

Aus dem
Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand Prof. Dr. med. Dr. med. habil. M. Graw

**IMMUNHISTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN VON ENTZÜNDUNGSZELLEN
AN GEHIRNEN VON SIDS-FÄLLEN**

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

vorgelegt von
Michaela Maria Hengstler
aus
München
Jahr
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Büttner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Winfried Lange Priv. Doz. Dr. Uwe Hasbargen
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	15.04.2010

Widmung

Für Martin in Liebe

&

für meine Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	SIDS	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Diagnostik und typische Befunde	2
1.1.3	Epidemiologie	3
1.1.3.1	Risikofaktoren	4
1.1.3.2	Präventionsstrategien	5
1.1.4	Differentialdiagnosen	5
1.1.4.1	Infektionskrankheiten als mögliche Differentialdiagnosen.....	5
1.1.4.2	Nicht-infektiöse Krankheitsbilder als mögliche Differentialdiagnosen.....	6
1.2	Immunsystem des Gehirns	7
1.3	Ursachenforschung bei SIDS	8
1.3.1	Ursachenforschung bei SIDS außerhalb des ZNS.....	8
1.3.1.1	Helicobacter pylori und Botulismus.....	9
1.3.1.2	Genetik	9
1.3.1.3	Apnoetheorien	10
1.3.1.4	ALTE.....	11
1.3.1.5	Hypoxiemarker.....	12
1.3.1.6	Blutfluss und Kopfposition	13
1.3.1.7	Impfungen	13
1.3.2	Ursachenforschung im ZNS	14
1.3.2.1	Klinische Neuropathophysiologie	14
1.3.2.2	Chemische Neuropathologie	14

1.3.2.2.1	Neurotransmitter.....	15
1.3.2.2.2	Oxidativer Stress	17
1.3.2.3	Pathologie der verschiedenen Gehirnregionen.....	17
1.3.3	Aktueller Stand der Ursachenforschung bezüglich einer Infektionskrankheit in der Pathogenese bei SIDS	21
1.3.3.1	Hinweise auf virale Mitbeteiligung.....	22
1.3.3.2	Hinweise auf bakterielle Mitbeteiligung	22
1.4	Fragestellung	25
2.	Material und Methoden	26
2.1	Stichprobe.....	26
2.2	Untersuchungsmaterial.....	28
2.3	Immunhistochemische Untersuchungen	29
2.3.1	LCA/CD45-Färbung.....	31
2.3.2	CD3- und CD20-Färbung.....	32
2.3.3	Interleukin-6-Färbung	33
2.4	Auswertung	35
2.4.1	Mikroskopische Auswertung/Rating-Skala.....	35
2.4.2	Statistische Auswertung	35
3.	Ergebnisse.....	37
3.1	Ergebnisse der LCA/CD45-Färbung.....	37
3.1.1	Immunhistochemische Ergebnisse	37
3.1.1.1	Telencephalon, Substantia grisea	37
3.1.1.2	Telencephalon, Substantia alba	38
3.1.1.3	Telencephalon, Leptomeningen	39
3.1.1.4	Cerebellum	40

3.1.1.5	Thalamus und Basalganglien	41
3.1.1.6	Mesencephalon.....	42
3.1.1.7	Pons	43
3.1.1.8	Medulla oblongata.....	44
3.1.2	Vergleichende statistische Ergebnisse bei der LCA-Färbung.....	45
3.1.2.1	Vergleich „infektiöse“ mit „nicht-infektiösen“ Fällen.....	45
3.1.2.2	Vergleich innerhalb der gesamten Kontrollgruppe	46
3.2	Ergebnisse der CD3- und CD20-Färbung	48
3.2.1	Ergebnisse der CD3-Färbung	48
3.2.2	Ergebnisse der CD20-Färbung	49
3.3	Ergebnisse der Interleukin-6-Färbung.....	51
3.3.1	Pons, Medulla oblongata und Frontallappen.....	51
3.3.2	Vergleich der „infektiösen“ Kontrollgruppenfälle mit den „nicht-infektiösen“ Kontrollgruppenfällen bei der IL-6-Färbung	53
4.	Diskussion	55
4.1	Stichprobengröße	55
4.2	Diskussion der Methode.....	57
4.2.1	Vorbereitung, Färbung und Auswertung.....	57
4.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen	58
4.2.2.1	CD45-Antikörper	58
4.2.2.2	CD20-Antikörper	59
4.2.2.3	CD3-Antikörper	60
4.2.2.4	Interleukin-6-Antikörper	60
4.3	Diskussion der Ergebnisse	61
4.3.1	Diskussion der Ergebnisse der LCA-, CD3- und CD20-Färbungen	63

4.3.2	Diskussion der Ergebnisse der IL-6-Färbung.....	77
5.	Zusammenfassung	87
6.	Literaturverzeichnis	90
1.	Anhang	103
1.1	Abkürzungsverzeichnis	103
1.2	Daten der SIDS- und Kontrollfälle.....	105
1.2.1	Daten der SIDS- Fälle	105
1.2.2	Daten der „infektiösen“ Kontrollfälle	105
1.2.3	Daten der „nicht-infektiösen“ Kontrollfälle	106
1.3	Vergleich von Körpergröße, Gewicht, Hirngewicht und postmortaler Liegezeit	107
1.4	Tabellen der Ergebnisse	108
1.4.1	Ergebnisse der LCA-Färbung.....	108
1.4.1.1	LCA-SIDS versus Kontrollgruppe	108
1.4.1.2	LCA-„infektiöse“ Kontrollgruppe versus „nicht-infektiöse“ Fälle.....	109
1.4.1.3	LCA-„infektiöse“ Kontrollgruppe versus „nicht-infektiöse“ Kontrollgruppe ..	110
1.4.2	Ergebnisse der CD3- und CD20-Färbung	111
1.4.3	Ergebnisse der Interleukin-6-Färbung.....	113
1.4.3.1	Vergleich SIDS mit Kontrollfällen	113
1.4.3.2	IL-6: Vergleich „infektiöse“ Kontrollfälle versus „nicht-infektiöse“ Kontrollfälle	114
1.5	Chemikalien	114
1.5.1	Antikörper	114
1.5.2	Lösungen, Puffer und Kits	115
2.	Danksagung	117

3.	Lebenslauf	118
----	------------------	-----

1. Einleitung

“SIDS is defined as the sudden unexpected death of an infant <1 year of age, which onset of the fatal episode apparently occurring during sleep, that remains unexplained after a thorough investigation, including performance of a complete autopsy and review of the circumstances of death and the clinical history” (Krous et al., 2004). SIDS (sudden infant death syndrome) ist trotz intensiver Forschung bis heute eine Ausschlussdiagnose geblieben (Bajanowski et al., 2007).

1.1 SIDS

Für den plötzlichen Kindstod gibt es sowohl in der nationalen als auch in der internationalen Literatur verschiedene Bezeichnungen. Im deutschsprachigen Raum spricht man vom plötzlichen Kinds- oder Säuglingstod aber auch vom Krippentod. Im angloamerikanischen Sprachgebrauch findet sich die Bezeichnung „sudden infant death syndrome“. Die Abkürzung dafür lautet SIDS und wird in wissenschaftlichen Studien international verwendet (Beckwith, 2003).

1.1.1 Definition

Die Etablierung des plötzlichen Kindstods als Syndrom erfolgte 1969 in Form einer ersten offiziellen Definition (Willinger et al., 1991). Im Jahr 1991 wurde vom „National Institute of Child Health and Human Development“ in Seattle diese Definition unter Kenntnis neuer epidemiologischer Fakten und Risikofaktoren aktualisiert. SIDS ist „der Tod eines Kindes jünger als ein Jahr, der ungeklärt bleibt trotz einer genauen Untersuchung, einschließlich

der Durchführung einer vollständigen Autopsie, einer Todesszenenuntersuchung und der Exploration der medizinischen Vorgeschichte“ (Krous et al., 2004).

Im Jahr 2004 traf sich eine Gruppe von Experten in San Diego mit dem Ziel, eine neue allgemeingültige Definition für SIDS zu entwickeln, die für administrative Zwecke wie beispielsweise Statistiken ebenso geeignet sein sollte wie für die Forschung. Die „San Diego-Definition“ lautet: „SIDS ist definiert als der plötzliche, unerwartete Tod eines Kindes, das jünger als ein Jahr ist. Das fatale Ereignis geschieht vermutlich während des Schlafes. Auch nach eingehender Untersuchung, einschließlich der Durchführung einer vollständigen Autopsie und der Begutachtung der Todesumstände sowie der medizinischen Vorgeschichte, bleibt der Tod ungeklärt“ (Krous et al., 2004). Erstmals wurde dort eine neue Kategorie namens USID (unclassified sudden infant death) eingeführt, die alle Todesfälle einschließt, die nicht die SIDS-Kriterien erfüllen, für die andere natürliche oder unnatürliche Todesursachen aber fragwürdig erscheinen, inklusive der Fälle, bei denen keine Autopsie durchgeführt wurde (Bajanowski et al., 2007).

1.1.2 Diagnostik und typische Befunde

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Diagnose SIDS eine Ausschlussdiagnose geblieben. Säuglinge mit der Verdachtsdiagnose SIDS werden nach einem standardisierten Autopsieprotokoll untersucht. Diese Vorgehensweise stimmt mit den europäischen Richtlinien

überein, die sich eng an den internationalen Standardprotokollen orientieren (Bajanowski et al., 2007).

Dabei findet zunächst eine gründliche äußere Untersuchung einschließlich radiologischer Bildgebung statt, anschließend eine vollständige Autopsie, zusätzlich werden mikrobiolo-

gische und virologische Analysen sowie eine neuropathologische Untersuchung durchgeführt. Es folgen danach eine ausgedehnte histologische Begutachtung sowie eine vollständige chemisch-toxische Analyse nach definiertem Schema. SIDS wird nur dann diagnostiziert, wenn sich keine oder nur geringfügige pathologische Befunde zeigen, die aber als alleinige Todesursache nicht ausreichen (Bajanowski et al., 2006).

Bei den SIDS-Fällen handelt es sich meist um Kinder, die sich im Normbereich der Wachstumsperzentilen entwickelt haben. Beim Auffinden des Säuglings werden oft eine erhöhte Körpertemperatur sowie starkes Schwitzen und durchnässte Kleidung festgestellt. Zum Teil findet sich Sekret vor der Nase, das schaumig weißlich bis blutig tingiert sein kann. Die Lippen und das Nagelbett können zyanotisch sein (Zinka et al., 2004).

Es gibt typische Organbefunde, die gehäuft bei SIDS-Fällen auftreten. Sie sind dafür jedoch nicht pathognomonisch. In ca. 85% der Fälle finden sich petechiale Blutungen an Thymus, viszeraler Pleura und/oder Epikard (Byard & Krous, 2003). In 89% der Fälle zeigt sich eine Lungenkongestion und in 63% der Fälle stellen sich Lungenödeme dar (Hunt & Hauck, 2006).

1.1.3 Epidemiologie

In Deutschland war der plötzliche Kindstod 1990 mit einer Rate von 1,4 pro 1000 Lebendgeburten noch für 1283 Todesfälle verantwortlich (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2006a). Nachdem epidemiologische Studien eine Senkung des SIDS-Risikos bei Kindern gezeigt hatten, die in Rückenlage schliefen, führten viele Länder so genannte „back-to-sleep-Kampagnen“ durch, um das SIDS-Risiko zu reduzieren. Die SIDS-Rate fiel um 50% bis 90% ab (Moon et al., 2007).

Mittlerweile ist die Zahl der Kinder, die an plötzlichem Kindstod sterben, weiter gesunken über 323 Fälle im Jahr 2004, was einer Fallzahl von etwa 0,5 pro 1000 Lebendgeburten entspricht auf 259 Fälle im Jahr 2006 (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2006a & b). Der plötzliche Kindstod zählt zu den Haupttodesursachen bei Kindern im ersten Lebensjahr. Er steht in Deutschland an dritter Stelle der Todesursachen nach „bestimmten Zuständen, die ihren Ursprung in der Perinatalperiode haben“ sowie „angeborenen Fehlbildungen, Deformitäten und Chromosomenanomalien“ (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2006b). In Deutschland sterben weniger Säuglinge als im EU-Durchschnitt, die Säuglingssterblichkeitsrate liegt im europäischen Vergleich im unteren Drittel. In den Niederlanden gibt es mittlerweile nur noch 0,1 Fälle von SIDS pro Tausend Lebendgeborenen (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2006a). Im Jahr 2001 forderte SIDS in den USA 2234 Opfer (Arias et al., 2002).

1.1.3.1 Risikofaktoren

Obwohl man SIDS-Kinder in allen sozialen Schichten finden kann, ist eine niedrigere Schichtzugehörigkeit der Eltern, das junge Alter (unter 20) der Mutter, ein geringer mütterlicher Bildungsgrad sowie der Status „allein erziehend“ mit einem erhöhten SIDS-Risiko assoziiert. Weitere mütterliche Risikofaktoren sind Rauchen in und nach der Schwangerschaft sowie Alkohol- und illegaler Drogenkonsum. Einige Faktoren, die sich speziell auf die Schwangerschaft beziehen, erhöhen ebenfalls das SIDS-Risiko. Das sind kurze Zeitabstände zwischen den Schwangerschaften, intrauterine Hypoxie, fetale Wachstumsretardierung sowie die späte Inanspruchnahme der Schwangerschaftsvorsorge (Moon et al., 2007). Kindliche Risikofaktoren sind das Alter zwischen zwei und vier Monaten, das männliche Geschlecht, die Rasse, die Frühgeburtlichkeit, die Seiten- oder Bauchlage im Schlaf, ein

kürzlich vorangegangener fiebriger Infekt und die Wintermonate. Kinder ohne Schnuller, Kinder, die zu weich gebettet werden oder deren Gesichter von Kissen und Decken bedeckt werden, haben, ebenso wie Kinder, die in überhitzten Räumen oder zu warmen Kleidern schlafen, ein erhöhtes SIDS-Risiko. Das geringste SIDS-Risiko haben Säuglinge die in ihrem eigenen Bett im Elternschlafzimmer schlafen (Hunt & Hauck, 2006).

1.1.3.2 Präventionsstrategien

Die AAP (American Academy of Pediatrics) gibt seit einigen Jahren zur Prävention des plötzlichen Kindstods elf Empfehlungen an alle Eltern. Beispielsweise wird die Rückenlage unbedingt als Schlafposition empfohlen (Task Force on Sudden Infant Death Syndrome, 2005; Hunt & Hauck, 2006).

1.1.4 Differentialdiagnosen

Es gibt ein weites Spektrum an Krankheiten, das für den plötzlichen Tod von Kindern, aus scheinbar bester Gesundheit heraus, verantwortlich sein kann. Da Kinder, selbst wenn sie an ernstesten Krankheiten erkrankt sind, oft nur geringe Symptome entwickeln, müssen bei dem Verdacht auf SIDS auch unerkannte organische Krankheiten, Unfälle oder auch Tötungen differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden (Byard & Krous, 2001).

1.1.4.1 Infektionskrankheiten als mögliche Differentialdiagnosen

Die Infektionskrankheiten sind heute noch einer der Hauptgründe für Kindersterblichkeit weltweit. Vor allem in den Dritte-Welt-Ländern bedeutsam sind Gastroenteritiden und Malaria (Byard & Krous, 2001).

Bakterielle und virale Pneumonien sowie Atemwegsinfektionen können zum plötzlichen

Tod bei Kindern führen. Eine Epiglottitis sowie Myokarditiden können als Todesursache wirksam werden. Die bakterielle Meningitis, die fulminante Meningokokken-Sepsis sowie die Sepsis bei Kindern mit fehlender oder unzureichend funktionierender Milz können ebenfalls den plötzlichen Tod bei Kindern verursachen (Handy & Buchino, 1998).

1.1.4.2 Nicht-infektiöse Krankheitsbilder als mögliche Differentialdiagnosen

Drei Prozent der Todesfälle in dieser Altersklasse werden durch Unfälle verursacht. Die häufigsten Gründe für den Unfalltod sind Ertrinken, Aspiration, unfallbedingte thermische Schäden wie Verbrennungen und Verbrühungen sowie Unfälle mit motorisierten Fahrzeugen. Aber auch Vergiftungen, Stürze, Todesfälle im Rahmen eines Krankenhausaufenthalts sowie Exsikkose und Elektrolytverschiebungen bei exogener Hyperthermie zählen zu diesem Todesursachenkomplex.

Eine weitere Gruppe sind die Todesfälle durch Fremdeinwirkung. An erster Stelle stehen hier die Schädelhirntraumata einschließlich Hirnblutungen und Schütteltraumata. An zweiter Position befinden sich die Abdominaltraumata. Weitere Krankheitsbilder dieser Gruppe sind absichtlich zugefügte Verbrennungen oder Verbrühungen, Vergiftungen und Mangelernährung, sowie Verletzungen des Skelettsystems und der Haut. Ebenso finden sich hier der sexuelle Missbrauch sowie die „Münchhausen-by-proxy-Störung“.

Zuletzt gibt es noch die Gruppe der Todesfälle, die durch Krankheiten verursacht werden. In dieser Gruppe finden sich die Krankheitsbilder des kardiovaskulären Systems, die respiratorischen Krankheitsbilder, die Krankheiten des hämatopoetischen Systems, des zentralen Nervensystems, des gastrointestinalen und urogenitalen Systems. Schließlich findet sich hier die Gruppe der seltenen angeborenen endokrinen und metabolischen Krankheitsbilder wie beispielsweise das Marfan-Syndrom (Byard & Krous, 2001).

1.2 Immunsystem des Gehirns

Das ZNS selbst enthält verschiedene Zellgruppen, die zur Antigenpräsentation geeignet sind wie Astrozyten, Mikrogliazellen, Endothelzellen und Perizyten (Fabry et al., 1994). Einer der wichtigsten Schutzmechanismen des ZNS gegen externe Einflüsse ist die sogenannte Blut-Hirn-Schranke, die den Übertritt von Blutzellen in das Gehirn zum Großteil verhindert. Sie besteht aus Endothelzellen, die mit tight junctions miteinander verbunden sind und stellt damit eine effektive Schranke für Proteine und Leukozyten dar (Merrill & Benveniste, 1996).

Nur aktivierte T-Lymphozyten können in das normale ZNS gelangen und diejenigen, die nicht in der Lage sind Antigene zu präsentieren, verlassen das Gehirn nach ein bis zwei Tagen. Diejenigen T-Lymphozyten, die zur Antigenpräsentation fähig sind, bleiben im ZNS, oder gelangen zyklisch wieder dorthin. Dabei initiieren sie Entzündungen (Hickey et al., 1991). Mittlerweile hat eine Studie gezeigt, dass B-Lymphozyten in geringer Anzahl auch im normalen Gehirn vorkommen (Anthony et al., 2003).

Virchow entdeckte 1846 die Neuroglia, die die Neuronen im ZNS umgibt. Sie setzt sich aus der sog. Makroglia, bestehend aus Astrozyten und Oligodendrozyten, und der Mikroglia zusammen. Die mikroglialen Zellen repräsentieren das Immunsystem des Gehirns (Moore & Thanos, 1996). Die Mikrogliazellen finden sich in sämtlichen Gehirnregionen und sind so zahlreich wie die Neuronen. Sie überwachen den Gesundheitszustand der Makroglia und reagieren rasch auf Veränderungen und Krankheitszeichen, sie entwickeln sich dann zu phagozytotischen Makrophagen. Die Mikrogliazellen sezernieren Cytokine, Wachstumsfaktoren, Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies (Streit & Kincaid-Colton, 1996). Bei Anwesenheit von IFN- γ oder LPS durch eine inflammatorische Reaktion scheint die Mikroglia eine Th1-Antwort zu unterstützen während bei einem Fehlen dieser

Marker die T-Zellen eher in Richtung Th2 stimuliert werden. Th1-Zellen fördern die Differenzierung von CD8-T-Zellen zu aktiven zytotoxischen Zellen, die infizierte Zellen lysieren und vermitteln eine phagozytäre Abwehr gegen Infektionen. Th-2-Zellen sind für die humorale Immunantwort verantwortlich. Sie sezernieren anti-inflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10) und stoßen die Differenzierung bei B-Lymphozyten sowie die Antikörperproduktion an. Mikrogliazellen exprimieren außerdem Zytokinrezeptoren, die intrazerebral während Entzündungsreaktionen gebildet werden. Dabei handelt es sich sowohl um pro- als auch um anti-inflammatorische Rezeptoren. Das Gleichgewicht der Zytokine wird als entscheidend betrachtet für die Regulation der immunologischen Funktionen der Mikroglia (Aloisi, 2001). Die Mikrogliazellen produzieren unter anderem IL-6, ein Zytokin mit pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften, das B-Zellwachstum und –differenzierung fördert (Frei et al., 1989).

1.3 Ursachenforschung bei SIDS

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Untersuchungen zur Erforschung der Pathologie bei SIDS vorgestellt. Trotz leichter Überschneidungspunkte werden die Ergebnisse zur besseren Übersichtlichkeit in außerhalb und innerhalb des ZNS aufgeteilt.

1.3.1 Ursachenforschung bei SIDS außerhalb des ZNS

Im Folgenden wird ein Überblick über Hypothesen und Forschungsergebnisse bei SIDS außerhalb des ZNS gegeben. Diese haben in den vergangenen Jahrzehnten eine Rolle bei der Ursachenforschung gespielt, sind aber auch gegenwärtig wichtig und werden zum Teil weiter verfolgt.

1.3.1.1 Helicobacter pylori und Botulismus

Im Jahr 2000 erregte eine Studie über den vermeintlichen Zusammenhang von Helicobacter pylori-Infektion und SIDS große Aufmerksamkeit. Die Autoren stellten eine hohe Signifikanz zwischen zwei Helicobacter pylori Genen im Magen, der Luftröhre und der Lunge bei SIDS-Fällen im Verhältnis zur Kontrollgruppe fest (Kerr et al., 2000).

Diese Studie wurde jedoch 2001 von Rowland und Drumm aufgrund ihres Studiendesigns, der Art des Helicobacter pylori-Nachweises mit fehlendem Korrelat in der Magenmukosa sowie weiteren Aspekten scharf kritisiert. Eine weitere Gruppe widersprach den Ergebnissen ebenfalls (Ho et al., 2001).

Böhnel et al. (2001) wollten eine mögliche Verbindung zwischen SIDS und dem kindlichen Botulismus, auf den ca. ein bis zwei Fälle pro Jahr in Deutschland entfallen, herausfinden. In bis zu 20% der Fälle diagnostizierten die Untersucher Botulismus. Da SIDS per definitionem eine ungeklärte Todesursache beinhaltet, muss der hier festgestellte Botulismus als eigenständiges Krankheitsbild betrachtet werden. Die Autoren errechneten aus ihren Daten eine Zahl von 100 bis 200 kindlichen Botulismusopfern pro Jahr, die momentan unter der Diagnose SIDS geführt werden. Sie forderten eine standardisierte Untersuchung auf Botulismus beim plötzlichen Kindstod, dies hat sich jedoch nicht etabliert (Böhnel et al., 2001).

1.3.1.2 Genetik

2004 veröffentlichten Mage und Donner die sogenannte „X-linkage-Hypothese“ für SIDS. Sie besagt, dass sich der überwiegendere Anteil an männlichen SIDS-Fällen durch ein Gen, das auf einem Ort des X-Chromosoms liegt, erklären lasse. Dieses Gen habe sowohl ein dominantes Allel, das vor cerebraler Hypoxie schütze, indem es einen anaeroben

oxidativen Stoffwechselweg unterstütze als auch ein rezessives Allel, das nicht genauso gut protektiv wirksam sei.

Opdal und Rognum (2004) unterschieden zwei Kategorien von genetischen Defekten:

- Es gibt Mutationen, die den „plötzlichen Kindstod“ direkt verursachen können wie Defekte in dem medium-chain-acyl-CoA-Dehydrogenase-Gen (MCAD) und in Ionenkanälen beim Long-QT-Syndrom.
- Zusätzlich existieren genetische Polymorphismen, die in kritischen Situationen prädisponierend für SIDS wirken wie beispielsweise im IL-10-Gen und der mtDNA.

Weese-Mayer et al. (2007) teilten die für SIDS in Frage kommenden Gene in fünf Kategorien ein:

- Gene für Ionenkanäle
- Gene für Serotonin-Transporter
- Gene, die mit der Embryologie des Autonomen Nervensystems zusammenhängen
- Gene für die Nikotin-verstoffwechselnden Enzyme
- Gene, die Entzündung, Energieproduktion, Hypoglykämie und Wärmeregulation codieren

1.3.1.3 Apnoetheorien

Im Jahr 1972 stellte Steinschneider die Hypothese auf, dass die prolongierte Apnoe Teil der kausalen Wegstrecke sei, die zu SIDS führe. Seine Theorie fand weithin Anklang, bezog sich allerdings v. a. auf zwei SIDS-Fälle innerhalb einer Familie, die sich ca. 20 Jahre später als Mord herausstellten (Sparks & Hunsaker, 2002).

Naeye stützte 1974 durch histologische Untersuchungen diese Theorie. Er wies unter ande-

rem eine Hypertrophie des rechten Ventrikels, eine Hyperplasie des roten Knochenmarks sowie eine Hypertrophie und Hyperplasie der Media der Pulmonalarteriolen sowie eine Gliose des Hirnstamms nach.

Nach Willinger et al. (1991) wachen gesunde Kinder nach einer Apnoephase normalerweise aus dem Schlaf auf und atmen Sauerstoff, um die Hypoxie auszugleichen. Bei SIDS-Kindern könnte dieser physiologische Mechanismus aufgrund von verminderter Reife fehlerhaft sein und zu SIDS führen.

In einer Studie erlebten die Kinder, die später an SIDS sterben sollten, signifikant mehr Episoden von obstruktiver und gemischter Schlafapnoe. Die Frequenz der Apnoeepisoden nahm mit zunehmendem Alter ab, jedoch stärker in der Kontrollgruppe als in der SIDS-Gruppe. Dies interpretierten die Autoren als indirekte Evidenz für eine langsamere Entwicklung der Atemkontrollmechanismen bei einigen Kindern, die an SIDS sterben (Kato et al., 2001).

In einer anderen Studie zeigten die Kinder in der SIDS-Gruppe signifikant längere Episoden von obstruktiver Apnoe (Sawaguchi et al., 2002).

