Academy of Paediatric Task Force 1992), im zu warmen Zimmer sowie mit zu warmer Bedeckung (Fleming et al. 1990).

Eine gesicherte Ätiologie für SIDS ist noch nicht gefunden worden. Die gängige Theorie besagt, dass ein scheinbar ruhig schlafendes Kind eine Kaskade von pathophysiologischen Ereignissen erlebt, die gekennzeichnet sind durch eine progressive oder rapide Entwicklung von Hypoxie, Hyperkapnie und Azidose, von denen alle als Trigger für zentrale Apnoe und respiratorischen Arrest wirken, was schließlich zu tödlichen kardialen Arrhythmien führt (Sparks und Hunsaker 2002).

In den letzten Jahren ist die Mortalität von SIDS zunehmend mit der Schlafposition der Kinder in Zusammenhang gebracht worden. Im Zeitraum der Jahre 1980 bis 1992 wurde in mehreren Ländern, die einen rapiden Wechsel der Schlafposition bei Säuglingen von der Bauch- zur Rückenlage verzeichneten, eine Abnahme der SIDS-Todesfälle um etwa 50%

festgestellt (Willinger et al. 1994). Weitere Studien bestätigten, dass der Rückgang des Schlafens in Bauchlage, die somit einen vermeidbaren Risikofaktor darstellt, gänzlich für die Verringerung der SIDS-Mortalität verantwortlich sei (Centers for Disease Control 1999).

Obwohl ungefähr zeitgleich die verbesserten diagnostischen Standards und Kriterien zur Diagnosestellung von SIDS vom NICHD in den USA herausgegeben wurden, und somit der Rückgang der SIDS-Mortalität auch im veränderten diagnostischen Vorgehen begründet sein könnte (Sawaguchi et al. 1998), empfahlen klinische Forscher das Schlafen in Rückenlage als einen Weg, SIDS zu verhindern, was aufgrund von diesbezüglich durchgeführten Werbekampagnen auch eine zunehmende Akzeptanz erfuhr (American Academy of Pediatric Task Force 1992; Willinger et al. 1998; Gibson et al. 1995).

Einen Erklärungsansatz für den offensichtlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von SIDS und der Schlafposition bot eine Studie, in der nach pharyngealer Flüssigkeitsapplikation im Schlaf eine signifikante Verminderung des Schluckreflexes und vermindertes Einsetzen der Atmung in der Bauchlage im Vergleich zur Rückenlage beobachtet wurde. Dieser Befund lässt reduzierte Schutzreflexe der Atemwege beim Schlafen in der Bauchlage vermuten und könnte somit ein höheres Risiko für SIDS erklären (Jeffrey et al. 1999).

Außerdem wurden eine Verlängerung der Tiefschlafphasen und eine verminderte Aufwachreaktion auf verschiedene Stimuli während des Schlafens in Bauchlage registriert, die wiederum mit einer Veränderung autonomer kardiovaskulärer Funktionen einhergehen, und damit einen Beitrag zur pathophysiologischen Endstrecke von SIDS leisten könnten (Horne et al. 2002).

Die bereits erwähnten erhöhten Temperaturen, die bei einer Anzahl von SIDS-Opfern gefunden wurden, oft verbunden mit starkem Schwitzen, haben die Aufmerksamkeit auf die Hyperthermie als mögliche Ursache von SIDS gelenkt.

In diesem Zusammenhang wurden sowohl eine Überwärmung durch unangemessen wärmende Bekleidung in Verbindung mit hohen Umgebungstemperaturen als auch endogene Wärmeproduktion in Betracht gezogen. Ebenso wurde erwogen, dass unreife zentrale Thermoregulationszentren zur Hyperthermie führen könnten (Byard 1991). Dabei wurde die Überhitzung durch externe Wärmezufuhr als unabhängiger Risikofaktor für SIDS identifiziert und akzeptiert (Fleming et al. 1990; Kleemann et al. 1996). In Verbindung mit dem Schlafen in Bauchlage könnte eine behinderte Wärmeabgabe über das Gesicht Ursache einer gestörten Thermoregulation sein (Nelson et al. 1989). Verschiedene pathophysiologische Erklärungsmodelle, wie eine Störung der respiratorischen Chemorezeptoren (Gozal et al. 1988) oder eine Instabilität des Surfactants bei höheren Temperaturen (Talbert 1990) wurden diskutiert, ohne letztlich ganz zu überzeugen.

Andererseits könnte die erhöhte Temperatur auch als Reaktion des Körpers auf eine Infektion interpretiert werden.

In diesem Zusammenhang fällt die Gemeinsamkeit anerkannter Risikofaktoren für SIDS auf der einen und Infektionen der oberen Atemwege auf der anderen Seite auf:

Exposition gegenüber Zigarettenrauch; Schlafen in Bauchlage; das nächtliche Auftreten der Todesfälle; die Altersverteilung mit der höchsten Prävalenz im Alter von 2-4 Monaten sowie der protektive Effekt der Muttermilch (Blackwell und Weir 1999).

Morris (1999) ermittelte in seiner „common bacterial hypothesis“ mittels eines mathematischen Modells eine Altersverteilung von SIDS, die der tatsächlichen Verteilung entspricht. Das Modell berücksichtigt die abnehmenden mütterlichen IgG-Antikörper auf

der einen sowie zunehmende Immunkompetenz des kindlichen Organismus auf der anderen Seite. Außerdem forderte er, dass das auslösende Agens so weit verbreitet sein müsse, dass 50% der Bevölkerung innerhalb 50 Tagen damit in Berührung kommen müssten. Das wiederum trifft nur für Bakterien zu, so dass, wenn eine infektiöse Ursache die Altersverteilung erklären kann, nur Bakterien, nicht aber Viren dafür in Frage kämen (Morris 1999).

Man hat jedoch in der Mehrzahl der Fälle keine invasive bakterielle Infektion bei SIDS gefunden, wobei die Diagnose SIDS dann auch nicht mehr zutreffen würde (Blackwell und Weir 1999).

Für Aufsehen sorgte der mögliche Zusammenhang zwischen SIDS und einem generalisierten Befall mit *Helicobacter pylori*, der in einer Studie postuliert wurde (Kerr et al. 2000). Die Studie wurde jedoch wegen handwerklicher Mängel stark kritisiert (Rowland und Drumm 2001) und eine neuere Arbeit verneinte einen Einfluss von *Helicobacter pylori* als ätiologischen Faktor von SIDS (Ho et al. 2001).

Die Problematik der SIDS-Forschung zeigt auch die anfangs hoch eingeschätzte Veröffentlichung von Steinschneider (1972), in der er den Tod zweier Geschwister an SIDS beschreibt und damit seine vielbeachtete These eines vererbten Gendefekts begründet, welcher zu fatalen Apnoe-Episoden führt (Steinschneider 1972). Dieser Fall wurde allerdings zur Kriminalgeschichte, als die Mutter der beiden 1994 wegen Mordes an ihren Kindern verurteilt wird, und somit Steinschneiders Artikel und die von ihm erhobenen Daten nicht länger akzeptiert wurden (Pinholster 1994; Firstman und Talan 1997).

Dies führte dazu, dass Rechtsmediziner in den USA überwiegend nach einer forensischen Faustregel vorgehen, die besagt, dass der erste Kindstod in einer Familie nach NICHD-

Kriterien als SIDS klassifiziert werden darf, ein zweiter in derselben Familie als unbestimmt und ein dritter als Tötungsdelikt aufgefasst werden soll (Pinholster 1994).

Trotzdem wurde die Theorie von möglicherweise tödlichen Apnoe-Phasen bzw. der Entwicklung einer Hypoxie bei SIDS weiterverfolgt. Der Zusammenhang zwischen Apnoe aufgrund von Unreife, pathologischen Apnoe-Episoden in der Kindheit (wobei v.a. diejenigen, die länger als 20 Sek. Andauern, mit einem offensichtlich lebensbedrohlichen Ereignis, „apparent life-threatening event“, „ALTE“, assoziiert sind) und dem Risiko von darauf folgendem SIDS war ungeklärt bis zur Veröffentlichung einer Konsensus-Studie, die die Schlussfolgerung zog, dass (1) Apnoe aufgrund von Unreife weder für Apnoe in der Kindheit noch für SIDS ein unabhängiger Risikofaktor ist, (2) ALTE in der Tat ein Risikofaktor für einen plötzlichen Tod ist, was SIDS mit einschließt und (3) nur ein kleiner Prozentsatz der Kinder, die an SIDS sterben, in der Anamnese entweder Apnoe aufgrund von Unreife (2-4%) oder ein ALTE (<7%) gehabt haben (National Institutes of Health Consensus Development conference on infantile apnea and home monitoring, 1987).

Mit der Apnoe-Hypothese beschäftigte sich vor allem auch Naeye (1974 und 1980), der über eine Reihe von morphologischen Veränderungen berichtete, die er bei SIDS-Opfern fand und die er den Auswirkungen einer chronischen Hypoxie zuschrieb.

Dazu gehörten Hypertrophie und Hyperplasie der Media kleiner Pulmonalarterien, Hypertrophie des rechten Herzventrikels, Hyperplasie des roten Knochenmarks, prolongierte Retention von periadrenalem braunem Fettgewebe, verändertes Volumen des Glomusgewebes an der A. carotis, Hyperplasie des chromaffinen Gewebes im Nebennierenmark, Gliose des Hirnstamms und vermehrte Erythropoese in der Leber (Naeye 1974 und 1980).

In Folgeuntersuchungen konnten allerdings bei weitem nicht alle von Naeye beschriebenen Hypoxiezeichen bestätigt werden (Byard 1991), während die Gliose des Hirnstamms von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen wurde (Takashima et al. 1978; Kinney et al. 1983).

Dies zog eine Suche nach weiteren Hypoxie-Markern nach sich und der erste biochemische Parameter für eine SIDS vorausgehende Hypoxie war der Nachweis von erhöhtem Hypoxanthin im Glaskörper bei ca. 80% der SIDS-Fälle (Rognum et al. 1988). Dabei handelt es sich um einen Metaboliten des Purin-Nukleosids Adenosin, welches unter hypoxämischen Bedingungen vermehrt katabolisiert wird und sich in Körperflüssigkeiten anreichert, da energiereiche Verbindungen wie ATP im Übermaß metabolisiert werden (Bell et al. 2001; Saugstad 1975). Es wurde bezüglich Hypoxanthin ein signifikanter Unterschied zwischen SIDS und Todesfällen durch Gewalteinwirkung oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen gefunden wurde, nicht jedoch zwischen SIDS und Todesfällen aufgrund von Infektionskrankheiten, sodass ein gemeinsamer Mechanismus beider Todesarten vermutet wurde (Opdal et al. 1998; Vege et al. 1994).

Ein weiterer Hinweis, dass SIDS eine länger andauernde Hypoxie vorangeht, wurde kürzlich im vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gefunden. VEGF wird als wichtiger Parameter für die Gefäßneubildung durch Hypoxie herauf- und durch Hyperoxie herunterreguliert (Pierce et al. 1996; Maniscalco et al. 1997; Marti und Risau 1998); deshalb kann ein hoher Spiegel vorangegangene Hypoxie anzeigen. VEGF wurde in der Liquorflüssigkeit, im Glaskörper und im Serum von SIDS-Opfern sowie bei einer Kontrollgruppe von Fällen mit bekannter Todesursache gemessen. Dabei wurden signifikant höhere Werte von VEGF im Liquor von SIDS-Fällen gegenüber Kontrollen gefunden, was darauf schließen lässt, dass Phasen von Hypoxie SIDS vorangehen und dass es möglicherweise doch nicht ein so plötzliches Ereignis ist, wie früher angenommen

wurde, da die Gentranskription- und expression des VEGF-Proteins nach ihrer Induktion mehrere Stunden benötigt (Jones et al. 2003).

1.1. SIDS und Zentrales Nervensystem

Ein Großteil der am zentralen Nervensystem (ZNS) durchgeführten Untersuchungen beschäftigt sich mit anatomischen und biochemischen Veränderungen, die möglicherweise mit SIDS in Zusammenhang stehen.

Die Beurteilung der Hirngewichte von SIDS-Opfern erbrachte widersprüchliche Ergebnisse. Während anfangs erhöhte Gewichte bezogen auf das erwartete Hirngewicht festgestellt wurden, deren Aussagekraft von den Autoren selbst allerdings kritisch beurteilt wurden (Shaw et al. 1989), wies eine andere Studie auch im direkten Vergleich der Hirngewichte von SIDS-Opfern und Kontrollpopulationen signifikant schwerere Gehirne bei SIDS-Kindern nach (Kinney et al. 1991). Neuere Studien hingegen zeigten mit direkten Meßmethoden keinen Unterschied im Hirngewicht zwischen SIDS- und Nicht-SIDS-Kindern (Falck und Rajs 1995). Dementsprechend gehen die meisten Untersucher nicht mehr davon aus, dass ein erhöhtes Hirngewicht bei SIDS vorliegt (Sparks und Hunsaker 2002).

Unter anderem ausgehend von Erkenntnissen über autonome Veränderungen bei späteren SIDS-Opfern wurden die Physiologie und Pathologie des Schlafes untersucht, des Zustands, in dem die betroffenen Kinder zumeist versterben.

Gefunden wurden dabei in polysomnographischen Studien u.a. längere zentrale und obstruktive Apnoephasen bei späteren SIDS-Opfern (Kahn et al. 1988 und 1992), ein erschwertes Erwachen aus dem Schlaf, v.a. in den frühen Morgenstunden (Schechtmann et al. 1995) sowie allgemein eine veränderte Schlafperiodizität mit einer Verschiebung der verschiedenen Schlafstadien (Harper et al. 1981; Schechtmann et al. 1992a).

Außerdem fanden sich bei SIDS-Opfern prolongierte Asystolien aufgrund vagaler Hyperreaktivität verglichen mit Kontrollen (Kahn et al. 1983), höhere Herzfrequenzen mit reduzierter Variabilität (Schechtman et al. 1992b) sowie eine Imbalance des autonomen Nervensystems (Franco et al. 1998).

All dies hat dazu geführt, nach neuropathologischen Veränderungen im Hirnstamm und dort speziell in der Medulla oblongata zu suchen. Diese beherbergt Kerngebiete, die den kardialen Tonus [Retikuläres aufsteigendes aktivierendes System (RAAS), vagale Kerngebiete und Ncl. tractus solitarii (NTS)], die Atmung während des Schlafes (dorsale und ventrale respiratorische Kerne, NTS), das Erwachen aus dem Schlaf (RAAS, NTS) und Muskeln, die die Atemwege offen halten (Ncl. hypoglossi, NTS), kontrollieren. Die Medulla enthält auch eine Neuronengruppe (Ncl. arcuatus), von der angenommen wird, dass sie den paCO_2 erfassen und damit ein Erwachen verursachen oder die Atmung als Antwort auf Hyperkapnie beeinflussen kann (Franco et al. 1998).

EEG-Untersuchungen zeigten bei der Mehrzahl der Beinahe-SIDS-Fälle sowie bei Geschwistern von SIDS-Opfern keine pathologischen Muster (Clancy und Spitzer 1985). Auditorisch evozierte Potentiale (AEP) des Hirnstamms (ein Index für die neuronale Verschaltung im Hirnstamm) ergaben zum einen veränderte AEPs bei allen Beinahe-SIDS-Fällen (Nodar et al. 1980) und verlängerte Interpeak-Intervalle (Pettigrew und Rahily

1985), während eine andere Studie abnorme Interpeak-Intervalle nur bei weniger als einem Fünftel aller Beinahe-SIDS-Fälle und Geschwister von SIDS fand (Orlowski et al. 1982).

In Zusammenhang mit der Regulation von Schlaf- und Wachzustand rückte auch die Epiphyse in den Blickpunkt der SIDS-Forschung.

In den frühen achtziger Jahren wurde erstmals erkannt, dass die Epiphyse wahrscheinlich über ihr Neurohormon Melatonin in die zirkadiane REM-Schlaf - Organisation durch serotonerge Mechanismen involviert ist (Mouret 1982). Neuere Studien zeigten außerdem, dass Melatonin tatsächlich die Aktivität serotonerger Neurone des Hirnstamms reguliert, die während des REM-Schlafes normalerweise reduziert ist (Sandyk 1995). Durchgeführte Bestimmungen der Melatoninkonzentration in Blut und Liquor ergaben signifikant erniedrigte Konzentrationen im Liquor von SIDS-Opfern im Vergleich zu Kontrollen, die Blutwerte zeigten einen ähnlichen Trend, was ebenfalls auf eine Störung der Reifung der zirkadianen Rhythmik hinweisen könnte (Sturner et al. 1990), wobei auch eine signifikante Verminderung der Größe der Epiphyse unter SIDS-Kindern gefunden wurde (Sparks et al. 1988).

Die Untersuchung spezifischer Melatonin-Bindungsstellen im zerebellären Kortex zeigte hingegen keinen Unterschied zwischen SIDS-Opfern und Kontrollen (Yuan et al. 1995). Eine andere Studie fand in der Risikogruppe der Kinder mit ALTE einen signifikant erhöhten REM-Schlaf ausschließlich in den frühen Morgenstunden im Vergleich zu den Kindern der Kontrollgruppe (Cornwell et al. 1998).

Bezüglich der Pathologie des Hirnstamms führte Naeye (1976) als Erster quantitative Analysen der astroglialen Fasern v.a. in der *Formatio reticularis* durch. Bei 14 von 28 SIDS-Opfern fand er abnorm erhöhte astrogliale Fasern (Astrogliose bzw. reaktive Gliose),

nicht nur in der *Formatio reticularis*, sondern über den gesamten Hirnstamm verteilt. Die Hirnstammgliose wurde vom Autor nicht als Ursache des Todes, sondern als Folge einer länger bestehenden, chronischen Hypoxämie gesehen (Naeye 1976).

Kinney et al. (1983) untersuchten das Ausmaß reaktiver Gliose in diversen Kerngebieten der *Medulla oblongata* bei SIDS und dessen mögliche Korrelation mit verschiedenen klinischen, pathologischen und sozioökonomischen Variablen. Dabei fanden sich in der SIDS-Gruppe signifikant mehr reaktive Astrozyten in der lateralen Region, dem NTS und dem Hilus der unteren Olive sowie in allen Regionen zusammen. Die größten statistischen Unterschiede zwischen SIDS und Kontrollen bestanden in der unteren Olive, der einzigen nicht mit der Atmung assoziierten Region. Intrathorakale Petechien wurden bei 56% der SIDS-Opfer und 5% der Kontrollkinder, ein Lungenödem bei 56% der SIDS- und 20% der Kontrollfälle gefunden, wobei keine signifikante positive Korrelation zwischen der Anzahl reaktiver Astrozyten und klinisch-pathologischen Variablen festgestellt wurde. Die Autoren erwogen ebenfalls ein sekundäres Phänomen bei chronischer Hypoxämie, obwohl die Inzidenz eines hypoxisch-ischämischen Schadens in der zerebralen grauen Substanz in der Studie niedrig war und eine periventrikuläre Leukomalazie bei SIDS-Opfern nicht erhöht erschien. Ein fehlender Zusammenhang zwischen SIDS und reaktiven Astrozyten wurde nicht ausgeschlossen (Kinney et al. 1983).

Auch über Unterschiede in Ausmaß und Reife der Myelinisierung in den Gehirnen von SIDS-Kindern wurde berichtet. So fand sich bei fast einem Drittel der SIDS-Kinder eine Hypomyelinisierung im lateralen retikulären Kern der *Medulla*, einem Zentrum der respiratorischen Kontrolle (Naeye et al. 1989). Als Ausdruck einer verzögerten ZNS-Reifung interpretierten andere Autoren die vor allem in somato- und viszeromotorischen

Systemen gefundene signifikante Hypomyelinisierung bei SIDS-Opfern (Kinney et al. 1991).

Unregelmäßigkeiten fanden sich auch bei der Untersuchung der dendritischen Fortsätze im Hirnstamm und anderen Regionen. Es wurde von einem hoch signifikanten Anstieg der Zahl dendritischer Fortsätze im Hirnstamm bei SIDS-Kindern im Vergleich mit Kontrollen berichtet (Quattrochi et al. 1985). Die zusätzlich durchgeführte regionale Analyse ergab bei den SIDS-Kindern signifikante Unterschiede in der Dichte der Fortsätze in unterschiedlichen Regionen des Hirnstamms, was bei den Kontrollen nicht zu beobachten war. Die Autoren vermuteten, dass dieses unreife Muster die normale Kontrolle der Respiration und des Erwachens beeinflussen könnte (Quattrochi et al. 1985).

Takashima et al. (1985) wiesen einen präpartalen Anstieg der dendritischen Fortsätze in der *Formatio reticularis* bei Nicht-SIDS-Kindern nach, gefolgt von einem schnellen postpartalen Abfall. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl termingerecht als auch frühgeborene SIDS-Opfer postpartal eine Persistenz der Fortsätze, was ebenfalls als mögliche inkomplette Reifung von respiratorischen Kontrollzentren interpretiert wurde (Takashima et al. 1985).

1994 konnte sowohl bestätigt werden, dass eine reduzierte Anzahl von neuronalen dendritischen Fortsätzen eine normale Entwicklung in der ventrolateralen Medulla, der *Formatio reticularis* und den vagalen Kernen unter Nicht-SIDS-Kindern kennzeichnet, als auch, dass diese bei SIDS-Kindern persistieren (Takashima et al. 1994).

In neueren Arbeiten wurden zunehmend auch die Botenstoffe und Enzyme in Gehirn und Liquorflüssigkeit auf mögliche Alterationen im Zusammenhang mit SIDS untersucht.

Zur Zeit der ersten neurochemischen Studien über SIDS war schon aus Tierversuchen bekannt, dass Serotonin (5-HT) und Acetylcholin (ACh) im Hirnstamm die Atmung fördern (Millhorn et al. 1980; Dev und Loescheke 1979), im Gegensatz zu Adrenalin (Adr) und Noradrenalin (NA), die die Atmung unterdrücken (Champagnat et al. 1979).

In ähnlicher Weise interagieren 5-HT/ACh und Adr/NA in Hirnstamm bzw. Medulla gegensätzlich in Bezug auf die Regulation von Blutdruck und kardialer Kontrolle (Dev und Loescheke 1979).

Es wurden zahlreiche Neurotransmitter-Veränderungen beschrieben, wie erhöhte Spiegel der Apnoe-induzierenden Peptide β -Endorphin und Neotensin im Liquor von SIDS-Opfern (Coquerel et al. 1992). Untersuchungen des pH-Werts und Laktats im Gehirn ergaben bei der Mehrzahl der SIDS-Fälle niedrige Laktat- und hohe pH-Werte, was darauf hindeutet, dass diese Kinder plötzlich, ohne signifikante prämortale Hypoxie, gestorben sind (Butterworth und Tennant 1989).

Im Hirnstamm wurde eine Verminderung der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT - das synthetisierende Enzym und limitierender Schritt bei der Synthese von Adrenalin aus Noradrenalin) in mehreren Regionen der SIDS-Medulla gefunden, wohingegen eine Verminderung der Dopamin- β -Hydroxylase (DBH - das Enzym, das Dopamin in Noradrenalin überführt) nur in einer der medullären Regionen vorlag, in der gleichzeitig PNMT reduziert war. Die Autoren postulierten eine mögliche adrenerge Dysfunktion in medullären respiratorischen und kardialen Kontrollzentren (Denoroy et al. 1980).

Eine weitere Untersuchung der DBH-Aktivität sowie der katecholamin-metabolisierenden Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH - das Enzym, das L-Dopa aus Tyrosin produziert und limitierender Faktor der Dopaminsynthese), Dopadecarboxylase (das Enzym, das L-Dopa in Dopamin überführt) und Catechol-o-Methyltransferase (COMT - ein Katecholamin-

kataboles Enzym) im Hirnstamm offenbarte keine Aktivitätsunterschiede dieser Enzyme zwischen SIDS- und Nicht-SIDS Kindern. Lediglich die DBH-Aktivität zeigte sich in drei Regionen (Hypothalamus, Putamen, Nucleus caudatus) erniedrigt, nicht jedoch im gesamten Hirnstamm (Ozand und Tildon 1983).

Die TH-Aktivität erwies sich in einer anderen Studie bei SIDS signifikant vermindert in den vagalen Kernen sowie der ventrolateralen Formatio reticularis, eng korreliert mit einer Hirnstammgliose. Die Autoren schlossen auf Veränderungen adrenerger Neurone, möglicherweise aufgrund bestehender Ischämie bzw. Hypoxie, mit möglichen Folgen für kardiorespiratorische Kontrollzentren (Obonai et al. 1998).

Widersprüchliche Ergebnisse ergaben die Analysen cholinergischer Rezeptorreaktivität. Eine signifikante Abnahme der Dichte von muskarinischen Bindungsstellen für Acetylcholin im Ncl. arcuatus bei SIDS wurde als Beitrag zum kardiorespiratorischen Versagen im Schlaf verstanden (Kinney et al. 1995; Kubo et al. 1998), dagegen wurden bei derselben Population von Kindern (Kinney et al. 1995) keine Unterschiede im Niveau der Nikotinbindung an nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren (Nachmanoff et al. 1998) bzw. der Naloxonbindung an Opioidrezeptoren (Kinney et al. 1998) im Hirnstamm im Vergleich zu Kontrollen gefunden.

Keine Unterschiede in der Rezeptorimmunreaktivität muskarinischer cholinergischer Neurone fand dagegen eine andere Studie, dafür aber verminderte Aktivität der Cholin-Acetyltransferase (ChAT) in den vagalen und hypoglossalen Kernen bei SIDS-Kindern. (Mallard et al. 1999), ebenfalls ein Hinweis für einen Defekt des cholinergen Hirnstammsystems mit möglicherweise fatalen Folgen.

Eine Analyse der Serotoninbindung bei SIDS-Opfern zeigte eine signifikante Verminderung der Bindung im Ncl. arcuatus, dem Raphekern und 4 weiteren Regionen des serotonergen- bzw. Raphesystems und ließ vermuten, dass nicht nur einzelne Kerne

sondern ein größeres Netzwerk serotonerger Neurone im Hirnstamm an der Pathogenese von SIDS beteiligt sein könnte (Panigrahy et al. 2000).

1.2. Mikroglia

1.2.1. Geschichte, Ontogenese und Reifung

Das ZNS setzt sich aus Nervenzellen (Neuronen) und einem eigenen, speziellen „Bindegewebe“, den Gliazellen (benannt nach griechisch glia = Leim), zusammen. Diese Gliazellen machen vom Volumen her nahezu die Hälfte des gesamten ZNS aus und stellen etwa 90% seiner Zellen (Trepel 1999).

Den Begriff der Neuroglia hat 1846 der deutsche Pathologe Rudolf Virchow eingeführt; er hielt sie für eine Art einheitliches Bindegewebe, einen uninteressanten Kitt zwischen den Neuronen in Gehirn und Rückenmark. Rund 75 Jahre später waren darin drei verschiedene Zelltypen identifiziert: Astrozyten und Oligodendrozyten (zusammen als Makroglia bezeichnet) sowie Mikrogliazellen.

Als Erster beschrieb Nissl 1891 die Mikroglia als „Stäbchenzellen“, ehe del Rio-Hortega 1919 eine auf Silbercarbonat basierende Färbemethode entwickelte, mit der sich die Mikroglia von den übrigen Zellen im Gehirn unterscheiden ließen. Hortega war es auch, der bereits 1932 die Fähigkeit der Mikrogliazellen zur Phagozytose erkannte und ihnen die Rolle von Makrophagen im ZNS zuschrieb (Streit und Kincaid-Colton 1996). Der Anteil der Mikroglia an allen Zellen der Glia beträgt ca. 10% (Vaughan und Peters 1974).

Der Ursprung der Mikrogliazellen war lange Zeit Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Es existieren zwei unterschiedliche Ansichten darüber, zum einen, dass Mikrogliazellen mesodermalen Ursprungs sind, und zum anderen, dass sie sich aus neuroepithelialen Zellen herleiten, wie auch die Neuronen und die Zellen der Makroglia (Cuadros und Navascues 1998). Hortega schlug bereits damals vor, dass sie aus Polyblasten oder embryonalen Zellen der Leptomeningen entstehen und von dort ins Hirngewebe einwandern und somit mesenchymalen Ursprungs sind, wobei sie seiner Meinung nach von Blutzellen abstammen, was er von ihrer Fähigkeit zur Phagozytose ableitete (del Rio-Hortega 1932).

Mikrogliazellen und die Monozyten des Bluts haben einige Gemeinsamkeiten, die neben den phagozytotischen Fähigkeiten ihre Verwandtschaft wahrscheinlich erscheinen lassen. Dazu gehört die Anwesenheit bestimmter Enzyme wie der Nukleosid-Diphosphatase, Nicht-spezifischer Esterasen und der sauren Phosphatase (Ling et al. 1982; Fujimoto et al. 1987), die Markierung durch mehrere Lektine (Streit und Kreutzberg 1987; Hutchins et al. 1990; Acarin et al. 1994) sowie die Erkennung sowohl von Mikroglia als auch Monozyten durch bestimmte Antikörper (Flaris et al. 1993; Penfold et al. 1991; Paulus et al. 1992).

Dieser Theorie widersprechende Studien führten u.a. Eigenschaften an, die die Mikroglia von anderen Zellen des mononukleären phagozytischen Systems unterscheiden:

Sie zeigen spezielle morphologische Eigenschaften *in vitro* (Giulian et al. 1995), sie proliferieren spontan in Kulturen (Giulian et al. 1995) und haben ein eigenes Muster von Ionenkanälen, das sich von dem von Monozyten und Makrophagen nicht-nervaler Gewebe unterscheidet (Kettenmann et al. 1990).

Die Möglichkeit eines neuroektodermalen Ursprungs der Mikroglia wurde u.a. durch die Beobachtung begründet, dass monoklonale Antikörper gegen das Protein Lipokortin-1

sowohl eine Fraktion neuroepithelialer Zellen als auch Mikrogliazellen im Rattenhirn während der Entwicklung markieren (McKanna 1993; Fedoroff 1995).

Allerdings sind derzeit mehr Marker bekannt, die Mikrogliazellen mit der Makrophagen/Monozyten-Linie verbinden als mit jedem anderen Zelltyp (Cuadros und Navascues 1998). Die meisten Autoren gehen daher heute von einem mesodermalen Ursprung der Mikroglia aus und einige betrachten diese Frage aufgrund deutlicher Ähnlichkeiten im molekularen Aufbau der Zelloberfläche sowie der erwähnten immunologischen Gemeinsamkeiten als beantwortet (Streit 2001).

Der Schluss allerdings, dass sich die Mikrogliazellen direkt von den Monozyten ableiten, die das ZNS über den Blutweg erreichen (Ling 1981), wird zunehmend in Frage gestellt. Denn Makrophagen bzw. Mikrogliazellen erscheinen im ZNS von Tieren bereits bevor es vaskularisiert ist (Sorokin et al. 1992; Cuadros et al. 1993; Wang et al. 1996) und auch bevor Monozyten in hämatopoetischen Geweben überhaupt produziert werden:

Es zeigte sich, dass Mikrogliazellen bereits am achten embryonalen Tag (E8) im ZNS von Nagetieren nachweisbar sind (Hurley und Streit 1996; Alliot et al. 1999) - vermutlich von Vorläuferzellen aus dem Dottersack abstammend (Alliot et al. 1999) - während Monozyten erst am zehnten embryonalen Tag (E10) nachgewiesen werden können (Takahashi et al. 1989). Somit erscheint es ziemlich wahrscheinlich, dass eine gemeinsame Vorläuferzelle, der so genannte fetale Makrophage, sowohl Ursprung der primitiven Mikroglia und Monozyten, als auch von anderen Gewebsmakrophagen ist (Streit 2001).

Dabei proliferieren fetale Makrophagen in den Organen, die sie besiedeln (Takahashi et al. 1989; Sorokin et al. 1992) und durchlaufen im ZNS eine kontinuierliche Differenzierung zu erwachsenen Mikrogliazellen.

Es gibt vermutlich drei Wege, durch die diese Vorläuferzellen der Mikroglia in das Nervengewebe eintreten:

- (1) Aus dem Blutstrom über die Zwischenform der Perizyten, indem sie das Gefäßendothel überwinden,
- (2) aus den Ventrikeln durch Passage der Ventrikelschicht und
- (3) von den Meningen nach Durchtritt durch die piaie Oberfläche.

Die Invasion über den Blutstrom wird möglicherweise über das LFA-1/ICAM-1 (lymphocyte function-associated antigen-1/ intercellular adhesion molecule-1)-Adhäsionssystem vermittelt (Dalmau et al. 1997a), wobei die Passage aus dem Blutfluss in das Nervensystem im Gehirn während der Entwicklung leichter ist als im reifen Gehirn, weil sich die Blut-Hirn-Schranke relativ spät ausbildet. Deshalb dürfte eine große Anzahl von mikroglialen Vorläuferzellen diesen Weg benutzen, um in das Gehirn einzudringen (Cuadros und Navascues 1998).

Allerdings erscheinen Mikrogliazellen auch in Regionen des ZNS ohne (Hurley und Streit 1996) und wie oben erwähnt bereits vor erfolgter Vaskularisierung, so dass sie wahrscheinlich auch andere Wege benutzen.

Die Idee, dass mikrogliale Vorläuferzellen das ZNS vom Ventrikel aus erreichen könnten, basiert auf der Anwesenheit von Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie im Ventrikellumen (Jordan und Thomas 1988).

Nach derzeitigem Stand der Forschung besiedeln die aus dem Dottersack stammenden Monozyten zunächst den Plexus choroideus (Epiplexuszellen), bevor sie entlang der Ventrikeloberfläche (supraependymale Zellen) als amöboide Mikrogliazellen in das Hirnparenchym einwandern (Jordan und Thomas 1988; Alliot et al. 1999). Dieser Prozess

der mikroglialen Durchwanderung der Ventrikeloberfläche konnte während der Hirnentwicklung beobachtet werden (Cuadros et al. 1994).

Der Eintritt der mikroglialen Vorläuferzellen aus den Meningen wurde schon von del Rio-Hortega 1932 vorgeschlagen und von späteren Studien unterstützt, die Mikrogliazellen während der Entwicklung auf der pialen Oberfläche zeigten (Boya et al. 1987 und 1991; Cuadros et al. 1994; Dalmau et al. 1997b). So stammen offenbar die meisten Mikrogliazellen im optischen Tektum (Cuadros et al. 1994) und im Kleinhirn (Cuadros et al. 1997) von Vorläufern ab, die das Nervengewebe über die piale Oberfläche erreicht haben.

Zusammengefasst scheint es so zu sein, dass mikrogliale Vorläuferzellen alle drei Wege zum Eintritt in das ZNS benutzen, wobei die ependymale und meningeale Migration der Entwicklung des Blutgefäßsystems vorausgehen (Cuadros und Navascues 1998).

Die weitere Ausbreitung der Mikroglia im ZNS ist durch die Prozesse der Proliferation und Migration charakterisiert: Die Mikrogliazellen zeigen im normalen erwachsenen Gehirn proliferative Aktivität (Lawson et al. 1992), die sich deutlich steigert, wenn sie durch Hirnverletzung aktiviert werden (Streit et al. 1988). Hirnmakrophagen und unreife Mikroglia im sich entwickelnden Gehirn besitzen auch mitotische Aktivität, wie sich aus der Aufnahme markierter Nukleotide oder der Anwesenheit des Proliferationsmarkers PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) schließen lässt (Mander und Morris 1996; Marin-Teva et al. 1999). Da bei in vitro-Studien mehrere mikrogliale Mitogene gefunden wurden und deren Anwesenheit auch in vivo bestand, dürften diese Faktoren in die Kontrolle der Proliferation der Mikroglia involviert sein (Suzumura et al. 1990; Giulian et al. 1991).

Um zu ihrem endgültigen Bestimmungsort zu gelangen, müssen zumindest die Mikrogliazellen, die das ZNS nicht über den Blutweg erreichen (siehe oben), zum Teil weite Strecken zurücklegen. Mehrere Studien konnten nachweisen, dass sich Mikrogliazellen aktiv durch das Nervengewebe bewegen (Lazar und Pal 1996; Humphrey und Moore 1996; Thanos und Richter 1993). Dabei hat sich herausgestellt, dass sich mikrogliale Vorläuferzellen vor allem in Richtung von Regionen des ZNS bewegen, in denen sich ein intensiver Zelltod abspielt (Ashwell 1991; Pearson et al. 1993), sowie dass sich Ansammlungen von Mikrogliazellen bzw. Makrophagen in Regionen des ZNS während der Entwicklung finden, wo programmierter Zelltod (Apoptose) stattfindet (Ashwell 1991; Johnson und Berman 1996) oder flüchtige axonale Projektionen eliminiert werden (Innocenti et al. 1983).

Mehrere Faktoren wurden im verletzten Hirn isoliert, die die Konzentrationserhöhung der Mikroglia in den betroffenen Regionen vermitteln könnten. Ein Anstieg von Migrationsfördernden Chemokinen (wie MCP-1) tritt in Verbindung mit degenerativen Prozessen auf (Glabinski et al. 1996; Mallat et al. 1996); es wurde ferner gezeigt, dass einige dieser Faktoren auch im unreifen Hirn nach Verletzung freigesetzt werden (Ivacko et al. 1997).

Allerdings korreliert die Verteilung von Mikrogliazellen während der Entwicklung oft nicht mit der Intensität des Zelltods (Milligan et al. 1991; Cuadros et al. 1994; Lawson et al. 1990), so dass es neben der Degeneration wohl noch andere Faktoren geben muss, die zur Kontrolle der Migration beitragen, wie z.B. die Produktion von Thrombospondin, das während der Entwicklung die Adhäsion und Migration steigert (Chamak et al. 1995).

1.2.2. Morphologie und Funktion der Mikroglia

Das Konzept der funktionalen Plastizität der Mikrogliazellen wurde 1988 von Streit et al. aufgestellt und später vom gleichen Autor noch modifiziert. Demnach ist der Ausgangspunkt im erwachsenen Gehirn die sogenannte „ruhende“ oder „verzweigte“ Mikroglia-Zelle.

Eine neuronale Verletzung löst deren Aktivierung aus, nächste Stufe ist die „hyperverzweigte“ Mikroglia (= intermediäres Stadium), die dann in die „reaktive“ oder „aktivierte“ Form übergeht.

Schließlich erhalten sie eine annähernd runde, auch „amöboid“ genannte Makrophagen-ähnliche Form (Streit et al. 1999) (Abbildung 1.2.). Eine sukzessive Aktivierung mit deutlich zunehmender Verzweigung der Mikrogliazellen lässt sich im menschlichen Gehirn auch während des normalen Alterungsprozesses beobachten, im mittleren Lebensalter haben viele Mikrogliazellen ausgedehnt verzweigte zelluläre Fortsätze entwickelt (Streit und Sparks 1997).

In der Entwicklung des ZNS dagegen nimmt diese Umwandlung einen umgekehrten Verlauf, d.h. ursprüngliche Mikrogliazellen besitzen eine abgerundete oder amöboide Morphologie, und während das ZNS in der fetalen und frühen postnatalen Periode reift, differenzieren sich diese amöboiden Mikrogliazellen in zunehmend verzweigte Zellen (Ling und Wong 1993; Hurley und Streit 1996) (Abbildung 1.2.).

Das früheste beschriebene Auftreten von Mikrogliazellen im menschlichen ZNS liegt in der 4,5. Gestationswoche; diese Lektin-markierten Zellen hatten die typische amöboide Morphologie und traten unabhängig von einer Vaskularisierung auf (Andjelkovic et al. 1998).

Eine andere Studie wurde ebenfalls mit dem Lektin RCA-1 (siehe unten) an Gehirnen von Feten von der 7. bis zur 40. Gestationswoche und Erwachsenen durchgeführt. Hier zeigten sich überwiegend runde, positive Zellen am Beginn der 8. Gestationswoche, die um die germinale Matrix, in der Wand von Blutgefäßen und in den Leptomeningen lokalisiert waren und in der weiteren Entwicklung zunehmend Fortsätze ausbildeten. Im erwachsenen Gehirn schließlich hatten die meisten positiven Zellen kleine Zellkörper mit zahlreichen verzweigten Prozessen (Wierzba-Bobrowicz et al. 1995).

Zu den gesicherten Funktionen bzw. Aktivitäten der Mikroglia während der Entwicklung gehört ihre Rolle als Phagozyten, v.a. ihre Rolle bei der Beseitigung von apoptotischen Partikeln, die in der normalen Entwicklung des Gehirns im Überfluss vorhanden sind (Ferrer et al. 1990; Egensperger et al. 1996).

Diskutiert wird über eine möglich Rolle der Mikroglia bei der Induktion einer Apoptose. In diesem Zusammenhang wurde über Makrophagen berichtet, die den Zelltod von endothelialen Zellen während der Regression von transienten Blutgefäßen im sich entwickelnden Auge des Nagetiers hervorrufen (Lang et al. 1994) und von amöboiden Mikrogliazellen, die den Tod von einigen Arten von Neuronen in der Entwicklung *in vitro* fördern (They et al. 1991).

Eine andere wahrscheinliche Funktion betrifft die Rolle von amöboider Mikroglia bei Wachstum und Führung von Axonen in der Entwicklung. Ein häufig beschriebenes Phänomen des postnatalen ZNS sind deutlich sichtbare Ansammlungen von amöboider Mikroglia (Ling und Wong 1993). Diese Zellhaufen werden vorwiegend in Regionen von sich entwickelnden Bahnen der weißen Substanz, besonders im Corpus callosum beobachtet (Hurley und Streit 1996; Hurley et al. 1999). Bei einem Tierexperiment hat

man kultivierte amöboide Mikrogliazellen vom neugeborenen Rattenhirn in ein verletztes Rückenmark eines erwachsenen Tieres transplantiert; dabei kam es zu einer verstärkten Regeneration und Elongation der Rückenmarks-Axone in die Mikroglia-Transplantate, was für Vermittlung des axonalen Wachstums durch die Mikroglia spricht (Rabchevsky und Streit 1997). Darüber hinaus sind Foci amöboider Mikroglia in der weißen Substanz bis etwa zum 14. postnatalen Tag zu beobachten, einem Zeitraum aktiven axonalen Wachstums, Elongation und Myelinisierung (Streit 2001). Ferner sollen Mikrogliazellen die Proliferation von Astrozyten vermitteln, die Myelinogenese steigern und die Vaskularisierung des ZNS stimulieren (Giulian et al. 1988; Hamilton und Rome 1994).

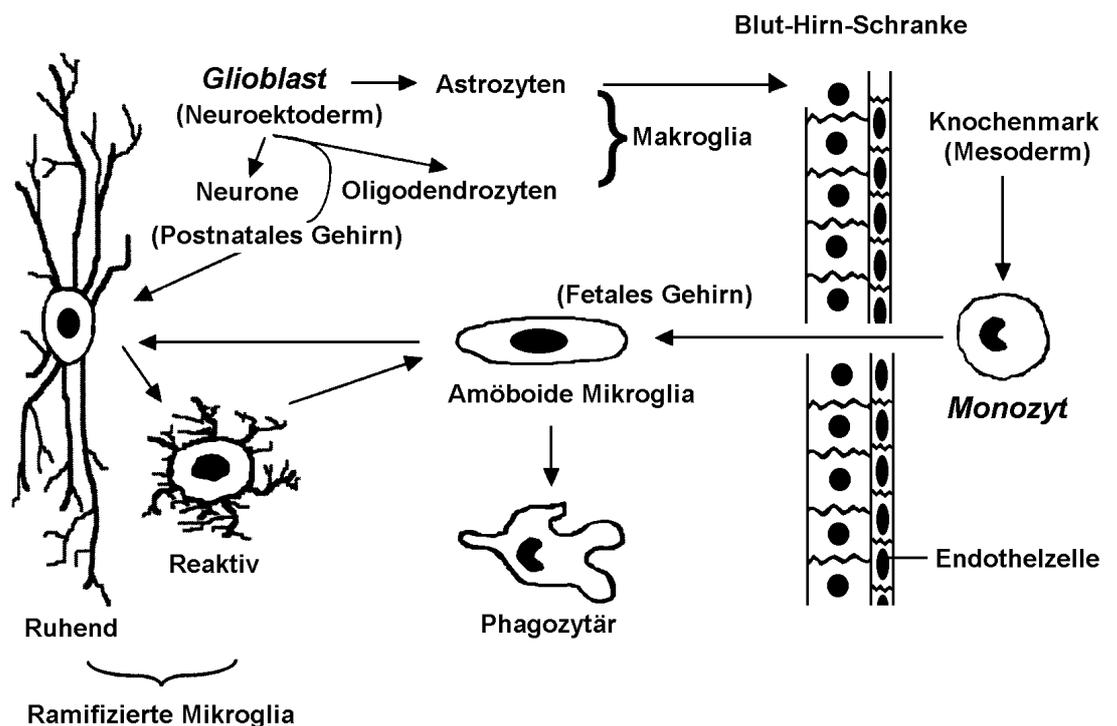


Abbildung 1.2. Übersicht über Herkunft der Makroglia sowie Ursprung und Morphologie der Mikroglia in verschiedenen Entwicklungs- und Aktivierungsstadien (nach Peterson et al. 1997).

1.2.3. Reaktionsmuster der Mikroglia im kindlichen und adulten Gehirn

Nachdem man früher vermutet hatte, die Astrozyten seien die Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) des ZNS (Fontana et al. 1984), wurde diese Ansicht revidiert, als man herausfand, dass MHC-Antigene der Klasse II praktisch nicht auf Astrozyten, sondern lediglich auf mikroglialen- und perivaskulären Zellen vorhanden sind (Hickey und Kimura 1988; Steiniger und van der Meide 1988). Die perivaskulären Zellen repräsentieren eine Population von mononukleären Phagozyten, die innerhalb der Wände kleiner bis mittelgroßer zerebraler Blutgefäße liegen; sie sind vom Hirnparenchym durch eine vaskuläre Basalmembran getrennt und sind, im Unterschied zu parenchymalen Mikrogliazellen, nicht Teil des ZNS-Parenchyms (Graeber und Streit 1990).

Da eine Verletzung oder Erkrankung des Gehirns meist mit einer Störung der Blut-Hirn-Schranke einhergeht, und somit Phagozyten aus dem Blut das Hirngewebe infiltrieren, was eine Differenzierung zwischen residenter Mikroglia und Makrophagen aus dem Blut schwierig macht, hat man nach einer Methode gesucht, die Reaktion der Mikroglia isoliert zu untersuchen. Als gutes Modell dafür stellte sich die Durchtrennung des N. facialis heraus, da die Durchtrennungsstelle im peripheren Nervensystem (PNS) weit entfernt vom Nucl. facialis im ZNS liegt und somit keine Blutmakrophagen das ZNS infiltrieren (Blinzinger und Kreutzberg 1968; Kreutzberg 1996).

Innerhalb von 3-4 Tagen nach Durchtrennung des Nervs proliferierte die Mikroglia v.a. um die entsprechenden Motoneurone und bildete langfristige Aktivierungsmarker aus, wie CD4, Leukozyten-Funktions-assoziiertes Antigen-1 und MHC-Moleküle der Klassen I und II. Vom 4.Tag nach Axiotomie ummantelte die aktivierte Mikroglia das Soma der verletzten Motoneurone und entfernte afferente synaptische Endigungen von der

Oberfläche der Motoneurone, ein Prozess, der als „synaptisches Stripping“ bezeichnet wurde. Dies ist ein wichtiger Prozess in der synaptischen Reorganisation nach Verletzung (Blinzinger und Kreutzberg 1968; Kreutzberg 1996).

Interessanterweise zeigten die Mikrogliazellen jedoch keine phagozytotische Aktivität, möglicherweise weil es nicht zum Zelltod kommt. In diesem Fall wird der Mikrogliareaktion eher eine Reparaturfunktion als eine degenerative Rolle zugeschrieben (Nakajima und Kohsaka 1993).

Nach Induktion eines selektiven Zelltodes der Motoneurone durch die Injektion des Nervengifts Ricin, das retrograd zu den Neuronen transportiert wird, kommt es hingegen zu einer Transformation der umgebenden Mikroglia zu Phagozyten und Beseitigung der absterbenden Neurone ohne Hilfe von Blutmakrophagen (Kreutzberg 1996). In ähnlicher Weise führte die durch Kain-Säure induzierte neuronale Degeneration zur phagozytotischen Umwandlung der Mikroglia im Hippocampus (Andersson et al. 1991).

Für eine pathogenetische Rolle der Mikroglia bei degenerativen ZNS-Erkrankungen, bei denen sie als Krankheitsmediator fungieren soll, sind in den letzten Jahren vermehrt Hinweise gefunden worden. Die häufigste Form der Demenz im Alter, die Alzheimer-Krankheit (AD), ist neuropathologisch u.a. charakterisiert durch die extrazelluläre Ablagerung von β -Amyloid ($A\beta$) in sogenannten senilen Plaques, in denen MHC I oder II ausbildende Mikrogliazellen beobachtet wurden (Mattiace et al. 1990; Perlmutter et al. 1990; Uchihara et al. 1997). Dies wurde allgemein als Versuch der Mikroglia interpretiert, die neurotoxischen $A\beta$ -Plaques zu phagozytieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Mikroglia $A\beta$ -Fibrillen mithilfe eines Typ-A Makrophagen Scavenger-Rezeptors internalisiert; bei der AD gibt es eine starke Ausprägung des Scavenger-Rezeptors auf aktivierter Mikroglia in der Nähe der senilen Plaques (Paresce et al. 1996).