In einer weiteren Studie zeichneten sich die zukünftigen SIDS-Fälle durch längere Phasen zentraler Apnoe sowie durch häufigere und längere obstruktive Apnoephasen aus (Sawaguchi et al., 2005).

1.3.1.4 ALTE

Ein scheinbar lebensbedrohliches Ereignis, das in der Fachliteratur als „apparent life-threatening event“ (ALTE) bezeichnet wird, ist folgendermaßen definiert: ALTE ist als plötzliches Ereignis beschrieben, das auf den Beobachter Furcht einflößend wirkt und durch eine Kombination der folgenden Symptome beim Säugling charakterisiert wird:

- zentrale oder gelegentlich obstruktive Apnoe
- Zyanose, aber auch Blässe oder Rötung
- Veränderungen im Muskeltonus von Steifheit bis hin zur Erschlaffung
- Würgen, Erstickungslaute und Husten (Ross-Russell & Ravikumar, 2007).

Kinder, die ein ALTE erlebt haben, haben ein drei- bis fünffach erhöhtes Risiko, an SIDS zu sterben (Hunt & Hauck, 2006). Zwischen vier und 13 Prozent der SIDS-Fälle haben eine oder mehrere ALTE-Episoden erlebt. Bis jetzt ist es allerdings noch nicht gelungen, einen klaren Zusammenhang zwischen ALTE und SIDS zu belegen (Ross-Russell & Ravikumar, 2007).

1.3.1.5 Hypoxiemarker

Im Glaskörper bei den SIDS-Fällen waren die Hypoxanthin-Werte signifikant höher als bei den Kontrollfällen. Dies weist auf eine relativ lange Episode von respiratorischer Minderversorgung und Hypoxie vor dem Tod hin (Rognum et al., 1988; Storm et al., 1994a).

Zehn Jahre später untersuchte eine Studie den Einfluss der postmortalen Liegezeit auf die Hypoxanthinkonzentration bei SIDS-Kindern, die hier ebenfalls statistisch bedeutsam höher waren als bei den Kontrollfällen (Opdal, 1998).

Im Jahr 2003 wurden signifikant erhöhte VEGF-Konzentrationen im Liquor bei SIDS-Kindern festgestellt. Das Gen für den Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) registriert äußerst sensitiv unter anderem Veränderungen in der Gewebesauerstoffsättigung ebenso wie Veränderungen in der Oxygenierung. Vermutlich ist die Hypoxie ein häufiges Ereignis, das dem plötzlichen und unerwarteten Tod dieser Kinder vorausgeht (Jones, 2003).

1.3.1.6 Blutfluss und Kopfposition

Es gibt eine Hypothese, die in einer Kompression einer oder beider Arteriae vertebrales die Ursache für SIDS vermutet. Dies könne durch Kompression mindestens einer Arteria vertebralis durch die HWS und die Unfähigkeit des Kindes den Kopf zu bewegen verursacht werden. Wenn zusätzlich eine Minderversorgung im Bereich der Kollateralkreisläufe vorliegt, könnte dies zu prolongierter Apnoe, ALTE oder SIDS führen (Maslowski, 1996). Eine Kompression der Vertebralarterien mit nachfolgender Hirnstammischämie konnte weder ausgeschlossen, noch bestätigt werden (Krous et al., 2001).

1.3.1.7 Impfungen

Man vermutete einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen der DTTP (Diphtherie, Tetanus, Pertussis, Poliomyelitis)-Impfung und SIDS, weil der Peak beim plötzlichen Kindstod mit dem typischen Impfalter einhergeht. Dies wurde nicht bestätigt (Jonville-Béra et al., 2000).

Eine nähere Untersuchung der Hexavalent-Impfung (Diphtherie, Tetanus, Pertussis, Poliomyelitis, Hämophilus Influenza Typ B, Hepatitis) konnte zwar ebenfalls keinen kausalen Zusammenhang aufzeigen (Zinka et al., 2006), die Impfung als ein Trigger für SIDS wird jedoch nach wie vor vermutet (Ottaviani, 2006).

Eine 2007 veröffentlichte Metaanalyse untersuchte die Beziehung zwischen Impfung und SIDS. Dabei gelangten die Autoren zu der Ansicht, dass Impfungen mit einer Halbierung des SIDS-Risikos einhergingen. Sie empfehlen allen Eltern, ihre Kinder als Bestandteil der SIDS-Präventionsmaßnahmen impfen zu lassen (Vennemann et al., 2007).

1.3.2 Ursachenforschung im ZNS

Seit langem wird vermutet, dass SIDS aus einer Dysfunktion des Gehirns resultiert. Dies ist schwierig zu verifizieren, denn SIDS-Gehirne sind morphologisch unauffällig oder zeigen allenfalls unspezifische Veränderungen (Kinney et al., 1992).

Es folgt ein Überblick über die bisherigen Ergebnisse der untersuchten Systeme und Regionen des Zentralen Nervensystems.

1.3.2.1 Klinische Neuropathophysiologie

Clancy und Spitzer (1985) kamen zu dem Ergebnis, dass das EEG SIDS-Risikokinder nicht verlässlich erkennen kann. Akustisch evozierte Hirnstammpotentiale (BAER) sind gleichfalls ungeeignet, spätere SIDS-Opfer zu identifizieren (Pettigrew & Rahilly, 1985). „Transiente otoakustisch evozierte Potentiale (TEOAE)“ zeigten bei den späteren SIDS-Kindern eine signifikant schwächere „signal to noise ratio“ (SNR) auf dem rechten Ohr (Rubens et al., 2007).

1.3.2.2 Chemische Neuropathologie

Im Jahr 1980 fanden Millhorn et al. heraus, dass Serotonin im Hirnstamm die Atmung erleichtert, ebenso wie Acetylcholin (Dev & Loeschke, 1979). Champagnat et al. konnten 1979 zeigen, dass Adrenalin und Noradrenalin die Atmung unterdrücken. Diese vier Transmitter arbeiten zusammen und regulieren so den Blutdruck und das Herz-Kreislaufsystem (Dev & Loeschke, 1979).

Die Hauptneurotransmitter, die den Atemrhythmus steuern, sind Glutamat, Gamma-Aminobuttersäure und Glycin. Außerdem reguliert Substanz P die Atemtätigkeit, während

Opioide diese unterdrücken (Bonham, 1995).

1.3.2.2.1 Neurotransmitter

Hollander konnte 1988 in 95% der Fälle keine *Beta-Endorphin*-Aktivität in der Medulla messen. Bezüglich der Konzentration an Beta-Endorphinen im Liquor bei SIDS-Fällen ließ sich, verglichen mit den Kontrollfällen, kein Unterschied feststellen. Coquerel et al. (1992) maßen einen erhöhten Spiegel an Beta-Endorphinen im Liquor von SIDS-Fällen sowie einen erhöhten *Neurotensin*-Spiegel in Teilen der Medulla. Storm et al. (1994b) fanden in 50% der SIDS-Fälle einen erhöhten Beta-Endorphin-Spiegel im Liquor. In den SIDS-Fällen wurde ein signifikant erniedrigter *Interleukin-6*-Spiegel im Liquor gemessen, während *Interleukin 1* und *Tumornekrosefaktor α* unauffällig waren (Vege et al., 1998).

In den späten 80er Jahren wurden erniedrigte *Laktatwerte* und erhöhte *pH-Werte* in ca. 2/3 der Gehirne von SIDS-Kindern entdeckt (Butterworth & Tennant, 1989).

Sparks und Hunsaker entdeckten 1991 bei SIDS-Fällen eine erniedrigte *Serotonin*-Konzentration sowie eine herabgesetzte Aktivität der *Acetylcholintransferase* im Hypothalamus. Die Aktivität der *Monoaminoxidase A* war hier deutlich erhöht (Sparks & Hunsaker, 2002).

Kopp et al. fanden 1992 eine Verminderung an *LH-RH immunreaktiven Fasern* des peri- und paraventriculären Kerns im SIDS-Hypothalamus. Im gesamten Gehirn wurden keine Unterschiede bezüglich der Aktivität von *Dopa-Decarboxylase (DD)* und *Katechyl-O-Methyltransferase* gefunden.

Ozand und Tildon (1983) stellten eine erhöhte *Tyrosin-Hydroxylase (TH)*-Aktivität in Putamen, Hypothalamus und Nucleus caudatus sowie eine reduzierte Aktivität der *Dopamin-Beta-Hydroxylase* in diesen Regionen fest. Erniedrigte *Dopamin*-Konzentrationen und eine herabgesetzte Aktivität der Acetylcholintransferase maß eine andere Studie (Kalaria et

al., 1993). Eine Studie kam zu dem Ergebnis, dass die TH im Nucl. vagus und in der *Formatio reticularis* signifikant vermindert ist und dass dort eine Korrelation zwischen reduzierter TH und vermehrter Gliose besteht (Obonai et al., 1998). Eine spätere Studie konnte eine signifikante TH-Reduktion jedoch nur in den Basalganglien bestätigen (Ozawa et al., 1999).

1983 untersuchten Kuich und Franciosi das endogene *Opioid-System*. Sie stellten keinen Unterschied zwischen *Met-Enkephalin* in Kortex und Medulla bei SIDS-Kindern und Kontrollen fest. Bergström et al. (1984) maßen eine signifikante Erhöhung der *Substanz P* in der Medulla von SIDS-Kindern. Dies konnten Jordan et al. (1997) jedoch nicht bestätigen. 1992 untersuchten Kopp und Jordan die *Neurotensin-* und *Somatostatinbindungsstellen* in der SIDS-Medulla. Die Bindungsstellen von Somatostatin waren unauffällig, aber die Anzahl der Neurotensinbindungsstellen war im Nucl. tractus solitarius nachweislich höher als bei den Kontrollen. Carpentier et al. (1998) stellten signifikant mehr Somatostatinbindungsstellen im medialen und parabrachialen Nucleus des Hirnstamms von SIDS-Kindern fest.

Eine verminderte *muskarinische acetylcholinerge Rezeptorbindungsichte* im Nucl. arcuatus wurde 1995 von Kinney et al. entdeckt. Bei der gleichen SIDS-Gruppe wurde zwei Jahre später eine verminderte Anzahl von *kainate Rezeptorbindungsstellen* nachgewiesen (Panigrahy et al., 1997). Außerdem zeigte sich in derselben Population ein Jahr später kein Unterschied bezüglich der Nikotinbindung an die *nikotinischen acetylcholinergen Rezeptoren* (Nachmanoff et al., 1998) sowie der *Naloxonbindung* an die Opioid-Rezeptoren (Kinney et al., 1998). Eine andere Gruppe stellte eine signifikante Verminderung von *Acetylcholintransferase-positiven Neuronen* im dorsalen motorischen Nucl. vagus sowie dem Nucl. hypoglossus fest. In der Dichte der *muscarinischen Acetylcholinrezeptoren* fand sich keine Auffälligkeit (Mallard et al., 1999). Panigrahy et al.

(2000) registrierten einen Abfall der *serotoninerger Rezeptorbindungsstellen* in der Raphe, dem Nucl. arcuatus, der unteren Olive und in Gebieten der hinteren Medulla.

1.3.2.2.2 Oxidativer Stress

Während der normalen frühkindlichen Entwicklung findet sich ein linearer Abfall in der Anzahl der Cu/Zn Superoxid Dismutase und Glutathion Peroxidase immunreaktiven Neuronen im Gyrus von Hippocampus und Parahippocampus. Bei über 80% der SIDS-Fälle im Alter von bis zu sechs Monaten war die Anzahl dieser Neuronen signifikant erhöht (Huggle et al., 1996).

1.3.2.3 Pathologie der verschiedenen Gehirnregionen

Verschiedene Gehirnregionen wurden immer wieder untersucht, ein spezielles Augenmerk lag dabei auf dem Hirnstamm, aber auch Hypophyse, Epiphyse, Kleinhirn und Großhirn waren und sind ein wichtiger Gegenstand der SIDS-Forschung (Sparks & Hunsaker, 2002).

Hirngewicht: Kinney et al. (1991) waren die ersten Untersucher, die das Hirngewicht verglichen. Sie ermittelten ein erhöhtes Hirngewicht bei SIDS-Fällen. Sowohl Falck und Rajs (1995) als auch Huggle et al. (1996) konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied im Hirngewicht feststellen. Die meisten Untersucher gehen heute von keinem erhöhten Hirngewicht bei SIDS aus (Sparks & Hunsaker, 2002).

Hypophyse:

Beta-Endorphin-immunoreaktive Neuronen zeigten sich bei allen Kindern, nicht nur bei SIDS-Fällen (Hollander, 1988). Auch bei der Analyse von Zelltypen, Immunreaktivität

und gonadotropen Zellen in der Hypophyse traten keine Unterschiede zur Kontrollgruppe auf (Reuss et al., 1994).

Epiphyse:

Im Jahr 1988 stellten Sparks und Hunsaker fest, dass die Epiphysen von SIDS-Kindern signifikant kleiner als bei der Kontrollgruppe waren. 1997 folgte von Sparks et al. die Erkenntnis, dass die Unterschiede in der Epiphysengröße verglichen mit den Kontrollfällen mit zunehmendem Alter größer werden. Im Jahr 1990 entdeckten Sturner et al., dass im Liquor von SIDS-Fällen signifikant verminderte Melatoninkonzentrationen vorlagen, in Blut und Glaskörper war ebenfalls ein Trend in diese Richtung zu erkennen. Sparks und Hunsaker untersuchten 2002 die Histologie und die zentrale Innervation der Epiphyse bei SIDS. Die Ergebnisse könnten entweder als eine verzögerte Reifung interpretiert werden oder als eine degenerative Dysinnervation und Myelinisierung.

Cerebellum:

In den 70er Jahren wurde im Kleinhirn von SIDS-Fällen eine reduzierte Zellzahl in der inneren Körnerschicht festgestellt (Gadson & Emery, 1976). Gut zehn Jahre später suchte man Veränderungen im Sinne einer antemortalen Hypoxie. Die Autoren erkannten eine erhöhte Purkinjezellichte, konnten aber weder vermehrte Makrophagen noch gliale Zellreaktionen nachweisen (Oehmichen et al., 1989). Eine signifikant erhöhte Anzahl von unreifen bipolaren äußeren Körnerschichtzellen wurde entdeckt, begleitet von einer Astrogliose (Cruz-Sanchez et al., 1997).

Telencephalon, Substantia alba: 1976 entdeckten Gadson und Emery „fettige Veränderungen“ in der periventrikulären weißen Substanz. 10 Jahre später fanden Forscher in rund

der Hälfte der Fälle veresterte Cholesterin-Ablagerungen der Gliazellen im periventrikulären frontalen Marklager (Misliwetz et al., 1986).

In 50% der SIDS-Fälle wurde speziell im Corpus callosum eine verminderte Anzahl von Oligodendrozyten sowie eine reduzierte Aktivität der 2,3-zyklischen-Nukleotid-3'-Phosphohydrolase festgestellt (Carey & Foster, 1984). Kinney et al. wiesen 1991 in knapp der Hälfte der Fälle eine verminderte Myelinisierung, vor allem im somatomotorischen und im viszeromotorischen System, nach. Zhang et al. ermittelten 1992 eine verminderte Astrozytenproliferation.

Telencephalon, Ependym: Lucena und Cruz-Sanchez untersuchten 1996 das Ependym von SIDS-Kindern und entdeckten eine Vielzahl von pathologischen Veränderungen bei knapp der Hälfte der Fälle. Es zeigten sich entzündliche Veränderungen wie Astrogliose und Mikrogliaknötchen der subependymalen Schicht, außerdem fand sich in einem Fünftel der Fälle ein Hirnödem.

Telencephalon, Hippocampus: Im Jahr 1991 wiesen Sparks und Hunsaker eine erhöhte Anzahl an Alz-50-immunreaktiven Neuronen im Hippocampus von SIDS-Fällen nach. Diese histologischen Befunde konnten Oehmichen et al. 1998 bestätigen. Streit und Sparks entdeckten 1997 wie auch andere Forschungsgruppen eine Mikrogliose im Hippocampus. Eine signifikante neuronale Apoptose wurde in 55% der Fälle im Hippocampus gefunden (Waters et al., 1999). Im Jahr 1996 interpretierten Sparks et al. die Alz-50-Immunpositivität bei SIDS-Kindern als eine apoptotische neurodegenerative Veränderung.

Hirnstamm:

Naeye beschrieb 1976 erstmals eine Astrogliose im Hirnstamm von SIDS-Kindern. 1981

stellten Summers und Parker fest, dass 12% der SIDS-Fälle eine Astrogliose in der *Formatio reticularis* aufwiesen. 1983 untersuchten Kinney et al. den Hirnstamm systematisch und stellten eine signifikante Erhöhung in der Anzahl der reaktiven Astrozyten (= reaktive Gliose) fest. In einer weiteren Studie wurden die Makrophagen und die nicht neuronalen Zellen untersucht, wobei sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten (Oehmichen et al., 1989). Sparks et al. konnten 1996 einen Anstieg von GFAP-immunreaktiven Astrozyten in bestimmten Regionen nachweisen, ebenso wie Obonai et al. (1996). Dies konnte von Pamphlett und Treloar (1996) jedoch nicht bestätigt werden. Der Grad der Astrogliose im unteren Olivenkern sei proportional zur Intensität des mütterlichen Rauchens während der Schwangerschaft (Storm et al., 1999).

Im Jahr 1989 stellten Naeye et al. fest, dass bei einem Drittel der SIDS-Kinder eine Hypomyelination des lateralen reticulären Kerns der Medulla vorlag. 1991 fanden Kinney et al. Korrelate für eine verzögerte Myelinisierung. Im Jahr 1985 entdeckten Quattrochi et al. einen hoch signifikanten Anstieg in der Dichte der dendritischen Spikes im Hirnstamm. Takashima et al. (1985) konnten dies bestätigen.

Naeye et al. entdeckten 1989 bei 2/3 der SIDS-Kinder eine reduzierte Anzahl von Neuronen im Nucleus hypoglossus.

O`Kusky und Norman (1992) stellten ein vergrößertes Volumen des Nucl. hypoglossus fest, welches von einem Abfall in der Neuronendichte begleitet wurde. Bei SIDS-Fällen schien das Volumen des Nucl. hypoglossus schneller zuzunehmen und ging dann über zu einer Abnahme der Neuronendichte, wenn auch deren totale Anzahl gleich blieb. 1995 konnten sie dieses Ergebnis bestätigen und stellten weiterhin fest, dass die absolute Anzahl von Synapsen im Nucl. hypoglossus erhöht war (O`Kusky & Norman, 1995). Im Gegensatz dazu fanden Konrat et al. (1992) keinen Unterschied in der Anzahl der Neuronen. Im Nucl. arcuatus wurde 1992 von Filiano und Kinney eine neuronale Hypoplasie nachgewie-

sen, während Gilson et al. (1994) dort eine Hyperplasie fanden.

Einen Anstieg von Alz-50-immunreaktiven Neuronen in der Medulla sowie eine reaktive Gliosis entdeckte eine weitere Gruppe (Sparks et al., 1996). Oehmichen et al. konnten diese Befunde 1998 bestätigen. Sie zeigten, dass bei SIDS-Kindern zu beinahe 100% Alz-50-reaktive Neuronen in Hippocampus und Olive vorhanden waren. Sie schlagen vor SIDS-Kinder nun mikroskopisch von Kindern, die an einem Trauma oder an bekannten Gründen außer SIDS starben, anhand des Nachweises von Alz-50-positiven Neuronen zu unterscheiden. Diese Methode sollte allerdings erst an einer größeren Anzahl von SIDS-Gehirnen getestet werden um sich zu etablieren. Waters et al. konnten 1999 in ihrer Arbeit zeigen, dass 96% der SIDS-Fälle eine Apoptose in der Medulla aufweisen.

Kinney et al. entdeckten 2001, dass mindestens 50% der SIDS-Fälle ein abweichendes Serotonin-System in der Medulla oblongata aufwiesen. Diese Anormalität äußert sich in einem Fehler bei der Antwort auf lebensbedrohliche Stressoren. Eine andere Gruppe fand eine erhöhte Anzahl von serotonergen Neuronen ebenso wie eine signifikant geringere Dichte von Serotonin Rezeptorbindungsstellen (Paterson et al., 2006).

1.3.3 Aktueller Stand der Ursachenforschung bezüglich einer Infektionskrankheit in der Pathogenese bei SIDS

Die Hauptrisikofaktoren für SIDS sind gleichzeitig auch die Risikofaktoren für ernste bakterielle Infektionen im Kindesalter. Diese Risikofaktoren schließen die Genetik, Umweltfaktoren und Risikofaktoren in der Entwicklung ein (Blackwell et al., 2005). Virale Infekte induzieren mit bakteriellen Toxinen Cytokinaktivität und es wird vermutet, dass unkontrolliert ablaufende Kaskaden von Entzündungsmediatoren an einigen SIDS-Fällen beteiligt sind (Raza & Blackwell, 1999).

1.3.3.1 Hinweise auf virale Mitbeteiligung

Eine respiratorische Infektion mit beispielsweise dem Adenovirus könnte als Triggermechanismus für den plötzlichen Kindstod wirken (Bajanowski et al., 1996).

Im Jahr 2003 beschäftigte sich eine Studie mit dem Nachweis von RNA-Viren als mögliche Triggerfaktoren bei SIDS. Influenza B konnte in 6,6% der SIDS-Fälle nachgewiesen werden (Bajanowski et al., 2003). Eine spanische Forschergruppe führte ein Screening auf Influenza A und B, Adenovirus, RSV, Cytomegalievirus (CMV) sowie bestimmte Antikörper durch. Mehr als 14% der Fälle hatten positive virale Befunde, aber nur in zwei Fällen war der Virus als Todesursache zu betrachten (Fernández-Rodríguez et al., 2006).

1.3.3.2 Hinweise auf bakterielle Mitbeteiligung

Relativ früh vermutete man, dass dem plötzlichen Kindstod nicht ein einzelner Risikofaktor oder ein bestimmter Defekt zugrunde liegt. Im Jahr 1972 wurde von Wedgewood die erste **„Triple Risk Hypothese“** aufgestellt. 1993 wurde von Rognum und Saugstad das „fatale triangle“ vorgestellt.

1994 publizierten Filiano und Kinney die bekannteste „Triple Risk Hypothese“, SIDS ist demnach das Ergebnis aus der Schnittmenge von drei überlappenden Faktoren. Diese sind

- ein vulnerables Kind,
- eine kritische Entwicklungsperiode in der homöostatischen Kontrolle und
- ein exogener Stressor.

Kinney veröffentlichte 2005 ihr „5-HT (Serotonin) triple risk model“. Ein Kind mit einer angeborenen Vulnerabilität im medullären Serotoninsystem stirbt, wenn es von einem homöostatischen Stressor in einer kritischen Entwicklungsphase der kardiorespiratorischen Kontrollsysteme getroffen wird.

Die „**Common Bacterial Hypothese**“ wurde von Morris erstmals 1987 publiziert. Eine ursprünglich virale Nasopharynxinfektion wird von Bakterien übersiedelt, die Endotoxine produzieren. Diese akkumulieren und können dem Kind in dem Zeitraum, in dem das mütterliche IgG abfällt und das eigene noch nicht ausreichend gebildet werden kann, gefährlich werden (Morris, 1999). Laut Morris gibt es eine einzige Erklärung für SIDS, die durch multiple Bakterien und Toxine wirkt, die mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in vielen verschiedenen Systemen des Körpers miteinander agieren (Morris, 2004).

Das Schlafen in Bauchlage bei einem Infekt der oberen Atemwege verändert die nasopharyngeale bakterielle Flora der Säuglinge. Als pathogenetisch bedeutsamster Erreger wird *Staphylococcus aureus* angesehen. Bei männlichen Säuglingen findet sich eine ausgedehntere Keimbeseidlung als bei weiblichen (Harrison et al., 1999).

Das Mucosa-Immunsystem entwickelt sich nach der Geburt und erreicht den vollen Schutz erst gegen Ende des ersten Lebensjahres. Eine inadäquate Immunantwort auf ein normales Antigen und der daraus resultierende entzündliche Prozess wurden als Faktoren vorgeschlagen, die zu SIDS beitragen könnten (Gleeson & Cripps, 2004).

Die pyrogenen Toxine von *S. aureus* werden nur zwischen 37° und 40° Celsius produziert. In Bauchlage steigen die Temperaturen in der Nase jedoch an und in manchen Fällen erreichten sie die erforderliche Höhe, um die Toxinproduktion anzustoßen (Blackwell & Weir, 1999).

Einige Kinder mit Immunsystem-schwächenden Risikofaktoren könnten Clostridien-, Enterobakterien- und Staphylokokken-Endotoxinen oder anderen erliegen (Siarakas et al., 1999). Bei einigen SIDS-Kindern war die Endotoxinkonzentration im Blut erhöht (Crawley et al., 1999). In 53% der SIDS-Fälle konnten *Staphylococcus aureus* und seine Toxine nachgewiesen werden (Zorgani et al., 1999).

Extreme Konzentrationen an Pilz-, Bakterien- und Virenpartikeln könnten zu der hohen

Inzidenz von Atemwegsinfekten und SIDS bei Kindern von kanadischen Eingeborenen beigetragen haben (Wilson, 1999).

In einigen SIDS-Fällen scheint es möglich, dass eine triviale Infektion zu einer entzündlichen Antwort führt, die eine Zytokin-Kaskade in Gang setzt und eventuell den Tod des Kindes nach sich zieht (Forsyth, 1999). Ein großer Teil der SIDS-Toten soll auf eine Überreaktion auf normalerweise harmlose Infektionen zurückzuführen sein, worauf beispielsweise Zytokine im Liquor hinweisen (Vege & Rognum, 1999).

Eine andere Studie wies bei einem Teil der SIDS-Kinder erhöhte IL-6-Spiegel im Liquor nach (Vege & Rognum, 2004).