Es gibt Hinweise darauf, dass, obwohl die Mikroglia möglicherweise A β aufnehmen und abbauen kann, das Maß des Abbaus begrenzt ist und die Zellen möglicherweise von der Menge an anfallendem A β überschwemmt werden (Paresce et al. 1997).

Jedoch könnte die Hypothese, dass die Mikroglia versucht, die Neurotoxizität von A β abzuwenden, nicht ganz zutreffend sein. Von Mikrogliazellen ist bekannt, dass sie diverse zytotoxische Substanzen produzieren können, wie Zytokine (Aloisi 2001) oder Komplement-Proteine (Korotzer et al. 1995).

Zu den zytotoxischen Faktoren, die kultivierte Mikrogliazellen nach Induktion durch Lipopolysaccharid (LPS) oder Zytokine produzieren, gehören Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive nitrogene Oxide wie ONOO⁻; NO₂ oder NO₂⁻ (Boje und Arora 1992), sowie Superoxid-Anion (Colton und Gilbert 1987). Die reaktiven oxygenen Zwischenprodukte, die aus der Lipid-Peroxidierung stammen (Sonderer et al. 1987), sind toxisch für das Myelin. Eikanoside wie Prostaglandine und Leukotriene sind unter bestimmten Voraussetzungen auch zytotoxisch. Da Mikrogliazellen sowohl Cyclooxygenase als auch Lipoxygenase enthalten, könnten die entstehenden Substanzen das Ausmaß der Entzündungsreaktion beeinflussen (Minghetti und Levi 1995).

Eine Studie zeigte, dass synthetisches A β die Sekretion dieser zytotoxischen Substanzen induzieren kann (Giulian et al. 1996), in einer anderen wurde beobachtet, dass Mikrogliazellen A β herstellen und sezernieren können und dass der Stimulus für die mikrogliale A β -Produktion das A β selbst sein könnte (Bitting et al. 1996).

Somit könnten die Mikrogliazellen direkt und indirekt für die Neurotoxizität im Rahmen der AD mitverantwortlich sein.

Auch in der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) scheinen Mikrogliazellen beteiligt zu sein. Studien der typischen demyelinisierenden Läsionen (=Plaques) im Gehirn zeigten

Infiltrate von inflammatorischen Zellen und Ansammlungen von Lipid-haltigen Makrophagen, die mit Färbungen für Myelin-Proteine anfärbbar waren (Prineas 1996), von denen einige unzweifelhaft phagozytotische Mikrogliazellen repräsentierten.

Man nimmt an, dass die Mikrogliazellen in ihrer Funktion als APZ nach Aktivierung einen initialen Entzündungsprozess in Gang setzten. Dabei führt die Antigen-Präsentation zu einer Anlockung von T-Zellen, was wiederum die Aktivierung der Mikroglia verstärkt. Diese sezernieren dann Neurotoxine, die die Oligodendrozyten und das Myelin schädigen, was im Endeffekt zur Degeneration der weißen Substanz führt, die mit der MS assoziiert ist. (Gonzalez-Scarano und Baltuch 1999).

Dafür spricht die Anwesenheit von MHC-Molekülen der Klasse II auf Makrophagen und Mikrogliazellen in MS-Läsionen (Bo et al. 1994), die Expression von Fc-Rezeptoren (Ulvestad et al. 1994) und die erhöhte Expression von chemotaktischen Rezeptoren wie C5a und Il-8 (Muller-Ladner et al. 1996). Zusätzlich zur Demyelinisierung zeigte sich jedoch ebenso ein progressiver Verlust von Axonen, der für die oft chronische Behinderung der Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung verantwortlich ist (Ferguson et al. 1997). Nach allerneuesten Erkenntnissen aktiviert das bei der Demyelinisierung entstehende 7-Ketocholesterol die Mikroglia über Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1), die in der Folge ihre Axonen-schädigende Aktivität entfaltet (Diestel et al. 2003).

Eine entscheidende Rolle spielt die Mikroglia schließlich bei der mit dem HI-Virus assoziierten Infektion des Gehirns, dem AIDS-Demenz-Komplex (ADC). Trotz der schweren klinischen Symptomatik, die motorische und kognitive Funktionen betrifft (Navia et al. 1986), gibt es nur wenig Hinweise auf eine Infektion von Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten. Stattdessen ist das Virus in Mikrogliazellen und

Makrophagen konzentriert (Wiley et al. 1986; Gabuzda et al. 1986; Kure et al. 1990). Den Weg ins Gehirn findet das HI-Virus nach vorherrschender Meinung verborgen in infizierten Monozyten, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden („Trojanisches Pferd“-Hypothese) (Peluso et al. 1985).

Als pathophysiologische und somit neurotoxische Faktoren kommen virale und nicht-virale Produkte der Mikroglia/Makrophagen in Betracht. (Magnuson et al. 1995; Adamson et al. 1996), wobei der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) ein entscheidender Faktor zu sein scheint: TNF- α wird von HIV-infizierter Mikroglia freigesetzt und schädigt besonders Oligodendrozyten (Wilt et al. 1995); bei Patienten mit ADC wurden signifikant höhere Spiegel an TNF- α -mRNA im Gehirn gefunden, verglichen mit nicht-dementen HIV-positiven Patienten (Wesselingh et al. 1997). Da Makrophagen und Mikroglia als vorherrschende zelluläre Quelle von TNF- α im ZNS von Patienten mit ADC identifiziert wurden, spricht das für eine mögliche Rolle von TNF- α in der neuronalen Dysfunktion bei ADC (Tyor et al. 1992; Wesselingh et al. 1997).

Eine immunhistochemische Studie von Weis et al. (1994) zeigte in HIV-infizierten Gehirnen eine signifikant erhöhte Zahl aktivierter Mikrogliazellen, unabhängig davon, ob in den Schnitten das HIV-1 Antigen vorhanden war oder nicht, ein weiterer Hinweis darauf, dass nicht das Virus, sondern die Mikroglia die entscheidenden neuronalen Schädigungen verursacht (Weis et al. 1994).

1.2.4. Immunhistochemische Marker der Mikroglia

Nachdem del Rio-Hortega die Mikrogliazellen im ZNS für seine Untersuchungen als erster mit einer Silber-Imprägnationsmethode färbte, wurde diese zunächst weiterhin benutzt

(Weil und Davenport 1933; Gallyas 1963). Im weiteren Verlauf wurden histochemische (Smith und Rubinstein 1962; Ibrahim et al. 1974) und immunhistochemische (Mathew et al. 1983; Esiri und Booss 1984) Methoden entwickelt, um Mikroglia in Formalin-fixiertem Gewebe zu identifizieren, die den konventionellen jedoch nicht immer überlegen waren. Einen großen Fortschritt diesbezüglich brachte die Einführung der Lektin-Histochemie (Hori et al. 1982; Schwechheimer et al. 1984).

Kommerziell erhältliche und in der klinischen Routine verwendete Reagentien sind heute zum einen monoklonale und polyklonale Antikörper sowie biotinierte Lektine. Zu den Antikörpern gehört das z.B. CD68, CR3/43, EBM-11, Ham-56, Mac387, HLA-DR/alpha, CD16 und Lysozym, das verwendete Lektin heißt Ricinus communis agglutinin (RCA-1) (Hulette et al. 1992). CD68 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper für ein Makrophagen-spezifisches 110 kDa Glykoprotein, CR3/43 bindet an eine monomorphe Region von HLA-DR, -DQ und -DP β -Ketten und ist somit ein Marker für HLA-Antigene der Klasse II. CD16 stellt einen Marker für die Expression von Fc-Rezeptoren dar, während Lysozym ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper für menschliches Lysozym ist (Hulette et al. 1992).

Mannoji et al. veröffentlichten 1986 ihre Ergebnisse über RCA-1. Sie fanden, dass RCA-1 spezifisch an Mikroglia von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten menschlichen Hirngewebe bindet, genauer an einen D-Galaktose-Rest an der Oberfläche der Mikroglia. Die Vorteile gegenüber anderen Methoden sahen sie auch darin, dass die Bindung von RCA-1 nicht durch die Formalin-Fixierung der Gewebe beeinträchtigt wird, wie es bei immunhistochemischen Markern der Fall sein kann, und in der hohen Spezifität des Biotin-Avidin-Komplexes (ABC-Methode), welcher über einen Biotin-konjugierten Brückenantikörper und dem Peroxidase-konjugierten Avidin letztlich die Farbreaktion

vermittelt. Zusätzlich kann über beigefügte Inhibitions-Kontrollen mit Galaktose und Laktose die Spezifität leicht demonstriert werden (Mannoji et al 1986).

In einer Vergleichsstudie der diagnostischen Wertigkeit der verschiedenen Marker zeigte sich, dass Ham-56, ein Makrophagen-spezifischer monoklonaler Antikörper, zuverlässig aktivierte Mikrogliazellen in pathologischen Geweben wie z.B. Plaques bei Multipler Sklerose sowie perivaskuläre Mikroglia färbte, während jedoch verzweigte Mikrogliazellen in histologisch normalen Gewebe mit Ham-56 nicht zur Darstellung kamen (Hulette et al. 1992). Die Färbungen mit CD68 zeigten ein sehr variables Muster, was wohl mit dem histopathologischen Prozess und dem Stadium der mikroglialen Aktivierung zusammenhängt. Ruhende Mikroglia der normalen weißen Substanz wurden gut gefärbt, während Zellen in mikroglialen Anhäufungen nicht gefärbt wurden.

RCA-1 hingegen färbte Makrophagen, perivaskuläre Zellen, ruhende Mikroglia und endotheliale Zellen. Besonders intensiv war die Reaktion in mikroglialen Anhäufungen und bei den Mikrogliazellen der angrenzenden Gewebe. Die Färbungen mit den übrigen oben erwähnten Antikörpern waren diagnostisch weit weniger ergiebig (Hulette et al. 1992).

Die besondere Zuverlässigkeit von RCA-1 in der Darstellung von Mikrogliazellen im kindlichen Gehirn zeigt auch eine Arbeit, in der RCA-1 positive Zellen in Kulturen menschlichen Gehirns bereits bei Embryonen in der 10. Gestationswoche nachgewiesen werden konnten. Elektronenmikroskopisch wurden schon hier zwei Formen positiver Zellen unterschieden, wovon eine Fortsätze aufwies, die andere hingegen nicht (Bobryshev und Ashwell 1994).

1.3. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die quantitative Analyse der Mikrogliazellen in Gehirnen einer Gruppe an SIDS verstorbenen Kindern verglichen mit einer Kontrollgruppe. Die Identifizierung der Mikrogliazellen erfolgte mithilfe des Lektins RCA-1. Es soll die Frage geklärt werden, ob ein signifikanter Unterschied im Auftreten RCA-1 positiver Mikrogliazellen zwischen beiden Gruppen besteht. In der Diskussion soll das Ergebnis interpretiert und ein möglicher Zusammenhang anhand der klinisch-automatischen Befunde sowie der vorliegenden Literaturergebnisse untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Gewebeproben aus dem Gehirn obduzierter SIDS- sowie Kontroll-Fälle wurden nach 14-tägiger Fixation in 4%igem gepuffertem Formalin, Wässern unter fließendem Wasser, Dehydratation, Einbettung in Paraffin und anschließendem Schneiden in 5 Mikrometer dicke Schnitte untersucht.

Es wurden die folgenden 25 Hirnregionen ausgewertet (Abkürzungen in Klammern):

Lobus frontalis, Substantia grisea- (Fro-co)

Lobus fronto-orbitalis, Substantia grisea- (Orb-co)

Lobus parietalis, Substantia grisea- (Par-co)

Lobus occipitalis, Substantia grisea- (Occ-co)

Lobus temporalis, Substantia grisea- (Tem-co)

Lobus frontalis, Substantia alba- (Fro-wm)

Lobus fronto-orbitalis, Substantia alba- (Orb-wm)

Lobus parietalis, Substantia alba- (Par-wm)

Lobus occipitalis, Substantia alba- (Occ-wm)

Lobus temporalis, Substantia alba- (Tem-wm)

Hippocampus

- CA1-Region (Hip-CA1)
- CA4-Region (Hip-CA4)
- Körnerzellschicht des Gyrus dentatus- (Hip-Gr)

Thalamus- (Thal)

Nucleus caudatus- (Caud)

Putamen - (Put)

Capsula interna- (Cain)

Mesenzephalon- (Mes)

Substantia nigra- (Nig)

Pons- (Pon)

Nuclei pontis- (Nclpo)

Medulla oblongata- (Med)

Nucleus olivaris inferior- (Oliv)

Cerebellum, Cortex- (KH-co)

Cerebellum, Substantia alba- (KH-wm)

2.1.1. Stichprobe

Die Gruppe der untersuchten SIDS-Fälle bestand aus 23 Kindern, davon 11 männlichen und 12 weiblichen Geschlechts im Alter von 1 bis 11 Monaten mit einem Mittelwert von 5 Monaten. Die Körperlänge reichte von 52 cm bis 80 cm mit einem Mittelwert von 64 cm, das Körpergewicht von 3,3 kg bis 8,6 kg mit einem Mittelwert von 6,1 kg. Die Hirngewichte lagen zwischen 438 g und 1178 g mit einem Mittelwert von 738 g.

Die postmortale Liegezeit betrug zwischen 7 und 80 Stunden mit einem Mittelwert von 31 Stunden (siehe Tabelle 7.1. und 7.3. im Anhang).

Gemäss den internationalen Standards zur Diagnosestellung eines SIDS wurde in dieser Gruppe nach Untersuchung der Todesumstände bei einer sorgfältigen Obduktion inklusive ZNS, sowie einer toxikologischen Untersuchung und der Suche nach pathogenen Keimen keine pathologischen Befunde erhoben, womit die Diagnose SIDS gestellt werden konnte.

Die Kontrollgruppe umfasste 22 Kinder, davon 12 männlich und 10 weiblich, im Alter von der 31. SSW bis 22 Monate mit einem Mittelwert von 5 Monaten. Die Körperlänge lag zwischen 43 cm und 93 cm mit einem Mittelwert von 63 cm, das Körpergewicht zwischen 1,5 und 13,1 kg mit einem Mittelwert von 5,9 kg. Die Hirngewichte lagen in der Kontrollgruppe zwischen 205 und 1250 g, der Mittelwert bei 697 g.

Bei der postmortalen Liegezeit ergaben sich Werte zwischen 4 und 78 Stunden mit einem Mittelwert von 29 Stunden (siehe Tabelle 7.2. und 7.3. im Anhang).

2.2. Lektin

Die Färbung der Mikroglia wurde mit dem Lektin RCA-1 durchgeführt. Verwendet wurde das biotinierte Ricinus communis Agglutinin 1 der Firma Vector Laboratories, Burlingame, USA. (Produktspezifikation siehe Anhang)

2.3. Untersuchungen

2.3.1. Lektin histochemische Untersuchungen

Lektine sind nichtimmunogene Proteine beziehungsweise Glykoproteine überwiegend pflanzlicher Herkunft. Aufgrund ihrer Eigenschaft, terminale Zuckerreste spezifisch zu binden, werden sie zur Untersuchung der Glykoproteine und Glykolipide von Zelloberflächen, in diesem Fall der Mikrogliazellen, verwendet (Damjanov 1987). Histochemisch erfolgt eine Lektinbindung an die Zuckerreste, welche durch Konjugation mit entsprechenden Markern sichtbar gemacht wird.

Mit dem in 2.2. aufgeführten Lektin wurden nach der ABC-Peroxidase-Methode SIDS- und Kontrollschnitte behandelt. Bei der ABC-Methode handelt es sich um ein indirektes immunhistochemisches Nachweisverfahren, welches aus den folgenden Grundsritten besteht:

- * Das Biotin-konjugierte (biotinilierte) Lektin bindet an die Zielstruktur.
- * Der Komplex aus Peroxidase-konjugiertem Streptavidin bindet an das Biotin des Lektins und vermittelt zugleich die Farbreaktion.

Vor Beginn der eigentlichen Bearbeitung stand die Erstellung einer Verdünnungsreihe, um die jeweils optimale Lektinkonzentration zu ermitteln. Während den Färbungen lief jedesmal eine Negativkontrolle zur Überprüfung der Spezifität der Untersuchung mit.

Die entsprechenden Gehirnregionen der SIDS- und Kontrollschnitte wurden jeweils gemeinsam gefärbt, das heißt in einer Färbeküvette befanden sich die Schnitte der SIDS- und Kontrollgruppe mit der jeweils gleichen Region.

Die lektin histochemischen Färbungen wurden entsprechend den nachfolgend aufgelisteten Schritten an jeweils den SIDS- und Kontrollschnitten durchgeführt:

1. Vorbehandlung
Entparaffinierung in Xylol über 30 Minuten
Rehydratation in der absteigenden Ethanolreihe:
100% 5 Minuten
96% 1 Minute
70% 1 Minute
2. Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten
3. Gewebebehandlung mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung für 10 Minuten zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität
4. Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten
5. Beträpfeln der Schnitte mit Kaninchen-Normalserum, Verdünnung 1:10, um elektrisch geladene Gewebsbestandteile durch Proteinbindung zu neutralisieren:
Einlegen der Schnitte für 15 Minuten in die feuchte Kammer
Ansatz: 0,5 ml Normalserum + 5ml PBS-Puffer
6. Abkippen des Normalserums
7. Inkubation mit dem biotinilierten Lektin für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer
8. Zweimaliges Waschen in PBS-Puffer; jeweils 10 Minuten
9. Inkubation mit dem 1:1000 in PBS-Puffer verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer
10. Inkubation mit der Wasserstoffperoxid-aktivierten DAB-Chromogenlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur

11. Waschen in Aqua destillata für 10 Minuten
12. Gegenfärbung mit Mayer's Hamalaun für 2 Minuten
13. Bläuen unter fließendem Wasser für 10 Minuten
14. Dehydratation in der aufsteigenden Ethanolreihe
 - 70% 1 Minute
 - 96% 1 Minute
 - 100% 2 x 5 Minuten
15. Einlegen in Xylol für 10 Minuten
16. Einschließen der Gewebeschnitte in Eukitt

Das Ergebnis dieser Behandlung stellt ein unlösliches braunes Endprodukt dar, welches lichtmikroskopisch an den Stellen einer stattgefundenen Lektinbindung sichtbar wird. (siehe Abbildung 2.1.)

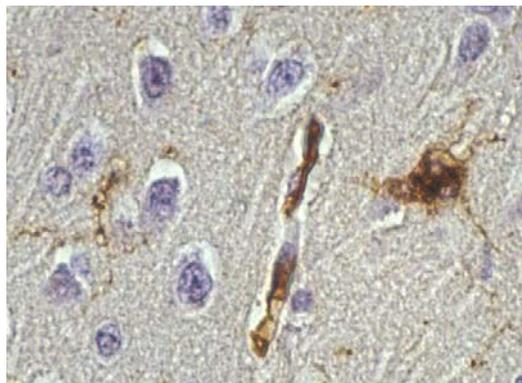


Abbildung 2.1. Lektin histochemische Darstellung von RCA-I im Hippokampus eines SIDS-Falles: deutliche Anfärbung der Mikroglia und der vaskulären Endothelzellen (Gegenfärbung mit Hämalaun, Originalvergrößerung 400x).

2.3.2. Rating

Die mikroskopische Auswertung erfolgte unter einem Leitz Biomed Mikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung. Je Gesichtsfeld wurde die Gesamtzahl der RCA-1-positiven Mikrogliazellen ermittelt. Es wurden nur parenchymale, nicht jedoch perivaskuläre Zellen gezählt. Die Auszählung geschah ohne Kenntnis davon, ob der ausgewertete Fall der Gruppe der SIDS-Fälle oder der Kontrollgruppe zuzuordnen war.

2.3.2.1 *Graue Substanz*

Die graue Substanz (Großhirnrinde/Cortex) wurde nach dem „systematic row sampling“ ausgewertet (Weis 1991). Für die Analyse wurde ein Gebiet mit geradem Verlauf der Rindenoberfläche ausgewählt. Sodann wurde das erste Messfeld an der pialen Oberfläche positioniert. Nun wurden alle immunpositiven Zellen in diesem Messfeld gezählt, einschließlich derer, die den linken bzw. oberen Rand des Rasters berühren, nicht jedoch diejenigen, die den rechten bzw. unteren Rand berühren (=Regel der verbotenen Linien) (Weis 1991). Danach wurde das Messfeld nach unten verschoben, so dass es genau anschließend an das erste Messfeld zu liegen kam. Auf diese Weise wurde bis zum Erreichen der weißen Substanz fortgefahren, wodurch eine vertikale Reihe entstand. Danach wurde das Messfeld wieder zur pialen Oberfläche geführt und seitlich anschließend an das erste Messfeld der ersten Reihe plaziert, um die nächste vertikale Reihe auszuzählen. Auf diese Weise wurden fünf vertikale Reihen ausgewertet.

2.3.2.2. *Weißer Substanz*

In der weißen Substanz (Marklager) und in den Strukturen subkortikaler grauer Substanz, des Kleinhirns und des Hirnstamms erfolgte die Auswertung nach dem „random systematic sampling“ (Weis, 1991). Hierbei wird die Position des ersten Messfeldes rein zufällig gewählt. Die weiteren vier Felder wurden vom ersten Gesichtsfeld ausgehend mäanderförmig ausgewertet. Insgesamt kamen jeweils 5 Gesichtsfelder pro Hirnregion zur Auswertung.

Mittels obengenannter Verfahren erfolgte die Datenerhebung für die Hirnregionen in SIDS- und Kontrollpersonen. Es wurde immer das entsprechende Areal in der jeweiligen Region gewählt. In einem zweiten Arbeitsschritt erfolgte die Berechnung der Zelldichte als Zellzahl pro definierte Messfläche anhand der Formel:

$$\text{Zelldichte (n/mm}^2\text{)} = \frac{\text{Anzahl der RCA-1 positiven Mikrogliazellen}}{\text{Anzahl der Gesichtsfelder} \times \text{Messfeldfläche}^*}$$

*Messfeldfläche= 0,248mm x 0,248mm

2.3.3. Statistische Auswertung

Nach Erhebung der Daten am histologischen Schnitt, erfolgte die Eingabe der Parameter in eine Datenmatrix. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des SPSS-Programms (Statistical Package for the Social Sciences). Neben dem Student's t-test für unabhängige Stichproben kamen der nicht-parametrische Mann-Whitney Test sowie Varianzanalysen (ANOVA) und die Berechnung von Korrelationskoeffizienten nach Pearson zur Anwendung. Dabei gelten p-Werte von unter 0,05 als statistisch signifikant.

Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2000

3. Ergebnisse

Bezüglich der Variablen Größe, Gewicht, Hirngewicht und postmortaler Liegezeit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der SIDS-Fälle und der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 7.3. im Anhang).

3.1. Lektin histochemische Befunde

3.1.1. Telenzephalon, Graue Substanz

Untersucht wurde die graue Substanz der Lobi fronto-orbitalis, frontalis, parietalis, temporalis und occipitalis. Es zeigte sich frontal eine Zunahme der Mikrogliazellen von 11,70 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe auf 15,03 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe ($p=0,27$), frontoorbital eine Abnahme von 17,45 Zellen/mm² auf 14,32 Zellen/mm² ($p=0,49$), parietal eine Zunahme von 10,99 Zellen/mm² auf 15,37 Zellen/mm² ($p=0,17$), temporal eine Zunahme von 9,40 Zellen/mm² auf 13,59 Zellen/mm² ($p=0,11$) und occipital ebenfalls ein Anstieg in der SIDS-Gruppe von 7,75 Zellen/mm² auf 15,23 Zellen/mm² ($p=0,009$).

Somit ergibt sich hier insgesamt in der SIDS-Gruppe eine tendenzielle Zunahme der RCA-1 positiven Mikroglia mit Ausnahme der frontoorbitalen Region, in der Regio occipitalis zeigte sich sogar ein signifikanter Anstieg (Abbildung 3.1. und 3.3., Tabelle 7.4. im Anhang).

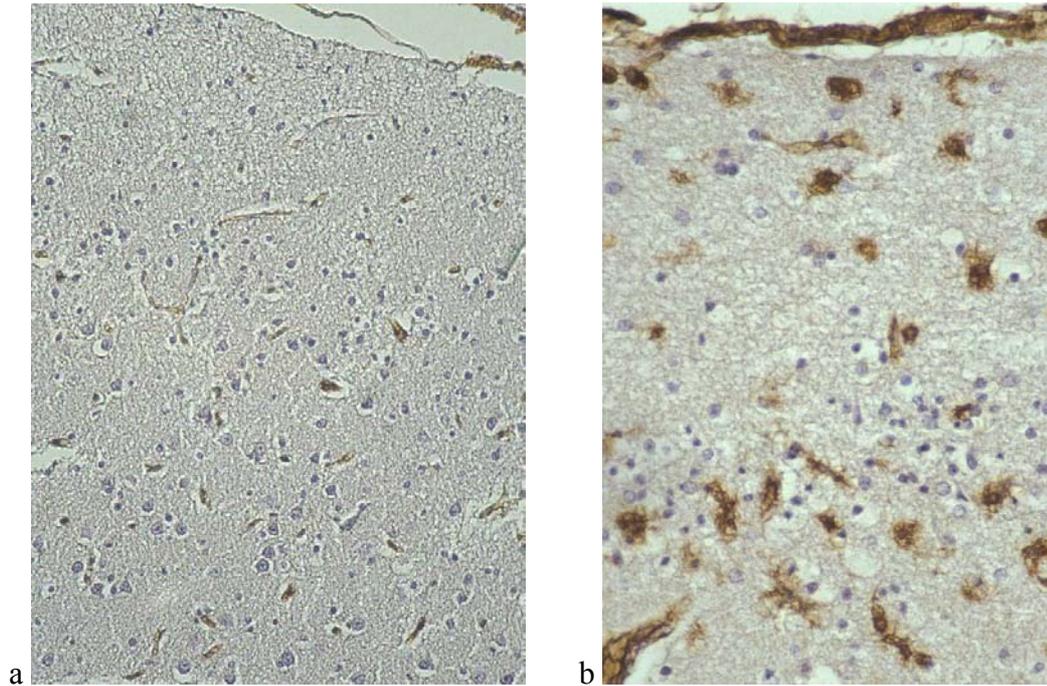


Abbildung 3.1. Lektin histochemische Darstellung von RCA-I im orbitofrontalen Kortex von Kontrollen (a) und SIDS-Fällen (b) (Gegenfärbung mit Hämalaun, Originalvergrößerung 100x).

3.1.2. Telenzephalon, Weiße Substanz

Analog zur Untersuchung der grauen Substanz bestanden die ausgewerteten Regionen der weißen Substanz aus Schnitten der Lobi fronto-orbitalis, frontalis, parietalis, temporalis und occipitalis.

Frontal zeigte sich eine Abnahme der RCA-1 positiven Mikrogliazellen von 17,50 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe auf 16,75 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe (p=0,87), fronto-orbital ebenfalls eine Abnahme 24,54 Zellen/mm² auf 15,41 Zellen/mm² (p=0,17), parietal dagegen ein Anstieg von 15,87 Zellen/mm² auf 18,95 Zellen/mm² (p=0,5),

temporal ein Anstieg von 12,28 Zellen/mm² auf 17,81 Zellen/mm² (p=0,18) und occipital eine Zunahme von 11,71 Zellen/mm² auf 17,66 Zellen/mm² (p=0,09).

Insgesamt zeigt sich in der weißen Substanz also in der SIDS-Gruppe eine tendenzielle Zunahme der Mikrogliazellen in drei Regionen, während die beiden frontalen Regionen eine tendenzielle Abnahme der Mikroglia-Zelldichte aufweisen (Abbildung 3.2. und 3.3., Tabelle 7.4. im Anhang).

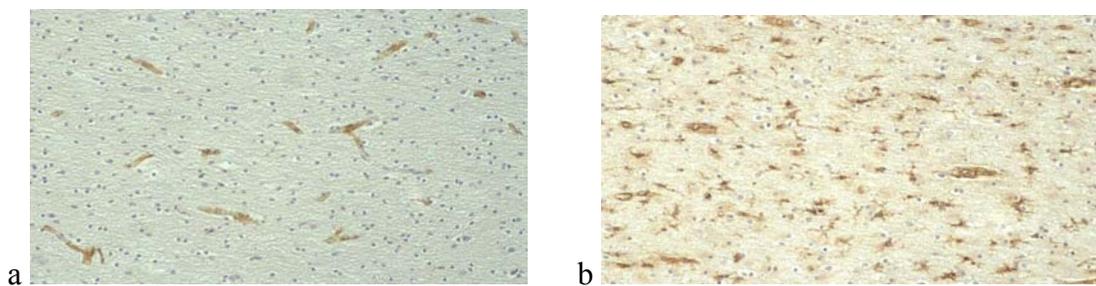


Abbildung 3.2. Lektinhistochemische Darstellung von RCA-I in der weißen Substanz von Kontrollen (a) und SIDS-Fällen (b) (Gegenfärbung mit Hämalaun, Originalvergrößerung 100x).

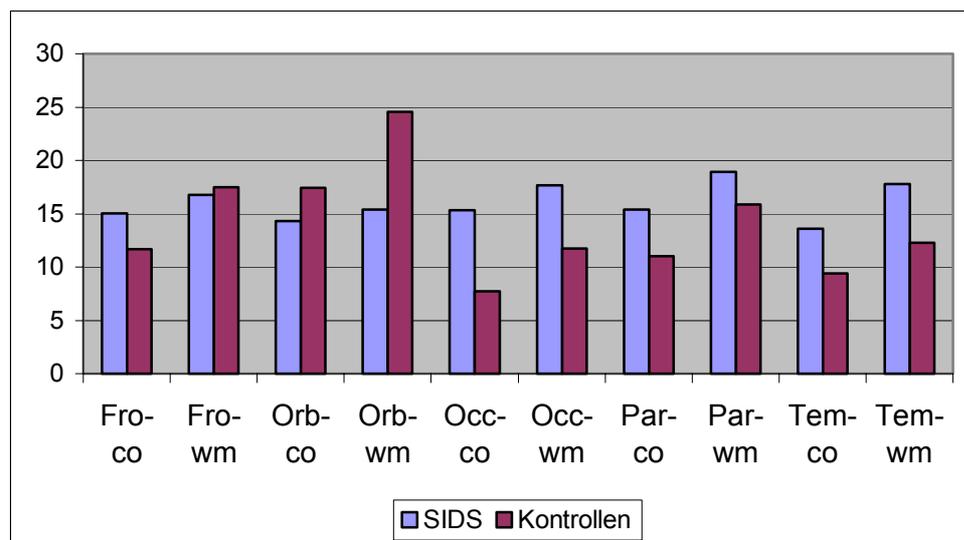


Abbildung 3.3. Darstellung der numerischen Dichte der Mikrogliazellen (Zellen/mm²) in den Regionen des Telenzephalons bei SIDS und Kontrollen

3.1.3. Hippocampus

In der Hippocampus-Formation wurden die Regionen CA1, CA4 und die granuläre Schicht jeweils einzeln ausgewertet. Die granuläre Schicht im Gyrus dentatus zeigte einen Anstieg der Mikrogliazellen von 10,89 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe auf 16,14 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe ($p=0,22$). In der Region CA1 wurde ein Anstieg von 6,91 Zellen/mm² auf 11,90 Zellen/mm² ($p=0,14$) festgestellt, in der Region CA4 zeigte sich ein Anstieg von 16,10 Zellen/mm² auf 26,31 Zellen/mm² ($p=0,04$).

Damit ergibt sich in einer Region des Hippocampus ein signifikanter Anstieg der RCA-1 positiven Zellen in der SIDS-Gruppe, während in den beiden anderen Regionen eine tendenzielle Zunahme beobachtet wird (Abbildung 3.4. und 3.5., Tabelle 7.4. im Anhang).

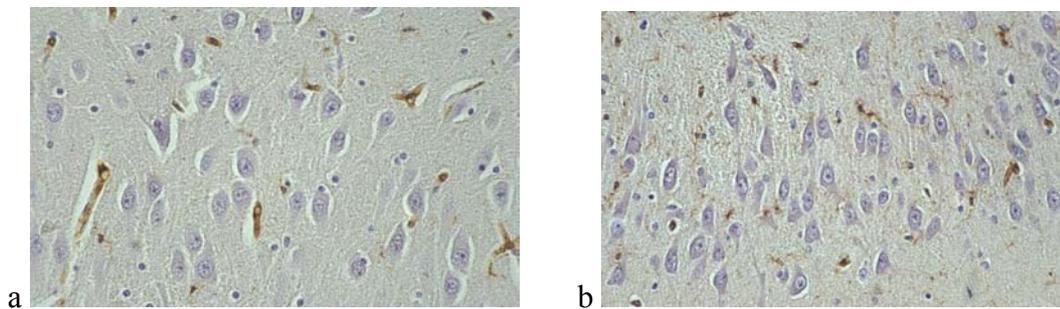


Abbildung 3.4. Lektin histochemische Darstellung von RCA-1 im Hippocampus von Kontrollen (a) und SIDS-Fällen (b) (Gegenfärbung mit Hämalaun, Originalvergrößerung 200x).

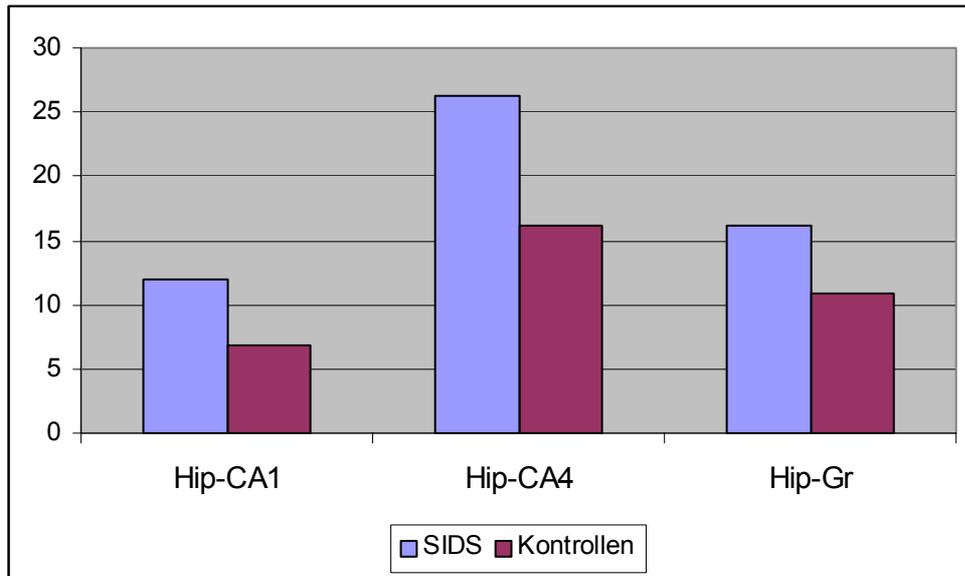


Abbildung 3.5. Numerische Dichte der Mikrogliazellen (Zellen/mm²) in Regionen der Hippocampusformation

3.1.4. Kleinhirn (Cerebellum)

Im Kleinhirn wurde analog zum Telenzephalon die graue Substanz und das Marklager, also die weiße Substanz getrennt ausgewertet. Im Cortex zeigte sich eine Zunahme der Mikrogliazellen von 8,55 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe auf 14,39 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe ($p=0,12$), in der weißen Substanz ebenfalls eine Zunahme von 23,09 Zellen/mm² auf 27,42 Zellen/mm² ($p=0,41$) (Abbildung 3.6., Tabelle 7.4. im Anhang).

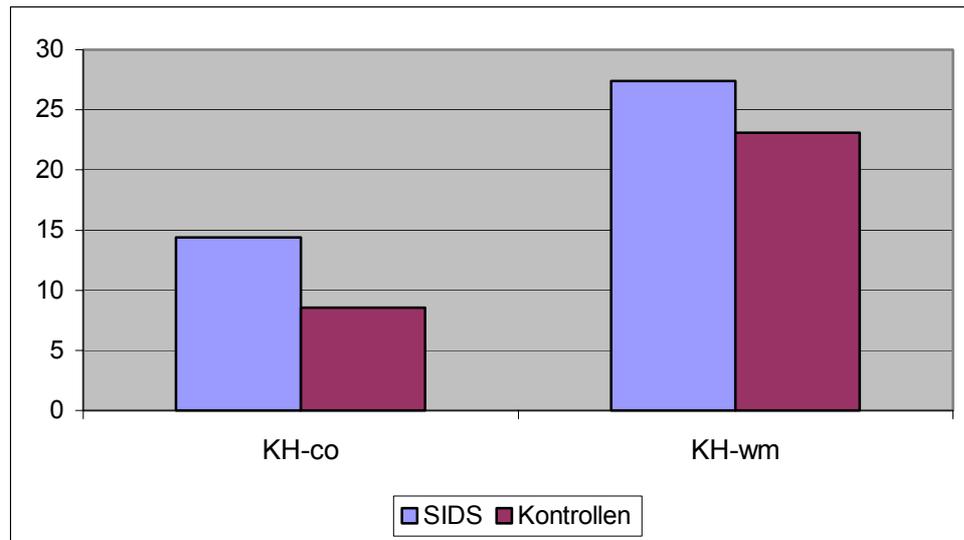


Abbildung 3.6. Vergleich der numerischen Dichte der Mikroglia (Zellen/mm²) im Kleinhirn bei SIDS und Kontrollen

3.1.5. Thalamus

Der im Zwischenhirn (= Diencephalon) liegende Thalamus stellt neurophysiologisch gesehen die zentrale Schaltstation sensibler Nervenbahnen dar. Hier ergab sich ein Anstieg der RCA-positiven Mikroglia von 15,69 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe auf 26,16 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe ($p=0,03$).

Somit zeigte sich im Thalamus eine signifikante Zunahme der Mikrogliazellen bei SIDS im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 3.7., Tabelle 7.4. im Anhang).

3.1.6. Basalganglien und Capsula interna

Untersucht wurden Putamen und Nucleus caudatus, sowie die innere Kapsel (Capsula interna). Die subkortikal liegenden Basalganglien sind als Schaltstationen der „extrapyramidalen Motorik“ vor allem an der Bewegungskoordination beteiligt, die Capsula interna wird von den sogenannten Projektionsfasern gebildet.

Im Putamen zeigte sich eine Zunahme der Mikroglia von 9,45 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe auf 19,51 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe (p=0,01), im Nucleus caudatus einen Anstieg von 22,30 Zellen/mm² auf 49,91 Zellen/mm² (p=0,06). Somit ist in einer Region der Basalganglien annähernd eine Verdoppelung der Mikroglia zu verzeichnen (Abbildung 3.7., Tabelle 7.4. im Anhang).

In der Capsula interna ergab sich ein Anstieg von 18,27 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe auf 25,73 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe (p=0,18) (Abb 3.7., Tabelle 7.4. im Anhang).

3.1.7. Mittelhirn (Mesencephalon) und Substantia nigra

Das Mittelhirn bildet zusammen mit dem Pons und der Medulla oblongata den Hirnstamm. Die im Mittelhirn gelegene Substantia nigra ist als Produktionsort des Dopamin klinisch u.a. beim Morbus Parkinson von Bedeutung.

Im Mesencephalon zeigte sich ein Anstieg der Mikroglia-Dichte von 13,43 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe auf 21,09 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe (p=0,11) und in der Substantia nigra eine Zunahme von 15,55 Zellen/mm² auf 45,08 Zellen/mm² (p=0,005), somit zeigt sich bei SIDS-Fällen eine signifikante Zunahme der numerischen Dichte der Mikroglia (Abbildung 3.7., Tabelle 7.4. im Anhang).

3.1.8. Regionen und Kerngebiete des Hirnstamms

Der Hirnstamm wird gebildet von Mittelhirn, Brücke (Pons) und dem sich anschließenden verlängerten Mark (Medulla oblongata). Er enthält die Kerne von Hirnnerven, auf- und absteigende Fasern und ist Sitz des lebenswichtigen Atem- und Kreislaufzentrums.

Untersucht wurden jeweils die Regionen Pons, Nuclei pontis, Medulla oblongata und Nucleus olivaris inferior.

Im Pons kam es zu einer Zunahme der RCA-1 positiven Zellen von 15,81 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe auf 21,95 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe (p=0,08), in den Nuclei pontis zu einer Zunahme von 30,20 Zellen/mm² auf 35,77 Zellen/mm² (p=0,68), die Medulla oblongata zeigte einen Anstieg von 18,10 Zellen/mm² auf 22,76 Zellen/mm² (p=0,39) und der Nucleus olivaris inferior einen Anstieg von 22,62 Zellen/mm² auf 43,12 Zellen/mm² (p=0,03).

Somit ergab sich in Teilen des Hirnstamms bei SIDS-Fällen ein signifikanter Anstieg der Mikroglia neben einer tendenziellen Zunahme (Abbildung 3.7. und 3.8., Tabelle 7.4. im Anhang).

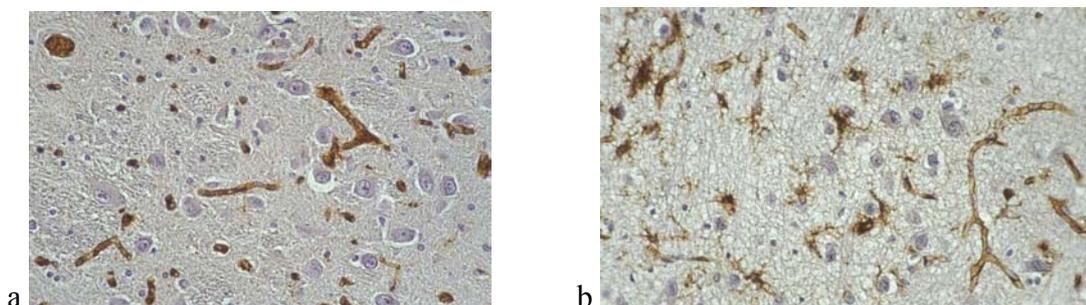


Abbildung 3.8. Lektin histochemische Darstellung von RCA-I in der Pons von Kontrollen (a) und SIDS-Fällen (b) (Gegenfärbung mit Hämalaun, Originalvergrößerung 200x).

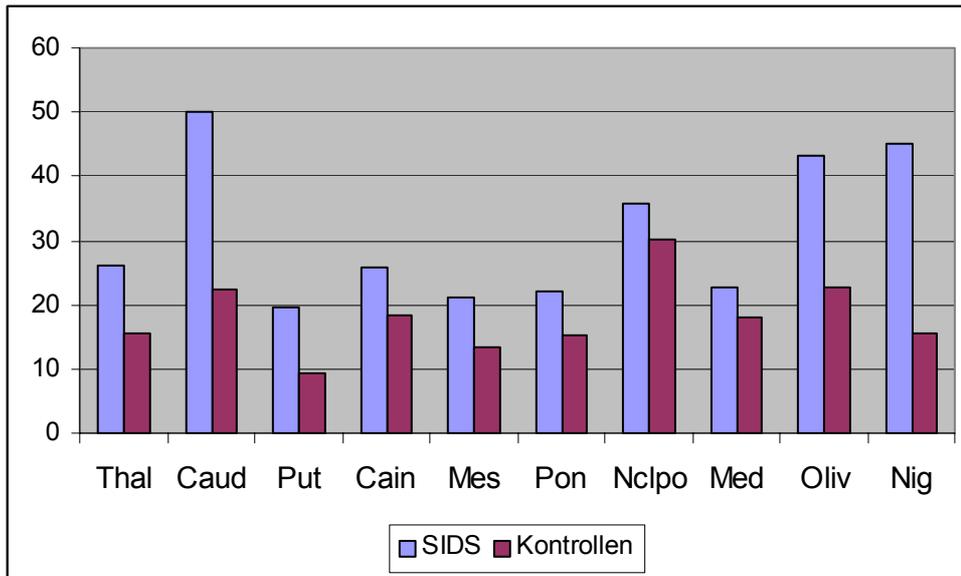


Abbildung 3.7. Vergleichende Darstellung der Mikroglia-Dichte (Zellen/mm²) in subkortikalen Kerngebieten bei SIDS und Kontrollen

4. Diskussion

4.1. Stichprobengröße

Die untersuchten Gehirne der SIDS-Fälle sowie der Kontrollgruppe wurden aus zwei nahezu gleich großen Gruppen verstorbener Kinder entnommen. Die Gesamtgröße der Stichprobe betrug $n = 45$, davon 23 SIDS- und 22 Kontrollfälle.

Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich Alter, Geschlecht, Körperlänge- und gewicht, Hirngewicht und postmortaler Liegezeit (siehe Tabelle 7.1. - 7.3. im Anhang). Der einzige Unterschied bestand in der Todesursache, wobei in der SIDS-Gruppe nach aufwändiger Diagnostik entsprechend den durch ein Expertengremium festgelegten und international akzeptierten Kriterien (Willinger et al. 1991) eine andere überprüfbare Ursache für den Tod des Kindes ausgeschlossen werden konnte, während in der Kontrollgruppe unterschiedliche, genau definierte natürliche oder nicht-natürliche Todesursachen vorlagen (Tabelle 7.3 im Anhang). Somit ist die Strukturgleichheit beider Gruppen gegeben.

4.2. Methode

Die in dieser Studie verwendeten Nachweismethoden der Lektin histochemie sind langjährig etablierte und sensitive Verfahren zur Identifizierung zellulärer Antigene. Sie erfordern jedoch eine große Sorgfalt und Sauberkeit bei ihrer Anwendung, um aussagekräftige Ergebnisse zu liefern. So ist es generell erforderlich, jeden Antikörper und jedes Lektin vor der Anwendung einer Verdünnungsreihe zur Ermittlung der optimalen

Verdünnung auszutesten. Weiterhin muss bei jeder Färbereihe eine Negativkontrolle zur Überprüfung der Reaktionsspezifität mitgeführt werden. Darüber hinaus sind die in den jeweiligen Rezepten vorgeschriebenen Inkubationszeiten, Verdünnungen und pH-Werte exakt einzuhalten. Diese Punkte wurden in der Studie genauestens berücksichtigt. Ferner erfolgte eine detaillierte Dokumentation des jeweiligen Versuchstages anhand fortlaufender Arbeitsprotokolle.

Schwieriger zu normieren waren die exogenen Faktoren wie zum Beispiel die Umgebungs- und Reagentientemperatur. Durch die Durchführung einer Färbung an der parallel bearbeiteten SIDS- und Kontrollgruppe an einem Tag konnte der Einfluss dieser Faktoren auf ein Minimum reduziert werden.

Wenig Einfluss konnte auf die postmortalen Liegezeiten der verstorbenen Kinder genommen werden, welche aufgrund des notwendigen Genehmigungsverfahrens zur Obduktion unterschiedlich lange ausfielen.

Ein weiterhin nicht zu vernachlässigender Einflussfaktor ist die nach der Entnahme des Gehirns notwendige Fixierungszeit. Hier wurde versucht, kontrollierte Bedingungen mit möglichst gleichen Fixierungszeiten in gepuffertem Formalin zu schaffen.

Die mikroskopische Auswertung musste ebenfalls sehr sorgfältig vorgenommen werden, um eine adäquate Einordnung der Zellen zu gewährleisten und um Doppelzählungen zu vermeiden. Aus diesem Grund geschah dieser Schritt an einem festen Arbeitsplatz mit konstanter Beleuchtung zu möglichst den gleichen Tageszeiten. Auch hier erfolgte eine detaillierte Dokumentation durch fortlaufende Arbeitsprotokolle.

Durch zweimalige Eingabe und Verarbeitung des Zahlenmaterials konnten auch hier eventuell auftretende Fehlermöglichkeiten weitgehend vermieden werden.

4.3. Lektin histochemische Untersuchungen

4.3.1. RCA-1

Bei dem verwendeten *Ricinus communis* agglutinin-1 handelt es sich um ein Lektin, das mit hoher Spezifität an einen Galaktose-Rest auf der Oberfläche von Mikrogliazellen bindet (Manoji et al. 1986). Zuvor erbrachte ein Versuch der Anfärbung der Mikroglia mit den monoklonalen Antikörpern CD68 und CR3/43 keine zufriedenstellenden Ergebnisse, was mutmaßlich durch die mangelhafte Bindung dieser Antikörper in noch unreifen Gehirnen zu erklären ist.

Mit RCA-1 wurde schließlich eine sehr gute Anfärbung der Mikroglia erreicht (Abbildung 2.1), was neben der ausgeprägten Spezifität auch auf die offenbar geringe Empfindlichkeit dieses Markers gegenüber Faktoren wie Unreife des Gewebes und dessen Fixierung in Formalin zurückzuführen ist (Mannoji et al. 1986; Bobryshev und Ashwell 1994).

Als gewisse Einschränkung erwies sich, dass RCA-1 auch die Endothelzellen der Blutgefäße anfärbt (Büttner et al. 1996). Da diese durch die räumliche Nähe zu den perivaskulären Mikrogliazellen nur sehr schwer abzugrenzen waren und die Gefahr von Fehlzählungen bestanden hätte, wurden ausschließlich die parenchymalen RCA-1 positiven Zellen ausgewertet.

4.3.2. Ergebnisse

Von den insgesamt 25 untersuchten Hirnregionen zeigte sich in 22 Regionen eine Zunahme der RCA-1 positiven Mikrogliazellen in der SIDS-Gruppe, dabei handelte es sich in 6 Regionen um eine statistisch signifikante Zunahme. In 3 Regionen wurde eine Abnahme der Mikrogliazellen bei SIDS gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet.