1.4 Fragestellung

In der Einleitung wird gezeigt, dass schon in vielen verschiedenen Bereichen bezüglich möglicher Ursachen für den plötzlichen Kindstod geforscht wurde. Diese Arbeit untersucht, ausgehend von Berichten und Studien über bakterielle und virale Infektionen, systematisch das Vorhandensein von entzündlichen Infiltraten in verschiedenen Gehirnregionen bei SIDS. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die quantitative Analyse des Auftretens von Lymphozyten mittels LCA-, CD3- und CD20-Antikörpern in Gehirnen einer Gruppe an SIDS verstorbener Kinder, verglichen mit einer Kontrollgruppe. Es soll die Frage geklärt werden, ob ein signifikanter Unterschied im Auftreten von entzündlichen Infiltraten zwischen beiden Gruppen besteht. Weiterhin soll ein möglicher Nachweis von IL-6 als wichtigem Faktor einer inflammatorischen Kaskade durchgeführt werden.

Folgende zwei Hypothesen wurden aufgestellt:

- Bei SIDS-Fällen finden sich signifikant mehr Lymphozyten im Gehirn als bei der Kontrollgruppe
- Bei SIDS-Fällen kann signifikant mehr Interleukin 6 nachgewiesen werden als bei den Kontrollfällen

In der Diskussion sollen die Ergebnisse interpretiert und ein möglicher Zusammenhang anhand der klinisch-autoptischen Befunde sowie der vorliegenden Literaturergebnisse untersucht werden.

2. Material und Methoden

Im Folgenden werden nun das untersuchte Material beschrieben, die verwendete Stichprobe erläutert, die Färbemethoden dargestellt sowie die Auswertung aufgezeigt.

2.1 Stichprobe

Die Gruppe der untersuchten SIDS-Fälle bestand aus elf Kindern, davon sechs männlichen und fünf weiblichen Geschlechts im Alter von einem bis elf Monaten mit einem Mittelwert von vier Monaten. Die Körpergröße reichte von 55 cm bis 78 cm mit einem Mittelwert von 65 cm, das Körpergewicht von 3,2 kg bis 8,6 kg mit einem Mittelwert von 6,2 kg. Die Hirngewichte lagen zwischen 479 g und 1055 g mit einem Mittelwert von 728 g. Die postmortale Liegezeit betrug zwischen sechs und 78 Stunden mit einem Mittelwert von 39 Stunden (Tabelle 1: Daten der SIDS- Fälle, S.105).

Gemäß den internationalen Standards zur Diagnosestellung eines SIDS wurden 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 todesursächlichen Befunde erhoben, weshalb die Diagnose SIDS gestellt wurde.

Die gesamte Kontrollgruppe umfasste 32 Kinder, davon 15 männlich und 17 weiblich, im Alter von der 31. SSW bis 84 Monate mit einem Mittelwert von 12 Monaten. Die Körperlänge lag zwischen 43 cm und 127 cm mit einem Mittelwert von 68 cm, das Körpergewicht zwischen 1,5 und 24,4 kg mit einem Mittelwert von 7,4 kg. Die Hirngewichte lagen in der

Kontrollgruppe zwischen 205 g und 1393 g, der Mittelwert bei 790 g. Bei der postmortalen Liegezeit ergaben sich Werte zwischen vier und 120 Stunden mit einem Mittelwert von 23 Stunden (Tabelle 2: Daten der „infektiösen“ Kontrollfälle, S.105; Tabelle 3: Daten der „nicht-infektiösen“ Kontrollfälle, S. 106).

Die Kontrollgruppe war in Fälle mit Infektionskrankheit, im Folgenden „infektiöse“ Fälle genannt und Fälle ohne Infektionskrankheit, nun als „nicht-infektiöse“ Fälle bezeichnet, untergliedert.

Die „infektiöse“ Kontrollgruppe umfasste 15 Kinder, davon acht männliche und sieben weibliche im Alter von der 31. SSW bis 84 Monate mit einem Mittelwert von 14 Monaten. Die Körperlänge lag zwischen 47 cm und 127 cm mit einem Mittelwert von 70 cm, das Körpergewicht zwischen 2,5 und 24,4 kg mit einem Mittelwert von 8,0 kg. Die Hirngewichte lagen in der Kontrollgruppe zwischen 383 g und 1393 g, der Mittelwert bei 831 g. Bei der postmortalen Liegezeit ergaben sich Werte zwischen sechs und 120 Stunden mit einem Mittelwert von 39 Stunden. In die „infektiöse“ Kontrollgruppe waren nur solche Fälle eingeschlossen, bei deren Obduktion sich eine Infektion als Todesursache herausgestellt hatte (Tabelle 2: Daten der „infektiösen“ Kontrollfälle, S. 105).

Die „nicht-infektiöse“ Kontrollgruppe umfasste 17 Kinder, davon sieben männliche und zehn weibliche im Alter von der 31. SSW bis 72 Monate mit einem Mittelwert von 10 Monaten. Die Körperlänge lag zwischen 43 cm und 118 cm mit einem Mittelwert von 66 cm, das Körpergewicht zwischen 3,3 und 19,5 kg mit einem Mittelwert von 6,9 kg. Die Hirngewichte lagen in der Kontrollgruppe zwischen 205 g und 1314 g, der Mittelwert bei 755 g. Bei der postmortalen Liegezeit ergaben sich Werte zwischen vier und 76 Stunden mit einem Mittelwert von 26 Stunden. Das Spektrum der Todesursachen untergliederte sich in traumatische und nicht-traumatische Fälle und umfasste ein großes Spektrum (Tabelle 3:

Daten der „nicht-infektiösen“ Kontrollfälle, S.106).

In allen Fällen wurden nach der Auswertung die Obduktionsprotokolle, die polizeilichen Ermittlungsunterlagen und - sofern vorhanden - die Krankenbettunterlagen eingesehen.

2.2 Untersuchungsmaterial

Gewebeproben aus den Gehirnen von obduzierten SIDS- sowie Kontrollfällen wurden nach 14-tägiger Fixation in vierprozentig gepuffertem Formalin, Wässern unter fließendem Wasser, Dehydratation, Einbettung in Paraffin und anschließendem Schneiden in vier Mikrometer dicke Serienschnitte untersucht. Es wurden die folgenden 25 Hirnregionen ausgewertet (Abkürzungen in Klammern):

- 1) Lobus frontalis
 - a) Lobus frontalis: graue Substanz (fro-co)
 - b) Lobus frontalis: weiße Substanz (fro-wm)
 - c) Lobus frontalis: Leptomeningen (fro-lm)
- 2) Lobus frontoorbitalis
 - a) Lobus frontoorbitalis: graue Substanz (orb-co)
 - b) Lobus frontoorbitalis: weiße Substanz (orb-wm)
 - c) Lobus frontoorbitalis: Leptomeningen (orb-lm)
- 3) Lobus temporalis
 - a) Lobus temporalis: graue Substanz (tem-co)
 - b) Lobus temporalis: weiße Substanz (tem-wm)
- 4) Lobus parietalis
 - a) Lobus parietalis: graue Substanz (par-co)
 - b) Lobus parietalis: weiße Substanz (par-wm)

- c) Lobus parietalis: Leptomeningen (par-lm)
- 5) Lobus occipitalis
 - a) Lobus occipitalis: graue Substanz (occ-co)
 - b) Lobus occipitalis: weiße Substanz (occ-wm)
 - c) Lobus occipitalis: Leptomeningen (occ-lm)
- 6) Hippocampusformation (hipca)
- 7) Thalamus (thal)
- 8) Basalganglien (bggl)
- 9) Cerebellum
 - a) Cerebellum: graue Substanz (kh-co)
 - b) Cerebellum: weiße Substanz (kh-wm)
 - c) Cerebellum: Leptomeningen (kh-lm)
- 10) Mesencephalon
 - a) Mesencephalon (mes)
 - b) Mesencephalon: Leptomeningen (mes-lm)
- 11) Pons
 - a) Pons (pons)
 - b) Pons: Leptomeningen (pons-lm)
- 12) Medulla
 - a) Medulla (med)
 - b) Medulla: Leptomeningen (med-lm)

2.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Immunhistochemie kann zelluläre Antigene durch spezifisch gegen diese gerichtete Anti-

körper identifizieren und lokalisieren. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch farbgebende enzymatische Marker sichtbar gemacht. Diese Methode wurde gewählt, da sie etabliert ist, eine sichere Identifizierung von Lymphozyten ermöglicht und am autoptischen Gewebe zuverlässig anzuwenden ist.

Die Behandlung der unter 2.2 einzeln aufgeführten Gewebeschnitte erfolgte nach einer modifizierten Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode (Boenisch, 2003; Hsu et al., 1982). Dabei handelt es sich um ein indirektes immunhistochemisches Nachweisverfahren, welches sich aus den folgenden Komponenten zusammensetzt:

Es besteht aus

- einem spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichteten primären Antikörper,
- einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet,
- sowie einem Peroxidase-konjugierten Streptavidin, das an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet und gleichzeitig die Farbreaktion katalysiert.

Vor Beginn der eigentlichen Färbungen wurden jeweils Verdünnungsreihen durchgeführt, um die optimale Antikörperkonzentration zu ermitteln. Während jeder Färbung wurde eine Tonsille als Positivkontrolle zur Überprüfung der Spezifität der Immunreaktion mitgeführt. Die sichtbare Färbung erfolgte mittels Diaminobenzidin (DAB)-Chromogen, welches an einer Antigen-Antikörper-Bindung als braunes Präzipitat sichtbar wird (Boenisch, 2003).

Die Färbungen wurden entsprechend den nachfolgenden Schritten jeweils an den Präparaten der SIDS- und Kontrollgruppen durchgeführt. Die detaillierten Angaben sowie die Bezugsquellen der verwendeten Substanzen finden sich im Anhang (1.5 Chemikalien, S.114).

2.3.1 LCA/CD45-Färbung

- Entparaffinierung in Xylol für 2x10 Minuten
- Rehydratation in einer absteigenden Ethanolreihe (1x100%ig, 1x90%ig, 1x80%ig, 1x70%ig) und Spülen in Aqua destillata für jeweils 1 Minute
- Hintergrundreduktion durch 3%ige Ethanol/H₂O₂ Lösung für 10 Minuten zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität
- Spülen in Aqua destillata für 5 Minuten
- Waschen in PBS-Puffer (phosphate-buffered-saline) für 10 Minuten
- Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-LCA (monoclonal, Verdünnung 1:100 in Dako[®] Antibody Diluent) für 30 Minuten zugedeckt in der feuchten Kammer
- Spülen mit Aqua destillata
- Waschen mit PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit dem Link (gebrauchsfertiges Reagens B) für 20 Minuten in der feuchten Kammer
- Spülen in Aqua destillata
- Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten.
- Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Histostain[®]-Plus Kit/gebrauchsfertiges Reagens C) für 20 Minuten in der feuchten Kammer
- Spülen mit Aqua destillata
- Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit der Substrat Chromogen-Lösung (Substrate Kit) für 15 Minuten bei offener feuchten Kammer
- Waschen für 10 Minuten in Aqua destillata
- Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun für 10 Minuten

- Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
- Dehydratation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (1x70%ig, 1x80%ig, 1x90%ig, 1x100%ig) für jeweils 1 Minute
- Einlegen in Xylol, 2x je 5 Minuten
- Eindeckeln der Schnitte mit Histofluid

Nach erfolgreicher Färbung sind die LCA-positiven Zellen braun gefärbt, was lichtmikroskopisch an den Stellen einer stattgefundenen Reaktion sichtbar wird (Abbildung 11, S.48).

2.3.2 CD3- und CD20-Färbung

- Entparaffinierung in Xylol für 2x10 Minuten
- Rehydratation in einer absteigenden Ethanolreihe (1x100%ig, 1x90%ig, 1x80%ig, 1x70%ig) und Spülen in Aqua destillata für jeweils 1 Minute
- Hintergrundreduktion durch 3%ige Ethanol/H₂O₂ Lösung für 10 Minuten zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität
- Spülen in Aqua destillata für 5 Minuten
- Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit Lösung A für 5 Minuten in der geschlossenen feuchten Kammer
- Inkubation mit dem Primärantikörper, Anti-CD3 bzw. Anti-CD20 (monoclonal, Verdünnung jeweils 1:100 in Dako[®] Antibody Diluent), für 30 Minuten zugedeckt in der feuchten Kammer
- Waschen mit PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit der Lösung B, dem Sekundärantikörper Biotin, für 15 Minuten in der geschlossenen feuchten Kammer
- Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten.

- Inkubation mit der Lösung C, der Streptavidin-Peroxidase, für 15 Minuten in der geschlossenen feuchten Kammer
- Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit der DAB-Lösung für 5 Minuten bei offener feuchten Kammer
- Waschen für 10 Minuten in Aqua destillata
- Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun für 10 Minuten
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
- Dehydratation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (1x70%ig, 1x80%ig, 1x90%ig, 1x100%ig) für jeweils 1 Minute
- Einlegen in Xylol 2x je 5 Minuten
- Eindeckeln der Schnitte mit Histofluid

Nach erfolgreicher Färbung sind die CD3- und CD20-positiven Zellen braun gefärbt. Dies sieht man lichtmikroskopisch an den Stellen einer stattgefundenen Reaktion (Abbildung 13, S.50; Abbildung 14, S.50 und Abbildung 15, S.51).

2.3.3 Interleukin-6-Färbung

- Entparaffinierung in Xylol für 2x10 Minuten
- Rehydratation in einer absteigenden Ethanolreihe (1x100%ig, 1x90%ig, 1x80%ig, 1x70%ig) und spülen in Aqua destillata für jeweils 1 Minute
- Hintergrundreduktion durch 3%ige Ethanol/H₂O₂ Lösung für 10 Minuten zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität
- Spülen in Aqua destillata für 5 Minuten
- Waschen in PBS-Puffer für 10 Minuten

- Vorbehandlung des Gewebes für den Primärantikörper: erhitzen der Schnitte in Target Retrieval Solution für 15 Minuten im Wasserbad und anschließendes Abkühlen der Schnitte auf Raumtemperatur
- Inkubation mit der Lösung A für 5 Minuten in der geschlossenen feuchten Kammer
- Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-Interleukin-6 (polyclonal, Verdünnung 1:400 in Dako[®] Antibody Diluent) für 60 Minuten in der geschlossenen feuchten Kammer
- Waschen mit PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit der Lösung B, dem Sekundärantikörper Biotin, für 15 Minuten in der geschlossenen feuchten Kammer
- Waschen mit PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit der Lösung C, dem Komplex Streptavidin, für 15 Minuten in der geschlossenen feuchten Kammer
- Waschen mit PBS-Puffer für 10 Minuten
- Inkubation mit der DAB-Lösung für 5 Minuten in der offenen feuchten Kammer
- Spülen in Aqua destillata für 10 Minuten
- Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun für 10 Minuten
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
- Dehydratation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (1x70%ig, 1x80%ig, 1x90%ig, 1x100%ig) für jeweils 1 Minute
- Einlegen in Xylol, 2x je 5 Minuten
- Eindeckeln der Schnitte mit Histofluid

Nach erfolgreicher Färbung sind die Interleukin-6-positiven Zellen braun gefärbt. Dies

kann man lichtmikroskopisch an den Stellen einer stattgefundenen Reaktion sehen (Abbildung 18, S.54;Abbildung 19, S.54).

2.4 Auswertung

Nach der jeweiligen Färbung wurden die Präparate mikroskopisch untersucht. Die sich daraus ergebenden Daten wurden statistisch ausgewertet. Dies wird nun ausführlich erläutert.

2.4.1 Mikroskopische Auswertung/Rating-Skala

Die Färbungen wurden unter einem Leitz-Biomed-Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Auszählung geschah ohne Kenntnis davon, ob der mikroskopierte Fall der Gruppe der SIDS-Fälle oder der Kontrollgruppe zuzuordnen war.

Die Zählung der LCA-positiven Zellen, der CD3- und CD20-positiven Zellen sowie der Interleukin-6-positiven Zellen erfolgte semiquantitativ nach einer Klassifikation von Gentleman et al. (1995) und Oehmichen et al. (1998) mit:

- 0= kein Nachweis von positiven Zellen
- 1= geringgradiger Nachweis von positiven Zellen
- 2= mehrfacher Nachweis von positiven Zellen
- 3= ausgeprägtes Vorhandensein von positiven Zellen über weite Areale.

2.4.2 Statistische Auswertung

Nach Erhebung der Daten am histologischen Schnitt wurden die Parameter in eine

Datenmatrix eingegeben. 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 U-Test sowie Varianzanalysen 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 wurde mit dem Programm Microsoft Excel 2002 durchgeführt.

3. Ergebnisse

Bezüglich der Variablen Größe, Gewicht, Hirngewicht und postmortaler Liegezeit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der SIDS-Fälle und der Kontrollgruppe (Tabelle 4: Vergleich von Körpergröße, Gewicht, Hirngewicht und postmortaler Liegezeit, S.107). Im Folgenden werden die Bezeichnungen Rating-Score, Score, Score-Wert und Rating-Wert synonym verwendet.

3.1 Ergebnisse der LCA/CD45-Färbung

Im Zuge der ersten Färbeserie wurden die elf Gehirnregionen mit einem LCA-Antikörper gefärbt und mikroskopiert.

3.1.1 Immunhistochemische Ergebnisse

Die Ergebnisse werden nun nach Gehirnregionen gegliedert vorgestellt (Tabelle 5: LCA-SIDS versus Kontrollgruppe, S.108).

3.1.1.1 Telencephalon, Substantia grisea

Die graue Substanz wurde gegliedert nach den Lobi frontalis, frontoorbitalis, temporalis, parietalis und occipitalis untersucht. Frontal ließ sich eine Zunahme im Score von 0,61 in der Kontrollgruppe auf 0,64 bei den SIDS-Fällen ($p=0,89$) darstellen, frontoorbital eine Abnahme von 0,41 auf 0,27 ($p=0,37$), temporal zeigte sich eine Zunahme von 0,63 auf 0,64 ($p=0,95$), parietal ergab sich eine Zunahme von 0,63 auf 0,82 ($p=0,24$) und occipital eine Zunahme von 0,70 auf 0,82 ($p=0,56$).

In der Hippocampusformation wurde die gesamte Formation einschließlich des Gyrus dentatus untersucht. Es zeigte sich eine Abnahme des Scores von 1,03 in der Kontrollgruppe auf 0,73 in der SIDS-Gruppe ($p=0,79$).

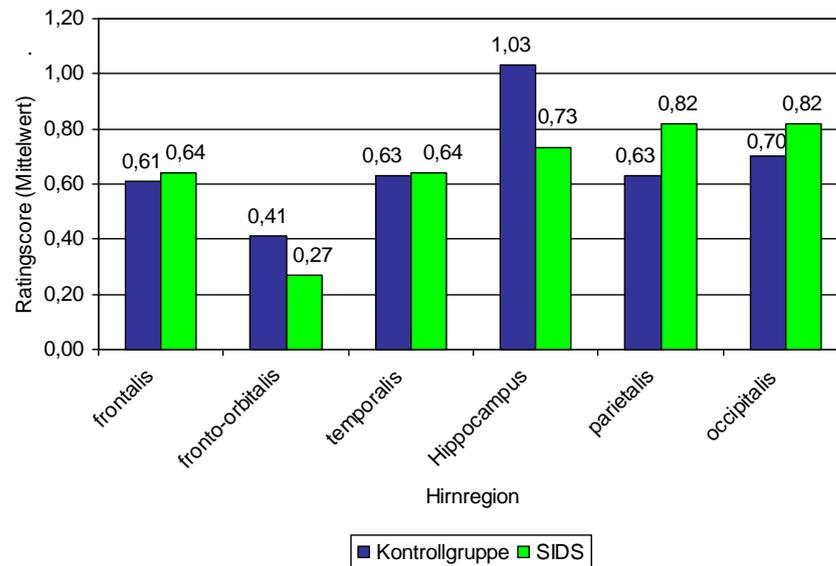


Abbildung 1: LCA-Telencephalon, *S. grisea*

Bis auf die Frontoorbital-Region und die Hippocampusformation erkennt man hier eine leichte wenngleich statistisch nicht signifikante Zunahme der LCA-positiven Zellen in der SIDS-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.

3.1.1.2 Telencephalon, Substantia alba

Die weiße Substanz wurde, ebenfalls in die Lobi frontalis, fronto-orbitalis, temporalis, parietalis und occipitalis gegliedert, gefärbt und mikroskopiert. Frontal nahm der Rating-Wert von 0,71 in der Kontrollgruppe auf 0,91 in der SIDS-Gruppe ($p=0,30$) zu, fronto-orbital von 0,36 auf 0,64 ($p=0,25$), temporal zeigte sich eine Zunahme von 0,69 auf 0,91 ($p=0,15$), parietal offenbarte sich ebenfalls eine Zunahme von 0,78 auf 0,91 ($p=0,40$)

und occipital ergab sich eine Zunahme von 0,61 auf 0,91 ($p=0,06$).

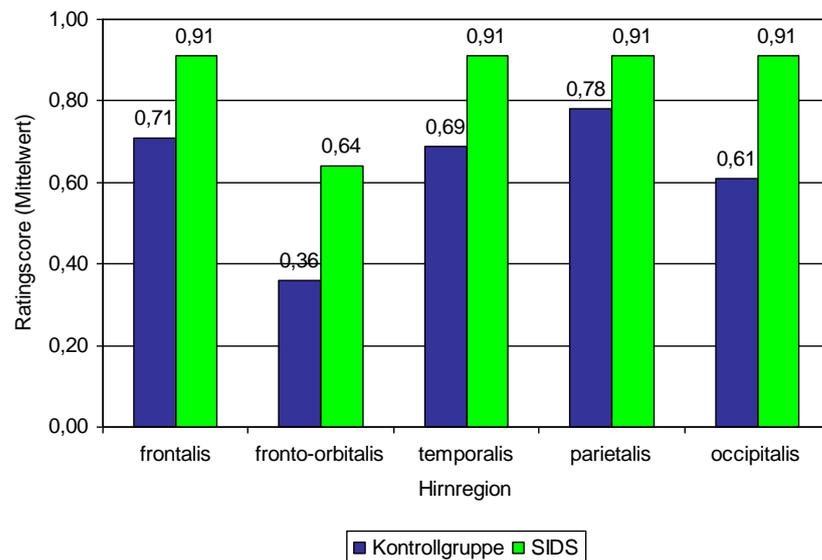


Abbildung 2: LCA-Telencephalon, S. alba

Insgesamt zeigten sich in der weißen Substanz der SIDS-Gruppe tendenziell mehr LCA-positive Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe mit einer signifikanten Erhöhung im Occipitallappen.

3.1.1.3 Telencephalon, Leptomeningen

Die Leptomeningen der Lobi frontalis, frontoorbitalis, temporalis, parietalis und occipitalis wurden ebenfalls immunhistochemisch behandelt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Frontal nahm der Rating-Score von 1,00 in der Kontrollgruppe auf 1,09 in der SIDS-Gruppe ($p=0,70$) zu, frontoorbital ergab sich eine Abnahme von 0,86 auf 0,67 ($p=0,71$), temporal zeigte sich eine Zunahme von 0,63 auf 0,64 ($p=0,30$), parietal eine Abnahme von 1,04 auf 0,89 ($p=0,60$) und occipital erhöhte sich der Score-Wert von 1,04 auf 1,09 ($p=0,54$).

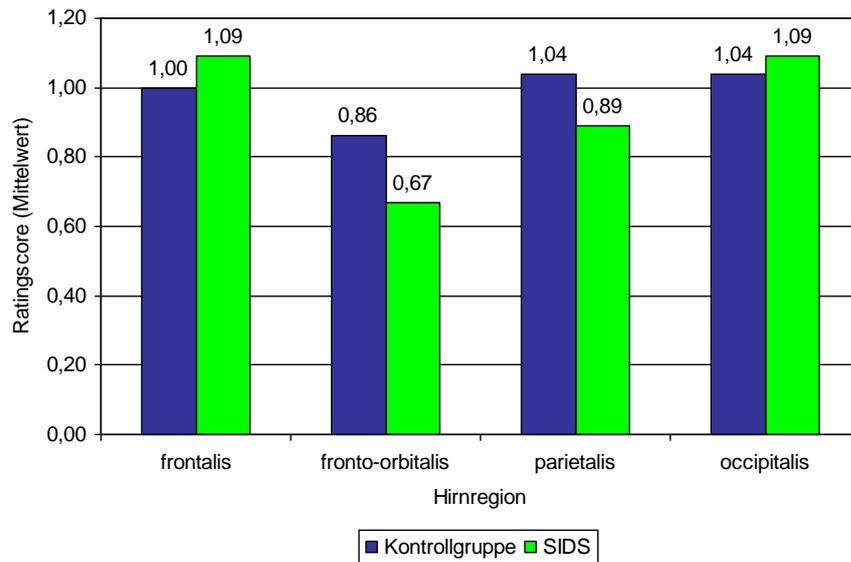


Abbildung 3: LCA-Telencephalon-Leptomeningen

Bezüglich des Vorkommens der LCA-positiven Zellen konnte man keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollfällen erkennen.

3.1.1.4 Cerebellum

Im Kleinhirn wurden die Kleinhirnrinde, die weiße Substanz sowie die Leptomeningen untersucht. Im Kortex verminderte sich der Score von 0,73 in der Kontrollgruppe auf 0,60 in der SIDS-Gruppe ($p=0,52$). In der weißen Substanz zeigten sich gleiche Rating-Werte von 0,80 sowohl bei den Kontrollen als auch in der SIDS-Gruppe ($p=0,42$). Bei den Leptomeningen schließlich ließ sich eine Zunahme von 0,90 auf 1,0 bei der SIDS-Gruppe zeigen ($p=0,47$).

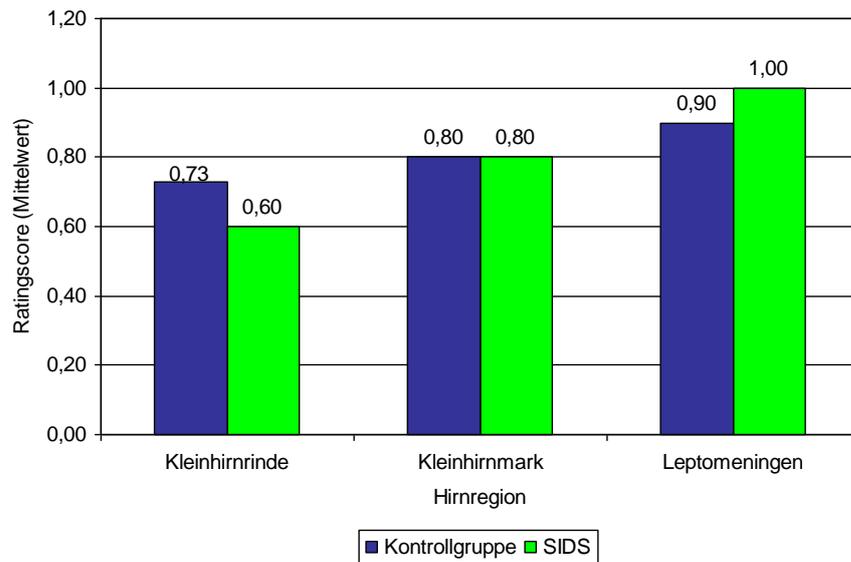


Abbildung 4: LCA-Cerebellum

Hier kann man eine geringfügige, jedoch statistisch nicht signifikante Zunahme der LCA-positiven Zellen in den Leptomeningen des Kleinhirns der SIDS-Gruppe verglichen mit den Kontrollfällen erkennen.