Somit ergab sich eine annähernd generalisierte, jedoch betont in den subkortikalen Kerngebieten auftretende Zunahme der Mikrogliazellen in der SIDS-Gruppe, verglichen mit den Kontrollen.

Einige Studien beschäftigten sich mit dem Auftreten von reaktiven Astrozyten, vor allem im Hirnstamm von SIDS-Kindern, was als „reaktive Gliose“ bzw. „Astrogliose“ bezeichnet wurde. Beispielhaft dafür ist die Arbeit von Kinney et al. (1983), die 6 anatomische Regionen des Hirnstamms bei SIDS und Kontrollen auf Astrozytose untersuchten. 5 Regionen standen in Zusammenhang mit der unwillkürlichen Atmungskontrolle (Kinney et al. 1983). Dabei wurden in 3 Regionen signifikant höhere Zahlen bei SIDS gefunden, der größte Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich jedoch am Hilus der unteren Olive, der einzigen nicht atmungsassoziierten der untersuchten Regionen. Es konnten keine Zusammenhänge mit klinischen oder pathologischen Variablen nachgewiesen werden, so dass die bisher angenommene Hypoxie als Ursache für sekundäre Hirnstammgliose zumindest in Zweifel gezogen wurde.

Dennoch kann ein sekundäres Phänomen auch als Erklärung für die Erhöhung der Mikrogliazellen in SIDS-Gehirnen angenommen werden. Dabei muss die Hypothese einer vorausgehenden Hypoxie, für die in vielen Studien zumindest indirekte Hinweise gefunden

worden sind (Naye 1974; Rognum et al. 1988; Del Bigio und Becker 1994; Jones et al. 2003), diskutiert werden.

Es wurde bereits dargelegt, dass der Tod von Nervenzellen, z.B. über einen hypoxischen Schaden, die Migration, Proliferation und Aktivierung von Mikrogliazellen bewirkt, welche dann direkt und indirekt eine inflammatorische Reaktion und einen phagozytotischen Prozess in Gang setzen.

Eine Untersuchung der Thalamusregion von Ratten, bei denen man durch Applikation eines Exzitotoxins eine ZNS-Läsion herbeigeführt hatte, zeigte einen zunehmenden Anstieg von Mikrogliazellen vom vierten bis zum fünfzehnten Tag mit erhöhter Mitoseaktivität, bis die Zahlen nach einem Monat wieder rückläufig waren (Marty et al. 1991).

Andere Versuche an den Gehirnen von Ratten konzentrierten sich besonders auf die Hippocampusformation als Region erhöhter Vulnerabilität gegenüber Ischämie bzw. Hypoxie. Nach der temporären Unterbrechung der zerebralen Blutzufuhr durch Gefäßverschlüsse erfolgte die Untersuchung der mikroglialen Reaktion in verschiedenen Bereichen des Hippocampus (Gehrmann et al. 1992a und 1992b; Jorgensen et al. 1993; Morioka et al. 1991). Einen Tag nach Läsion zeigten sich Zeichen der Aktivierung der Mikroglia, v.a. in den Sektoren CA1 und CA4, außerdem wurden phagozytierende Mikrogliazellen positiv für MHC II – Moleküle. Aber auch in „Ischämie-resistenteren“ Bereichen wie dem Sektor CA3 und im frontoparietalen Kortex fand sich eine Mikrogliaaktivierung als Frühzeichen für eine neuronale Schädigung (Gehrmann et al. 1992a und b). Eine andere Studie fand die stärkste mikrogliale Reaktion 4-5 Tage nach Reperfusion, betont in den hippocampalen Arealen CA1 sowie im Gyrus dentatus (Morioka et al. 1991).

Eine der wenigen Studien, die sich mit der Aktivierung der Mikroglia bei Kindern befasst, untersuchte diese im Gyrus dentatus des Hippocampus (Del Bigio und Becker 1994). Dabei wurden 4 Gruppen gebildet, wovon eine aus 26 SIDS-Kindern bestand. Das Ergebnis war, dass sowohl die Gruppe der an kardiorespiratorischen Erkrankungen verstorbenen, als auch die Gruppe der SIDS-Kinder signifikant höhere Zahlen an Mikrogliazellen aufwies als die Gruppe der Kontrollkinder.

Die Autoren interpretierten diese Erhöhung als einen Marker einer milden oder zuvor stattgehabten hypoxischen oder ischämischen Hirnschädigung (Del Bigio und Becker 1994).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die deutlichste Zunahme der Mikroglia bei SIDS im Hippocampus im Sektor CA4 des Ammonshorns, ein Anstieg zeigte sich ebenfalls im Sektor CA1 sowie der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus. Dass diese sehr Hypoxie-vulnerablen Regionen des limbischen Systems eine teilweise signifikant erhöhte Mikrogliaaktivierung bei SIDS aufweisen, könnte tatsächlich Hinweis auf eine zerebrale Hypoxie bei SIDS sein. In Frage käme etwa eine chronisch mild verlaufende zerebrale Hypoxie, die keine morphologisch sichtbaren Nervenzellschädigungen verursacht, letztlich aber möglicherweise in einer finalen Apnoephase gipfeln und dadurch den plötzlichen Tod des Kindes hervorrufen könnte.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die in 6 Regionen signifikante und auch in fast allen Regionen des Großhirns bestehende tendenzielle Erhöhung der Mikrogliazellen nicht Hypoxie-bedingt, sondern möglicherweise Folge eines generalisierten inflammatorischen Prozesses ist, was einen Hinweis auf eine Infektion des Hirnparenchyms mit einem noch

nicht definierten Erreger, bzw. allgemeiner die Aktivierung eines chronischen immunologischen Prozesses bedeuten könnte.

Früher bestand die Ansicht, das Gehirn sei ein immunologisch privilegiertes Organ. Das lag daran, dass die Blut-Hirn-Schranke den Übertritt von Blutzellen und Serumkomponenten in das Hirnparenchym verhindert, dass das Gehirn praktisch über kein lymphatisches System verfügt und vor allem daran, dass keine Ausprägung von Molekülen des „major histocompatibility complex“ (MHC) erkannt wurde, die für die Antigen-Präsentation erforderlich sind (Kreutzberg 1996). Das hätte bedeutet, dass das ZNS über kein intrinsisches Immunsystem verfügt und bei intakter Blut-Hirn-Schranke vom systemischen Immunsystem abgetrennt wäre.

Mittlerweile weiß man, dass es sehr wohl zu einer Ausprägung von MHC-Antigenen kommt, und zwar sowohl der Klasse I als auch der Klasse II. Während die Expression von MHC-Antigenen der Klasse I auch auf anderen Zellen wie den Astrozyten stattfindet, werden Klasse II-Antigene, welche in der Peripherie exklusiv auf APZ zu finden sind, im ZNS nahezu ausschließlich von Mikrogliazellen ausgebildet, ganz besonders in zu Grunde gehenden Bahnen der weißen Substanz (Steininger und van der Meide 1988; Konno et al. 1989; Rao und Lund 1983; Hayes et al. 1987). Eine schnelle Hochregulation von MHC-II auf residenter Mikroglia konnte durch die intrathekale Applikation von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und Interferon- γ demonstriert werden (Wekerle et al. 1986).

Während inflammatorischer Reaktionen ist diese MHC-II- Induktion ausgedehnt verbreitet; z.B. werden bei einer Herpes-simplex-Infektion von Säugetieren fast alle residenten Mikrogliazellen MHC-II- positiv (Weinstein et al. 1990).

Die MHC-Moleküle stimulieren CD8-zytotoxische- bzw. CD4-T-Helferzellen, wobei zusätzliche Interaktionen zwischen Adhäsions- (wie ICAM-1) und kostimulatorischen

Molekülen (wie CD40) auf APZ und spezifischen passenden Rezeptoren auf T-Zellen erforderlich sind, um eine optimale T-Zell-APZ-Bindung und gegenseitige Aktivierung zu gewährleisten (Slavik et al. 1999; van Kooten und Banchereau 2000). Nahezu alle bisher durchgeführten Versuche mit Mikroglia-Kulturen haben gezeigt, dass diese Zellen in der Lage sind, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und sie naiven-, Gedächtnis- oder differenzierten T-Zellen zu präsentieren (Becher et al. 2000; Aloisi et al. 2000), wobei kultivierte Mikrogliazellen aus dem sich entwickelnden Gehirn einen aktivierteren Phänotyp und effektivere APZ darstellen als die aus dem erwachsenen ZNS isolierte Mikroglia (Carson et al. 1998). Die mit MHC II-Molekülen reagierenden CD4-T-Helferzellen werden in 2 Subpopulationen unterteilt (Th1 und Th2), die sich in ihrer Effektorfunktion und dem Profil der sezernierten Zytokine unterscheiden. Die Hauptfunktion der Th1-Zellen ist das Auslösen einer Phagozyten-vermittelten Abwehr gegen Infektionen und die Förderung der Differenzierung von CD8-T-Zellen zu aktiven zytotoxischen Zellen, die infizierte Zellen lysieren (Aloisi 2001). Th2-Zellen vermitteln humorale Immunantworten, indem sie die Differenzierung von B-Zellen und die Antikörperbildung stimulieren, und regulieren die Th1-Antworten durch die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10) (Aloisi 2001).

Die von Th1-Zellen produzierten Zytokine wie IFN- γ und TNF- α aktivieren die Mikroglia und Makrophagen und schädigen wohl gleichzeitig Oligodendrozyten und Neuronen direkt, wie es bei MS beobachtet wird (Merrill und Benveniste 1996), wohingegen die Th2-Zytokine einen gegenteiligen Effekt haben (Mathisen et al. 1997). Die Gewichtung von Th1 und Th2- Antworten innerhalb einer Immunreaktion wird wohl in erster Linie durch die Ausschüttung von Zytokinen in der Initialphase bestimmt, wobei IL-12 bzw. IL-4 entscheidende Rollen spielen (O'Garra 1998).

Während das antiinflammatorische IL-4 offenbar nicht von residenten Zellen im ZNS gebildet wird, scheint das proinflammatorische IL-12 hauptsächlich von Mikrogliazellen im Verlauf einer Entzündung produziert zu werden (Stalder et al. 1997).

Zusammengefasst scheint es so zu sein, dass die Mikroglia bei etwa durch IFN- γ oder LPS vermittelten inflammatorischen Bedingungen eine Th1-Antwort unterstützt, während sie bei Abwesenheit dieser Mediatoren die T-Zellen in Richtung Th2 stimuliert (Aloisi 2001).

Die Regulation der Immunfunktion der Mikroglia ist sehr komplex und besteht nach gegenwärtigem Wissen aus verschiedenen Komponenten, deren Zusammenspiel für die Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS von entscheidender Bedeutung ist. Die nachfolgende kurze Übersicht soll u.a. die Relevanz dieser komplexen Zusammenhänge für eine eventuell überschüssige Mikrogliaaktivierung und deren mögliche Folgen für das kindliche Gehirn verdeutlichen:

Zunächst beeinflusst das *Milieu im Gehirn* selbst, ob eine Mikrogliaaktivierung stattfindet oder nicht. Unter Berücksichtigung der Heterogenität neuronaler Populationen in verschiedenen neuroanatomischen Regionen wurde vorgeschlagen, dass die Auswirkungen der neurochemischen Umgebung auf die Mikroglia in Bezug auf das Ausmaß der Aktivierung und der inflammatorischen Reaktionen regionenspezifisch sind (McCluskey und Lampson 2000).

Es scheint so zu sein, dass während normaler neuronaler Aktivität neurotrophe Substanzen freigesetzt werden, die eine Aktivierung der Mikroglia über eine Inhibierung Makrophagen-stimulierender Faktoren wie Lipopolysaccharid (LPS) bzw. der Expression von MHC II-Molekülen verhindern (Neumann et al. 1996 und 1998). Andere Neuropeptide wie α -Melanozyten stimulierendes Hormon (alpha-MSH) oder vasoaktives intestinales

Peptid (VIP) hemmen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Stickstoffmonoxid (NO) in LPS-aktivierten Mikrogliazellen v.a. indem sie den intrazellulären cAMP-Spiegel anheben (Delgado et al. 1998; Kim et al. 2000).

Darüber hinaus besitzen Mikrogliazellen eine große Anzahl von *Oberflächenrezeptoren*, die eine Immunantwort auslösen oder verstärken können. Man nimmt an, dass die Erkennung und Beseitigung von fremden Pathogenen durch von Geburt an vorhandene Immunzellen über eine Reihe von spezifischen Rezeptoren erfolgt, welche direkt mit mikrobiellen Strukturen interagieren, was zur Stimulation von Phagozytose, Induktion zytotoxischer Mechanismen und Aktivierung von Immunzellen führt (Medzhitov und Janeway 2000). Der Komplementrezeptor Typ 3 (CR3) bindet an eine Reihe von mikroglialen Molekülen und ist ein sehr effektiver Vermittler von Phagozytose sowie einer Vielzahl intrazellulärer Signalvorgänge, darunter Proteinkinase-Kaskaden, die u.a. für die Leukozytenaktivierung bedeutsam sind (Ehlers 2000); CR3 ist einer der am schnellsten heraufregulierten Marker auf aktivierter Mikroglia und sein Anstieg wird unter nahezu allen pathologischen Bedingungen gesehen (Gehrmann et al. 1995). Ein weiterer wichtiger Rezeptor ist CD14, an den LPS, ein Hauptbestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, bindet (Kitchens 2000).

Fc- und Komplementrezeptoren auf der Oberfläche von Mikrogliazellen dienen hauptsächlich der Vermittlung und Unterstützung der Phagozytose (= Opsonierung) unter neuroinflammatorischen Bedingungen, verbunden mit spezifischen humoralen Antworten gegen ZNS-Pathogene oder Autoantigene sowie einer entsprechenden Aktivierung des Komplementsystems (Aloisi 2001). Da die Signalübertragung durch Fc-Rezeptoren oder CR3 die Produktion von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffmolekülen vermittelt, könnten diese Rezeptoren auch die proinflammatorischen und zytotoxischen Funktionen der Mikroglia verstärken (Colton et al. 1994; van der Laan et al. 1996).

Mikrogliazellen exprimieren ferner eine Reihe von *Rezeptoren für Zytokine*, die während einer *Entzündungsreaktion* intrazerebral gebildet werden. Das schließt sowohl Rezeptoren für pro- als auch für antiinflammatorische Zytokine ein, dessen Gleichgewicht als entscheidend für die Induktion und Regulation der Immunfunktionen der Mikroglia angesehen wird (Aloisi 2001).

Eines der am besten untersuchten proinflammatorischen und immunstimulierenden Zytokine ist *Interferon-gamma (IFN- γ)*, das hauptsächlich von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und der Th1-Population der CD4-T-Zellen produziert wird (Colton et al. 1994; Benveniste 1998). IFN- γ -Rezeptoren sind auf ruhenden Mikrogliazellen vorhanden, und die intrazerebrale Injektion von IFN- γ induziert schnell eine MHC II-Expression auf diesen Zellen (Vass und Lassmann 1990). Die Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor bewirkt die Transkription und Expression verschiedener Immungene wie CD40 über die klassische IFN- γ induzierte Signalübertragungs-Kaskade unter Einschluss des Transkriptionsfaktors STAT-1 (Nguyen und Benveniste 2000).

TNF- α ist ein weiteres proinflammatorisches Zytokin mit Makrophagen-aktivierender Funktion, das die Phagozytose wie auch die Produktion vor allem pro- und weniger antiinflammatorischer Zytokine durch die Mikroglia fördert (Smith et al. 1998; Becher et al. 2000). Es wird bei einer Entzündung des ZNS von aktivierten Th1-Zellen, Makrophagen und Mikrogliazellen produziert und stellt offenbar einen potenten autokrinen Aktivator dar (Becher et al. 2000). Die Rezeptorbindung induziert die Transkription diverser Immungene über die Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Cao et al. 1999).

Die Mehrzahl der mikroglialen Immunfunktionen, die durch IFN- γ und LPS ausgelöst werden, werden durch antiinflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- β gehemmt (Frei et al. 1994; Benveniste 1998).

Das Antigen *CD40* findet sich auf der Oberfläche von APZ und somit auch auf Mikrogliazellen, während sein natürlicher Ligand CD40L auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird (van Kooten und Banchereau 2000). Das System hat eine bedeutsame Rolle in der Vermittlung der Differenzierung aktivierter B-Zellen sowie der Interaktionen zwischen T-Zellen und APZ (Aloisi 2001). Darüberhinaus wurden sowohl CD40-ausbildende Makrophagen und Mikrogliazellen als auch CD40L-ausbildende T-Zellen in MS-Läsionen identifiziert (Gerritse et al. 1996).

Wie schon erwähnt spielen *Zytokine* eine zentrale Rolle bei der Regulation von Immunantworten.

Die inflammatorische Wirkung der von Mikrogliazellen produzierten IL-1 und TNF- α besteht hauptsächlich in ihrer Fähigkeit, die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen und die Synthese von Chemokinen in zerebrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten zu induzieren, die den Gefäßaustritt der Leukozyten und deren Ansiedlung im ZNS ermöglichen (Sedgwick et al. 2000).

In vitro Untersuchungen zeigten, dass Mikrogliazellen wohl auch die Hauptproduktionsstätten weiterer Zytokine sind, welche humorale und zellvermittelte Immunantworten stimulieren. Dazu gehören IL-6, ein Zytokin mit pro- und antiinflammatorischen Aktivitäten, das B-Zellwachstum und -differenzierung fördert (Frei et al. 1989), IL-12 (Aloisi et al. 1997) und IL-18 (Prinz und Hanisch 1999), die eine entscheidende Rolle bei der Stimulation von NK- und Th1-Zellen spielen; dazu kommt IL-15, das selektiv NK und CD8-T-Zellen stimuliert (Hanisch et al. 1997).

Auf der anderen Seite produziert die Mikroglia auch *Zytokine mit antiinflammatorischer Aktivität* wie TGF- β , IL-10 und IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) (Kiefer et al. 1998; Jander et al. 1998; Liu et al. 1998). Diese hemmen die Aktivierung von Mikrogliazellen

und Makrophagen, indem sie sowohl die Ausbildung von Molekülen, die mit der Antigen-Präsentation in Verbindung stehen, als auch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Sauerstoffradikalen inhibieren (Frei et al. 1994; O'Keefe et al. 1999).

Chemokine sind eine Familie von kleinen Peptiden, die eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut in das ZNS als Antwort auf neurotrophe Pathogene oder bei Autoimmunprozessen spielen (Glabinski und Ransohoff 1999). Bestimmte Chemokine wie IP-10 oder MIP-1a werden von der Mikroglia synthetisiert und tragen möglicherweise zur intrazerebralen Anlockung von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen bei, außerdem gibt es Hinweise, dass sie die Migration der Mikrogliazellen hin zu geschädigten bzw. entzündlichen Hirnregionen stimulieren können (Aloisi 2001).

Bei der Komplexität des Zusammenspiels der zahlreichen Faktoren, die die Immunfunktionen der Mikroglia induzieren, vermitteln und regulieren, ist es ohne weiteres denkbar, dass eine Fehlfunktion oder Überstimulation dieses Systems gerade im kindlichen Gehirn erhebliche Schäden anrichten könnte. So wäre es möglich, dass z.B. eine Immuninduktion durch eine banale Infektion aus bisher nicht geklärten Gründen zu einer überschüssigen Aktivierung der Mikrogliazellen führt, die schließlich in eine inflammatorische Kaskade mündet. Gerade eine in dieser Arbeit nachgewiesene Aktivierung der Mikroglia in den Kerngebieten des Hirnstamms könnte auf diese Weise zu neurotoxischen Schädigungen führen, was bei Neuronen des Atem- oder Kreislaufzentrums möglicherweise zum Tod der Kinder führen könnte.

Verschiedene Studien beschäftigten sich mit der Suche nach bakteriellen Toxinen, viralen Infekten und der mikrobiologischen Besiedlung des Nasen-Rachen-Raums bei SIDS. So wurden pyrogene Toxine von *Staphylokokkus aureus* (*S.aureus*) wie das „toxic shock syndrome toxin“ (TSST) in Gewebeproben innerer Organe von über 50% der SIDS-Opfer gefunden, während es in der entsprechenden Kontrollgruppe nur bei 16% der Kinder nachgewiesen wurde (Zorgani 1999). Nachdem die nasale Besiedlung durch *S.aureus* bei SIDS und Kontrollen in annähernd gleichem Maße vorkommt, könnte eine Erhöhung der Schleimhauttemperatur bei SIDS zur Produktion von pyrogenen Toxinen führen (Zorgani 1999).

Die Schwierigkeit der postmortalen Messung und Aussagekraft von Endotoxinen wird jedoch daran deutlich, dass im Rahmen einer anderen Studie zwar bei allen SIDS-Opfern, allerdings auch bei sämtlichen Kontrollfällen, Endotoxine nachgewiesen werden konnten, mutmaßlich durch agonale Freisetzung (Morris 1999). Dies schließt allerdings eine Beteiligung von Endotoxinen in der Genese von SIDS nicht aus, zumal höhere Konzentrationen bei SIDS-Kindern mit histologischem Nachweis einer Entzündung gefunden wurden (Crawley et al. 1999).

In Untersuchungen der nasopharyngealen Flora bei Kindern wurde vorwiegend *Staphylokokkus aureus* isoliert, assoziiert mit den Befunden der mütterlichen Flora des Nasen-Rachen-Raums (Blackwell et al. 1999). Eine andere Arbeit offenbarte eine Abnahme der Besiedlung mit *Staphylokokkus aureus* mit zunehmenden Alter, eine stärkere Besiedlung dagegen bei männlichen Kindern und in den Wintermonaten. Kinder zwischen 12 und 18 Monaten zeigten außerdem eine Besiedlung mit *Hämophilus influenzae* sowie gramnegativen Bakterien. Aus der Kombination von Schlafen in Bauchlage und gleichzeitigen viralen Infektionen der oberen Atemwege resultierte das Muster

nasopharyngealer bakterieller Besiedlung, welches oft bei SIDS-Opfern gefunden wird (Harrison et al. 1999).

Ferner wurden Befunde einer leichten viralen Infektion der Atemwege, wie mit RS-Virus, vermehrt bei SIDS-Opfern gefunden (An et al. 1993).

Von besonderem Interesse sind vor allem die gemeinsamen Befunde, die bei SIDS auf der einen und bei Tod durch Infektionen auf der anderen Seite erhoben wurden (Abbildung 4.1.).

So fand man erhöhte Spiegel von Hypoxanthin (siehe Kapitel 1) im Glaskörper sowohl bei SIDS-Fällen als auch bei Fällen eines Todes durch Infektionskrankheiten, nicht aber bei anderen Kontrollfällen (Vege et al. 1994). Außerdem zeigten mehrere Studien eine Immunstimulation bei SIDS anhand einer Erhöhung von verschiedenen Immunglobulinen in Lunge (Raven et al. 1978; Forsyth et al. 1989), Trachea und Duodenum (Stoltenberg et al. 1992). Die T-Zell Aktivierungsmarker CD45 RO, CD29, CD58 und CD38 waren allgemein in hohen Spiegeln bei SIDS-Opfern nachweisbar, was auf eine immunologische Aktivierung als Antwort auf einen infektiösen Stimulus hindeutet (Forsyth und Atthowe 1995). Dazu passt auch, dass bei SIDS-Opfern im Liquor signifikant erhöhte Spiegel des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) gegenüber Kontrollen, die nicht an Infektionen gestorben waren, gefunden wurden (Vege et al. 1995), welches als endogenes Pyrogen hohe Körpertemperaturen verursachen und damit zu respiratorischen Störungen führen kann (LeMay et al. 1990; Riesenfeld et al. 1996).

Bakterielle Produkte (Hedges et al. 1992) und verschiedene Viren (Lundemose et al. 1993; Mistchenko et al. 1994) können neben anderen Zytokinen (Dinarello 1989) die Produktion von IL-6 stimulieren.

Über hohe Spiegel an IL-6 im Liquor wurde bei Patienten mit Infektionen des ZNS berichtet (Houssiau et al. 1988; Chavanet et al. 1992; Waage et al. 1989).

Da IL-6 im ZNS vorwiegend von den Mikrogliazellen synthetisiert wird (Lee et al. 1993), können diese Ergebnisse mit der hier nachgewiesenen Mikrogliaaktivierung in den Gehirnen von SIDS-Opfern in Bezug gesetzt werden, da die Mikroglia nach ihrer Aktivierung durch immunologische oder hypoxische Prozesse im ZNS proinflammatorische Zytokine produziert, welche schließlich im Liquor nachweisbar sind. Die Gemeinsamkeiten, die die plötzlichen Todesfälle durch SIDS bzw. Infektionen aufweisen, lassen auch den denkbaren Schluss zu, dass es bei SIDS möglicherweise zu einer Überreaktion des Immunsystems, auch des ZNS, bei einer eigentlich benignen und subakut verlaufenden Infektion kommt, die schließlich in einer tödlichen Kaskade enden könnte.