3.1.1.5 Thalamus und Basalganglien

Im Thalamus fanden sich die gleichen Score-Werte von 0,91 sowohl bei den SIDS-Fällen als auch der Kontrollgruppe.

In den Basalganglien zeigte sich eine Abnahme des Rating-Wertes von 0,82 in der Kontrollgruppe auf 0,73 in der SIDS-Gruppe ($p=0,79$).

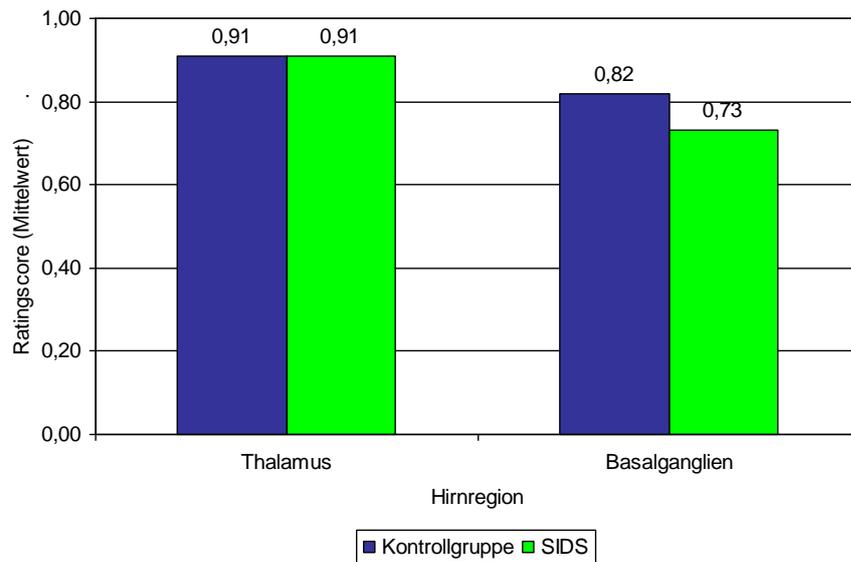


Abbildung 5: LCA-Thalamus und Basalganglien

3.1.1.6 Mesencephalon

Im Mesencephalon ergab sich eine Zunahme des Scores von 0,85 in der Kontrollgruppe auf 0,90 in der SIDS-Gruppe ($p=0,57$). In den Leptomeningen zeigte sich hier ebenfalls eine Zunahme von 0,85 in der Kontrollgruppe auf 1,00 in der SIDS-Gruppe ($p=0,71$). Insgesamt waren im Mesencephalon der SIDS-Gruppe mehr LCA-positive Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe vorhanden.

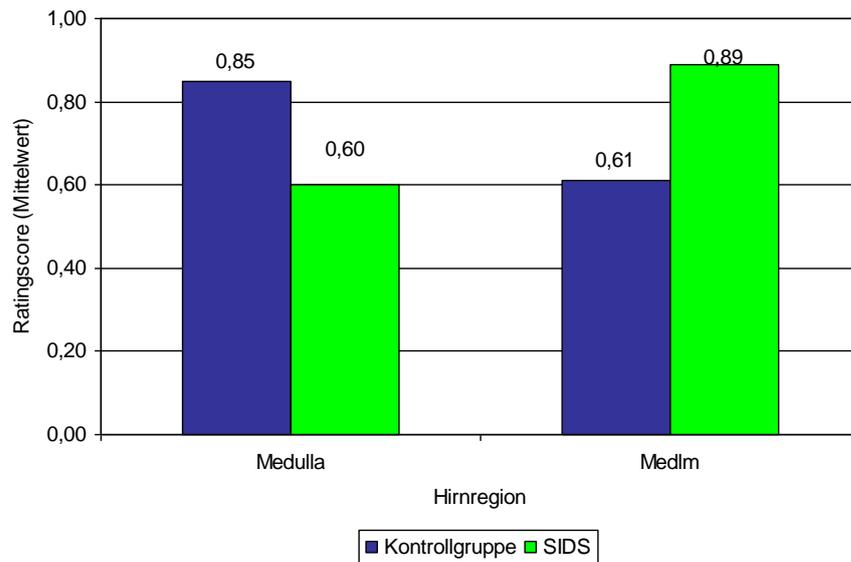


Abbildung 6: LCA-Mesencephalon

3.1.1.7 Pons

In der Pons ergab sich eine Abnahme des Score-Wertes von 0,88 in der Kontrollgruppe auf 0,55 in der SIDS-Gruppe ($p=0,52$). In dem zugehörigen Leptomeningenabschnitt hingegen zeigte sich eine Zunahme von 0,82 in der Kontrollgruppe auf 1,13 in der SIDS-Gruppe ($p=0,83$).

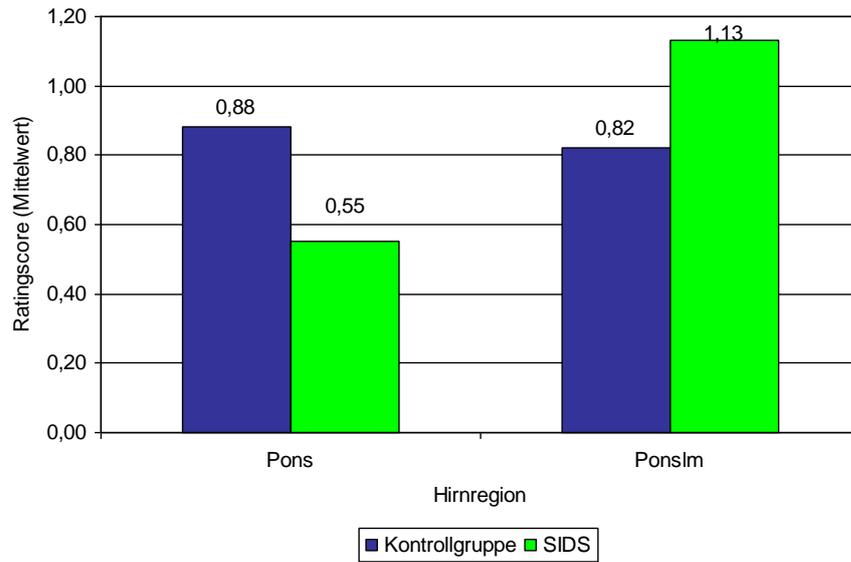


Abbildung 7: LCA-Pons

3.1.1.8 Medulla oblongata

In der Medulla oblongata nahm der Score von 0,85 in der Kontrollgruppe auf 0,60 in der SIDS-Gruppe ($p=0,52$) ab, in den Leptomeningen zeigte sich eine Zunahme von 0,61 in der Kontrollgruppe auf 0,89 in der SIDS-Gruppe ($p=0,60$).

Im Hirnstamm konnte man in den Leptomeningen eine tendenzielle Zunahme der LCA-positiven Zellen in der SIDS-Gruppe, verglichen mit den Kontrollfällen, erkennen.

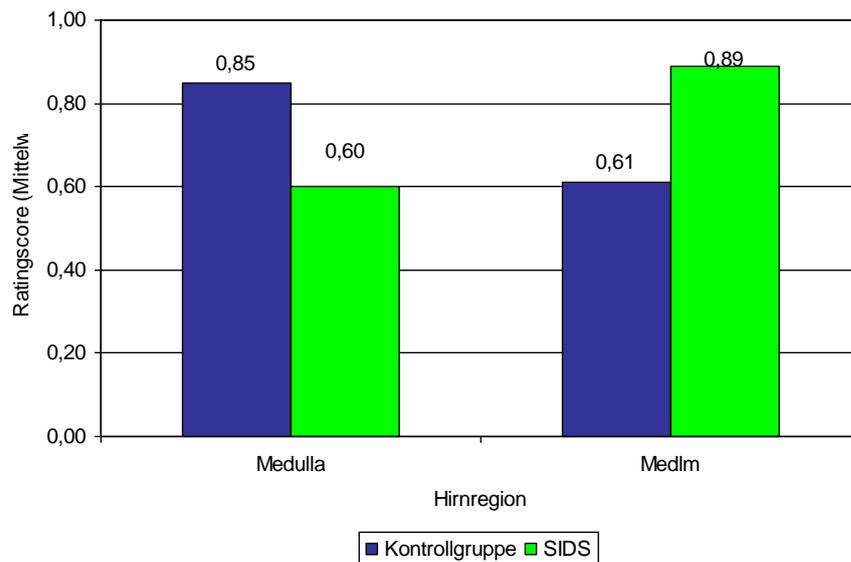


Abbildung 8: LCA-Medulla oblongata

3.1.2 Vergleichende statistische Ergebnisse bei der LCA-Färbung

In diesem Kapitel werden die Daten der Messungen getrennt nach Infektionskrankheiten als Todesursache und anderen Todesursachen statistisch miteinander verglichen.

Alle SIDS-Fälle sind per Definitionem Todesfälle ohne Infektionskrankheit (Tabelle 2: Daten der „infektiösen“ Kontrollfälle, S.105; Tabelle 3: Daten der „nicht-infektiösen“ Kontrollfälle, S.106).

3.1.2.1 Vergleich „infektiöse“ mit „nicht-infektiösen“ Fällen

Beim Vergleich der „infektiösen“ Kontrollfälle mit den „nicht-infektiösen“ Fällen, in die die SIDS-Fälle eingeschlossen waren, konnte man in einigen Gehirnregionen signifikante Unterschiede feststellen.

In den Leptomeningen des Lobus parietalis ergab sich eine Zunahme des Rating-Wertes

von 0,83 in den Kontrollfällen auf 1,31 in den SIDS-Fällen ($p=0,04$).

In den Leptomeningen des Lobus occipitalis zeigte sich eine Zunahme des Rating-Scores von 0,92 in der Kontrollgruppe auf 1,36 in der SIDS-Gruppe ($p=0,05$).

In der Hippocampusformation schließlich nahm der Score von 0,78 in der Kontrollgruppe auf 1,27 in der SIDS-Gruppe zu ($p=0,05$).

Insgesamt waren in diesen drei Gehirnregionen signifikant mehr LCA-positive Zellen bei den „infektiösen“ Kontrollfällen zu finden (Tabelle 6: LCA-„infektiöse“ Kontrollgruppe versus „nicht-infektiöse“ Fälle, S.109).

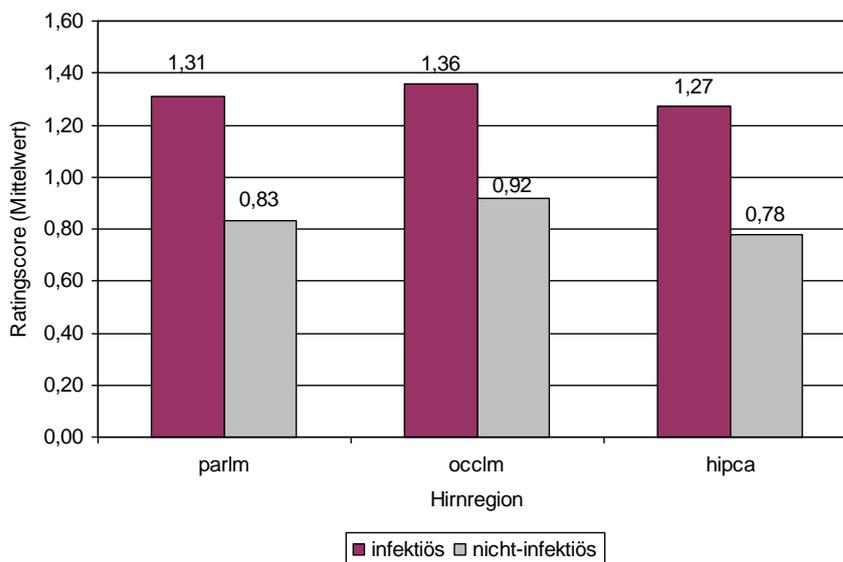


Abbildung 9: LCA-„infektiöse“ Fälle versus „nicht-infektiöse“ Fälle

3.1.2.2 Vergleich innerhalb der gesamten Kontrollgruppe

Beim Vergleich der „infektiösen“ Fälle mit den „nicht-infektiösen“ Fällen innerhalb der Kontrollgruppe relativierte sich ein Teil der obigen Ergebnisse.

In den Leptomeningen des Lobus parietalis ergab sich eine Zunahme des Rating-Wertes

von 0,79 in der „nicht-infektiösen“ Kontrollgruppe auf 1,31 in der „infektiösen“ Gruppe ($p=0,06$).

In den Leptomeningen des Lobus occipitalis zeigte sich eine Zunahme des Rating-Scores von 0,80 in der Kontrollgruppe auf 1,36 in der „infektiösen“ Gruppe ($p=0,03$).

In der Hippocampusformation nahm der Score von 0,81 in der „nicht-infektiösen“ Kontrollgruppe auf 1,27 in der „infektiösen“ Gruppe zu ($p=0,12$).

Bei den „infektiösen“ Fällen zeigte sich eine signifikante Zunahme von LCA-positiven Zellen in den Leptomeningen des Lobus occipitalis. Zusätzlich ergab sich eine leichte Zunahme von LCA-positiven Zellen in den Leptomeningen des Lobus parietalis (Tabelle 8: Ergebnisse der CD3- und CD20-Färbung, S.111).

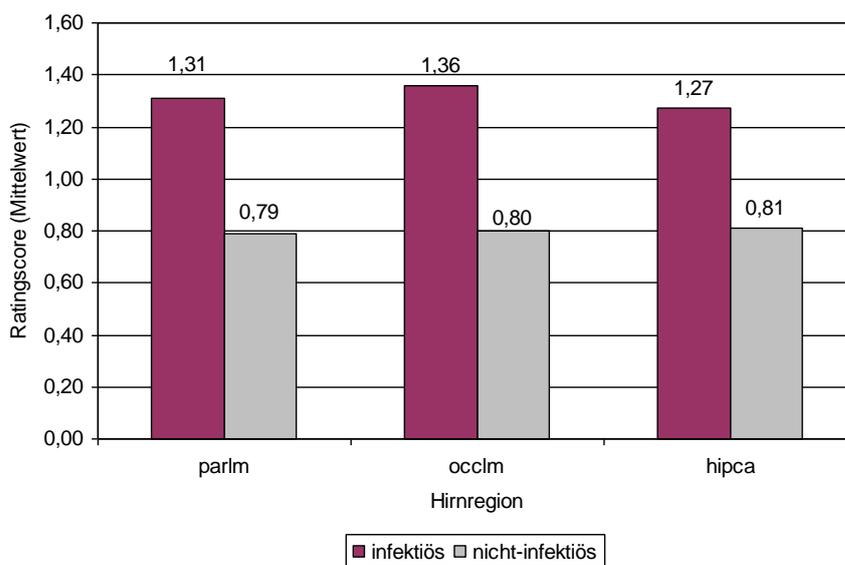


Abbildung 10: LCA-Kontrollgruppen intern: Vergleich „infektiöse“ Fälle versus „nicht-infektiöse“ Fälle

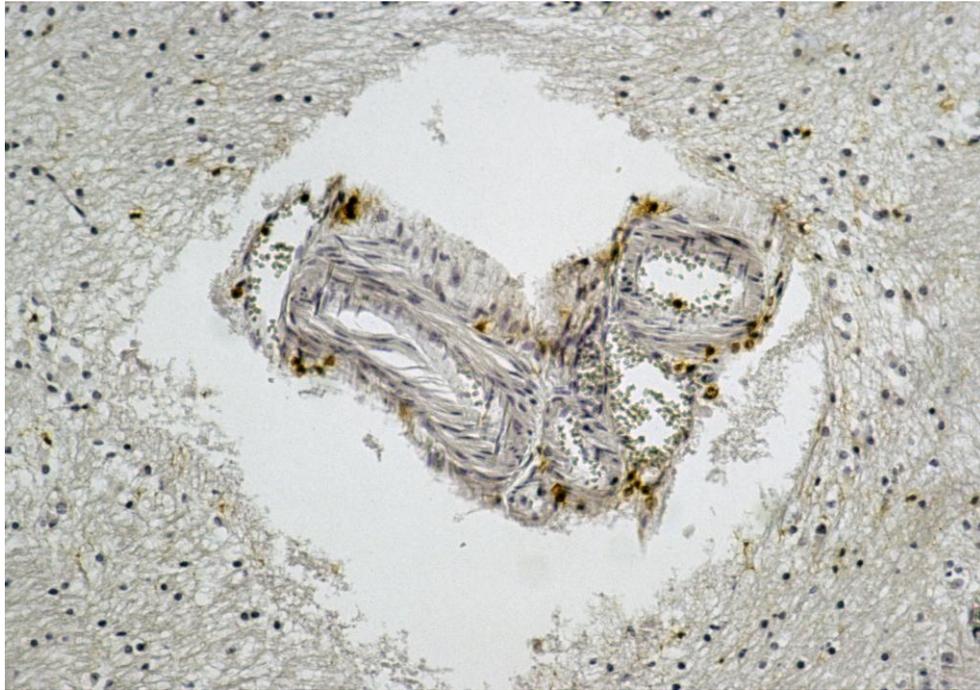


Abbildung 11: Immunhistochemische Darstellung von LCA-positiven Lymphozyten in der weißen Substanz des Frontallappens/SIDS-Gruppe; (Gegenfärbung mit Hämalaun, Vergrößerung 100fach)

3.2 Ergebnisse der CD3- und CD20-Färbung

In der zweiten Färbeserie wurden als repräsentative Regionen der Frontallappen und Occipitallappen mit CD3- und CD20-Antikörpern gefärbt und mikroskopiert, um die nachgewiesenen Lymphozyten in der ersten Färbung nun in B- oder T-Lymphozyten unterscheiden zu können (Tabelle 8: Ergebnisse der CD3- und CD20-Färbung, S.111).

3.2.1 Ergebnisse der CD3-Färbung

Von allen gefärbten Gehirnschnitten waren in 85% CD3-positive Zellen zu identifizieren, 15% der Schnitte waren CD3-negativ.

In der SIDS-Gruppe waren 90% der Gehirnschnitte CD3-positiv und 10% der Schnitte waren CD3-negativ.

3.2.2 Ergebnisse der CD20-Färbung

Von allen gefärbten Gehirnregionen waren in 14% der Fälle CD20-positive Zellen zu erkennen, 86% der Schnitte waren CD20-negativ.

In der SIDS-Gruppe waren 90% der Gehirnschnitte CD20-negativ und 10% der Schnitte waren CD20-positiv.

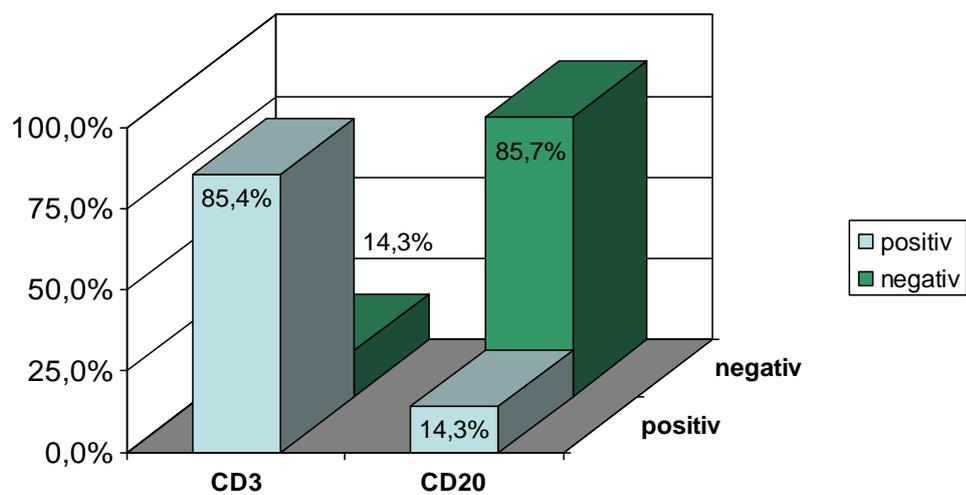


Abbildung 12: Ergebnisse der CD3- und CD20-Färbung

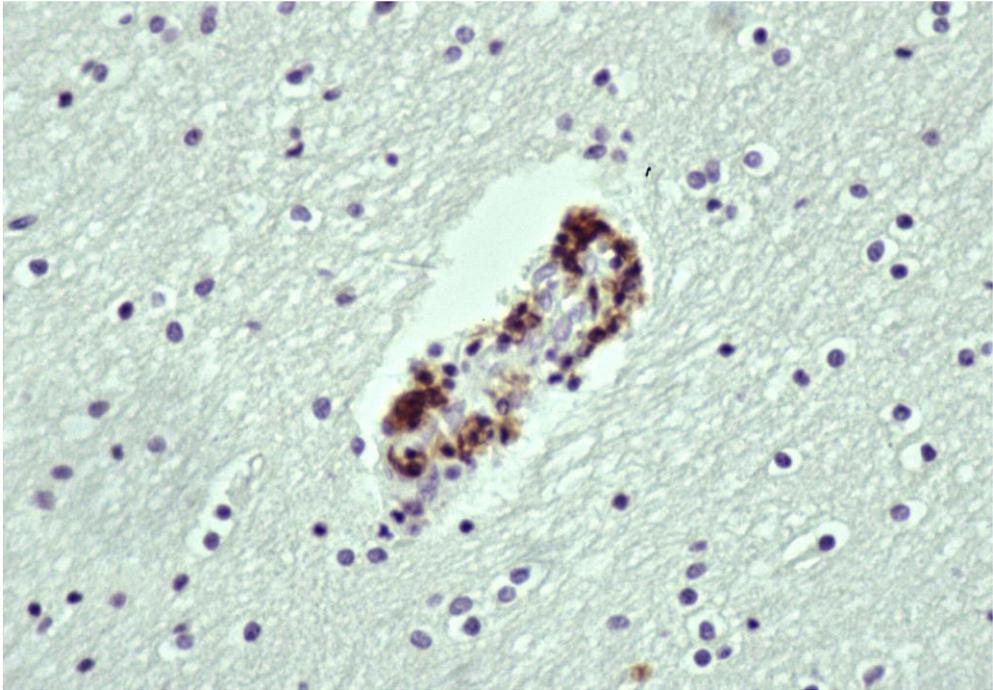


Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung von CD20-positiven B-Lymphozyten in der weißen Substanz des Frontallappens/KG „nicht-infektiös“; (Gegenfärbung mit Hämalaun, Vergrößerung 200fach)

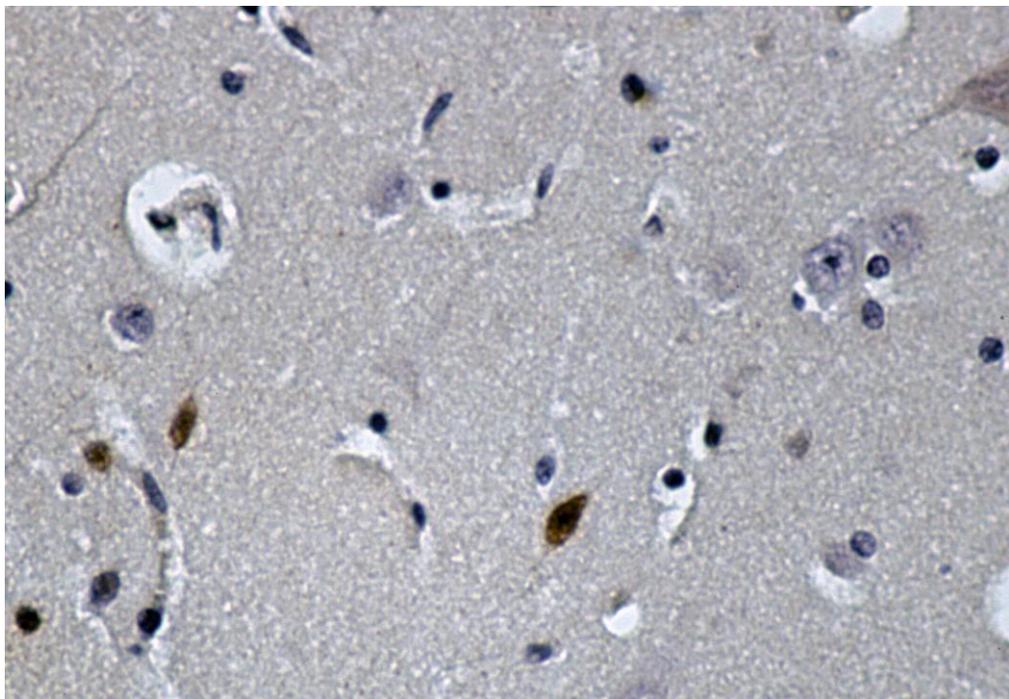


Abbildung 14: Immunhistochemische Darstellung von CD3-positiven T-Lymphozyten im Kortex des Frontallappens/KG „infektiös“; (Gegenfärbung mit Hämalaun, Vergrößerung 200fach)

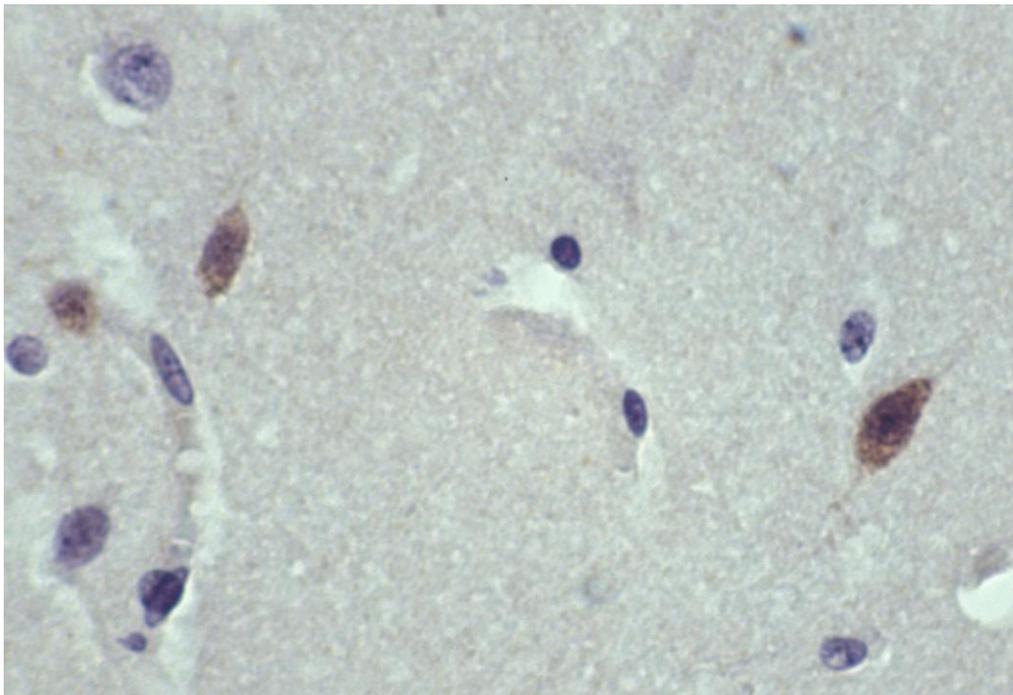


Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung von CD3-positiven T-Lymphozyten im Kortex des Frontallappens/KG „infektiös“; (Gegenfärbung mit Hämalaun, Vergrößerung 400fach)

3.3 Ergebnisse der Interleukin-6-Färbung

In der dritten Färbung wurden der Frontallappen sowie Pons und Medulla mit einem Antikörper gegen Interleukin-6 angefärbt und ausgewertet (Tabelle 10: IL-6: Vergleich „infektiöse“ Kontrollfälle versus „nicht-infektiöse“ Kontrollfälle; S.114).