Möglicherweise spielt die Mikroglia bei SIDS eine ähnlich fatale Rolle wie offenbar bei der Pathogenese von MS (Gonzalez-Scarano und Baltuch 1999) und ADC (Wesselingh et al 1997) (siehe 1.2.3.). Bei diesen Krankheitsbildern vermitteln und unterhalten die Mikrogliazellen einen chronischen Entzündungsprozess, der schließlich zu schweren neurologischen Ausfällen führt. Das kindliche Gehirn wäre gegenüber schädigenden inflammatorischen Einflüssen vermutlich noch weit empfindlicher als das reife Hirn eines Erwachsenen.

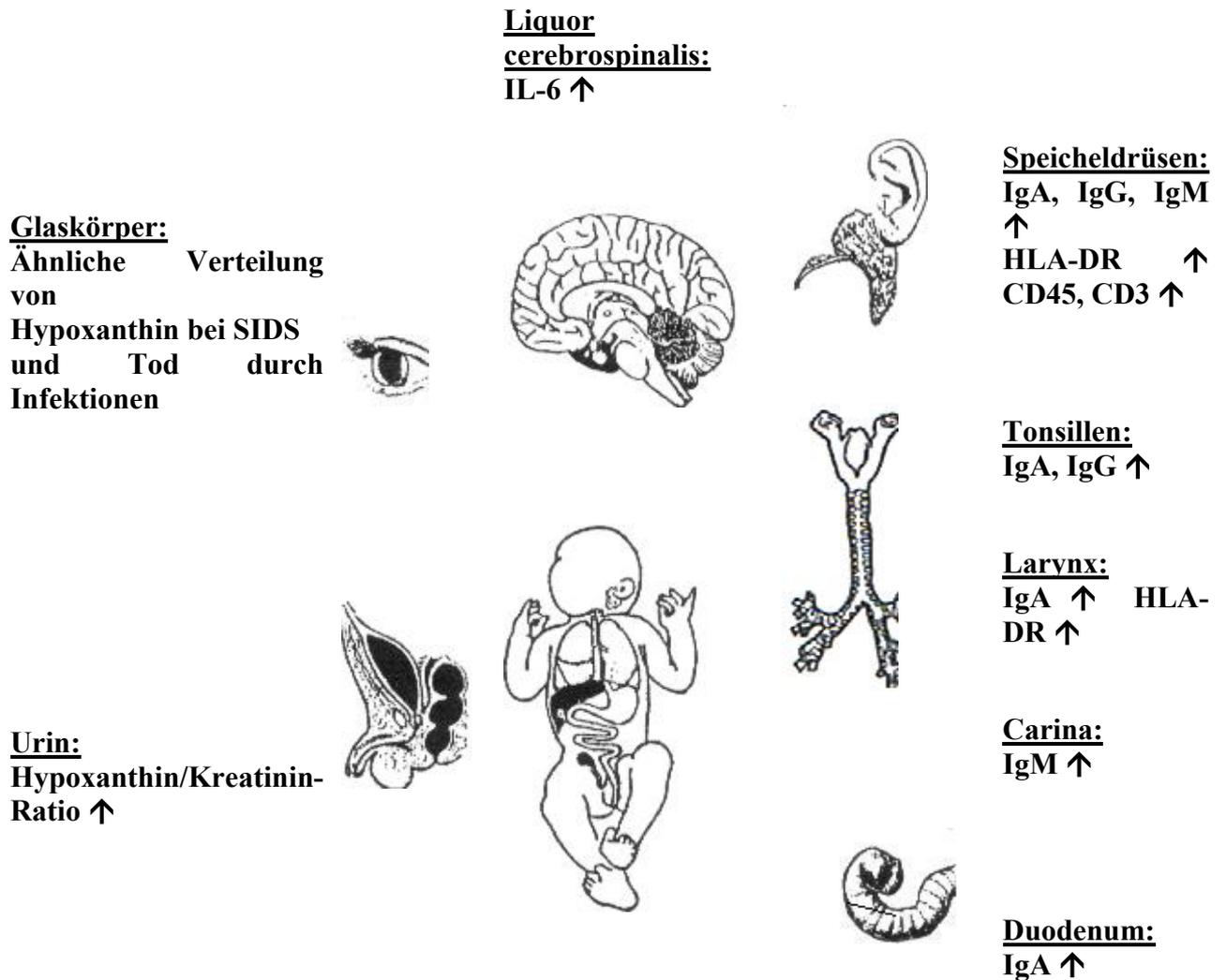


Abbildung 4.1. Zusammenfassung von gemeinsamen immunologischen und biochemischen Befunden, die sowohl bei SIDS als auch bei Tod durch Infektion erhoben wurden (nach Vege und Rognum 1999)

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Entdeckung eines Proteins durch Wolozin et al. (1986), welches in 15-30-fach größeren Mengen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten im

Vergleich mit normalen Gehirnen nachgewiesen wurde. Dieser Nachweis gelang immunhistochemisch mit dem so bezeichneten Antikörper Alz-50 (Wolozin et al. 1987).

Ein paar Jahre später berichteten Sparks und Hunsaker (1991) über eine erhöhte Dichte von Alz-50 immunreaktiven Neuronen im Hippocampus bei SIDS-Kindern verglichen mit Kontrollen (Sparks und Hunsaker 1991), außerdem fanden sich vermehrt Alz-50 immunreaktive Neurone in Regionen der dorsalen Medulla, dem Nucl.solitarii, Nucl.ambiguus sowie dem RAAS (Sparks et al. 1996). Diese Parallele zu Gehirnen von Patienten mit der Alzheimer'schen Krankheit brachte die Autoren dazu, mithilfe einer Iktin histochemischen Methode nach einer Mikrogliaaktivierung als mögliche weitere Gemeinsamkeit zu suchen. Sie fanden im Hippocampus bei 5 von 9 SIDS-Opfern eine Aktivierung der Mikroglia im frühen Stadium, während keines von 7 Kontroll-Kindern solche Veränderungen zeigte. Diese unveröffentlichten Beobachtungen wurden nicht detaillierter erläutert (Sparks und Hunsaker 2002).

Esiri et al. (1991) wiesen schon etwas früher mithilfe der monoklonalen Antikörper EBM11 und HLA-DR Mikrogliazellen im kindlichen Gehirn nach. In dieser Studie zeigte sich bei einem von 4 SIDS-Opfern eine erhöhte Anzahl von Mikrogliazellen in der periventrikulären weißen Substanz (Esiri et al. 1991).

Oehmichen et al. (1998) wiesen immunzytochemisch in nahezu allen untersuchten Hirnregionen (Hippocampus, Kerngebiete der Medulla oblongata) Alz-50 immunreaktive Neurone nach, sowohl in der SIDS-, als auch der Gruppe mit akuter Hypoxie (ohne Reperfusion) sowie der Gruppe mit subakuter Hypoxie (mit Reperfusion). In den SIDS-Gehirnen exprimierten nahezu 100% aller Neuronen Alz-50, während es sowohl bei den

akuten wie auch den subakuten Hypoxie-Kontrollfällen im Hippocampus und dem Nucleus olivaris inferior signifikant weniger waren (Oehmichen et al. 1998).

Ausgehend von Erkenntnissen über die Induktion von Alz-50 Immunreaktivität durch Ischämie (Dewar und Dawson 1995; Uchihara et al. 1995) schlossen die Autoren auf ein hypoxisch/ischämisches Ereignis bei SIDS, welches allerdings eine andere Qualität bezüglich Dauer oder Intensität gegenüber den Hypoxie-Kontrollen haben müsse; gleichzeitig betonten sie den Wert des Alz-50 Antikörpers als möglichen Marker zur Diagnosestellung von SIDS (Oehmichen et al. 1998).

Allerdings führten diese gefundenen neuropathologischen Gemeinsamkeiten zwischen SIDS und der neurodegenerativen Alzheimer'schen Erkrankung auch zu dem möglichen Schluss, dass es sich bei SIDS ebenfalls primär um eine neurodegenerative Veränderung im Sinne einer gesteigerten Apoptose im sich entwickelnden Gehirn handeln könnte (Sparks et al. 1996).

Eine Studie mit 29 SIDS- und 9 Kontrollfällen wies mithilfe einer Methode, die spezifisch fragmentierte DNA in situ aufzeigt, bei 79% der SIDS-Fälle eine signifikante Apoptose von Neuronen nach, sowohl im Hippocampus (55%) als auch im Hirnstamm (96%), während sich bei den Kontrollen keine signifikante Apoptose zeigte (Waters et al. 1999). Die Autoren interpretierten die Ergebnisse als Folge einer kürzlich abgelaufenen hypoxischen ZNS-Schädigung und postulierten wiederholte hypoxische Episoden, die in besonders hypoxie-vulnerablen Regionen wie dem Hirnstamm zu signifikantem Verlust von Neuronen und damit einem Funktionsausfall führen könnten (Waters et al. 1999).

Wie bereits oben beschrieben spielt die Mikroglia eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von apoptotischen Partikeln, wobei es jedoch nicht zur Formierung von mikroglialen phagozytotischen Herden kommt (Streit 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene regionenabhängig mehr oder weniger ausgeprägte, erhöhte Dichte an Mikrogliazellen bei SIDS wäre vereinbar mit einer subkortikal betonten gesteigerten Apoptose, was insbesondere in Bereichen der vitalen Zentren des Hirnstamms fatale Folgen haben könnte.

Die Frage, ob es sich hierbei um eine Hypoxie-induzierte gesteigerte Apoptose handelt (Waters et al. 1999), oder ob der signifikant vermehrte Verlust von Neuronen möglicherweise auf degenerativen Prozessen wie bei der Alzheimer-Demenz (Sparks und Hunsaker 2002) bzw. Mikroglia-vermittelter Neurotoxizität (Bitting et al. 1996) beruht, konnte bisher nicht geklärt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben einen weiteren starken Hinweis darauf, dass es bei SIDS zu neuropathologischen Veränderungen kommt, die erst mittels morphometrischer Methoden erfasst werden konnten. Die subkortikal betonte Aktivierung der Mikroglia bei SIDS zeigt, dass die Gehirne dieser Kinder nicht als unauffällig anzusehen sind, auch wenn makro- und mikroskopisch zunächst keine pathologischen Befunde erhoben werden konnten. Die Mikrogliazellen stellen ein hochsensibles Überwachungssystem im Gehirn dar, das dessen strukturelle und molekulare Homöostase permanent kontrolliert. Aufgrund der aktuellen Kenntnisse über Rolle und Funktion der Mikroglia im kindlichen ZNS ist die aufgezeigte Aktivierung bei SIDS als Reaktion auf einen wie auch immer gearteten Prozess der Störung des Gleichgewichts des ZNS zu werten. In Frage kommen dabei vor allem Hypoxie/Ischämie, Infektion bzw. überschüssige immunologische Aktivierung sowie ein primär degenerativer oder apoptotischer Prozess. Die sich auf mehrere Gehirnregionen erstreckende Mikrogliaaktivierung lässt eine lokal beschränkte Ischämie eher unwahrscheinlich

erscheinen, bestätigt aber die Möglichkeit eines generalisierten, eventuell rezidivierenden hypoxischen Schadens, z. B. ausgelöst durch wiederkehrende Apnoephasen.

Die Rolle der Mikroglia als primäre Immunzellen des Gehirns lassen auch eine infektiöse Ursache ihrer Aktivierung nicht ausschließen. Die gefundene Erhöhung der Mikroglia-Dichte wäre gut vereinbar mit den anderen dokumentierten Gemeinsamkeiten zwischen Opfern von SIDS und Infektionen (Abbildung 4.1.).

Letztlich kann auch ein primär apoptotischer Prozess ungeklärter Genese nicht ausgeschlossen werden, da auch in diesem Fall eine Mikrogliaaktivierung sehr wahrscheinlich wäre. Dabei könnte die Degeneration wichtiger kreislauf- und atmungsregulatorischer Neuronenzentren eine Erklärung für den Tod der Kinder sein.

Auf der anderen Seite darf auch die Tatsache nicht außer Acht gelassen werden, dass die Mikroglia v.a. über die Produktion von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies selbst ein zytotoxisches Potential besitzt, was in Zusammenhang mit diversen degenerativen und infektiösen Erkrankungen des ZNS nachgewiesen wurde (Boje und Arora 1992; Bo et al. 1994; Wilt et al. 1995). Damit wäre es denkbar, dass Mikrogliazellen nach Aktivierung auch bei SIDS im Gehirn Schäden verursachen, die ihren Teil zur Pathogenese von SIDS beitragen könnten.

Aufgrund der immer noch hohen Inzidenz von SIDS und dem großen Leid, das dieser plötzliche Tod über Familien bringt, ist es notwendig, weitere Untersuchungen vorzunehmen, die sich mit den möglichen neuropathologischen Veränderungen bei SIDS sowie deren Ursachen beschäftigen, um letztlich mit Kenntnis der Pathogenese wirksame Prophylaxe- und Therapiestrategien zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Fragestellung: Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem plötzlichen Kindstod (SIDS) und dem Auftreten RCA-1 positiver Mikrogliazellen in den Gehirnen der Opfer zu beleuchten. Ausgangspunkt sind diverse beschriebene neuropathologische Veränderungen bei SIDS und die zentrale Bedeutung der Mikroglia für die Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase im ZNS.

Material und Methoden: Aus einer Stichprobe von 23 an SIDS verstorbenen Kindern sowie 22 durch autoptisch gesicherte bekannte Todesursachen verstorbenen Kontrollfällen wurden Gewebsschnitte aus dem Gehirn entnommen und histologisch verarbeitet. Die Präparate wurden mit dem Lektin RCA-1 behandelt, welches durch Bindung an einen Galaktose-Rest nahezu selektiv die Mikroglia-Zellen über eine Farbreaktion sichtbar macht. Anschließend wurden bei 400-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop die RCA-1 positiven Zellen nach genau festgelegten Kriterien in 25 Hirnregionen ausgezählt. Mithilfe statistischer Methoden konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob in den verschiedenen Regionen signifikante Unterschiede in der Dichte RCA-1 positiver Mikrogliazellen zwischen den beiden Gruppen bestehen.

Ergebnisse: Es zeigte sich in 22 der ausgewerteten Regionen eine Zunahme der RCA-1 positiven Mikrogliazellen in der SIDS-Gruppe, davon handelte es sich in 6 Regionen um eine statistisch signifikante Zunahme ($p < 0,05$). Der Anstieg in der Dichte der Mikroglia bei SIDS trat betont in subkortikalen Arealen wie dem Thalamus, den Basalganglien sowie in Regionen der Hippocampusformation und Kerngebieten des Hirnstamms auf.

Diskussion: Die gefundene, betont subkortikal auftretende Aktivierung der Mikrogliazellen erhärtet den Verdacht eines neuropathologischen Prozesses bei SIDS, da die Mikroglia einen sehr sensitiven Marker für eine Störung des Gleichgewichts im ZNS darstellt. Aufgrund der aktuellen Kenntnisse von den Funktionen und Reaktionsmustern der Mikrogliazellen müssen v.a. die Aspekte einer chronischen Hypoxie, eines infektiösen bzw. immunologischen Prozesses sowie eines primär neurodegenerativen Schadens bei SIDS in die Diskussion miteinbezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

National Institutes of Health. Consensus Development conference on infantile apnea and home monitoring. Sept 29 to Oct 1, 1986. *Pediatrics* 79:292-299, 1987.

American Academy of Pediatrics AAP Task Force on Infant Positioning and SIDS: Positioning and SIDS. *Pediatrics* 89:1120-1126, 1992.

Acarin L, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* 42:1033-1041, 1994.

Adamson DC, Wildemann B, Sasaki M, Glass JD, McArthur JC, Christov VI, Dawson TM, Dawson VL. Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science* 274:1917-1921, 1996.

Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res* 117:145-152, 1999.

Aloisi F, Penna G, Cerase J, Menendez IB, Adorini L. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol* 159:1604-1612, 1997.

Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21:141-147, 2000.

Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179, 2001.

An SF, Gould S, Keeling JW, Fleming KA. Role of respiratory viral infection in SIDS: detection of viral nucleic acid by in situ hybridization. *J Pathol* 171:271-278, 1993.

Andersson PB, Perry VH, Gordon S. The kinetics and morphological characteristics of the macrophage-microglial response to kainic acid-induced neuronal degeneration. *Neuroscience* 42:201-214, 1991.

Andjelkovic AV, Nikolic B, Pachter JS, Zecevic N. Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Res* 814:13-25, 1998.

Ashwell K. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev Brain Res* 58:1-12, 1991.

Bass M, Kravath RE, Glass L. Death-scene investigation in sudden infant death. *N Engl J Med* 315:100-105, 1986.

Becher B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29:293-304, 2000.

Bell MJ, Robertson CS, Kochanek BM, Goodman JC, Gopinath SP, Carcillo JA, Clark RS, Marion DW, Mi Z, Jackson EK. Interstitial brain adenosin and xanthine increase during

jugular venous oxygen desaturations in humans after traumatic brain injury. *Crit Care Med* 29:399-404, 2001.

Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:259-275, 1998.

Bergman AB, Beckwith JB, Ray CG (eds). Sudden infant death syndrome. Proceedings of the Second International Conference on causes of sudden death in infants. University of Washington Press, Seattle, S 17-18, 1970.

Bitting L, Naidu A, Cordell B, Murphy GM, Jr. Beta-amyloid peptide secretion by a microglial cell line is induced by beta-amyloid-(25-35) and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 271:16084-16089, 1996.

Blackwell CC, Weir DM. The role of infection in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25:1-6, 1999.

Blackwell CC, MacKenzie DAC, James VS, Elton RA, Zorgani AA, Weir DM, Busuttill A. Toxigenic bacteria and sudden infant death syndrome (SIDS): nasopharyngeal flora during the first year of life. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25:51-58, 1999.

Blair PS, Nadin P, Cole TJ, Fleming PJ, Smith IJ, Platt MW, Berry PJ, Golding J. Weight gain and sudden infant death syndrome: changes in weight z scores may identify infants at increased risk. *Arch Dis Child* 82:462-469, 2000.

Blinzinger K, Kreutzberg G. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85:145-157, 1968.

Bo L, Mork S, Kong PA, Nyland H, Pardo CA, Trapp BD. Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 51:135-146, 1994.

Bobryshev Y, Ashwell K. Ultrastructural identification of Ricinus communis agglutinin-1 positive cells in primary dissociated cell cultures of human embryonic brain. *Arch Histol Cytol* 57:481-491, 1994.

Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 587:250-256, 1992.

Boya J, Carbonell AL, Calvo J, Borregon A. Ultrastructural study on the origin of rat microglia cells. *Acta Anat (Basel)* 130:329-335, 1987.

Boya J, Calvo JL, Carbonell AL, Borregon A. A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat* 175:229-236, 1991.

Butterworth J, Tennant MC. Postmortem human brain pH and lactate in sudden infant death syndrome. *J Neurochem* 53:1494-1499, 1989.

Büttner A, Mehraein P, Weis S. Vascular changes in the cerebral cortex in HIV-1 infection. II. An immunohistochemical and lectin histochemical investigation. *Acta Neuropathol* 92:35-41, 1996.

- Byard RW. Possible mechanisms responsible for the sudden infant death syndrome. *J Paediatr Child Health* 27:147-157, 1991.
- Cao Z, Tanaka M, Regnier C, Rothe M, Yamit-hezi A, Woronicz JD, Fuentes ME, Durnin MH, Darlymple SA, Goeddel DV. NF-kappa B activation by tumor necrosis factor and interleukin-1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64:473-483, 1999.
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 22:72-85, 1998.
- Centers for Disease Control. Progress in reducing risky infant sleeping positions- 13 states, 1996-1997. *Centers for Disease Control: morbidity and mortality weekly report* 48:878-882, 1999.
- Chamak B, Dobbertin A, Mallat M. Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neuroscience* 69:177-187, 1995.
- Champagnat J, Denavit-Saubie M, Henry JL, Leviel V. Catecholaminergic depressant effects on bulbar respiratory mechanisms. *Brain Res* 160:57-68, 1979.
- Chavanet P, Bonnotte B, Guiguet M, Zeller V, Solary E, Maurice L, Casasnovas O, Caillot D, Waldner A, Kisterman JP. High concentrations of intrathecal interleukin-6 in human bacterial and nonbacterial meningitis. *J Infect Dis* 166:428-431, 1992.
- Clancy RR, Spitzer AR. Cerebral cortical function in infants at risk for sudden infant death syndrome. *Ann Neurol* 18:41-47, 1985.
- Colton CA, Gilbert DL. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett* 223:284-288, 1987.
- Colton CA, Snell J, Chernyshev O, Gilbert DL. Induction of superoxide anion and nitric oxide production in cultured microglia. *Ann N Y Acad Sci* 738:54-63, 1994.
- Coquerel A, Buser M, Tayot J, Pfaff F, Matray F, Proust B. Beta-endorphin and neurotensin in brainstem and cerebrospinal fluid in the sudden infant death syndrome. *Neurochem Int* 20:97-102, 1992.
- Cornwell AC, Feigenbaum P, Kim A. SIDS, abnormal nighttime REM sleep and CNS immaturity. *Neuropediatrics* 29:72-79, 1998.
- Crawley BA, Morris JA, Drucker DB, Barson AJ, Morris J, Knox WF, Oppenheim BA. Endotoxin in blood and tissue in the sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25:131-135, 1999.
- Cuadros MA, Martin C, Coltey P, Almendros A, Navascues J. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol* 330:113-129, 1993.
- Cuadros MA, Moujahid A, Quesada A, Navascues J. Development of microglia in the quail optic tectum. *J Comp Neurol* 348:207-224, 1994.

- Cuadros MA, Rodriguez-Ruiz J, Calvente R, Almendros A, Marin-Teva JL, Navascues J. Microglia development in the quail cerebellum. *J Comp Neurol* 389:390-401, 1997.
- Cuadros MA, Navascues J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173-189, 1998.
- Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B. Expression of LFA-1alpha and ICAM-1 in the developing rat brain: a potential mechanism for the recruitment of microglial cell precursors. *Dev Brain Res* 103:163-170, 1997 (a).
- Dalmau I, Finsen B, Tonder N, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J Comp Neurol* 377:70-84, 1997 (b).
- Damjanov I. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab Invest* 57:5-20, 1987.
- Del Bigio MR, Becker LE. Microglial aggregation in the dentate gyrus: a marker of mild hypoxic-ischaemic brain insult in human infants. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20:144-151, 1994.
- del Rio-Hortega P. Microglia. In: W Penfield, PB Hoeber (eds): *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* 2. New York, S 483-534, 1932.
- Delgado R, Carlin A, Airaghi L, Demitri MT, Meda L, Galimberti D, Baron P, Lipton JM, Catania A. Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J Leukoc Biol* 63:740-745, 1998.
- Denoroy L, Kopp N, Gay N, Bertrand E, Pujol JF, Gilly R. [Activities of enzymes synthesizing catecholamines in areas of the brain stem in sudden infant death]. *C R Seances Acad Sci D* 291:245-248, 1980.
- Dev NB, Loeschcke HH. A cholinergic mechanism involved in the respiratory chemosensitivity of the medulla oblongata in the cat. *Pflugers Arch* 379:29-36, 1979.
- Dewar D, Dawson D. Tau protein is altered by focal cerebral ischaemia in the rat: an immunohistochemical and immunoblotting study. *Brain Res* 684:70-78, 1995.
- Diestel A, Aktas O, Hackel D, Hake I, Meier S, Raine CS, Nitsch R, Zipp F, Ullrich O. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med* 198:1729-1740, 2003.
- Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* 44:153-205, 1989.
- Douglas AS, Allan TM, Helms PJ. Seasonality and the sudden infant death syndrome during 1987-9 and 1991-3 in Australia and Britain. *BMJ* 312:1381-1383, 1996.
- Dwyer T, Ponsonby AL. SIDS epidemiology and incidence. *Pediatr Ann* 24:350-356, 1995.