3.3.1 Pons, Medulla oblongata und Frontallappen

In der Pons nahm der Score-Wert von 0,57 in der Kontrollgruppe auf 0,60 in der SIDS-Gruppe zu ($p=0,82$).

In der Medulla oblongata nahm der Rating-Wert von 0,90 in der Kontrollgruppe auf 1,10 in der SIDS-Gruppe ebenfalls zu ($p=0,63$).

Im Frontallappen ergab sich eine größere Zunahme des Scores von 0,46 in den Kontrollfäl-

len auf 1,00 in der SIDS-Gruppe ($p=0,06$).

In den Leptomeningen des Frontallappens stieg der Rating-Wert ebenfalls von 0,20 in der Kontrollgruppe auf 0,56 in der SIDS-Gruppe an ($p=0,35$).

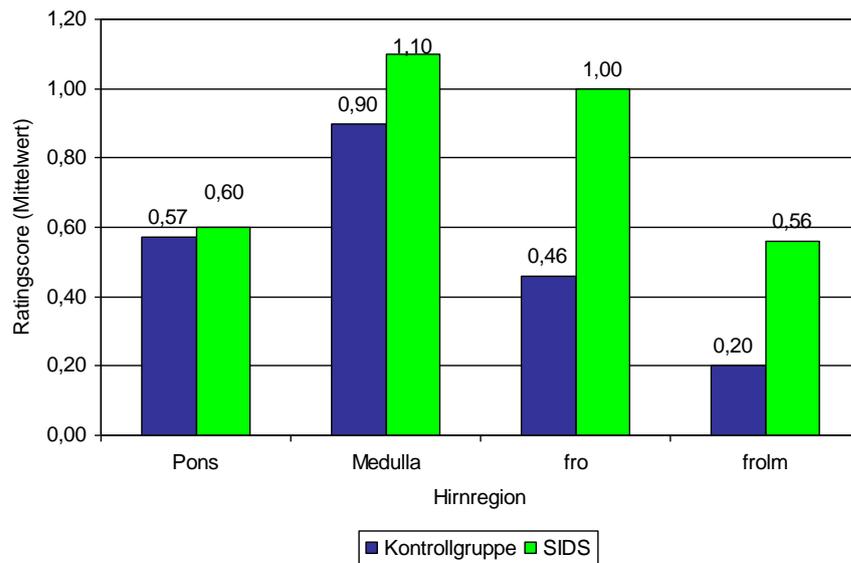


Abbildung 16: Ergebnisse der IL-6-Färbung

Insgesamt lässt sich bezüglich des Interleukinvorkommens feststellen, dass in allen vier untersuchten Regionen mehr Interleukin-6 bei den SIDS-Fällen vorhanden war als bei den Kontrollfällen, was jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau erreichte. Bei der Auswertung fiel auf, dass auch Endothelzellen zusätzlich zu den Lymphozyten durch die immunhistochemische Färbung mit dem IL-6-Antikörper positiv angefärbt wurden.

3.3.2 Vergleich der „infektiösen“ Kontrollgruppenfälle mit den „nicht-infektiösen“ Kontrollgruppenfällen bei der IL-6-Färbung

Beim Vergleich der „infektiösen“ Kontrollgruppenfälle mit den „nicht-infektiösen“ Kontrollgruppenfällen zeigte sich in der Medulla oblongata eine signifikante Zunahme des Rating-Scores (Tabelle 10: IL-6: Vergleich „infektiöse“ Kontrollfälle versus „nicht-infektiöse“ Kontrollfälle, S.114). Er nahm von 0,53 in der „nicht-infektiösen“ Kontrollgruppe auf 1,42 in der „infektiösen“ Kontrollgruppe ($p=0,01$) zu.

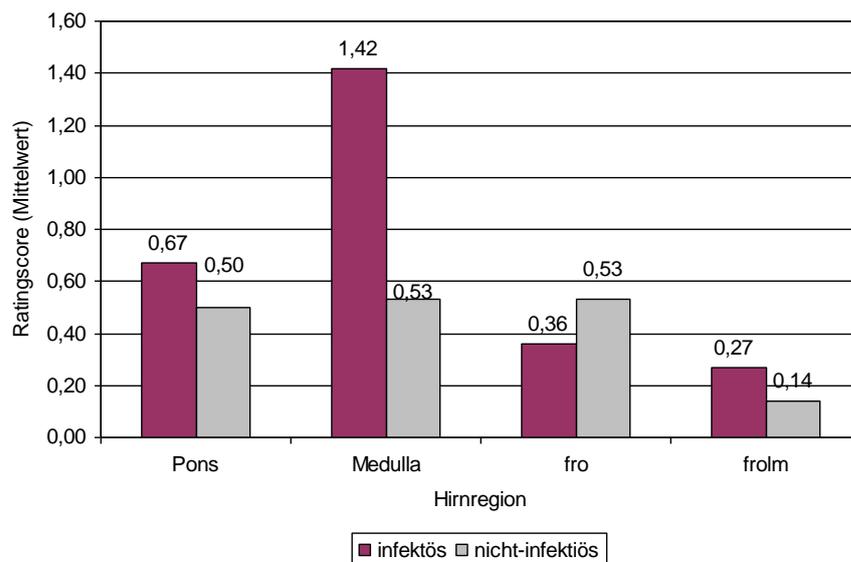


Abbildung 17: IL-6: Kontrollgruppe intern, Vergleich „infektiöse“ Fälle mit „nicht-infektiösen“ Fällen

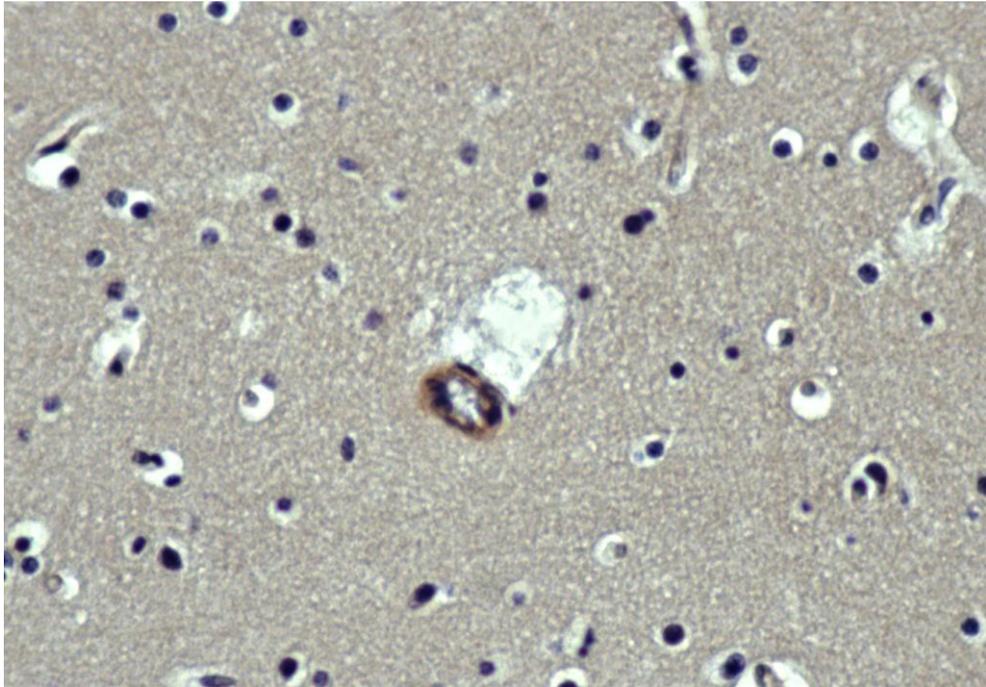


Abbildung 18: Immunhistochemische Darstellung von IL-6-positiven Lymphozyten im Kortex des Frontallappens/SIDS-Gruppe; (Gegenfärbung mit Hämalaun, Vergrößerung 200fach)

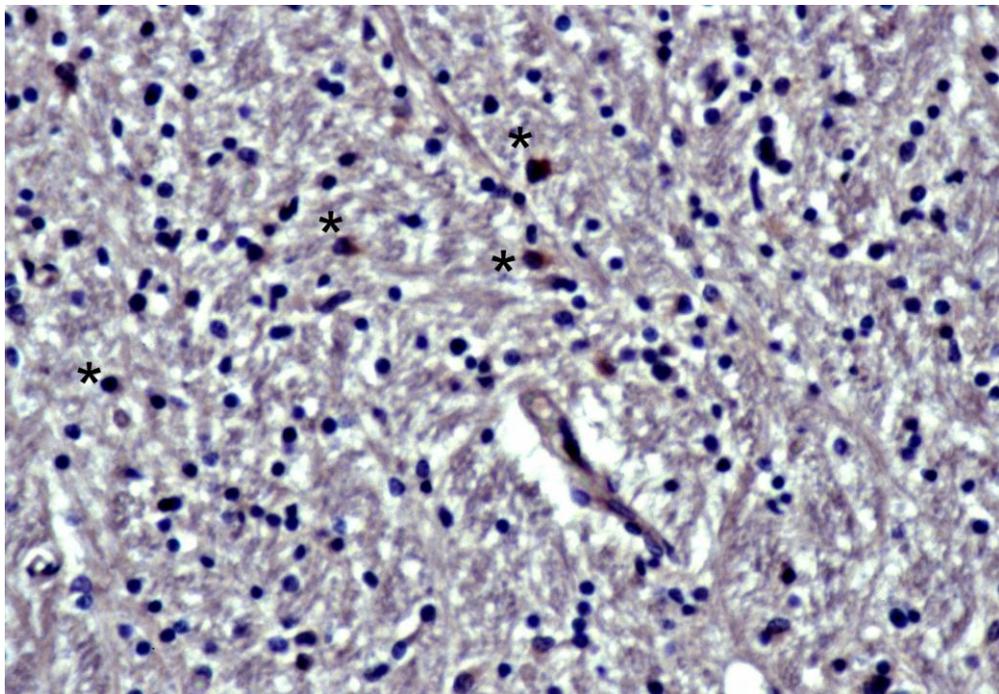


Abbildung 19: Immunhistochemische Darstellung von IL-6 positiven Lymphozyten in der Pons/Kontrollgruppe; (Gegenfärbung mit Hämalaun, Vergrößerung 200fach)

4. Diskussion

In den bisher durchgeführten Studien an Kindern, die an SIDS verstarben, wurden epidemiologische Gesichtspunkte geprüft, Faktoren außerhalb des ZNS untersucht ebenso wie neuropathologische Prozesse. Speziell im Gehirn wurde vor allem der Hirnstamm untersucht, wobei vor allem eine Gliose auffiel, die durch eine Infektion verursacht sein könnte (Naeye, 1966; Kinney et al., 1983; Sparks & Hunsaker, 2002). Eine detaillierte neuropathologische Analyse über inflammatorische Prozesse im Hirnstamm sowie in anderen Hirnregionen von Kindern und Kleinkindern ist in der Literatur bisher nicht beschrieben (Vege & Rognum, 2004; Hunt & Hauck, 2006; Moon et al., 2007). Das Vorhandensein speziell von entzündlichen Infiltraten in Form von B- und T-Lymphozyten sowie Interleukin-6 in den verschiedenen Regionen des Gehirns wurde gleichfalls noch nicht methodisch erforscht (Hunt & Hauck, 2006; Moon et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war daher die systematische lichtmikroskopische Untersuchung von grauer und weißer Substanz sowie der Leptomeningen der verschiedenen Gehirnregionen unter Verwendung von immunhistochemischen Färbemethoden.

4.1 Stichprobengröße

Die Gesamtgröße der in dieser Arbeit untersuchten Stichprobe betrug $n=43$, es handelte sich um elf SIDS-Fälle, 15 „infektiöse“ und 17 „nicht-infektiöse“ Kontrollfälle. Die Stichprobe ist damit anderen publizierten Studien, bezogen auf die Gesamtfallzahl, vergleichbar (Naeye, 1975; Waters et al., 1999; Mallard et al., 1999; Paterson et al., 2006). Die Altersverteilung zwischen SIDS- und Kontrollgruppe bewegte sich in vergleichbarer Größenordnung (Tabelle 1-3, ab S.105).

Aufgrund des Studiendesigns als Blindstudie waren keine Rückschlüsse auf die Gruppenverteilung möglich und die Auswertung erfolgte in Unkenntnis der Gruppenzugehörigkeit. Dadurch konnte sie objektiv durchgeführt werden. Erst nach Auswertung der Ergebnisse stellte sich die Verteilung auf die drei Gruppen heraus. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass sich bei einer größeren Anzahl von SIDS-Fällen die Anzahl der Fälle, in denen vermehrte, jedoch nicht statistisch signifikante, entzündliche Infiltrate gesehen wurden (3. Ergebnisse, S.37), erhöht hätte. Bei einer Einzelbetrachtung der SIDS-Fälle konnte kein einziger Fall gefunden werden, der bei der mikroskopischen Auswertung mit einer drei auf der Rating-Skala bewertet wurde, einige Gehirnregionen wurden jedoch mit einer zwei kategorisiert (2.4.1 Mikroskopische Auswertung/Rating, S.35).

Um die SIDS-Gruppe hinsichtlich des Vorkommens von B- und T-Lymphozyten sowie Interleukin-6 im Gehirn einordnen zu können, wurde die Kontrollgruppe sowohl aus „infektiösen“ Fällen (z.B. Sepsis, Meningitis) als auch aus „nicht-infektiösen“ Fällen (z.B. Ertrinken, Erstickten) zusammengesetzt (Tabelle 2: Daten der „infektiösen“ Kontrollfälle, S 105.; Tabelle 3: Daten der „nicht-infektiösen“ Kontrollfälle, S.106). Die unabhängige Variable hierbei war die Todesursache. Unter Umständen könnten hier jedoch auch Störvariablen eine Rolle gespielt haben. Nicht berücksichtigt wurden hier z.B.

- der Impfstatus der Kinder,
- bereits durchgemachte bakterielle oder virale Erkrankungen,
- die gleichzeitig möglichen Erkrankungen von Geschwisterkindern und Eltern sowie sonstigen Betreuungspersonen,
- virale und bakterielle Erreger, die nicht standardmäßig bei der Obduktion untersucht werden.

Es wäre möglich, dass sich bei einer so eben durchgemachten Infektion noch geringfügige inflammatorische Infiltrate im Gehirn finden. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass enge

Bezugspersonen an einer bakteriellen oder viralen Infektion um den Todeszeitpunkt erkrankt waren, oder sich gerade in der Inkubationszeit befanden, und das SIDS-Kind bereits infiziert war, aber noch keine Symptome oder auffällige Pathologie zeigte. Diese Problematik findet sich allerdings bei allen Arbeiten, die zu der Thematik SIDS durchgeführt wurden, wenn sie nicht speziell die bakteriologische oder virologische Diagnostik zum Ziel hatten.

4.2 Diskussion der Methode

Im Folgenden werden das verwendete Material sowie die durchgeführten Methoden diskutiert.

4.2.1 Vorbereitung, Färbung und Auswertung

Die postmortale Liegezeit ist die Zeitspanne zwischen Todeszeitpunkt und Obduktionszeitpunkt. Sie sollte idealerweise möglichst kurz sein, um einer Artefaktbildung vorzubeugen. Aufgrund der notwendigen Anordnungsverfahren zur gerichtsmedizinischen Obduktion konnte auf die Dauer der postmortalen Liegezeit kein Einfluss genommen werden. Es wurden jedoch nur solche Gehirne in die Studie eingeschlossen, die keine autolytischen Veränderungen aufwiesen. Ferner wurde vom Studienleiter bei der Auswahl der SIDS- und Kontrollfälle darauf geachtet, dass sich die postmortale Liegezeit für die SIDS- und die Kontrollgruppe in vergleichbaren Größenordnungen bewegte. Standardmäßig wurden die Gehirne von SIDS- und Kontrollgruppe direkt nach der Obduktion von dem Studienleiter in Formalin eingelegt. Außerdem befanden sich die entnommenen Gehirne annähernd gleich lange in gepuffertem Formalin, um einen möglichen Einfluss von unterschiedlichen Fixierungszeiten zu minimieren. Um eine ordnungsgemäße, fehlerfreie Anfärbung und

damit ein korrektes Färbeergebnis sicherzustellen, wurden die Färbungen und mikroskopischen Auswertungen jeweils unter Verwendung einer Positivkontrolle durchgeführt. Zur Minimierung des Einflusses der exogenen Faktoren wurden die Reagenzien immer am selben Ort aufbewahrt und die Färbungen fanden stets im gleichen Labor statt. Um eine adäquate Zellzählung zu gewährleisten und Doppelzählungen zu vermeiden, wurde die mikroskopische Auswertung an einem Ort durchgeführt. Die Lichtverhältnisse waren vergleichbar, indem immer bei gleichem Raumlicht, aufrechterhalten durch eine konstante Beleuchtungsquelle, mikroskopiert wurde. Somit konnten auch hier die äußeren Störeinflüsse gering gehalten werden. Sowohl bei den verschiedenen Färbungen als auch bei der Auswertung wurden fortlaufende Arbeitsprotokolle geschrieben.

4.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Da die angenommene Hypothese ein erhöhtes Vorkommen von Lymphozyten im Gehirn von SIDS-Kindern implizierte, wurden zunächst alle Gehirnschnitte mit LCA/CD45 angefärbt.

4.2.2.1 CD45-Antikörper

CD45, ein Transmembran-Protein, wird von allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen exprimiert, außer von Erythrozyten und Thrombozyten (Zuckermann et al., 1998). In Gewebeschnitten erwies sich der monoklonale Antikörper PD7/26 besonders selektiv bei Mantelzelllymphomen und der monoklonale Antikörper 2B11 färbte vor allem T-Zell-Zonen. Deswegen werden beide zusammen bei paraffinierten Gewebeschnitten verwendet um das Leukocyten Common Antigen aufzuspüren (Kurtin & Pinkus, 1985). Auch hier in der Arbeit wurden die Klone 2B11 und PD7/26 zusammen im monoklonalen CD45-

Antikörper für die immunhistochemische Färbung bei paraffinierten Gewebeschnitten verwendet. Da die Mikroglia ebenfalls LCA exprimiert, wurde bei der Auswertung besondere Sorgfalt aufgewendet. Mikrogliale Zellen und Lymphozyten unterscheiden sich durch die Zellmorphologie: Während Lymphozyten eher rund erscheinen, wirken mikrogliale Zellen stäbchenförmig und weisen Ausläufer auf. In den Auswertungen wurden mikrogliale Zellen und Lymphozyten in jedem Präparat getrennt voneinander ausgewertet, damit es zu keinen Verwechslungen oder Ungenauigkeiten hinsichtlich der Positivität kam.

Zur Differenzierung in B- und T-Lymphozyten wurde im Anschluss sowohl eine Färbeserie mit CD20-Antikörpern für B-Lymphozyten als auch eine Färbeserie mit CD3-Antikörpern für T-Lymphozyten durchgeführt.

4.2.2.2 CD20-Antikörper

CD20 wird auf der Oberfläche aller reifen B-Zellen exprimiert und als Marker der Entwicklung der B-Zelllinie angesehen. Der klinische Nutzen von CD20 ist sehr gut bei der Identifizierung der B-Zell-Linie bei Non-Hodgkin-Lymphomen, kann aber auch bei der Diagnostik anderer Krankheiten des blutbildenden Systems helfen. Der am häufigsten zum Nachweis von CD20 verwendete monoklonale Antikörper ist L26. Er ist für Gewebeschnitte, die in Paraffin eingebettet sind, geeignet und wurde auch hier verwendet. Für den Gebrauch bei Paraffingewebeschnitten zeigte L26 eine 95%ige Sensitivität sowie eine 100%ige Spezifität als Marker für die B-Zell-Linie (Chadburn & Knowles, 1994). Eine andere Studie testete verschiedene B-Zell-Marker und kam zu dem Ergebnis, dass L26 der sensitivste unter den getesteten Markern war (Hall et al., 1988).

Trotzdem gab es eine Studie, die feststellte, dass das CD20-Antigen zu einem geringen

Grad auch auf einer Subpopulation von T-Lymphozyten exprimiert wird. Allerdings handelte es sich bei den reagierenden monoklonalen Antikörpern um Leu 16, B1 und 1F5 und nicht um L26, der hier verwendet wurde (Hultin et al., 1993). Das untersuchte Material war jedoch Blut und nicht paraffiniertes Gewebe. Bei einem 2001 stattgefundenen Expertentreffen sollte ein Konsens bezüglich der wichtigsten Marker in der hämatoonkologischen Diagnostik erzielt werden. CD20 wurde bei jeder großen Kategorie an vorderer Stelle genannt (Braylan et al., 2001).

4.2.2.3 CD3-Antikörper

Das CD3-Molekül ist als Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor verbunden, der auf allen T-Zellen exprimiert wird. Die monoklonalen CD3-Antikörper sind weit verbreitet als spezifische T-Zell-Marker in der Lymphomdiagnostik, sie sind allerdings nur für frische Gewebeschnitte oder Gefrierschnitte geeignet. Für die routinemäßige Anfärbung von paraffinierten Gewebeschnitten, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, wurde ein polyklonaler CD3-Antikörper genommen, der sich auf diesem Gebiet etabliert hat (Chan et al., 1995). Auf dem oben genannten Expertentreffen wurde 2001 auch CD3 als oft verwendeter, nützlicher Antikörper angegeben (Braylan et al., 2001).

4.2.2.4 Interleukin-6-Antikörper

Zur Überprüfung der zweiten Hypothese, dass sich in Gehirnen von SIDS-Kindern vermehrt Interleukin-6 findet, wurde eine weitere Färbung durchgeführt. Hierbei wurden der Frontallappen, Pons und Medulla oblongata mit einem IL-6-Antikörper auf die Anwesenheit von Interleukin-6 untersucht.

Der hier verwendete Interleukin-6-Antikörper wurde laut Herstellerangaben noch nicht oft

eingesetzt. Er wurde zum einen in einer Studie verwendet, die die „SELDI immunaffinity capture technology“ untersuchte (Rossi et al., 2006). Zum anderen wurde der IL-6-Antikörper in einer Studie mit ANXA1 (Annexin1) Knock-out-Mäusen und Wildtypen benutzt. Dort sollte die geschlechtsspezifische Wirkung eines Mangels an ANXA1 untersucht werden. Dabei wurde auch Interleukin-6 untersucht. Die hierbei verwendeten Gewebeproben waren allerdings gefroren und nicht paraffiniert wie in der hier vorliegenden Arbeit. In jener Studie wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, eine Verdünnung von 1:400 gewählt, allerdings wurde der Antikörper 2h inkubiert, in dieser Arbeit nur 1 Stunde (Morris et al., 2006).

Exakt der gleiche Klon wurde sowohl in vorliegender Arbeit als auch in einer Studie über Brustkrebs verwendet. Damals wurden jedoch keine Gewebeschnitte, sondern Zellen im Urin angefärbt, die Verdünnung betrug dort 1:1500 (Novick et al., 1992). Um die optimale Konzentration des Antikörpers in der vorliegenden Arbeit zu ermitteln sowie die zuverlässige Anfärbung zu gewährleisten wurden vor der eigentlichen Färbung Verdünnungsreihen mit Positivkontrollen durchgeführt. Darüber hinaus lief bei jeder Färbung eine Tonsille als Positivkontrolle mit, um ein verlässliches Färbeergebnis sicherzustellen, da auch Referenzdaten zum verwendeten Antikörper nur spärlich vorhanden sind. Laut Herstellerangaben ist dieser Antikörper aber ohne weiteres für Paraffinschnitte zu verwenden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Es gibt viele Hinweise auf eine infektiöse Ätiologie bei SIDS. Zahlreiche Studien haben eine solche bakterielle oder virale Ätiologie untersucht und Thesen entwickelt. Bislang war es jedoch nicht möglich, eine eindeutige Ursache für SIDS zu finden.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte das Gehirn systematisch im Hinblick auf eine

inflammatorische Ätiologie untersucht werden. Dazu wurde das Vorhandensein von B- und T-Lymphozyten im Gehirngewebe untersucht. Diese werden sowohl bei bakteriellen als auch bei viralen Infekten als Bestandteil des körpereigenen Immunsystems aktiviert. Die SIDS-Fälle in ihrer Gesamtheit unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollfällen. Bei Betrachtung der einzelnen SIDS-Fälle ohne Kontrollgruppe fiel allerdings auf, dass bei einem Teil der SIDS-Fälle vermehrt Lymphozyten nachweisbar waren. Das wäre vereinbar mit einem entzündlichen Geschehen. Dies könnte von peripher ins ZNS fortgeleitet worden sein oder direkt im ZNS entstanden sein als Antwort auf einen das Immunsystem stimulierenden Reiz. Beim Vergleich der „infektiösen“ Fälle mit den „nicht-infektiösen“ Fällen, in die die SIDS-Fälle eingeschlossen waren, konnte man in einigen Gehirnregionen signifikante Unterschiede feststellen.

In den Leptomeningen des Lobus parietalis ($p=0,04$), den Leptomeningen des Lobus occipitalis ($p=0,05$) sowie der Hippocampusformation ($p=0,05$) fanden sich signifikant mehr LCA-positive Zellen bei den „infektiösen“ Kontrollfällen verglichen mit den „nicht-infektiösen“ Fällen einschließlich der SIDS-Fälle (Tabelle 6: LCA-„infektiöse“ Kontrollgruppe versus „nicht-infektiöse“ Fälle, S.109). Unter Herausnahme der SIDS-Fälle aus der Gruppe der „nicht-infektiösen“ Fälle zeigte sich in den Leptomeningen des Lobus occipitalis ($p=0,03$) bei der „infektiösen“ Gruppe eine vermehrte Anzahl von LCA-positiven Lymphozyten (Tabelle 7: LCA-„infektiöse“ Kontrollgruppe versus „nicht-infektiöse“ Kontrollgruppe, S.110).

Außerdem wiesen 85% der gefärbten Gehirnregionen CD3-positive T-Lymphozyten auf. In der SIDS-Gruppe waren sogar in 90% der Fälle CD3-positive T-Lymphozyten nachweisbar. In 15% der Fälle konnten CD20-positive B-Lymphozyten gefunden werden. In der SIDS-Gruppe waren 10% der Fälle CD20-positiv.

4.3.1 Diskussion der Ergebnisse der LCA-, CD3- und CD20-Färbungen

Die Hauptrisikofaktoren für SIDS sind ähnlich den Risikofaktoren für eine erhöhte Kolonisation und für bakterielle Infektionen. Es existiert die jahreszeitliche Schwankung in der SIDS-Inzidenz, die in den Wintermonaten signifikant statistisch erhöht ist, vergleichbar mit der erhöhten Inzidenz von Erkältungskrankheiten in dieser Jahreszeit (Douglas et al., 1996; Hunt & Hauck, 2006). Harrison wies eine vermehrte Besiedelung des Nasenrachens mit *Staphylococcus aureus* vor allem in den Wintermonaten nach, in denen die SIDS-Inzidenz erhöht ist (Harrison et al., 1999).

Weitere Beispiele für Risikofaktoren sind die Bauchlage und die Exposition für Zigarettenrauch (Blackwell et al., 2005). Kolonisierende Bakterien produzieren Toxine, die die Immunkompetenz des Säuglings angreifen können, vor allem wenn prädisponierende Risikofaktoren wie zum Beispiel die Bauchlage vorliegen (Siarakas et al., 1999). Zusätzlich potenziert die Exposition gegenüber Zigarettenrauch die letalen Effekte der bakteriellen Toxine (Morris, 1999). Bei der Akkumulation einer großen Anzahl an Bakterien im respiratorischen Trakt und einer gleichzeitig erhöhten bakteriellen Bindungsfähigkeit bei Vorhandensein von Zigarettenrauch steigt das SIDS-Risiko (Blackwell et al., 2004). Bei den SIDS-Fällen dieser Arbeit wurde in der polizeilichen Akte eines Falls der Hinweis auf rauchende Eltern gefunden. In sechs Fällen gab es keine Angaben über diesen Risikofaktor im Hinblick auf SIDS.

Das Schlafen in Bauchlage ist ein anderer Hauptrisikofaktor für SIDS, der zu einer vermehrten bakteriellen Kolonisation beitragen kann. Dabei akkumulieren hier mehrere potenzielle bakterielle Toxine in der nasopharyngealen Flora als bei den Kindern, die in Rückenlage schlafen (Goldwater, 2004). Das Schlafen in Bauchlage bei einem Infekt der oberen Atemwege verändert die nasopharyngeale bakterielle Flora der Säuglinge. Eine verän-

derte Besiedelung der Nasenschleimhäute wurde auch bei der Obduktion von SIDS-Fällen häufiger vorgefunden. Die erhöhte Anzahl von männlichen SIDS-Opfern kann dazu auch in Bezug gesetzt werden: Studien haben gezeigt, dass bei männlichen Säuglingen, die in Bauchlage schlafen, signifikant höhere Zahlen von gram-positiven Kokken einschließlich *Staphylococcus aureus* gefunden wurden als bei weiblichen Säuglingen (Harrison et al., 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ebenfalls ein häufigeres Auftreten der entzündlichen Infiltrate bei männlichen SIDS-Fällen. Bei drei männlichen und zwei weiblichen SIDS-Opfern fanden sich vermehrte entzündliche Infiltrate im Gehirn. Bei drei dieser fünf SIDS-Fälle fanden sich auch peripher nachweisbare Zeichen einer Entzündung.

Die pyrogenen Toxine von *S. aureus* werden nur zwischen 37° und 40° Grad Celsius produziert. In der Nase herrschen normalerweise niedrigere Temperaturen. In Bauchlage steigen die Temperaturen in der Nase jedoch an und in manchen Fällen erreichten sie die erforderliche Höhe, um die Toxinproduktion anzustoßen (Blackwell & Weir, 1999). Bei den hier untersuchten SIDS-Fällen lagen fünf Kinder postmortal in Bauchlage, davon konnten bei einem Fall vermehrt Lymphozyten durch die LCA-Färbung nachgewiesen werden. Zwei lagen in Rückenlage, bei den restlichen Fällen fehlten die Angaben.

Weiterhin existieren epidemiologische Daten über die Kinder der kanadischen Eingeborenen, die ein drei- bis siebenfach erhöhtes Risiko für SIDS haben. Hier liegt die Vermutung nahe, dass inflammatorische Prozesse bei der Pathogenese von SIDS eine Rolle spielen. Im Lebensraum der kanadischen Eingeborenen, wurden sehr hohe Konzentrationen an Pilz-, Bakterien- und Virenpartikeln gefunden, die sich sehr wahrscheinlich nachteilig auf die Gesundheit der dort lebenden Einwohner auswirkten. Solche extremen Konzentrationen könnten zu der hohen Inzidenz von Atemwegsinfekten und SIDS beigetragen haben (Wilson, 1999). Auch bei der hier vorliegenden Arbeit zeigten sich bei einem Teil der Fälle vermehrt Lymphozyten im Gehirngewebe. Dies könnte auf eine entzündliche

Mitinfiltration des Gehirns hinweisen, bei der eine periphere Infektion die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht hat. Dadurch könnten die Lymphozyten in das Gehirngewebe gelangt sein. Bei den untersuchten SIDS-Fällen dieser Arbeit wurden leichtere periphere Infektionen bei acht SIDS-Fällen festgestellt. Die Hals-Nasen-Ohren-Region war bei jedem der Fälle betroffen, bei zwei Fällen wurde zusätzlich eine Magen-Darm-Infektion nachgewiesen. Bei zwei von drei Fällen mit postmortal nachgewiesener Lungenbeteiligung waren vermehrt LCA-positive Lymphozyten vorhanden. In vier von acht SIDS-Fällen zeigten sich vergrößerte Lymphknoten wobei bei einem der vier Fälle vermehrt LCA-positive Lymphozyten auftraten.

Die **„Common Bacterial“ Hypothese** wurde erstmals 1987 von Morris publiziert. Er vermutete bakterielle Toxine von bekannten Bakterienstämmen, mit denen jedes Kind im ersten Lebensjahr in Berührung kommt, als Verursacher für SIDS. Mit seiner Hypothese ist Morris in der Lage, den Alterspeak um den zweiten bis vierten Lebensmonat zu erklären. In den ersten Lebenswochen sind die Kinder noch durch das fetoplazentar übertragene mütterliche IgG geschützt. Je mehr der mütterliche IgG-Spiegel im Kind abfällt, desto mehr steigt das Risiko einer Infektion, bis die Kinder eine eigene Immunität gegenüber den normalen Keimen erworben haben. Grundannahme ist, dass jeweils 50% der Bevölkerung mit dem verursachenden Antigen innerhalb von 50 Tagen in Berührung kommen müssen. Dies könne nur ein Bakterium bewirken, kein Virus. Eine ursprünglich virale Nasopharynxinfektion werde von Bakterien übersiedelt, die Endotoxine produzierten. Diese akkumulierten mit den Endotoxinen der intestinalen Keime und könnten dem Kind in dem Zeitraum, in dem das mütterliche IgG abfällt und das eigene noch nicht ausreichend gebildet werden kann, gefährlich werden (Morris, 1999). In der hier vorliegenden Arbeit wurden, als Zeichen für eine inflammatorische Reaktion, Lymphozyten im Gehirngewebe

untersucht. Bei einem Teil der SIDS-Fälle fanden sich vermehrte Lymphozyteninfiltrate, Endotoxine wurden jedoch nicht untersucht. Es scheint durchaus möglich, dass die Infiltrate durch eine infektiobedingte nasopharyngeale Stimulation des Immunsystems bis in das ZNS fortgeleitet wurden.

Morris entwickelte seine Theorie weiter: Für jeden Rezeptor, der den Informationsfluss über die Zellmembran reguliert, existiert ein passendes bakteriell codiertes Molekül, das ihn aktivieren oder deaktivieren kann. Darauf basierend ist es dann möglich, dass bakterielle Toxämie in der kurzen Zeit entstehen kann, die ein Molekül zur Aktivierung oder Deaktivierung des Rezeptors braucht. Damit gibt es nun einen alleinigen Erklärungsansatz, der mit multiplen Bakterien und Toxinen, die mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in vielen verschiedenen Systemen des Körpers miteinander agieren, in Einklang zu bringen ist (Morris, 2004). Bisher wurden in anderen Studien nur bei einem Teil der SIDS-Opfer pathogene Keime im Körper nachgewiesen (Highet, 2008). Es ist denkbar, dass die verursachenden Keime nicht standardmäßig mitgetestet wurden, weil es sich um beispielsweise seltenere oder vermeintlich irrelevante Pathogene handelte. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Viren oder Bakterien, sondern direkt die Lymphozyten als zellulärer Bestandteil des Immunsystems untersucht. Dies geschah unter Verwendung eines LCA/CD45-Antikörpers, der standardmäßig in der Leukozytendiagnostik gebraucht wird. Nur bei einem Teil der SIDS-Fälle konnten leicht vermehrte Lymphozyteninfiltrate entdeckt werden. Morris` Hypothese könnte somit auf einen Teil der SIDS-Fälle zutreffen. Nachdem keine Granulozyten nachgewiesen wurden, deuten die Veränderungen eher auf eine virale als auf eine bakterielle Genese hin. Durch diese Arbeit lässt sich jedoch nicht bestätigen, dass sein Konzept auf alle SIDS-Fälle anzuwenden ist.

Wenn man Morris` Hypothese als richtig annimmt, dann müssten sich die in dieser Arbeit untersuchten SIDS-Fälle statistisch von der Kontrollgruppe unterscheiden und es müssten

vermehrt lymphozytäre Infiltrate in Gehirnen von SIDS-Opfern anzutreffen sein vorausgesetzt sie überwinden die Blut-Hirn-Schranke. Nachdem dies in der vorliegenden Arbeit nicht zutraf, ist entweder Morris` Hypothese nicht bzw. nur zum Teil damit in Einklang zu bringen oder es gibt Faktoren, die die Ergebnisse verfälscht haben. Entweder kann es nun sein, dass die Färbemethoden nicht valide waren, was allerdings durch die mitlaufenden Positivkontrollen ausgeschlossen ist. Es wäre auch möglich, dass sich die Entzündung und damit die Lymphozyten noch nicht ganz bis in das Gehirn ausgebreitet haben und die Blut-Hirn-Schranke noch nicht überwunden haben, aber schon durch Toxine und Cytokinkaskaden zum Tod geführt haben und zwar bei dem Teil der Kinder, die noch keine Infiltrate gezeigt haben.

Crawley et al. (1999) forderten weitere Studien über **Endotoxin**wirkungen und deren Interaktionen. Ihnen fielen bei einigen SIDS-Kindern Zeichen einer leichten bis mittleren Entzündung auf. Bei ihnen war die Endotoxinkonzentration im Blut höher als bei den anderen SIDS-Kindern. Es ist vorstellbar, dass bei diesen Kindern ebenfalls entzündliche Infiltrate im Gehirn zu finden gewesen wären. Zu den SIDS-Fällen dieser Arbeit gibt es leider keine Daten über Endotoxinkonzentrationen im Blut, auf die man zurückgreifen hätte können.

Toxine wurden in SIDS-Gewebeschnitten von Lunge, Niere, Milz und Mittelhirn sowie dem Serum untersucht. In 53% der SIDS-Fälle aus drei verschiedenen Ländern gelang es, *Staphylococcus aureus* und seine Toxine nachzuweisen. Die Rolle der Toxine sollte deshalb genauer untersucht werden (Zorgani et al., 1999). Mittels ELISA und Durchflusszytometrie wurde nur das Mittelhirn untersucht. Es ist gut vorstellbar, dass in den SIDS-Fällen, in denen *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden konnte, auch entzündliche Infiltrate im Gehirn nachweisbar gewesen wären.

Dabei ist es nicht zwingend notwendig, dass eine invasive Infektion vorliegt, eine alleinige Kolonisation reicht vermutlich aus. Ein Beispiel dafür ist der kindliche Botulismus. Hier verursachen die Toxine die Krankheit mit fatalem Ausgang, ohne dass eine charakteristische Pathologie mit invasiver Infektion vorliegt. Diese alleinige Kolonisation könnte bei SIDS eine Rolle spielen, da eine invasive Infektion und eine Todesursache bei SIDS bisher noch nicht gefunden sind (Morris, 1999). Artefakte bei der postmortalen mikrobiologischen Diagnostik werden hauptsächlich durch Kontamination verursacht. Eine Translokation von Bakterien von der oberflächlichen Schleimhaut in das Gewebe und Blut kommt selten vor. Ein Wachstum von Pathogenen in Blut oder Liquor sollte als möglicher Mitverursacher des Todes in jeder Altersklasse betrachtet werden (Morris et al., 2006). Goldwater untersuchte 2008 anhand von Obduktionsprotokollen das Vorhandensein von *Staphylococcus aureus* in sterilen Bereichen (Herzblut, Milz, Liquor) von 130 Säuglingen. Diese sterilen Bereiche sind normalerweise frei von Keimen. In der Gruppe der Kinder, die an einer Infektion gestorben waren, wurde bei einem von fünf Kindern eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* in den sterilen Bereichen festgestellt. Dies konnte auch bei einem von zehn SIDS-Fällen nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser Teil der SIDS-Fälle an einer *Staphylococcus aureus* induzierten Infektion gestorben ist. Deshalb sollten SIDS-Fälle mit *Staphylococcus aureus* Nachweis neu überdacht werden (Goldwater, 2008).

Im Jahr 1972 wurde von Wedgewood die erste **„Triple Risk Hypothese“** aufgestellt. Er präsentierte drei Klassen von Risikofaktoren. Zu der ersten Klasse gehörten Risikofaktoren, die die Wahrscheinlichkeit für den Tod erhöhen wie z.B. Armut. In der zweiten Klasse befanden sich altersspezifische Risikofaktoren, die sich auf den Entwicklungsstatus des Kindes beziehen. Zur dritten Klasse gehörten prädisponierende Risikofaktoren wie das

Schlafen in Bauchlage. 1993 wurde von Rognum und Saugstad die „fatale triangle Hypothese“ vorgestellt. Beim Vorliegen eines vulnerablen Entwicklungsstatus des zentralen Nervensystems und der mucosalen Immunität, sowie zusätzlich prädisponierenden Faktoren wie Astrogliose und genetischen Veränderungen, kommt ein auslösendes Ereignis wie eine Infektion, die als Trigger für SIDS fungiert. Ein Jahr später publizierten Filiano und Kinney die bekannteste „Triple Risk Hypothese“ wonach SIDS das Ergebnis aus der Schnittmenge von drei überlappenden Faktoren ist. Diese sind

- ein vulnerables Kind,
- eine kritische Entwicklungsperiode in der homöostatischen Kontrolle,
- ein exogener Stressor.

Ein Kind stirbt nur dann an plötzlichem Kindstod, wenn alle drei Faktoren zusammen treffen (Guntheroth & Spiers, 2002). Kinney veröffentlichte 2005 ihr „5-HT (Serotonin) triple risk model“.

In dieser Arbeit wurde die Infektion als Beispiel für einen exogenen Stressor näher untersucht. Es schien vor allem interessant, das gesamte Gehirn im Hinblick auf entzündliche Infiltrate zu untersuchen. Im Gesamtvergleich wurden hierbei jedoch keine signifikanten entzündlichen Infiltrate gefunden, so dass dieser Mechanismus wohl nicht für alle Fälle zutrifft. Bei genauerer Betrachtung der SIDS-Fälle gab es jedoch fünf Fälle, die gemäß der rating-Skala in einigen Gehirnregionen mit einer 2 (2.4.1 Mikroskopische Auswertung/Rating, S.35) kategorisiert wurden. Dies lässt sich mit einer vermehrten entzündlichen Aktivität bei einem Teil der SIDS-Fälle in Einklang bringen. Damit wird die „Triple Risk Hypothese“ am Beispiel einer Infektion als exogenem Trigger durch diese Arbeit unterstützt. Da noch keine andere Studie Lymphozyteninfiltrate bei SIDS im Gehirn untersucht hat, fehlt es jedoch an Referenzdaten, um die Ergebnisse genau einordnen zu können. Bei einem Teil der SIDS-Fälle wird durch diese Arbeit die Annahme einer entzündlichen Ätio-

logie untermauert.

Es gibt gleichfalls viele Hinweise auf eine **virale Ätiologie** bei SIDS. Die Epidemiologie von SIDS gibt Anlass zu der Vermutung, dass Viren zu einer infektiösen Ätiologie beitragen könnten. Dies kann direkt oder indirekt über eine synergistische Interaktion mit bakteriellen virulenten Faktoren oder immunregulierenden Polymorphismen stattfinden (Blackwell et al., 2005). Mehr oder weniger starke Hinweise auf virale Infektionen fanden sich in den Obduktionsprotokollen bei acht von elf SIDS-Fällen. Eine virologische Diagnostik wurde von der Staatsanwaltschaft nicht gefordert. Somit liegen diesbezüglich keine genaueren Daten vor. Jedoch fanden sich unter den SIDS-Fällen bei vier Opfern sowohl vermehrte entzündliche Infiltrate als auch IL-6. Bei einem Fall waren nur vermehrte entzündliche Infiltrate vorhanden, bei zwei Fällen waren nur vermehrt IL-6 nachweisbar.

Eine respiratorische Infektion mit Adenoviren könnte als Triggermechanismus für den plötzlichen Kindstod wirken (Bajanowski et al., 1996). Im Jahr 2003 beschäftigte sich eine Studie mit dem Nachweis von RNA-Viren bei SIDS. Die Ergebnisse unterstützten die Hypothese, dass virale Atemwegsinfekte als Trigger beim plötzlichen Kindstod wirken könnten. Getestet wurde auf Influenza A und B, Parainfluenzavirus und RSV. Influenza B konnte in 6,6% der SIDS-Fälle nachgewiesen werden, die anderen Viren konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Bajanowski et al., 2003). Bei dem Großteil der SIDS-Fälle dieser Arbeit wurde zusätzlich keine virologische Diagnostik von der Staatsanwaltschaft angeordnet. Entzündliche Infiltrate, möglicherweise ausgelöst oder mitverursacht durch eine virale Infektion, konnten in fünf von elf SIDS-Fällen gesehen werden. Die Virusisolierung in postmortalem Gewebe ist selten positiv. Der Erfolg könnte durch eine niedrige Viruslast beeinträchtigt sein, vor allem in den Fällen, in denen labile RNA-Viren vorliegen. Es könnte aber auch an den anspruchsvollen benötigten Kulturmedien liegen. So könnte

die aktuelle Inzidenz von viralen Infektionen in postmortalem Gewebe tatsächlich höher sein als angenommen (Bajanowski et al., 2003). Molekularbiologische Untersuchungen wurden seitens der Staatsanwaltschaft nicht angefordert, so dass diesbezüglich keine Aussage über die SIDS-Fälle dieser Arbeit getroffen werden kann. Es scheint somit durchaus möglich, dass in Wirklichkeit viel höhere Zahlen von Viren bei SIDS vorhanden sind, die jedoch aufgrund der schwierigen Kultivierungsverhältnisse nicht oder nur manchmal erkannt werden. Virale Infekte induzieren mit bakteriellen Toxinen Zytokinaktivität und es wird vermutet, dass unkontrolliert ablaufende Kaskaden von Entzündungsmediatoren in einige SIDS-Fälle verwickelt sind (Raza & Blackwell, 1999). Vermutlich erhöht sich die Dosis der bakteriellen Toxine durch das Auftreten einer viralen Infektion und wird letal. Der Mechanismus, durch den dies bewerkstelligt wird, ist noch nicht verstanden, aber eine hohe Zytokinproduktion wird als Ursache angenommen (Doughty et al., 2006). In dieser Arbeit wurde zum Nachweis einer Zytokinaktivität beispielhaft IL-6 in Gewebeschnitten des Gehirns untersucht. IL-6 ist ein Zytokine mit pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften, das B-Zellwachstum und -differenzierung fördert und von den Mikrogliazellen produziert wird (Frei et al., 1989).

Es existiert keine Untersuchung über das Vorhandensein von bakteriellen Toxinen in den SIDS-Fällen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Die Beteiligung der Viren bei der Ätiopathogenese von SIDS könnte auf indirektem Weg erfolgen. Die Kolonisation sowie die Einbindung der Bakterien einschließlich ihrer Toxine sind in Anwesenheit von Viren deutlich erhöht (Blackwell et al., 2004). Prandota vermutet eine systemische Aktivierung des Immunsystems als Antwort auf ein virales Pathogen, das zu einer Verminderung von Enzymen führt, die für den Toxin-Metabolismus und die Toxin-Elimination normalerweise zuständig sind (Prandota, 2005). Eine spanische Forschergruppe führte ein Screening auf Influenza A und B, Adenovirus, RSV und Cytomegalievirus (CMV) durch. Zusätzlich

wurden IgM und IgG von Varicella-Zoster-Virus, Herpes-Simplex-Virus und CMV, Epstein-Barr-Virus und Humanes-Herpes-Virus 6 bestimmt. Mehr als 14% der Fälle hatten positive virale Befunde, aber nur in zwei Fällen war der Virus als Todesursache zu betrachten. Hier könnten die viralen Infekte als Trigger für SIDS fungiert haben. SIDS sollte erst dann diagnostiziert werden, wenn pathologische, toxikologische und mikrobiologische Analysen postmortal negativ sind (Fernández-Rodríguez et al., 2006). Bei acht SIDS-Fällen dieser Arbeit ergaben sich pathologische, meist geringfügige Hinweise auf bestehende Infekte der betroffenen Kinder. Bei vier Kindern fanden sich erhöhte entzündliche Infiltrate und IL-6 im Gehirn.

Wenn nun Infektionen eine Rolle bei der Pathogenese von SIDS spielen, muss es weitere Kofaktoren geben. Die Vermutung bei SIDS ist, dass der Tod multifaktoriell verursacht wird. Es handelt sich um eine Mischung aus prädisponierenden Faktoren und epidemiologischen Risikofaktoren (Goldwater, 2004). Insbesondere relevant erscheinen Polymorphismen in immunregulierenden Genen, die bei dem Kind zu einer gesteigerten Immunantwort führen können, wenn sie von bakteriellen Toxinen und/oder einer viralen Infektion herausgefordert werden. Eine Exposition gegenüber bakteriellen Toxinen oder viralen Infekten könne zu einer erhöhten Cytokinausschüttung führen, die sich als toxisches Schocksyndrom manifestieren kann (Doughty et al., 2006). Hinweise auf leichtere virale Infektionen fanden sich bei acht der hier untersuchten SIDS-Fälle im Hals-Nasen-Ohren-Trakt sowie bei zwei Fällen zusätzlich im Magen-Darm-Trakt.

Das mucosale **Immunsystem** entwickelt sich nach der Geburt und erreicht den vollen Schutz gegen Ende des ersten Lebensjahres. Vor allem über die Nahrung kommen die Kinder in Kontakt mit den Antigenen. In den ersten sechs Lebensmonaten ist die Immunabwehr noch nicht voll ausgereift und stimmt mit dem Peak in der SIDS-Inzidenz überein.

Eine überschießende Immunantwort wurde häufig bei SIDS-Kindern gefunden, teilweise assoziiert mit einer Infektion der oberen Atemwege. Eine inadäquate Immunantwort auf ein normales Antigen und der daraus resultierende entzündliche Prozess wurden als Faktoren vorgeschlagen, die zu SIDS beitragen könnten (Gleeson & Cripps, 2004). In dieser Arbeit wurden bei fünf von elf SIDS-Fällen entzündliche Infiltrate gefunden, die mit der Annahme eines entzündlichen Prozesses in Einklang zu bringen sind.

Ein großer Teil der SIDS-Fälle soll auf eine Überreaktion auf normalerweise harmlose Infektionen zurückzuführen sein. Darauf hinweisende Faktoren sind die mucosale Immunstimulation, Cytokine im Liquor und eine erhöhte Konzentration an Hypoxanthinen im Glaskörper (Vege & Rognum, 1999).