- Egensperger R, Maslim J, Bisti S, Hollander H, Stone J. Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells). *Dev Brain Res* 97:1-8, 1996.
- Ehlers MR. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* 2:289-294, 2000.
- Esiri MM, Booss J. Comparison of methods to identify microglial cells and macrophages in the human central nervous system. *J Clin Pathol* 37:150-156, 1984.
- Esiri MM, al Izzi MS, Reading MC. Macrophages, microglial cells, and HLA-DR antigens in fetal and infant brain. *J Clin Pathol* 44:102-106, 1991.
- Falck G, Rajs J. Brain weight and sudden infant death syndrome. *J Child Neurol* 10:123-126, 1995.
- Fedoroff S. Development of microglia. In: H Kettenman, BR Ransom (eds): *Neuroglia*. Oxford University Press, New York, S 162-181, 1995.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120:393-399, 1997.
- Ferrer I, Bernet E, Soriano E, del Rio T, Fonseca M. Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39:451-458, 1990.
- Firstman R, Talan J. *The deaths of innocents. A true story of murder, medicine and high-stake science*. Bantam, New York 1997.
- Flaris NA, Densmore TL, Molleston MC, Hickey WF. Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia* 7:34-40, 1993.
- Fleming PJ, Gilbert R, Azaz Y, Berry PJ, Rudd PT, Stewart A, Hall E. Interaction between bedding and sleeping position in the sudden infant death syndrome: a population based case-control study. *BMJ* 301:85-89, 1990.
- Fontana A, Fierz W, Wekerle H. Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* 307:273-276, 1984.
- Forsyth KD, Weeks SC, Koh L, Skinner J, Bradley J. Lung immunoglobulins in the sudden infant death syndrome. *BMJ* 298:23-26, 1989.
- Forsyth KD, Atthowe J. Immune responses in SIDS. In: TO Rognum (ed): *Sudden Infant Death Syndrome: New Trends in the 90s*. Scandinavian University Press, Oslo, S 182-188, 1995.
- Forsyth KD. Immune and inflammatory responses in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25:79-83, 1999.

- Franco P, Szliwowski H, Dramaix M, Kahn A. Polysomnographic study of the autonomic nervous system in potential victims of sudden infant death syndrome. *Clin Auton Res* 8:243-249, 1998.
- Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol* 19:689-694, 1989.
- Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and production of cytokines depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol* 152:2720-2728, 1994.
- Fujimoto E, Miki A, Mizoguti H. Histochemical studies of the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks. *Histochemistry* 87:209-216, 1987.
- Gabuzda DH, Ho DD, de la Monte SM, Hirsch MS, Rota TR, Sobel RA. Immunohistochemical identification of HTLV-III antigen in brains of patients with AIDS. *Ann Neurol* 20:289-295, 1986.
- Gaillard JM. Biochemical pharmacology of paradoxical sleep. *Br J Clin Pharmacol* 16 Suppl 2:205S-230S, 1983.
- Gallyas F. Silver impregnation method for microglia. *Acta Neuropathol* 3:206-209, 1963.
- Gehrmann J, Bonnekoh P, Miyazawa T, Hossmann KA, Kreutzberg GW. Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:257-269, 1992. (a)
- Gehrmann J, Bonnekoh P, Miyazawa T, Oeschles U, Dux E, Hossmann KA, Kreutzberg GW. The microglial reaction in the rat hippocampus following global ischemia: immunoelectron microscopy. *Acta Neuropathol* 84:588-595, 1992. (b)
- Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Rev* 20:269-287, 1995.
- Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2499-2504, 1996.
- Gibson E, Cullen JA, Spinner S, Rankin K, Spitzer AR. Infant sleep position following new AAP guidelines. *American Academy of Pediatrics. Pediatrics* 96:69-72, 1995.
- Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci* 8:2485-2490, 1988.
- Giulian D, Johnson B, Krebs JF, George JK, Tapscott M. Microglial mitogens are produced in the developing and injured mammalian brain. *J Cell Biol* 112:323-333, 1991.

- Giulian D, Li J, Bartel S, Broker J, Li X, Kirkpatrick JB. Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte. *J Neurosci* 15:7712-7726, 1995.
- Giulian D, Haverkamp LJ, Yu JH, Karshin W, Tom D, Li J, Kirkpatrick J, Kuo LM, Roher AE. Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J Neurosci* 16:6021-6037, 1996.
- Glabinski AR, Balasingam V, Tani M, Kunkel SL, Strieter RM, Yong VW, Ransohoff RM. Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J Immunol* 156:4363-4368, 1996.
- Glabinski AR, Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol* 5:3-12, 1999.
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22:219-240, 1999.
- Gozal D, Colin AA, Daskalovic YI, Jaffe M. Environmental overheating as a cause of transient respiratory chemoreceptor dysfunction in an infant. *Pediatrics* 82:738-740, 1988.
- Graeber MB, Streit WJ. Perivascular microglia defined. *Trends Neurosci* 13:366, 1990.
- Gupta R, Helms PJ, Jolliffe IT, Douglas AS. Seasonal variation in sudden infant death syndrome and bronchiolitis--a common mechanism? *Am J Respir Crit Care Med* 154:431-435, 1996.
- Hamilton SP, Rome LH. Stimulation of in vitro myelin synthesis by microglia. *Glia* 11:326-335, 1994.
- Hanisch UK, Lyons SA, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Kettenmann H, Kirchhoff F. Mouse brain microglia express interleukin-15 and its multimeric receptor complex functionally coupled to Janus kinase activity. *J Biol Chem* 272:28853-28860, 1997.
- Harper RM, Leake B, Hoffman H, Walter DO, Hoppenbrouwers T, Hodgman J, Serman MB. Periodicity of sleep states is altered in infants at risk for the sudden infant death syndrome. *Science* 213:1030-1032, 1981.
- Harrison LM, Morris JA, Telford DR, Brown SM, Jones K. The nasopharyngeal bacterial flora in infancy: effects of age, gender, season, viral upper respiratory tract infection and sleeping position. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25:19-28, 1999.
- Hayes GM, Woodroffe MN, Cuzner ML. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J Neurol Sci* 80:25-37, 1987.
- Hedges S, Svensson M, Svanborg C. Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation in vitro. *Infect Immun* 60:1295-1301, 1992.
- Hickey WF and Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292, 1988.

- Ho GY, Windsor HM, Snowball B, Marshall BJ. *Helicobacter pylori* is not the cause of sudden infant death syndrome (SIDS). *Am J Gastroenterol* 96:3288-3294, 2001.
- Hori T, Nishiyama F, Matsutani M, Teramoto A, Takakura K, Sano K, Hirano H. Lectin-binding sites of the human pituitary adenoma cells by means of the ferritin-labeling technique. *Acta Neuropathol* 56:67-74, 1982.
- Horne RS, Franco P, Adamson TM, Groswasser J, Kahn A. Effects of body position on sleep and arousal characteristics in infants. *Early Hum Dev* 69:25-33, 2002.
- Houssiau FA, Bukasa K, Sindic CJ, Van Damme J, Van Snick J. Elevated levels of the 26K human hybridoma growth factor (interleukin 6) in cerebrospinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system. *Clin Exp Immunol* 71:320-323, 1988.
- Hulette CM, Downey BT, Burger PC. Macrophage markers in diagnostic neuropathology. *Am J Surg Pathol* 16:493-499, 1992.
- Humphrey MF, Moore SR. Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions. *Glia* 16:325-341, 1996.
- Hurley SD, Streit WJ. Microglia and the mononuclear phagocyte system. In: Ling EA, Tan CK, Tan CBC (eds): *Topical issues of microglial research*. Singapore Neuroscience Association, S 1-19, 1996.
- Hurley SD, Walter SA, Semple-Rowland SL, Streit WJ. Cytokine transcripts expressed by microglia in vitro are not expressed by amoeboid microglia of the developing rat central nervous system. *Glia* 25:304-309, 1999.
- Hutchins KD, Dickson DW, Rashbaum WK, Lyman WD. Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Dev Brain Res* 55:95-102, 1990.
- Ibrahim MZ, Khreis Y, Koshayan DS. The histochemical identification of microglia. *J Neurol Sci* 22:211-233, 1974.
- Innocenti GM, Clarke S, Koppel H. Transitory macrophages in the white matter of the developing visual cortex. II. Development and relations with axonal pathways. *Brain Res* 313:55-66, 1983.
- Ivacko J, Szaflarski J, Malinak C, Flory C, Warren JS, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:759-770, 1997.
- Jander S, Pohl J, D'Urso D, Gillen C, Stoll G. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. *Am J Pathol* 152:975-982, 1998.
- Jeffery HE, Megevan A, Page H. Why the prone position is a risk factor for sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 104:263-269, 1999.

Johnson JK, Berman NE. A transient phase of cell death in the developing medial forebrain of the perinatal ferret. *Dev Brain Res* 94:159-165, 1996.

Jones AM, Weston JT. The examination of the sudden infant death syndrome infant: investigative and autopsy protocols. *J Forensic Sci* 21:833-841, 1976.

Jones KL, Krous HF, Nadeau J, Blackbourne B, Zielke HR, Gozal D. Vascular endothelial growth factor in the cerebrospinal fluid of infants who died of sudden infant death syndrome: evidence for antecedent hypoxia. *Pediatrics* 111:358-363, 2003.

Jordan FL, Thomas WE. Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res* 472:165-178, 1988.

Jorgensen MB, Finsen BR, Jensen MB, Castellano B, Diemer NH, Zimmer J. Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp Neurol* 120:70-88, 1993.

Kahn A, Riazi J, Blum D. Oculocardiac reflex in near miss for sudden infant death syndrome infants. *Pediatrics* 71:49-52, 1983.

Kahn A, Blum D, Rebuffat E, Sottiaux M, Levitt J, Bochner A, Alexander M, Grosswasser J, Muller MF. Polysomnographic studies of infants who subsequently died of sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 82:721-727, 1988.

Kahn A, Grosswasser J, Rebuffat E, Sottiaux M, Blum D, Foerster M, Franco P, Bochner A, Alexander M, Bachy A. Sleep and cardiorespiratory characteristics of infant victims of sudden death: a prospective case-control study. *Sleep* 15:287-292, 1992.

Kerr JR, Al Khattaf A, Barson AJ, Burnie JP. An association between sudden infant death syndrome (SIDS) and *Helicobacter pylori* infection. *Arch Dis Child* 83:429, 2000.

Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, Banati R, Kreutzberg G. Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages. *J Neurosci Res* 26:278-287, 1990.

Kiefer R, Schweitzer T, Jung S, Toyka KV, Hartung HP. Sequential expression of transforming growth factor-beta1 by T-cells, macrophages, and microglia in rat spinal cord during autoimmune inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:385-395, 1998.

Kim WK, Kan Y, Ganea D, Hart RP, Gozes I, Jonakait GM. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor-alpha production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci* 20:3622-3630, 2000.

Kinney HC, Burger PC, Harrell FE, Jr., Hudson RP, Jr. 'Reactive gliosis' in the medulla oblongata of victims of the sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 72:181-187, 1983.

Kinney HC, Brody BA, Finkelstein DM, Vawter GF, Mandell F, Gilles FH. Delayed central nervous system myelination in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:29-48, 1991.

- Kinney HC, Filiano JJ, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, White WF. Decreased muscarinic receptor binding in the arcuate nucleus in sudden infant death syndrome. *Science* 269:1446-1450, 1995.
- Kinney HC, Filiano JJ, Assmann SF, Mandell F, Valdes-Dapena M, Krous HF, O'Donnell T, Rava LA, Frost WW. Tritiated-naloxone binding to brainstem opioid receptors in the sudden infant death syndrome. *J Auton Nerv Syst* 69:156-163, 1998.
- Kitchens RL. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem Immunol* 74:61-82, 2000.
- Kleemann WJ, Schlaud M, Poets CF, Rothamel T, Troger HD. Hyperthermia in sudden infant death. *Int J Legal Med* 109:139-142, 1996.
- Klonoff-Cohen HS, Srinivasan IP, Edelstein SL. Prenatal and intrapartum events and sudden infant death syndrome. *Paediatr Perinat Epidemiol* 16:82-89, 2002.
- Konno H, Yamamoto T, Iwasaki Y, Suzuki H, Saito T, Terunuma H. Wallerian degeneration induces Ia-antigen expression in the rat brain. *J Neuroimmunol* 25:151-159, 1989.
- Korotzer AR, Watt J, Cribbs D, Tenner AJ, Burdick D, Glabe C, Cotman CW. Cultured rat microglia express C1q and receptor for C1q: implications for amyloid effects on microglia. *Exp Neurol* 134:214-221, 1995.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318, 1996.
- Kubo S, Orihara Y, Gotohda T, Tokunaga I, Tsuda R, Ikematsu K, Kitamura O, Yamamoto A, Nakasono I. [Immunohistochemical studies on neuronal changes in brain stem nucleus of forensic autopsied cases. II. Sudden infant death syndrome]. *Nippon Hoigaku Zasshi* 52:350-354, 1998.
- Kure K, Lyman WD, Weidenheim KM, Dickson DW. Cellular localization of an HIV-1 antigen in subacute AIDS encephalitis using an improved double-labeling immunohistochemical method. *Am J Pathol* 136:1085-1092, 1990.
- Lang R, Lustig M, Francois F, Sellinger M, Plesken H. Apoptosis during macrophage-dependent ocular tissue remodelling. *Development* 120:3395-3403, 1994.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48:405-415, 1992.
- Lazar G, Pal E. Removal of cobalt-labeled neurons and nerve fibers by microglia from the frog's brain and spinal cord. *Glia* 16:101-107, 1996.
- Leach CE, Blair PS, Fleming PJ, Smith IJ, Platt MW, Berry PJ, Golding J. Epidemiology of SIDS and explained sudden infant deaths. CESDI SUDI Research Group. *Pediatrics* 104:e43, 1999.

- Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 150:2659-2667, 1993.
- LeMay LG, Vander AJ, Kluger MJ. Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol* 258:R798-R803, 1990.
- Lewak N, van den Berg BJ, Beckwith JB. Sudden infant death syndrome risk factors. Prospective data review. *Clin Pediatr* 18:404-411, 1979.
- Ling EA. The origin and nature of microglia. In: S Fedoroff, L Hertz (eds): *Advances in Cell Neurobiology* 2. Academic Press, London, S 33-82, 1981.
- Ling EA, Kaur C, Wong WC. Light and electron microscopic demonstration of non-specific esterase in amoeboid microglial cells in the corpus callosum in postnatal rats: a cytochemical link to monocytes. *J Anat* 135:385-394, 1982.
- Ling EA, Wong WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18, 1993.
- Liu JS, Amaral TD, Brosnan CF, Lee SC. IFNs are critical regulators of IL-1 receptor antagonist and IL-1 expression in human microglia. *J Immunol* 161:1989-1996, 1998.
- Lundemose JB, Smith H, Sweet C. Cytokine release from human peripheral blood leucocytes incubated with endotoxin with and without prior infection with influenza virus: relevance to the sudden infant death syndrome. *Int J Exp Pathol* 74:291-297, 1993.
- Magnuson DS, Knudsen BE, Geiger JD, Brownstone RM, Nath A. Human immunodeficiency virus type 1 tat activates non-N-methyl-D-aspartate excitatory amino acid receptors and causes neurotoxicity. *Ann Neurol* 37:373-380, 1995.
- Mallard C, Tolcos M, Leditschke J, Campbell P, Rees S. Reduction in choline acetyltransferase immunoreactivity but not muscarinic-m2 receptor immunoreactivity in the brainstem of SIDS infants. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:255-264, 1999.
- Mallat M, Calvo CF, Dobbertin A. Recruitment of brain macrophages: roles of cytokines and extracellular matrix proteins produced by glial or neuronal cells. *Braz J Med Biol Res* 29:1173-1177, 1996.
- Mander TH, Morris JF. Development of microglia and macrophages in the postnatal rat pituitary. *Cell Tissue Res* 286:347-355, 1996.
- Maniscalco WM, Watkins RH, D'Angio CT, Ryan RM. Hyperoxic injury decreases alveolar epithelial cell expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in neonatal rabbit lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:557-567, 1997.
- Mannoji H, Yeger H, Becker LE. A specific histochemical marker (lectin *Ricinus communis* agglutinin-1) for normal human microglia, and application to routine histopathology. *Acta Neuropathol* 71:341-343, 1986.

- Marin-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascues J. Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. *Anat Embryol* 200:289-300, 1999.
- Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15809-15814, 1998.
- Marty S, Dusart I, Peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS - I. Microglia/macrophages. *Neuroscience* 45:529-539, 1991.
- Mathew RC, Gupta SK, Katayama I, Curtis J, Turk JL. Macrophage specific antigen is expressed by resting microglia in the CNS but not by Langerhans cells in the skin. *J Pathol* 141:435-440, 1983.
- Mathews TJ, MacDorman MF, Menacker F. Infant mortality statistics from the 1999 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep* 50:1-28, 2002.
- Mathisen PM, Yu M, Johnson JM, Drazba JA, Tuohy VK. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with genetically modified memory T cells. *J Exp Med* 186:159-164, 1997.
- Mattiace LA, Davies P, Yen SH, Dickson DW. Microglia in cerebellar plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 80:493-498, 1990.
- McCluskey LP, Lampson LA. Local neurochemicals and site-specific immune regulation in the CNS. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:177-187, 2000.
- McKanna JA. Primitive glial compartments in the floor plate of mammalian embryos: distinct progenitors of adult astrocytes and microglia support the notoplate hypothesis. *Perspect Dev Neurobiol* 1:245-255, 1993.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173:89-97, 2000.
- Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 19:331-338, 1996.
- Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG. Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. *Respir Physiol* 42:171-188, 1980.
- Milligan CE, Cunningham TJ, Levitt P. Differential immunochemical markers reveal the normal distribution of brain macrophages and microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 314:125-135, 1991.
- Minghetti L, Levi G. Induction of prostanoid biosynthesis by bacterial lipopolysaccharide and isoproterenol in rat microglial cultures. *J Neurochem* 65:2690-2698, 1995.
- Mistchenko AS, Diez RA, Mariani AL, Robaldo J, Maffey AF, Bayley-Bustamante G, Grinstein S. Cytokines in adenoviral disease in children: association of interleukin-6,

interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. *J Pediatr* 124:714-720, 1994.

Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ. The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:966-973, 1991.

Morris JA. The common bacterial toxins hypothesis of sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25:11-17, 1999.

Mouret J. [Biological foundations for the use of sleep privation in the treatment of depression]. *Encephale* 8:229-255, 1982.

Muller-Ladner U, Jones JL, Wetsel RA, Gay S, Raine CS, Barnum SR. Enhanced expression of chemotactic receptors in multiple sclerosis lesions. *J Neurol Sci* 144:135-141, 1996.

Nachmanoff DB, Panigrahy A, Filiano JJ, Mandell F, Sleeper LA, Valdes-Dapena M, Krous HF, White WF, Kinney HC. Brainstem 3H-nicotine receptor binding in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:1018-1025, 1998.

Naeye RL. Hypoxemia and the sudden infant death syndrome. *Science* 186:837-838, 1974.

Naeye RL. Brain-stem and adrenal abnormalities in the sudden-infant-death syndrome. *Am J Clin Pathol* 66:526-530, 1976.

Naeye RL. Sudden infant death. *Sci Am* 242:56-62, 1980.

Naeye RL, Olsson JM, Combs JW. New brain stem and bone marrow abnormalities in victims of sudden infant death syndrome. *J Perinatol* 9:180-183, 1989.

Nakajima K, Kohsaka S. Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci Res* 17:187-203, 1993.

Navia BA, Jordan BD, Price RW. The AIDS dementia complex: I. Clinical features. *Ann Neurol* 19:517-524, 1986.

Nelson EA, Taylor BJ, Weatherall IL. Sleeping position and infant bedding may predispose to hyperthermia and the sudden infant death syndrome. *Lancet* 1:199-201, 1989.

Neumann H, Boucraut J, Hahnel C, Misgeld T, Wekerle H. Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. *Eur J Neurosci* 8:2582-2590, 1996.

Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, Wekerle H. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5779-5784, 1998.

Nguyen VT, Benveniste EN. Involvement of STAT-1 and ets family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J Biol Chem* 275:23674-23684, 2000.

- Nodar RH, Lonsdale D, Orlowski JP. Abnormal brain stem potentials in infants with threatened sudden infant death syndrome. *Otolaryngol Head Neck Surg* 88:619-621, 1980.
- O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275-283, 1998.
- O'Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN. Class II transactivator and class II MHC gene expression in microglia: modulation by the cytokines TGF-beta, IL-4, IL-13 and IL-10. *Eur J Immunol* 29:1275-1285, 1999.
- Obonai T, Yasuhara M, Nakamura T, Takashima S. Catecholamine neurons alteration in the brainstem of sudden infant death syndrome victims. *Pediatrics* 101:285-288, 1998.
- Oehmichen M, Theuerkauf I, Bajanowski T, Merz H, Meissner C. Enhanced reactivity of Alz-50 antibody in brains of sudden infant death syndrome victims versus brains with lethal hypoxic/ischemic injury. Diagnostic significance after application of the ImmunoMax technique on routine paraffin material. *Acta Neuropathol* 95:280-286, 1998.
- Opdal SH, Rognum TO, Vege A, Saugstad OD. Hypoxanthine levels in vitreous humor: a study of influencing factors in sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 44:192-196, 1998.
- Orlowski JP, Lonsdale D, Nodar RH, Williams GW. Brainstem dysfunction in the infant apnea syndrome. *Clin Electroencephalogr* 13:226-232, 1982.
- Ozand PT, Tildon JT. Alterations of catecholamine enzymes in several brain regions of victims of sudden infant death syndrome. *Life Sci* 32:1765-1770, 1983.
- Panigrahy A, Filiano J, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, Krous HF, Rava LA, Foley E, White WF, Kinney HC. Decreased serotonergic receptor binding in rhombic lip-derived regions of the medulla oblongata in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:377-384, 2000.
- Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17:553-565, 1996.
- Paresce DM, Chung H, Maxfield FR. Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells. *J Biol Chem* 272:29390-29397, 1997.
- Paulus W, Roggendorf W, Kirchner T. Ki-M1P as a marker for microglia and brain macrophages in routinely processed human tissues. *Acta Neuropathol* 84:538-544, 1992.
- Pearson HE, Payne BR, Cunningham TJ. Microglial invasion and activation in response to naturally occurring neuronal degeneration in the ganglion cell layer of the postnatal cat retina. *Dev Brain Res* 76:249-255, 1993.
- Peluso R, Haase A, Stowring L, Edwards M, Ventura P. A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* 147:231-236, 1985.

Penfold PL, Madigan MC, Provis JM. Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis Neurosci* 7:383-388, 1991.

Penning R. *Rechtsmedizin systematisch*. Uni-Med Verlag, S 55-57, 1996.

Perlmutter LS, Barron E, Chui HC. Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 119:32-36, 1990.

Peterson PK, Gekker G, Hu S, Chao CC. Microglia: A "Double-Edged Sword". In: Peterson PK, Remington JS (eds): *In Defense of the Brain: Current Concepts in the Immunopathogenesis and Clinical Aspects of CNS Infections*. Blackwell Science, Oxford, S 31-55, 1997.

Pettigrew AG, Rahilly PM. Brainstem auditory evoked responses in infants at risk of sudden infant death. *Early Hum Dev* 11:99-111, 1985.

Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 114:1219-1228, 1996.

Pinholster G. SIDS paper triggers a murder charge. *Science* 264:197-198, 1994.

Prineas J.W. Pathology of multiple sclerosis. In: SE Cook (ed) *Handbook of Multiple Sclerosis*. Dekker, Monticello, NY, S 223-255, 1996.

Prinz M, Hanisch UK. Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem* 72:2215-2218, 1999.

Quattrochi JJ, McBride PT, Yates AJ. Brainstem immaturity in sudden infant death syndrome: a quantitative rapid Golgi study of dendritic spines in 95 infants. *Brain Res* 325:39-48, 1985.

Rabchevsky AG, Streit WJ. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 47:34-48, 1997.

Rao K, Lund RD. Optic nerve degeneration induces the expression of MHC antigens in the rat visual system. *J Comp Neurol* 336:613-627, 1993.

Raven C, Maverakis NH, Eveland WC, Ackermann WW. The sudden infant death syndrome: a possible hypersensitivity reaction determined by distribution of IgG in lungs. *J Forensic Sci* 23:116-128, 1978.

Riesenfeld T, Hammarlund K, Norsted T, Sedin G. Irregular breathing in young lambs and newborn infants during heat stress. *Acta Paediatr* 85:467-470, 1996.

Rognum TO, Saugstad OD, Oyasaeter S, Olaisen B. Elevated levels of hypoxanthine in vitreous humor indicate prolonged cerebral hypoxia in victims of sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 82:615-618, 1988.

Rowland M, Drumm B. *Helicobacter pylori* and sudden-infant-death syndrome. *Lancet* 357:327-327, 2001.

Sadler DW. The value of a thorough protocol in the investigation of sudden infant deaths. *J Clin Pathol* 51:689-694, 1998.

Sandyk R. The pineal gland, cataplexy, and multiple sclerosis. *Int J Neurosci* 83:153-163, 1995.

Saugstad OD. Hypoxanthine as a measurement of hypoxia. *Pediatr Res* 9:158-161, 1975

Sawaguchi T, Nelson EA, Fujita T, Sawaguchi A, Knight B. Is the incidence of SIDS increasing in Asia? *Int J Legal Med* 111:278-280, 1998.