Die Anwesenheit von Antikörpern gegen Clostridien-, Enterobakterien- und Staphylokokken-Endotoxinen wurde im Serum von gesunden Säuglingen und SIDS-Opfern gemessen und verglichen (Siarakas et al., 1999). In allen Seren wurden toxinspezifische Antikörper nachgewiesen, wodurch sich zeigte, dass alle Kinder diesen Bakterien ausgesetzt waren. Die meisten Kinder bewältigten den Kontakt mit den Toxinen erfolgreich und bildeten IgG- und IgM-Antikörper. Einige Kinder mit Immunsystem-schwächenden Risikofaktoren (Temperaturveränderungen, Rauchexposition, Infektion, noch nicht abgeschlossene Entwicklung des Immunsystems, Schlafposition...) könnten jedoch diesen Toxinen oder anderen erliegen (Siarakas et al., 1999). In dieser Arbeit wurden nicht bei allen Kindern entzündliche Infiltrate gefunden. Die Daten konnten die Annahme der Toxinverschuldung des Todes bei SIDS nicht für alle SIDS-Fälle bestätigen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Toxine als exogener Trigger, wie es auch in der Triple Risk Hypothese beschrieben ist, wirken.

Auch andere Autoren vermuteten eine entzündliche Komponente bei der SIDS-Ursachenforschung. Ihre Hypothese lautet, dass bei SIDS im Hintergrund eine triviale In-

fektion und eine entzündliche Reaktion ablaufen. Letztere wird an erhöhten Immunglobulinen in der Lunge und einer erhöhten T-Zell-Aktivierung festgemacht. In einigen SIDS-Fällen ist es möglich, dass diese triviale Infektion zu einer entzündlichen Antwort führt, die eine Zytokin-Kaskade in Gang setzt und eventuell den Tod des Kindes nach sich zieht (Forsyth, 1999). Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit auch überein. Bei dem Vergleich der SIDS-Fälle dieser Arbeit, bei denen IL-6 und Lymphozyten vermehrt nachgewiesen wurden, ergibt sich folgendes Bild: Bei vier Fällen ließen sich jeweils mehr IL-6 und mehr entzündliche Infiltrate als bei den anderen SIDS-Fällen nachweisen, dabei waren jeweils zwei männliche und zwei weibliche Säuglinge betroffen. Bei einem Fall waren nur in bestimmten Gebieten mehr Lymphozyten, bei zwei Fällen war nur vermehrt IL-6 aber keine Lymphozyten nachweisbar.

Eine vermehrte Astrogliose wurde erstmals von Naeye 1966 in der *Formatio reticularis* festgestellt. Weitere Studien untersuchten Gliose bei SIDS. Kinney et al. stellten beispielsweise 1983 bei einigen SIDS-Opfern eine reaktive Gliose durch Astrozyten im Hirnstamm fest. Der Begriff „Gliose“ wird verwendet, um die Antwort der endogenen mikroglialen Zellen auf einen neuronalen Gewebeschaden zu beschreiben (Streit et al., 1999). Eine reaktive Gliose ist der Schlüssel zur Verteidigung des neuronalen Parenchyms gegenüber Infektionskrankheiten, Entzündungen, Verletzungen, Ischämie, Hirntumoren und Neurodegeneration. In dieser Arbeit wurde im Speziellen die inflammatorische Reaktion im Gehirn als ein möglicher Erklärungsansatz für die Gliose überprüft. Es fanden sich nicht bei allen SIDS-Opfern entzündliche Infiltrate, jedoch bei fünf der untersuchten Fälle ließ sich eine vermehrte Infiltration feststellen. Dies ist vereinbar mit der Arbeit von Kinney et al. (1983), die bei einigen SIDS-Opfern eine reaktive Gliose feststellte.

In einer Dissertation zeigte sich eine Zunahme der RCA-1-positiven **Mikrogliazellen** in der SIDS-Gruppe vor allem in den subkortikalen Regionen. Diese Aktivierung der Mikroglia stellt eine Reaktion auf einen Vorgang dar, der das Gleichgewicht des ZNS aus der Balance bringt. Eine zu Grunde liegende infektiöse Ursache wurde wegen der Rolle der Mikroglia als Immunologischem System des Gehirns in Betracht gezogen (Argirov, 2004). Die Ergebnisse oben genannter Arbeit unterstützen die Annahme einer zu Grunde liegenden Infektion mit erhöhter Zytokinproduktion bei einem Teil der SIDS-Fälle als Auslöser für den Tod. Aus dem gleichen Kollektiv stammen die untersuchten SIDS-Fälle dieser Arbeit. Während einer Herpes-Simplex-Infektion wandeln sich die Mikrogliazellen und werden MHC-II-positiv (Kreutzberg, 1996). Bei M. Alzheimer, Multipler Sklerose und HIV kommt der Mikroglia eine zweigeteilte Rolle zu. Zum einen verstärkt sie die Effekte einer Entzündung, zum anderen reguliert sie die zelluläre Degeneration (Gonzalez-Scarano & Baltuch 1999). Die Mikrogliazellen produzierten, stimuliert durch das Immunsystem, lösliche Faktoren, die unter anderem die Formation der tight junctions zwischen den Endothelzellen des Gehirns induzierten. Somit erhöhten sie die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und fördern den Lymphozytenverkehr und deren Persistenz im ZNS (Prat et al., 2001). Bei den SIDS-Fällen mit nachgewiesenen erhöhten entzündlichen Infiltraten könnte dies auf eine Aktivierung des Immunsystems hinweisen.

Anthony et al. (2003) untersuchten die Anwesenheit von **B-Lymphozyten** im gesunden Gehirn. Sie fanden heraus, dass B-Lymphozyten alle Teile des normalen Gehirns besiedeln, allerdings in einer sehr geringen Anzahl. Es konnte keine örtliche Präferenz bei den B-Lymphozyten festgestellt werden. Durch eine Doppelfärbung mit dem Von-Willebrand-Antikörper wurde sichergestellt, dass die B-Lymphozyten weder intravaskulär noch perivaskulär im Verschwinden waren. Die B-Lymphozyten im normalen Parenchym des

Gehirns sind ein CD20-positiver Phänotyp. In dieser Studie wurde unter anderem ein CD20-Antikörper für die immunhistochemische Anfärbung der B-Lymphozyten verwendet. Außerdem wurden die gleichen Hirnregionen wie in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch untersucht und behandelt. Das Gewebe lag ebenfalls in 5µm dicken Paraffinschnitten vor. Dort wurde zusätzlich eine CD23-Färbung durchgeführt, deren Ergebnisse darauf hinweisen, dass nur aktivierte CD23-positive B-Lymphozyten in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und in das ZNS zu gelangen (Anthony et al., 2003). In der hier vorliegenden Studie waren in 14% aller untersuchten Gehirnregionen B-Lymphozyten nachweisbar. Es wurden keine zusätzlichen Bestimmungen über den Aktivierungsgrad der B-Lymphozyten vorgenommen. Vermutlich handelt es sich jedoch um aktivierte B-Lymphozyten, die so in das ZNS eindringen konnten. Hier liegt nun eine Diskrepanz mit der Studie von Anthony et al. (2003) vor. Diese lässt sich folgendermaßen erklären. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die CD20-Färbung kombiniert mit der CD3-Färbung vor allem durchgeführt, um die CD45-Färbeargebnisse nochmals zu reevaluieren und um zu sehen, ob erwartungsgemäß die nachgewiesenen Lymphozyten vor allem T-Lymphozyten waren. Dies konnte bestätigt werden. In 83% der Fälle waren hier T-Lymphozyten zu erkennen. Es wurde hier exemplarisch nur eine Region angefärbt und nicht das gesamte Gehirn untersucht. Bei der mikroskopischen Auswertung wurde ferner der Gewebeschnitt nur dann als positiv gekennzeichnet, wenn mehrere immunhistochemisch positive Zellen vorhanden waren. Somit sind in den negativ gekennzeichneten Schnitten trotzdem einzelne B-Lymphozyten und T-Lymphozyten vorhanden, die dem geringen Grad der normalerweise vorhandenen B- und T-Lymphozyten entsprechen dürften. Es wäre möglich, dass sich bei einer immunhistochemischen Färbung aller Gehirnregionen gezeigt hätte, dass in mehreren Regionen vermehrt B-Lymphozyten vorhanden gewesen wären. Zusätzlich ist es möglich, dass nicht alle vorhandenen B-

Lymphozyten erkannt wurden, da diese laut Anthony et al. (2003) zwar im gesamten Gehirn vorkommen, jedoch nur in einer sehr geringen Anzahl.

Auch **T-Lymphozyten** können, abhängig von ihrem Aktivierungsstatus, durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS einwandern. T-Lymphoblasten gelangen in das ZNS, während T-Lymphozyten, die sich nicht in der Blastenphase befinden, ausgeschlossen sind. Die T-Lymphoblasten erscheinen sehr schnell im Gehirngewebe. T-Lymphozyten, die in das Gehirn gelangt sind, verlassen es innerhalb von 1-2 Tagen. Diejenigen, die in der Lage sind, mit einem ZNS-Antigen zu reagieren, bleiben im Gehirngewebe oder gelangen zyklisch wieder dorthin, um eine Entzündung zu initiieren, wenn sie ihr Antigen korrekt erkennen können (Hickey et al., 1991). In der hier durchgeführten Studie ließen sich in 83% aller Fälle T-Lymphozyten nachweisen, bei den SIDS-Fällen sogar in 90% der Fälle. Dies könnte bei den SIDS-Fällen auf ein inflammatorisches Geschehen hinweisen. Da sich jedoch auch in normalen Gehirnen T-Lymphozyten finden, ist der Unterschied hier nur minimal. Zu Bedenken ist, dass in der oben genannten Studie Gehirne von Erwachsenen untersucht wurden. Es erscheint durchaus vorstellbar, dass nicht alle Ergebnisse, die auf die Gehirne von Erwachsenen zutreffen, auch auf Kinder übertragbar sind.

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse der IL-6-Färbung

Mit der IL-6-Färbeserie in dieser Arbeit ließ sich die anfängliche Hypothese, dass vermehrt IL-6-positive Lymphozyten im Gehirn von SIDS-Opfern zu finden seien, nicht bestätigen. Insgesamt lässt sich jedoch bezüglich des Interleukinvorkommens feststellen, dass in allen vier untersuchten Regionen geringfügig mehr Interleukin-6 bei den SIDS-Fällen vorhanden war als bei den Kontrollfällen. Aufgrund der beschriebenen Gliose im Hirnstamm wurde in

der vorliegenden Arbeit speziell diese Region mit Interleukin-6 angefärbt (Naeye, 1966; Kinney et al., 1983). Beim Vergleich der infektiösen Kontrollgruppenfälle mit den nicht-infektiösen Kontrollgruppenfällen zeigte sich in der Medulla oblongata eine signifikante Zunahme des Rating-Scores ($p=0,01$). Dies ist gut vereinbar mit der proinflammatorischen Funktionskomponente von IL-6 (Merrill & Benveniste, 1996).

Ferner fiel bei der Auswertung auf, dass auch Endothelzellen zusätzlich zu den Lymphozyten durch die immunhistochemische Färbung mit dem IL-6-Antikörper positiv angefärbt wurden.

Die Th-2-Lymphozyten produzieren unter anderem **Interleukin-6**. Das erhöht die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, induziert Fieber und eine reaktive Gliose und erhöht die Produktion von Cytokinen und Antikörpern. IL-6 scheint sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirksam sein zu können (Merrill & Benveniste, 1996). Hier in dieser Arbeit wurde speziell IL-6 als ein wichtiger Vertreter der Cytokine untersucht. Die Ergebnisse der IL-6-Färbung dieser Studie zeigten in allen drei untersuchten Regionen eine höhere Präsenz von IL-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Somit ließ sich die zweite Hypothese, dass bei SIDS vermehrt IL-6 im Gehirn vorhanden ist, nicht bestätigen. Bei genauerer Betrachtung der SIDS-Fälle alleine zeigten sich jedoch bei sechs von elf Fällen vermehrte IL-6-positive Zellen im Gehirn. 1999 maßen Vege et al. bei mehr als der Hälfte der untersuchten SIDS-Fälle erhöhte IL-6- Spiegel im Liquor. Diese Kinder hatten außerdem erhöhte IgA-Spiegel in der laryngealen Mukosa und der Epiglottitis. Die laryngeale HLA-DR-Expression war dort ebenfalls signifikant erhöht. Vege und Rognum untersuchten 2004 den IL-6-Spiegel im Liquor von SIDS-Kindern. Sie konnten anhand der IL-6-Spiegel im Liquor zwei SIDS-Populationen unterscheiden. Die erste Gruppe hatte erhöhte IL-6-Spiegel im Liquor, ähnlich wie die Kinder, die an Infekti-

onskrankheiten starben. Die zweite Gruppe hatte IL-6-Spiegel wie die Kinder, die gewaltsam zu Tode kamen und bei denen postmortal auch keine Infektion nachweisbar war. Ein Kind in einer vulnerablen Altersklasse mit einer leichten Infektion kombiniert mit Bauchlage, warmer Umgebung und möglicherweise genetischen Risikofaktoren könnte eine Serie von entzündlichen und physiologischen Antworten durchleben (Hypoxämie, Hyperthermie, Stimulierung des Immun-/Entzündungssystems), die schnell zum Tode führen könnte (Vege & Rognum, 2004). In der Studie wurden allerdings keine Gewebeschnitte des Gehirns untersucht. Die hier vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, systematisch das Gehirn auf das Vorhandensein von entzündlichen Infiltraten zu untersuchen. Zusätzlich wurde im Hirnstamm die Anwesenheit von IL-6 untersucht. Es war nicht möglich, die SIDS-Gruppe als Ganzes, wie vorgesehen, anhand der IL-6-Nachweise zwischen der entzündlichen und der nicht-entzündlichen Kontrollgruppe zu positionieren. In der SIDS-Gruppe selbst ließen sich jedoch zwei Gruppen erkennen, ähnlich wie dies bei Vege und Rognum 2004 möglich war. Eine Gruppe hatte vermehrt IL-6 (mind. Kategorie 2 in mehr als zwei Regionen) in der anderen Gruppe waren kaum entzündliche Infiltrate zu sehen (2.4.1 Mikroskopische Auswertung/Rating, S. 35). Bei den SIDS-Kindern, bei denen vermehrtes IL-6 nachgewiesen werden konnte, fanden sich in den zugehörigen gerichtsmedizinischen Akten und Obduktionsprotokollen folgende zusätzliche Informationen: In fünf der sechs SIDS-Fälle mit erhöhtem IL-6-Nachweis fanden sich anamnestisch und von pathologischer Seite Anhaltspunkte für leichte Infekte entweder der Ohren, der Atemwege oder des Gastrointestinaltraktes, die jedoch nicht todesursächlich waren. Vier dieser sechs Kinder wurden in Bauchlage gefunden.

Es erscheint denkbar, dass man die SIDS-Opfer in mindestens zwei Gruppen aufteilen muss: Bei der einen Gruppe scheint eine inflammatorische Reaktion im ZNS stattzufinden oder dorthin weitergeleitet zu werden. Bei der anderen Gruppe muss ein anderer unbekann-

ter Mechanismus in Betracht gezogen werden. Bei der hier vorliegenden Arbeit zeigten sechs SIDS-Fälle einen erhöhten Nachweis von IL-6 im Gehirn. Jedoch wurde keine IgA-Bestimmung aus dem Nasen-Rachenraum zur Identifikation einer peripheren Infektion vorgenommen. Somit kann keine sichere Aussage über das gleichzeitige Vorhandensein einer peripheren Infektion im Nasen-Rachenraum getroffen werden.

Man muss nun überlegen, woher das IL-6 im Liquor stammt. Entweder es wurde postmortal im Rahmen von autolytischen Prozessen freigesetzt oder es wurde lokal im Körper produziert und über retrograden axonalen Transport ins ZNS transportiert. In der Hälfte der Fälle wurde ein postmortaler Anstieg beobachtet, bei einem Drittel der untersuchten Fälle zeigte sich ein Abfall in der IL-6 Konzentration (Vege et al., 1998).

Fishman et al. wiesen 1998 nach, dass Erwachsene mit dem GG-Genotyp des IL-6-G-147C SNP *in vitro* höhere IL-6-Level produzierten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es einen genetisch bestimmten Unterschied im Grad der IL-6-Antwort auf Stressoren zwischen den verschiedenen Menschen gibt. So ließe sich die Aufteilung der Kinder in mindestens zwei Gruppen dadurch erklären, dass bei der Gruppe mit erhöhtem IL-6-Spiegel im Liquor der oben genannte Genotyp vorliegt. Dies könnten auch die IL-6-Werte bei einem Teil der SIDS-Fälle dieser Studie bestätigen. 1998 wurde weiter herausgefunden, dass die Cytokine IL-1 und IL-6 stark dilatierend auf die Skelettmuskelarteriolen wirken. Es handelt sich dabei um einen indirekten Wirkmechanismus, an dem parenchymale oder intravasale Faktoren beteiligt sind (Minghini et al., 1998). Dies könnte eine Erklärung für die Auffindesituation mancher SIDS-Kinder sein. Durch diese Dilatation der Arteriolen könnte die beschriebene Rötung und Überwärmung mancher SIDS-Kinder erklärt werden. 2002 wurden im Blut von neugeborenen Ratten die Effekte von Hyperthermie und Muramyl-Dipeptide (MDP), auf IL-1b, IL-6 und die Mortalität untersucht. Nelson et al. (2002) fanden heraus, dass Hyperthermie die Produktion von IL-6 signifikant steigerte,

nicht jedoch IL-1b. Durch MDP wurde die IL-6-Produktion nicht gesteigert, jedoch die von IL-1b. Hyperthermie und eine Infektion, simuliert durch MDP, beeinflussen die Produktion von Cytokinen. Ebenso erhöhten Hyperthermie und MDP die Mortalität der neugeborenen Ratten. Das im Gehirn nachgewiesene IL-6 könnte die Blut-Hirn-Schranke überwunden haben und ein Zeichen für eine stattgefundene Hyperthermie bei den SIDS-Kindern sein. Es muss überlegt werden, auf welchem Weg das IL-6 die Blut-Hirn-Schranke überwinden konnte. Eine parallel vorhandene periphere Infektion könnte dafür beispielsweise in Betracht kommen (Streit & Kincaid-Colton, 1996). Maehlen et al. (1989) zeigten, dass eine periphere Stimulation eine lokale Immunantwort innerhalb des ZNS durch retrograden axonalen Transport hervorrufen könnte. Daher ist es möglich, dass eine Infektion des Nasen-Rachenraums bestimmte Regionen im Hirnstamm stimuliert und dadurch eine IL-6-Produktion im ZNS anregt (Maehlen et al., 1989).

Den Endotoxin-Einfluss auf den IL-6-Spiegel im Blut untersuchten Heesen et al. (2002). Dabei wurde unter anderem eine erhöhte IL-6-Antwort bei Männern festgestellt. Verglichen mit den Ergebnissen der IL-6-Färbungen dieser Studie waren es zwei weibliche und vier männliche SIDS-Fälle mit erhöhtem mikroskopischem IL-6-Nachweis. Dies lässt wiederum eine gewisse Übereinstimmung der Studien erkennen. Allerdings wurde bei oben genannter Studie IL-6 im Blut mittels PCR nachgewiesen und nicht durch eine Antikörper-Färbung im Gewebe.

Eine andere Studie verglich die IL-6-Reaktion auf eine Endotoxin-Stimulation. Dabei wurden verschiedene Populationen mit unterschiedlich hohem SIDS-Risiko verglichen. Das IL-6-G-147C allein kann die beobachteten Unterschiede in der SIDS-Inzidenz bei Aborigines, die eine ungewöhnlich hohe SIDS-Inzidenz haben, und den Bangladeschi, die eine niedrige SIDS-Inzidenz haben, nicht erklären. Hier konnte die unterschiedliche Höhe der IL-6-Antwort bei beiden Geschlechtern nicht bestätigt werden. Moscovis et al. (2006)

verwendeten niedrigere Endotoxinkonzentrationen als Heesen et al.. Möglicherweise reichte der Stimulus nicht aus um eine adäquate repräsentative IL-6-Reaktion zu erreichen. Moscovis et al. (2006) verwendeten zwei verschiedene Konzentrationen: Bei der niedrigeren Konzentration reagierten die männlichen Probanden mit erhöhter IL-6-Produktion, was jedoch statistisch nicht relevant war. Bei der höheren verwendeten Konzentration reagierten diesmal die weiblichen Probandinnen mit einer vermehrten IL-6-Produktion, die jedoch ebenfalls statistisch nicht bedeutsam war (Moscovis et al., 2006). Im Vergleich mit der Arbeit von Moscovis et al. (2006) ist festzustellen, dass hier bei einem Teil der Fälle eine statistisch nicht signifikante Zunahme von IL-6 zu sehen war. Die Arbeit von Moscovis et al. (2006) ist allerdings wegen ihrer nicht repräsentativen Stichprobe in ihrer Aussagekraft eingeschränkt (Highet, 2008).

Es wurde nun untersucht, ob SIDS mit höher produzierenden Genpolymorphismen für gewisse proinflammatorische Cytokine und mit niedriger produzierenden Genpolymorphismen für bestimmte anti-inflammatorische Cytokine assoziiert ist. Dabei fand man heraus, dass sich die Polymorphismen für VEGF und IL-6 signifikant zwischen SIDS-Fällen und Kontrollen unterschieden. Hier war ebenfalls IL-6-174-GG überrepräsentiert bei SIDS. Dieses Allel wird übereinstimmend mit einer vermehrten IL-6-Produktion assoziiert. Das bedeutet, dass bei SIDS-Fällen häufiger die GG-Variante vorhanden ist als in der Normalpopulation (Dashash et al., 2006). Demnach handelt es sich bei den SIDS-Fällen um zwei Gruppen, von denen die eine durch den Genpolymorphismus vermehrt IL-6 produziert. Diese zwei Gruppen fanden sich angedeutet auch in dieser Arbeit: Bei sechs SIDS-Fällen fand sich vermehrt IL-6, bei fünf davon gab es außerdem Hinweise auf periphere Infektionen.

Opdal und Rognum untersuchten 2007 diesen IL-6-174-G/C-Polymorphismus an einer norwegischen SIDS-Gruppe. Sie konnten keine Unterschiede in der IL-6-Produktion in

Zusammenhang mit den verschiedenen Genotypen feststellen. Die Autoren schlugen vor, weitere Genpolymorphismen in der Promoterregion zu untersuchen, um die Rolle des IL-6 bei SIDS näher einordnen zu können.

In dieser Arbeit wurde bei der Auswertung zusätzlich festgestellt, dass nicht nur Lymphozyten, sondern auch Endothelzellen positiv auf die immunhistochemische Färbung mit dem IL-6-Antikörper reagierten. Früh wurde vermutet, dass ein gewebespezifisches Autoantigen auf der Gefäßoberfläche der Endothelzellen exprimiert wird. Man kann davon ausgehen, dass aktivierte zirkulierende T-Lymphozyten ihre Autoantigene auf der Endotheloberfläche mittels eines spezifischen Rezeptors erkennen und so eine lokale inflammatorische Reaktion anregen (Wekerle et al., 1986). Vermutlich präsentieren Endothelzellen

ebenfalls IL-6. Durch die Wirkung von IL-6 ist die Produktion von Cytokinen und Antikörpern erhöht (Merrill & Benveniste, 1996). Diese IL-6-Expression der Endothelzellen kann die T-Lymphozyten zu einer weiteren IL-6-Produktion anregen und so ein mögliches inflammatorisches Geschehen aufrechterhalten und unterstützen. Romano et al. (1997) fanden heraus, dass Endothelzellen nur die gp130-Untereinheit exprimieren, die für die Signaltransduktion zuständig ist, jedoch nicht IL-6R-gp80. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass IL-6 eine positive Rolle in lokalen inflammatorischen Reaktionen spielt, indem es die Leukozyten-Anlockung verstärkt fördert.

Nach Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit ließen sich nur einzelne signifikante Werte ermitteln. In einigen untersuchten Gehirnregionen wie in der grauen und weißen Substanz des Telencephalons sowie dem Mesencephalon ließ sich jedoch eine Tendenz erkennen, dass hier mehr Lymphozyten auftreten. Diese Beobachtung erlangte jedoch keine statisti-

sche Signifikanz. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass sich bei SIDS-Opfern in ihrer Gesamtheit, im Vergleich zu den Kontrollfällen mit und ohne Infektionskrankheit, keine vermehrten entzündlichen Infiltrate im gesamten Gehirn finden. Somit konnte die erste Hypothese dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Einordnung der Ergebnisse bei SIDS-Kindern im Vergleich mit den „infektiösen“ und „nicht-infektiösen“ Kontrollfällen war nicht immer eindeutig möglich. In den Leptomeningen des Lobus parietalis und des Lobus occipitalis sowie der Hippocampusformation fanden sich bei den Kontrollfällen mit Infektionskrankheit jedoch signifikant mehr Lymphozyten.

Ohne Einschluss der SIDS-Kinder in die nicht-infektiösen Fälle zeigte sich nur im Lobus occipitalis eine signifikante Zunahme von Lymphozyten im Vergleich zu den infektiösen Kontrollfällen.

Wie auch schon bei allen vorigen Studien zum Thema SIDS wurde keine Todesursache oder Pathologie gefunden, die für alle SIDS-Fälle zutrifft (Sparks & Hunsaker, 2002; Hunt & Hauck, 2006; Moon et al., 2007). Es ist deshalb fraglich, ob es überhaupt eine alleinige Todesursache gibt, die bei allen SIDS-Opfern gleich ist.

Gemäß der „Triple Risk Hypothese“ ist SIDS das Ergebnis der Schnittmenge von drei überlappenden Faktoren (Filiano & Kinney, 1994; Rognum & Saugstad, 1993; Guntheroth & Spiers, 2002). Diese sind ein vulnerables Kind, eine kritische Entwicklungsperiode in der homöostatischen Kontrolle und ein exogener Stressor (Filiano & Kinney, 1994).

Bei genauerer Betrachtung nur der SIDS-Fälle in dieser Arbeit fand sich bei fünf von elf SIDS-Opfern, in einigen Gehirnregionen eine vermehrte entzündliche Infiltration (Tabelle 5: LCA-SIDS versus Kontrollgruppe, S.108). Durch das Vorhandensein von entzündlichen Infiltraten bei einem Teil der SIDS-Opfer der vorliegenden Arbeit ist es als wahrscheinlich anzusehen, dass eine periphere Infektion vorlag, die die Blut-Hirn-Schranke überwinden

konnte. Dies lässt vermuten, dass eine inflammatorische Reaktion als exogener Stressor gemäß der „Triple Risk Hypothese“ für SIDS wirken kann. Der exogene Stressor kann verschiedener Art sein, zum Beispiel Fieber, Hyperthermie oder Bauchlage. Aber auch bakterielle oder virale Infektionen können als exogener Stressor wirksam werden. Diese Vermutung stützt sich auf epidemiologische Studien, die bei vielen SIDS-Kindern um den Todeszeitpunkt herum leichte Infektionen des Atemwegsystems oder des Gastrointestinaltraktes beschreiben (Filiano & Kinney, 1994).