Schechtman VL, Harper RM, Wilson AJ, Southall DP. Sleep state organization in normal infants and victims of the sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 89:865-870, 1992. (a)

Schechtman VL, Raetz SL, Harper RK, Garfinkel A, Wilson AJ, Southall DP, Harper RM. Dynamic analysis of cardiac R-R intervals in normal infants and in infants who subsequently succumbed to the sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 31:606-612, 1992. (b)

Schechtman VL, Harper RK, Harper RM. Aberrant temporal patterning of slow-wave sleep in siblings of SIDS victims. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 94:95-102, 1995.

Schellscheidt J, Oyen N, Jorch G. Interactions between maternal smoking and other prenatal risk factors for sudden infant death syndrome (SIDS). *Acta Paediatr* 86:857-863, 1997.

Schoendorf KC, Kiely JL. Relationship of sudden infant death syndrome to maternal smoking during and after pregnancy. *Pediatrics* 90:905-908, 1992.

Schwechheimer K, Weiss G, Schnabel P, Moller P. Lectin target cells in human central nervous system and the pituitary gland. *Histochemistry* 80:165-169, 1984.

Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Korner H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today* 21:110-113, 2000.

Shaw CM, Siebert JR, Haas JE, Alvord EC, Jr. Megalencephaly in sudden infant death syndrome. *J Child Neurol* 4:39-42, 1989.

Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res* 19:1-24, 1999.

Smith B, Rubinstein LJ. Histochemical observations on oxidative enzyme activity in reactive microglia and somatic macrophages. *J Pathol Bacteriol* 83:572-575, 1962.

Smith ME, van der Maesen K, Somera FP. Macrophage and microglial responses to cytokines in vitro: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. *J Neurosci Res* 54:68-78, 1998.

Sonderer B, Wild P, Wyler R, Fontana A, Peterhans E, Schwyzer M. Murine glia cells in culture can be stimulated to generate reactive oxygen. *J Leukoc Biol* 42:463-473, 1987.

Sorokin SP, Hoyt RF, Jr., Blunt DG, McNelly NA. Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. *Anat Rec* 232:527-550, 1992.

Sparks DL, Hunsaker JC, III. The pineal gland in sudden infant death syndrome: preliminary observations. *J Pineal Res* 5:111-118, 1988.

Sparks DL, Hunsaker JC, III. Increased ALZ-50-reactive neurons in the brains of SIDS infants: an indicator of greater neuronal death? *J Child Neurol* 6:123-127, 1991.

Sparks DL, Davis DG, Bigelow TM, Rasheed K, Landers TM, Liu H, Coyne CM, Hunsaker JC, III. Increased ALZ-50 immunoreactivity in sudden infant death syndrome. *J Child Neurol* 11:101-107, 1996.

Sparks DL, Hunsaker JC, III. Neuropathology of sudden infant death (syndrome): literature review and evidence of a probable apoptotic degenerative cause. *Childs Nerv Syst* 18:568-592, 2002.

Stalder AK, Pagenstecher A, Yu NC, Kincaid C, Chiang CS, Hobbs MV, Bloom FE, Campbell IL. Lipopolysaccharide-induced IL-12 expression in the central nervous system and cultured astrocytes and microglia. *J Immunol* 159:1344-1351, 1997.

Steiniger B, van der Meide PH. Rat ependyma and microglia cells express class II MHC antigens after intravenous infusion of recombinant gamma interferon. *J Neuroimmunol* 19:111-118, 1988.

Steinschneider A. Prolonged apnea and the sudden infant death syndrome: clinical and laboratory observations. *Pediatrics* 50:646-654, 1972.

Stewart AJ, Williams SM, Mitchell EA, Taylor BJ, Ford RP, Allen EM. Antenatal and intrapartum factors associated with sudden infant death syndrome in the New Zealand Cot Death Study. *J Paediatr Child Health* 31:473-478, 1995.

Stoltenberg L, Saugstad OD, Rognum TO. Sudden infant death syndrome victims show local immunoglobulin M response in tracheal wall and immunoglobulin A response in duodenal mucosa. *Pediatr Res* 31:372-375, 1992.

Streit WJ, Kreutzberg GW. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J Neurocytol* 16:249-260, 1987.

Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1:301-307, 1988.

Streit WJ, Kincaid-Colton CA. *Das Immunsystem des Gehirns. Spektrum der Wissenschaft*, Januar, S 80-85, 1996.

Streit WJ, Sparks DL. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. *J Mol Med* 75:130-138, 1997.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-581, 1999.

Streit WJ. Microglia and Macrophages in the Developing CNS. *NeuroToxicology* 22:619-624, 2001.

Sturner WQ, Lynch HJ, Deng MH, Gleason RE, Wurtman RJ. Melatonin concentrations in the sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* 45:171-180, 1990.

Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J Neuroimmunol* 30:111-120, 1990.

Takahashi K, Yamamura F, Naito M. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 45:87-96, 1989.

Takashima S, Armstrong D, Becker L, Bryan C. Cerebral hypoperfusion in the sudden infant death syndrome? Brainstem gliosis and vasculature. *Ann Neurol* 4:257-262, 1978.

Takashima S, Mito T, Becker LE. Neuronal development in the medullary reticular formation in sudden infant death syndrome and premature infants. *Neuropediatrics* 16:76-79, 1985.

Takashima S, Mito T, Yamanouchi H. Developmental brain-stem pathology in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr Jpn* 36:317-320, 1994.

Talbert DG. SIDS, surfactant, and temperature. *Lancet* 336:690, 1990.

Taylor JA, Davis RL. Risk factors for the infant prone sleep position. *Arch Pediatr Adolesc Med* 150:834-837, 1996.

Thanos S, Richter W. The migratory potential of vitally labelled microglial cells within the retina of rats with hereditary photoreceptor dystrophy. *Int J Dev Neurosci* 11:671-680, 1993.

Thery C, Chamak B, Mallat M. Cytotoxic effects of brain macrophages on developing neurons. *Eur J Neurosci* 3:1155-1164, 1991.

Trepel M. *Neurorantatomie*. Urban & Fischer, S 6-7, 1999.

Tyor WR, Glass JD, Griffin JW, Becker PS, McArthur JC, Bezman L, Griffin DE. Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol* 31:349-360, 1992.

Uchihara T, Tsuchiya K, Kondo H, Hayama T, Ikeda K. Widespread appearance of Alz-50 immunoreactive neurons in the human brain with cerebral infarction. *Stroke* 26:2145-2148, 1995.

Uchihara T, Akiyama H, Kondo H, Ikeda K. Activated microglial cells are colocalized with perivascular deposits of amyloid-beta protein in Alzheimer's disease brain. *Stroke* 28:1948-1950, 1997.

Ulvestad E, Williams K, Vedeler C, Antel J, Nyland H, Mork S, Matre R. Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for the Fc part of IgG. *J Neurol Sci* 121:125-131, 1994.

Valdes-Dapena MA. Sudden and unexpected death in infancy: a review of the world literature 1954-1966. *Pediatrics* 39:123-138, 1967.

van der Laan LJ, Ruuls SR, Weber KS, Lodder IJ, Dopp EA, Dijkstra CD. Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J Neuroimmunol* 70:145-152, 1996.

van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67:2-17, 2000.

Vass K, Lassmann H. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol* 137:789-800, 1990.

Vaughan DW, Peters A. Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscope study. *J Neurocytol* 3:405-429, 1974.

Vege A, Chen Y, Opdal SH, Saugstad OD, Rognum TO. Vitreous humor hypoxanthine levels in SIDS and infectious death. *Acta Paediatr* 83:634-639, 1994.

Vege A, Rognum TO, Scott H, Aasen AO, Saugstad OD. SIDS cases have increased levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid. *Acta Paediatr* 84:193-196, 1995.

Vege A, Rognum TO, Opdal SH. SIDS--changes in the epidemiological pattern in eastern Norway 1984-1996. *Forensic Sci Int* 93:155-166, 1998.

Vege A, Rognum TO. Inflammatory responses in sudden infant death syndrome - past and present views. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25:67-78, 1999.

Waage A, Halstensen A, Shalaby R, Brandtzaeg P, Kierulf P, Espevik T. Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. *J Exp Med* 170:1859-1867, 1989.

Wang CC, Wu CH, Shieh JY, Wen CY, Ling EA. Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. *J Anat* 189:567-574, 1996.

Waters KA, Meehan B, Huang JQ, Gravel RA, Michaud J, Cote A. Neuronal apoptosis in sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 45:166-172, 1999.

Wedgewood RJ, Benditt ER (eds). Sudden death in infants. Proceedings of the Conference on Causes of Sudden Death in Infants. September 1963, Seattle, WA. US PHS Publication No 1412, Washington, DC 1965.

Weil A, Davenport HA. Staining oligodendroglia and microglia in celloidin sections. *Arch Neurol Psychiatry* 30:175-178, 1933.

Weinstein DL, Walker DG, Akiyama H, McGeer PL. Herpes simplex virus type I infection of the CNS induces major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia. *J Neurosci Res* 26:55-65, 1990.

Weis S. Morphometry in the neurosciences. In: E Wenger, L Dimitrov (eds). *Digital Image Processing and Computer Graphics: Theory and Application*. Munich-Vienna: Oldenbourg, S 306-326, 1991.

Weis S, Neuhaus B, Mehraein P. Activation of microglia in HIV-1 infected brains is not dependent on the presence of HIV-1 antigens. *Neuroreport* 5:1514-1516, 1994.

Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 9:271-277, 1986.

Wesselingh SL, Takahashi K, Glass JD, McArthur JC, Griffin JW, Griffin DE. Cellular localization of tumor necrosis factor mRNA in neurological tissue from HIV-infected patients by combined reverse transcriptase/polymerase chain reaction in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Neuroimmunol* 74:1-8, 1997.

Wierzb-Bobrowicz T, Gwiazda E, Poszwinska Z. Morphological study of microglia in human mesencephalon during the development and aging. *Folia Neuropathol* 33:77-83, 1995.

Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, Lampert PW, Oldstone MB. Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7089-7093, 1986.

Willinger M, James LS, Catz C. Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatr Pathol* 11:677-684, 1991.

Willinger M, Hoffman HJ, Hartford RB. Infant sleep position and risk for sudden infant death syndrome: report of meeting held January 13 and 14, 1994, National Institutes of Health, Bethesda, MD. *Pediatrics* 93:814-819, 1994.

Willinger M, Hoffman HJ, Wu KT, Hou JR, Kessler RC, Ward SL, Keens TG, Corwin MJ. Factors associated with the transition to nonprone sleep positions of infants in the United States: the National Infant Sleep Position Study. *JAMA* 280:329-335, 1998.

Wilt SG, Milward E, Zhou JM, Nagasato K, Patton H, Rusten R, Griffin DE, O'Connor M, Dubois-Dalcq M. In vitro evidence for a dual role of tumor necrosis factor-alpha in human immunodeficiency virus type 1 encephalopathy. *Ann Neurol* 37:381-394, 1995.

Wolozin B, Davies P. Alzheimer-related neuronal protein A68: specificity and distribution. *Ann Neurol* 22:521-526, 1987.

Yuan H, Chan CW, Sturmer WQ, Pang SF, Brown GM. Comparison of [¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in infant cerebellum of sudden infant death syndrome and non-sudden infant death syndrome. *Neurosci Lett* 197:154-158, 1995.

Zorgani A, Essery SD, Al Madani O, Bentley AJ, James VS, MacKenzie DAC, Keeling JW, Rambaud C, Hilton J, Blackwell CC. Detection of pyrogenic toxins of *Staphylococcus aureus* in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25:103-108, 1999

7. Anhang

Tabelle 7.1. Daten der SIDS-Fälle (NB = nicht bekannt).

| Nr | Alter/ Geschlecht | Länge | Körper- gewicht | Hirn- gewicht | PM-Zeit |
|-----------|------------------------------|--------------|----------------------------|--------------------------|----------------|
| 1 | 1 Mon/M | 54 cm | 3,6 kg | 543 g | 80 Std |
| 2 | 1 Mon/M | 56 cm | 4,1 kg | 487 g | 7 Std |
| 3 | 1 Mon/W | 52 cm | 3,8 kg | 514 g | 23 Std |
| 4 | 1 Mon/W | 54 cm | 4,9 kg | 464 g | 29 Std |
| 5 | 1 Mon/W | 54 cm | 3,3 kg | 438 g | 22 Std |
| 6 | 1 Mon/W | 58 cm | 4,6 kg | 545 g | 8 Std |
| 7 | 2 Mon/W | 56 cm | 4,4 kg | 509 g | 7 Std |
| 8 | 2 Mon/W | 59 cm | 4,9 kg | 573 g | 26 Std |
| 9 | 3 Mon/M | 62 cm | 6,3 kg | 717 g | 45 Std |
| 10 | 3 Mon/W | 56 cm | 4,5 kg | 532 g | 53 Std |
| 11 | 3 Mon/W | 60 cm | 5,3 kg | 632 g | 23 Std |
| 12 | 3 Mon/W | 57 cm | 3,9 kg | 509 g | 74 Std |
| 13 | 3 Mon/W | 71 cm | 8,5 kg | 852 g | 69 Std |
| 14 | 5 Mon/M | 62 cm | 5,9 kg | 692 g | 30 Std |
| 15 | 5 Mon/M | 69 cm | 7,0 kg | 704 g | 19 Std |
| 16 | 5 Mon/M | 71 cm | 8,5 kg | 774 g | 42 Std |
| 17 | 7 Mon/W | 68 cm | 6,9 kg | 856 g | 30 Std |
| 18 | 7 Mon/M | 72 cm | 7,4 kg | 1081 g | 28 Std |
| 19 | 8 Mon/M | 71 cm | 8,7 kg | 1178 g | 5 Std |
| 20 | 10 Mon/M | 74 cm | 7,7 kg | 1030 g | 29 Std |
| 21 | 10 Mon/M | 75 cm | 8,6 kg | 1055 g | 29 Std |
| 22 | 11 Mon/W | 78 cm | 8,5 kg | 963 g | 28 Std |
| 23 | 11 Mon/M | 80 cm | 8,4 kg | 1125 g | 7 Std |

Tabelle 7.2. Daten der Kontrollfälle (NB = nicht bekannt).

| Nr | Alter/ Geschlecht | Länge | Körper- gewicht | Hirn- gewicht | PM-Zeit | Todesursache |
|-----------|------------------------------|--------------|----------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------------------|
| 1 | Neugebore/W | 43 cm | 1,5 kg | 205 g | 12 Std | Ertrinken |
| 2 | Neugebore/W | 49 cm | 2,7 kg | 335 g | 33 Std | Ertrinken |
| 3 | Neugebore/W | 53 cm | 3,3 kg | 407 g | 6 Std | Ertrinken |
| 4 | 1 Mon/M | 47 cm | 2,5 kg | 387 g | 30 Std | Blutaspiration |
| 5 | 1 Mon/W | 53 cm | 3,5 kg | NB | 30 Std | Meningitis |
| 6 | 1 Mon/M | 53 cm | 3,9 kg | NB | 32 Std | Sepsis |
| 7 | 1 Mon/M | 54 cm | 4,3 kg | 540 g | 42 Std | Ersticken |
| 8 | 1 Mon/W | 55 cm | 4,1 kg | 482 g | 10 Std | Herzfehler |
| 9 | 2 Mon/W | 58 cm | 5,1 kg | 622 g | 6 Std | anatomisch nicht eindeutig |
| 10 | 3 Mon/M | 55 cm | 5,4 kg | 539 g | 27 Std | Waterhouse- Friedrichsen Syndrom |
| 11 | 3 Mon/M | 58 cm | 3,9 kg | 530 g | 24 Std | Infekt |
| 12 | 3 Mon/M | 60 cm | 4,4 kg | 643 g | 24 Std | Stoffwechselerkrankung |
| 13 | 3 Mon/M | 64 cm | 5,1 kg | 631 g | 4 Std | Darmnekrose |
| 14 | 5 Mon/W | 65 cm | 6,7 kg | 676 g | 10 Std | anatomisch nicht eindeutig |
| 15 | 6 Mon/M | 68 cm | 7,3 kg | 816 g | 6 Std | Tötung |
| 16 | 7 Mon/M | 73 cm | 8,2 kg | 941 g | 23 Std | Aspiration |
| 17 | 10 Mon/W | 65 cm | 5,5 kg | 836 g | 76 Std | CO-Intoxikation |
| 18 | 10 Mon/M | 79 cm | 10,0 kg | 1192 g | 78 Std | Rauchgasintoxikation |
| 19 | 11 Mon/M | 73 cm | 8,8 kg | 960 g | 56 Std | Herzfehler |
| 20 | 11 Mon/M | 93 cm | 13,1 kg | 1250 g | 45 Std | Ertrinken |
| 21 | 13 Mon/W | 79 cm | 8,9 kg | NB | 38 Std | Ersticken |
| 22 | 22 Mon/W | 81 cm | 11,5 kg | 1229 g | NB | Ersticken an Erdnuss |

Tabelle 7.1. Vergleich zwischen Körperlänge, -gewicht, Hirngewicht und postmortalen Liegezeit von SIDS- und Kontrollgruppe (MW = Mittelwert; SEM = Standardfehler).

| | Kontrollen | | SIDS | | p |
|--------------------------------|-------------------|-------|-------------|-------|----------|
| | MW | SEM | MW | SEM | |
| Größe (cm) | 63 | 3.30 | 64 | 1.19 | .19 |
| Gewicht (kg) | 5.9 | 0.77 | 6.1 | 0.28 | .15 |
| Hirngewicht (g) | 697 | 61.47 | 738 | 32.43 | .53 |
| Postmortale Liegezeit (Std) | 29 | 32.56 | 31 | 3.73 | .28 |

Tabelle 7.2. Ergebnisse der lektinhistochemischen Untersuchungen in Zellen/mm²**(Abkürzungen siehe Kapitel 2.1.) (MW = Mittelwert; SEM = Standardfehler)**

| Region | Kontrollen | | SIDS | | p |
|--------|------------|------|-------|-------|------|
| | MW | SEM | MW | SEM | |
| FROCO | 11.70 | 2.21 | 15.03 | 2.07 | .27 |
| FROWM | 17.50 | 4.02 | 16.75 | 2.86 | .87 |
| ORBCO | 17.45 | 3.52 | 14.32 | 2.67 | .49 |
| ORBWM | 24.54 | 7.25 | 15.41 | 2.91 | .17 |
| OCCO | 7.75 | 1.12 | 15.23 | 2.36 | .009 |
| OCCWM | 11.71 | 2.27 | 17.66 | 2.65 | .09 |
| PARCO | 10.99 | 1.98 | 15.37 | 2.41 | .17 |
| PARWM | 15.87 | 3.43 | 18.95 | 3.00 | .50 |
| TEMCO | 9.40 | 1.67 | 13.59 | 1.98 | .11 |
| TEMWM | 12.28 | 1.69 | 17.81 | 3.62 | .18 |
| HIPCA1 | 6.91 | 2.01 | 11.90 | 2.63 | .14 |
| HIPCA4 | 16.10 | 2.92 | 26.31 | 3.93 | .04 |
| HIPGR | 10.89 | 1.73 | 16.14 | 3.77 | .22 |
| THAL | 15.69 | 1.99 | 26.16 | 4.23 | .03 |
| CAUD | 22.30 | 4.29 | 49.91 | 13.17 | .06 |
| PUT | 9.45 | 2.33 | 19.51 | 3.17 | .01 |
| CAIN | 18.27 | 3.44 | 25.73 | 4.29 | .18 |
| KHCO | 8.55 | 2.08 | 14.39 | 3.00 | .12 |
| KHWM | 23.09 | 2.67 | 27.42 | 4.37 | .41 |
| MES | 13.43 | 1.82 | 21.09 | 4.43 | .11 |
| PON | 15.18 | 2.68 | 21.95 | 2.79 | .08 |
| NCLPO | 30.20 | 9.13 | 35.77 | 9.98 | .68 |
| MED | 18.10 | 4.26 | 22.76 | 3.41 | .39 |
| OLIV | 22.62 | 4.66 | 43.12 | 8.22 | .03 |
| NIG | 15.55 | 3.46 | 45.08 | 9.44 | .005 |

7.1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| 5-HAT | 5-Hydroxytryptophan=Serotonin |
| ABC | Avidin-Biotin-Komplex |
| Ach | Acetylcholin |
| AD | Alzheimer Disease=Alzheimer'sche Krankheit |
| ADC | AIDS-Demenz-Komplex |
| Adr | Adrenalin |
| AEP | Akkustisch evoziertes Potential |
| ALTE | Apparent life-threatening event |
| α -MSH | alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon |
| APZ | Antigen-präsentierende Zellen |
| A β | Beta-Amyloid |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CD | Cluster determinant=Differenzierungsantigene |
| ChAT | Cholin-Acetyl-Transferase |
| COMT | Catechol-o-Methyltransferase |
| CR3 | Komplementrezeptor Typ 3 |
| DBH | Dopamin-beta-Hydroxylase |
| EEG | Elektroenzephalographie |
| Fc | aus konstanten Domänen der schweren Ketten gebildeter Teil der Immunglobuline |
| HIV | Human immunodeficiency virus=Humanes Immundefizienz Virus |
| HLA | Human leucocyte antigen=Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| Ig | Immunglobulin |
| Il | Interleukin |
| IP-10 | Interferon-inducible protein-10=IFN-induzierbares Protein-10 |
| LFA-1/ICAM-1 | Lymphocyte function-associated antigen/intercellular adhesion molecule |

| | |
|----------------|---|
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein=Monozytenanlockendes Protein |
| MHC | Major histocompatibility-complex=Haupthistokompatibilitäts-Genkomplex |
| MIP-1 α | Macrophage inflammatory protein-1alpha=Makrophagen-inflammatorisches Protein-1alpha |
| MS | Multiple Sklerose |
| N | Nervus |
| NA | Noradrenalin |
| Ncl | Nucleus |
| NF-kB | Nuclear factor-kappa B=Nukleärer Faktor-kappa B |
| NICHHD | National Institute of Child Health and Human Development |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NTS | Nucleus tractus solitarii |
| PCNA | Proliferating cell nuclear antigen |
| PNMT | Phenylethanolamin-N-Methyltransferase |
| PNS | Peripheres Nervensystem |
| RAAS | Retikuläres aufsteigendes aktivierendes System |
| RCA-1 | Ricinus communis Agglutinin-1 |
| SIDS | Sudden Infant Death Syndrome=Plötzlicher Kindstod |
| STAT-1 | Signal transducer and activator of transcription-1 |
| TGF- β | Transforming growth factor-beta |
| TH | Tyrosinhydroxylase |
| Th-Zellen | T-Helferzellen |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| TSST | Toxischer-Schock-Syndrom-Toxin |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| VIP | Vasoaktives intestinales Peptid |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

7.2. Datenblatt RCA-I



PRODUCT SPECIFICATIONS

Product BIOTINYLATED RICINUS COMMUNIS AGGLUTININ I
(RCA 120)

Catalog No. B-1085

Amount 5 mg

Lot No. L0106

Active Conjugate 91%

Lectin Biotinylated 95%

Protein Concentration 5.0 mg/ml

Solution 10 mM phosphate. 0.15 M NaCl. pH 7.5. 0.08% sodium azide

Storage **Refrigerate - DO NOT FREEZE**

Other Remarks:

EXERCISE CAUTION IN ITS USE! It has been found to have moderate toxicity in some animal models, but its toxicity to humans has not been fully determined, and a related protein, RCA 60, is highly toxic to humans. Never pipet solutions of this lectin by mouth. **DO NOT LYOPHILIZE!**

The recommended concentration range for use is 5-20 $\mu\text{g/ml}$.



8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Eisenmenger, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Möglichkeit, die hier vorgelegten Untersuchungen durchführen zu können.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Randolph Penning sowie meinem Mitbetreuer, Herrn Dr. med. Andreas Büttner, vom Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für ihre fachliche Unterstützung und Betreuung.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn PD Dr. Serge Weis, Neuropathologisches Labor des Stanley Medical Research Institute, Bethesda, USA, für die Hilfe bei der statistischen und neuropathologischen Auswertung.

Besonderen Dank verdienen weiterhin die technischen Assistentinnen des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München für die ausgezeichnete Arbeit. Insbesondere sind Frau Miriam Finelli und Frau Susanne Ring zu erwähnen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern dafür, dass sie mich immer unterstützt haben.

9. Lebenslauf

Michael Alexander Argirov

Persönliche Angaben:

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Geburtsdatum : 24.September 1974

Geburtsort: München

Konfession: römisch-katholisch

Ausbildung

Schule

1994 Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife am
humanistischen Wilhelmsgymnasium München

Studium

1995 Immatrikulation an der LMU München zum Studium
der Humanmedizin

28.4.2003: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der
LMU

ab 1.4.2004

AIP/Assistenzarzt an der Medizinischen Poliklinik
der LMU München

Sprachkenntnisse

Englisch, Französisch

Ersatzdienst

Sommer1994 - Herbst1995, MS-Klinik für Multiple
Sklerose