Es könnte hier sowohl eine periphere Infektion bakterieller oder viraler Genese wie beispielsweise ein nasopharyngealer Infekt vorgelegen haben, der über retrograden axonalen Transport an das ZNS übermittelt wurde. Bei Durchsicht der Fallakten fanden sich immerhin bei acht Fällen Hinweise auf leichte Infektionen. Genauso könnte aber auch eine direkte Immunstimulation des Gehirns vorgelegen haben, die zu der lokalen Bildung von entzündlichen Infiltraten geführt hat. Bei dem Vergleich der SIDS-Fälle dieser Arbeit, bei denen IL-6 und Lymphozyten vermehrt nachgewiesen werden konnten, ergibt sich folgendes Bild: Bei vier Fällen ließen sich jeweils mehr IL-6 und mehr entzündliche Infiltrate als bei den anderen SIDS-Fällen sehen, dabei waren jeweils zwei männliche und zwei weibliche Säuglinge betroffen. Bei einem Fall waren nur in bestimmten Gebieten mehr Lymphozyten, bei zwei Fällen waren nur vermehrt IL-6, aber keine Lymphozyten nachweisbar.

In der Gesamtschau hat diese Arbeit Morris` Hypothese untermauert. Eine virale oder bakterielle Infektion könnte als exogener Stressor zu SIDS führen. Um zu einer Ursachenklärung bei SIDS zu gelangen, ist es wichtig, weiter über die anderen exogenen Stressoren zu forschen. Sie müssen dringend in ihrer Gesamtheit identifiziert werden, um in Zukunft SIDS gezielt vorbeugen zu können. Weiterhin wird empfohlen, in einer weiteren Arbeit die Rolle der Endothelzellen hinsichtlich einer gesteigerten Expression von

proinflammatorischen Faktoren bei SIDS im gesamten Gehirn systematisch zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Ausgehend von Berichten über milde virale und bakterielle Infektionszeichen in einigen Organen bei SIDS-Opfern wurde in der vorliegenden Arbeit systematisch untersucht, ob sich auch im Gehirn solche entzündlichen Korrelate finden lassen. Um die Ergebnisse einordnen zu können, setzte sich die Kontrollgruppe sowohl aus Kindern zusammen, die an einer Infektion gestorben waren, als auch aus Kindern, die durch eine geklärte nicht-entzündliche Ursache ums Leben gekommen waren.

Dazu wurden elf Gehirnregionen von elf SIDS-Fällen und 32 Kontrollfällen untersucht, die sich aus 15 infektiösen Fällen und 17 nicht-infektiösen Fällen zusammensetzten und die in dem Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München obduziert worden waren. Diese wurden immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen das CD45 Transmembran-Glykoprotein auf das Vorhandensein von Leukozyten hin untersucht. Die systematische lichtmikroskopische Auswertung erfolgte semiquantitativ anhand einer Vier-Punkte-Skala. Anschließend wurden die positiven Präparate mit CD3- und CD20-Antikörpern angefärbt, um die Leukozyten in B- und T-Lymphozyten zu unterteilen. In einem dritten Färbegang wurden speziell der Frontallappen sowie Pons und Medulla oblongata der obigen Fälle mit einem Antikörper gegen Interleukin-6 gefärbt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten in keiner der untersuchten Gehirnregionen ein signifikant höheres Auftreten von LCA-positiven Zellen bei SIDS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit konnte die erste Hypothese, dass bei SIDS vermehrt Entzündungszellen im Gehirn auftreten, nicht bestätigt werden. Beim Vergleich der „infektiösen“

Kontrollgruppenfälle mit den „nicht infektiösen“ Fällen, die sich aus den „nicht-infektiösen“ Kontrollgruppenfällen und den SIDS-Fällen zusammensetzten, erkennt man ein signifikant höheres Auftreten von LCA-positiven Zellen in den Leptomeningen von Occipital- und Parietallappen sowie in der Hippocampusformation. Beim Vergleich der „infektiösen“ Kontrollgruppenfälle mit den „nicht-infektiösen“ Kontrollgruppenfällen waren signifikant mehr LCA-positive Zellen in den Leptomeningen des Occipitallappens vorhanden. Die CD3- und CD20-Färbung wurde beispielhaft in drei Gehirnregionen durchgeführt, dabei handelte es sich um Pons, Medulla oblongata und Frontallappen. Sie diente der nochmaligen Kontrolle und Absicherung der LCA-Färbung. Theoretisch ist es möglich, dass sich in den ungefärbten Regionen unerwartete Änderungen im Färbeverhalten ergeben könnten.

Bei den Interleukin-6-Färbungen zeigte sich kein signifikant höheres Vorkommen von Interleukin-6 bei den SIDS-Fällen im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Somit konnte die zweite Hypothese, dass vermehrt Interleukin-6 bei SIDS-Fällen im Gehirn auftritt, nicht bestätigt werden. Allerdings wurden nicht alle Gehirnregionen mit IL-6 angefärbt. Immunhistochemisch untersucht wurden exemplarisch Pons, Medulla oblongata und Frontallappen. Es ist nicht auszuschließen, dass sich in einer der nicht untersuchten Regionen vermehrt Interleukin-6 bei SIDS-Opfern anreichert. Beim Vergleich innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikant höheres Auftreten von Interleukin-6 bei den „infektiösen“ Kontrollgruppenfällen verglichen mit den „nicht-infektiösen“ Kontrollgruppenfällen.

Bei alleiniger Betrachtung der SIDS-Fälle zeigten sich in einigen Fällen vermehrte entzündliche Infiltrate und/oder ein erhöhtes IL-6-Vorkommen. Dies könnte auf eine bakterielle oder virale Infektion hinweisen, die entweder über retrograden axonalen Transport von peripher ins ZNS fortgeleitet werden kann, oder auch eine direkte lokal entstehende ent-

zündliche Infektion. Eine Infektion könnte somit als exogener Stressor bei einem Teil der SIDS-Fälle gemäß der „Triple Risk Hypothese“ wirken. Zur weiteren Abklärung der Ätiopathogenese bei SIDS sollten weitere genetische Polymorphismen untersucht werden und das gesamte Gehirn auf mögliche andere exogene Stressoren überprüft werden.

6. Literaturverzeichnis

- Aloisi F. Immune function of microglia. *GLIA* 36: 165-179, 2001.
- Anthony IC, Crawford DH, Bell JE. B lymphocytes in the normal brain: contrasts with HIV-associated lymphoid infiltrates and lymphomas. *Brain* 126: 1058-1067, 2003.
- Argirov M. Lektin histochemische Untersuchungen der Mikroglia an Gehirnen von SIDS-Fällen. München, 2004.
- Arias E, MacDorman MF, Strobino DM, Guyer B. Annual summary of vital statistics-2002. *Pediatrics* 112: 1215-1230, 2003.
- Bajanowski T, Wiegand P, Cecchi R, Pring-Akerblom P, Adrian T, Jorch G, Brinkmann B. Detection and significance of adenoviruses in cases of sudden infant death. *Virchows Arch* 428: 113-118, 1996.
- Bajanowski T, Rolf B, Jorch G, Brinkmann B. Detection of RNA viruses in sudden infant death (SID). *Int J Legal Med* 117: 237-240, 2003.
- Bajanowski T, Brinkmann B, Vennemann M. The San Diego definition of SIDS: Practical application and comparison with the GeSID classification. *Int J Legal Med* 120: 331-336, 2006.
- Bajanowski T, Vege A, Byard RW, Krous HF, Arnestad M, Bachs L, Banner J, Blair PS, Borthne A, Dettmeyer R, Fleming P, Gaustad P, Gregersen M, Groggaard J, Holter E, Isaksen CV, Jorgensen JV, de Lange C, Madea B, Moore I, Morland J, Opdal SH, Rasten-Almqvist P, Schlaud M, Sidebotham P, Skullerud K, Stoltenburg-Didinger G, Stray-Pedersen A, Sveum L, Rognum TO. Sudden infant death syndrome (SIDS) - Standardised investigations and classification: Recommendations. *Forensic Sci Int* 165: 129-143, 2007.
- Beckwith JB. Defining the sudden infant death syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157: 286-290, 2003.
- Bergström L, Lagercrantz H, Terenius L. Post-mortem analysis of neuropeptides in brains from sudden infant death victims. *Brain Res* 323: 279-285, 1984.
- Blackwell CC, Moscovis SM, Gordon AE, Al Madani OM, Hall ST, Gleeson M, Scott RJ, Roberts-Thomson J, Weir DM, Busuttill A. Cytokine response and sudden infant death syndrome: genetic, developmental, and environmental risk factors. *J Leukoc Biol* 78: 1242-1254, 2005.
- Blackwell CC, Weir DM. The role of infection in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 1-6, 1999.

- Böhnel H, Behrens S, Loch P, Lube K, Gessler F. Is there a link between infant botulism and sudden infant death? Bacteriological results obtained in central Germany. *Eur J Pediatr* 160: 623-628, 2001.
- Boenisch T. Handbuch Immunchemische Färbemethoden. 3. Auflage DakoCytomation GmbH, Hamburg, 2003.
- Bonham AC. Frontiers Review. Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Resp Physiol* 101: 219-230, 1995.
- Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias. Results of an international consensus meeting. *Cytometry* 46: 23-27, 2001.
- Butterworth J, Tennant MC. Postmortem human brain pH and lactate in sudden infant death syndrome. *J Neurochem* 53: 1494-1499, 1989.
- Byard RW, Krous HF. Sudden infant death syndrome - a change in philosophy. Problems, progress & possibilities. Chapter 12: Differential diagnosis of sudden infant death. London: Arnold; 2001.
- Byard RW, Krous HF. Sudden infant death syndrome: Overview and update. *Pediatric and Developmental Pathology* 6: 112-127, 2003.
- Carey EM, Foster PC. The activity of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in the corpus callosum, subcortical white matter, and spinal cord in infant dying from sudden infant death syndrome. *J Neurochem* 42: 924-929, 1984.
- Carpentier V, Vaudry H, Mallet E, Laquerriere A, Leroux P. Increased density of somatostatin binding sites in respiratory nuclei of the brainstem in sudden infant death syndrome. *Neuroscience* 86: 159-166, 1998.
- Champagnat J, Denavit-Saubie M, Henry JL, Leviel V. Catecholaminergic depressant effects on bulbar respiratory mechanisms. *Brain Res* 160: 57-68, 1979.
- Chadburn A, Knowles DM. Paraffin-resistant antigens detectable by antibodies L26 and polyclonal CD3 predict the B- or T-cell lineage of 95% of diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol* 102: 284-291, 1994.
- Chan JKC, Tsang WYW, Pau MY. Discordant CD3 expression in lymphomas when studied on frozen and paraffin sections. *Hum Pathol* 26: 1139-1143, 1995.
- Clancy RR, Spitzer AR. Cerebral cortical function in infants at risk for sudden infant death syndrome. *Ann Neurol* 18: 41-47, 1985.
- 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.

- 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.
- Cruz-Sanchez FF, Lucena J, Ascaso C, Tolosa E, Quinto I, Rossi ML. Cerebellar cortex delayed maturation in sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 340-346, 1997.
- Dashash M, Pravica V, Hutchinson IV, Barson AJ, Drucker DB. Association of sudden infant death syndrome with VEGF and IL-6 gene polymorphisms. *Hum Immunol* 67: 627-633, 2006.
- Dev NB, Loeschcke HH. A cholinergic mechanism involved in the respiratory chemosensitivity of the medulla oblongata in the cat. *Pflügers Arch* 379: 29-36, 1979.
- Doughty LA, Carlton S, Galen B, Cooma-Ramberan I, Chung CS, Ayala A. Activation of common antiviral pathways can potentiate inflammatory responses to septic shock. *Shock* 2: 187-194, 2006.
- 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.
- Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today* 5: 218-224, 1994.
- Falck G, Rajs J. Brain weight and sudden infant death syndrome. *J Child Neurol* 10: 123-126, 1995.
- Fernández-Rodríguez A, Ballesteros S, de Ory F, Echevarría JE, Álvarez-Lafuente R, Vallejo G, Gómez J. Virological analysis in the diagnosis of sudden children death: A medico-legal approach. *Forensic Sci Int* 161: 8-14, 2006.
- Filiano JJ, Kinney HC. Arcuate nucleus hypoplasia in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 394-403, 1992.
- Filiano JJ, Kinney HC. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: The triple-risk model. *Biol Neonate* 65: 194-197, 1994.
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369-1376, 1998.
- Forsyth KD. Immune and inflammatory responses in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 79-83, 1999.
- 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.

- Gadson D, Emery J. Quantitative morphologic studies of developing human cerebellar cortex in various disease states. *Arch Dis Child* 51: 964-967, 1976.
- Gentleman SM, Roberts GW, Gennarelli TA, Maxwell WL, Adams JH, Kerr S, Graham DI. Axonal injury: a universal consequence of fatal closed head injury? *Acta Neuropathol* 89: 537-543, 1995.
- Gilson TP, Balko MG, Blisard KS, Taylor KL. Morphologic variations of the external arcuate nucleus in infants dying of SIDS: A preliminary report. *J Forensic Sci* 39: 1076-1083, 1994.
- Gleeson M, Cripps AW. Mini-review. Development of mucosal immunity in the first year of life and relationship to sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42: 21-33, 2004.
- Goldwater PN. SIDS pathogenesis: pathological findings indicate infection and inflammatory responses are involved. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42: 11-20, 2004.
- Goldwater PN. Sterile site infection at autopsy in sudden unexpected deaths in infancy. *Arch Dis Child* Doi:10.1136/adc.2007.135939; PMID 18794179, 2008.
- Gonzalez-Sacrano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22: 219-240, 1999.
- Guntheroth WG, Spiers PS. The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 110: 64-69, 2002.
- Hall PA, D'Ardenne AJ, Stansfeld AG. Paraffin section immunohistochemistry. I. Non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 13: 149-160, 1988.
- Handy TC, Buchino JJ. Forensic Pathology, Part II - Sudden natural death in infants and young children. *Clinics in Laboratory Medicine* 18: 323-338, 1998.
- 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.
- Heesen M, Bloemeke B, Heussen N, Kunz D. Can the interleukin 6 response to endotoxin be predicted? Studies of the influence of a promoter polymorphism of the interleukin 6 gene, gender, the density of the endotoxin receptor CD14, and inflammatory cytokines. *Crit Care Med* 3: 664-669, 2002.
- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* 28: 254-260, 1991.
- Hight AR. An infectious aetiology of sudden infant death syndrome. *J Appl Microbiol* 105: 625-635, 2008.

- 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.
- Hollander N. Beta-endorphin in the brainstem, pituitary, and spinal fluid of infants at autopsy: Relation to sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* 38: 67-74, 1988.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981.
- Huggle S, Hunsaker III JC, Coyne CM, Sparks DL. Oxidative stress in sudden infant death syndrome. *J Child Neurol* 11: 433-438, 1996.
- Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (Pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T-lymphocytes. *Cytometry* 14: 196-204, 1993.
- Hunt CE, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *CMAJ* 174: 1861-1869, 2006.
- 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.
- Jonville-Béra AP, Autret-Leca E, Barbeillon F, Paris-Llado J, The French reference centers for SIDS. Sudden unexpected death in infants under 3 months of age and vaccination status-A case-control study. *J Clin Pharmacol* 51: 271-276, 2000.
- Jordan D, Kermadi I, Rambaud C, Bouvier R, Dijoud F, Martin D, Kopp N. Autoradiographic distribution of brainstem substance P binding sites in humans: Ontogenic study and relation to sudden infant death syndrome (SIDS). *J Neural Transm* 104: 1101-1105, 1997.
- Kalaria RN, Fiedler C, Hunsaker III JC, Sparks DL. Synaptic neurochemistry of human striatum during development: Changes in sudden infant death syndrome. *J Neurochem* 60: 2098-2105, 1993.
- Kato I, Groswasser J, Franco P, Scaillet S, Kelmanson I, Togari H, Kahn A. Developmental characteristics of apnea in infants who succumb to sudden infant death syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1464-1469, 2001.
- 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: 429-434, 2000.
- Kinney HC, Brody BA, Finkelstein DM, Vawter GF, Mandell F, Gilles FH. Delayed central nervous system myelination in the sudden infant death syndrome. *J Neuropath Exp Neurol* 50: 29-48, 1991.

- Kinney HC, Burger PC, Harrell FE, Hudson RP. "Reactive gliosis" in the medulla oblongata of victims of the sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 72: 181-187, 1983.
- Kinney HC, Filiano JJ, Harper RM. The neuropathology of the sudden infant death syndrome. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 115-126, 1992.
- Kinney HC, Filiano JJ, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, Frost-White W. 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, Rava LA, Frost-White W. Tritiated-naloxone binding to brainstem opioid receptors in the sudden infant death syndrome. *J Auton Nerv Syst* 69: 156-163, 1998.
- Kinney HC, Filiano JJ, Frost-White W. Medullary serotonergic network deficiency in the sudden infant death syndrome: review of a 15-year study of a single dataset. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 228-247, 2001.
- Kinney HC. Abnormalities of the brainstem serotonergic system in the sudden infant death syndrome: A review. *Pediatr Dev Pathol* 8: 507-524, 2005.
- Konrat G, Halliday G, Sullivan C, Harper C. Preliminary evidence suggesting delayed development in the hypoglossal and vagal nuclei of SIDS infants: A necropsy study. *J Child Neurol* 7: 44-49, 1992.
- Kopp N, Najimi M, Champier J, Chigr F, Charnay Y, Epelbaum J, Jordan D. Ontogeny of peptides in human hypothalamus in relation to sudden infant death syndrome (SIDS). *Prog Brain Res* 93: 167-187, 1992.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318, 1996.
- Krous HF, Nadeau JM, Silva PD, Blackbourne BD. Neck extension and rotation in sudden infant death syndrome and other natural infant deaths. *Pediatr Dev Pathol* 4: 154-159, 2001.
- Krous H, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG, Mitchell EA. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: A definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 114: 234-238, 2004.
- Kuich TE, Franciosi RA. A study of the endogenous opioid system in the sudden infant death syndrome. *Med Hypotheses* 10: 365-384, 1983.
- Kurtin PJ, Pinkus GS. Leucocyte common antigen-A diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 16: 353-365, 1985.

- Lucena J, Cruz-Sanchez FF. Ependymal changes in sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 348-356, 1996.
- Maehlen J, Olsson T, Zachau A, Klareskog L, Kristensson K. Local enhancement of major histocompatibility complex (MHC) class I and II expression and cell infiltration in experimental allergic encephalomyelitis around axotomized motor neurons. *J Neuroimmunol* 23: 125-132, 1989.
- Mage DT, Donner M. The X-linkage hypotheses for SIDS and the male excess in infant mortality. *Med Hypotheses* 62: 564-567, 2004.
- 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.
- Maslowski HA. A new hypothesis for sudden infant death syndrome: the occlusion of vertebral arteries as a major cause. *J Clin Forensic Med* 3: 93-98, 1996.
- 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. *Resp Physiol* 42: 171-188, 1980.
- Minghini A, Britt LD, Hill MA. Interleukin 1 and interleukin 6 mediated skeletal muscle arteriolar vasodilatation: In vitro versus in vivo studies. *Shock* 3: 210-215, 1998.
- Missliwetz J, Reiter C, Zoder G. Periventricular fatty metamorphosis in neuroglia-A morphologic substrate in SIDS. *Z Rechtsmed* 96: 173-182, 1986.
- Moon RY, Horne RSC, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370: 1578-1587, 2007.
- Moore S, Thanos S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Progress in Neurobiology* 48: 441-460, 1996.
- Morris JA. The common bacterial toxins hypothesis of sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 11-17, 1999.
- Morris JA. Mini-Review. Common bacterial toxins and physiological vulnerability to sudden infant death: The role of deleterious genetic mutations. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42: 42-47, 2004.
- Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Postmortem bacteriology: a re-evaluation. *J Clin Pathol* 59: 1-9, 2006.
- Morris JF, Omer S, Davies E, Wang E, John C, Afzal T, Wain S, Buckingham JC, Rower RJ, Christian HC. Lack of annexin 1 results in an increase in corticotroph number in male but not female mice. *J Neuroendocrinol* 18: 835-846, 2006.

- Moscovis SM, Gordon AE, Al Madani OM, Gleeson M, Scott RJ, Roberts-Thomson J, Hall ST, Weir DM, Busuttill A, Blackwell CC. IL6 G-174C associated with sudden infant death syndrome in a caucasian Australian cohort. *Hum Immunol* 67: 819-825, 2006.
- Nachmanoff DB, Panigraphy A, Filiano JJ, Mandell F, Sleeper LA, Valdes-Dapena M, Krous HF, Frost White W, Kinney HC. Brainstem 3H-nicotine receptor binding in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1018-1025, 1998.
- Naeye RL. Brainstem and adrenal abnormalities in the sudden infant death syndrome. *Am J Clin Pathol* 66: 526-530, 1976.
- Naeye RL, Olsson JM, Combs JW. New brain stem and bone marrow abnormalities in victims of sudden infant death syndrome. *Journal of Perinatology* 2: 180-183, 1989.
- Naeye RL. Hypoxemia and the sudden infant death syndrome. *Science* 186: 837-838, 1974.
- Naeye RL. Sudden infant death. *Sci Am* 242: 56-62, 1980.
- Nelson EAS, Wong Y, MeeYu L, Fok TF, Li K. Effects of hyperthermia and muramyl dipeptide on IL-1b, IL-6 and mortality in a neonatal rat model. *Pediatr Res* 52: 886-891, 2002.
- Novick D, Shulman LM, Chen L, Revel M. Enhancement of interleukin 6 cytostatic effect on human breast carcinoma cells by soluble IL-6 receptor from urine and reversion by monoclonal antibody. *Cytokine* 4: 6-11, 1992.
- O`Kusky JR, Norman MG. Sudden infant death syndrome: Postnatal changes in the numerical density and total number of neurons in the hypoglossal nucleus. *J Neuro-path Exp Neurol* 51: 577-584, 1992.
- O`Kusky JR, Norman MG. Sudden infant death syndrome: Increased number of synapses in the hypoglossal nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 627-634, 1995.
- Obonai T, Takashima S, Becker LE, Asanuma M, Mizuta R, Horie H, Tanaka J. Relationship of substance P and gliosis in medulla oblongata in neonatal sudden infant death syndrome. *Pediatr Neurol* 15: 189-192, 1996.
- Obonai T, Yasuhara M, Nakamura T, Takashima S. Catecholamine neurons alterations in the brainstem of sudden infant death syndrome victims. *Pediatrics* 101: 285-288, 1998.
- Oehmichen M, Wullen B, Zilles K, Saternus KS. Cytological investigations on the cerebellar cortex of sudden infant death victims. *Acta Neuropathol (Berl)* 78: 404-409, 1989.

- Oehmichen M, Meißner C, Schmidt V, Pedal I, König HG, Saternus KS. Axonal injury-A diagnostic tool in forensic neuropathology? A review. *Forensic Sci Int* 95: 67-83, 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. *Ped Res* 44: 192-196, 1998.
- Opdal SH, Rognum TO. The sudden infant death syndrome gene: Does it exist? *Pediatrics* 114: e506-e512, 2004.
- Opdal SH, Rognum TO. The IL6-174G/C polymorphism and sudden infant death syndrome. *Hum Immunol* 68: 541-543, 2007.
- Ottaviani G, Lavezzi AM, Maturri L. Sudden infant death syndrome (SIDS) shortly after hexavalent vaccination: another pathology in suspected SIDS? *Virchows Arch* 448: 100-104, 2006.
- Ozand PT, Tildon JT. Alterations of catecholamine enzymes in several brain regions of victims of sudden infant death syndrome. *Life Sciences* 32: 1765-1770, 1983.
- Ozawa Y, Obonai T, Itoh M, Aoki Y, Funayama M, Takashima S. Catecholaminergic neurons in the diencephalon and basal ganglia of SIDS. *Pediatr Neurol* 21: 471-475, 1999.
- Pamphlett R, Treloar L. Astrocytes in the hypoglossal nuclei of sudden infant death syndrome (SIDS) infants: A quantitative study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22: 136-143, 1996.
- Panigrahy A, Filiano JJ, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, Krous HF, Rava LA, Frost White W, Kinney HC. Decreased kainate receptor binding in the arcuate nucleus of the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 1253-1261, 1997.
- Panigrahy A, Filiano JJ, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, Krous HF, Rava LA, Foley E, Frost White W, 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.
- Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, Chadwick AE, Krous HF, Kinney HC. Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA* 296: 2124-2132, 2006.

- Pettigrew AG, Rahilly PM. Brainstem auditory evoked responses in infants at risk of sudden infant death. *Early Hum Dev* 11: 99-111, 1985.
- Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36: 145-155, 2001.
- 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: 39-45, 1985.
- Raza MW, Blackwell CC. Sudden infant death syndrome, virus infections and cytokines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 85-96, 1999.
- Reuss W, Saeger W, Bajanowski T. Morphological and immunohistochemical studies of the pituitary in sudden infant death syndrome (SIDS). *Int J Legal Med* 106: 249-253, 1994.
- 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.
- Rognum TO, Saugstad OD. Biochemical and immunological studies in SIDS victims. Clues to understanding the death mechanism. *Acta Paediatr Suppl* 389: 82-85, 1993
- Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggione R, Luini W, Hinsbergh van V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leucocyte recruitment. *Immunity* 6: 315-325, 1997.
- Rossi L, Moharram R, Martin BM, White RL, Panelli MC. Detection of human MCP-4/CCL13 isoforms by SELDI immunoaffinity capture. *J Translat Med* 4: 5, 2006.
- Ross-Russell R, Ravikumar K. Apparent life-threatening episodes in children. *Pediatrics and Child Health* 17: 188-192, 2007.
- Rowland M, Drumm B. *Helicobacter pylori* and sudden infant death syndrome. *Lancet* 357: 327, 2001.
- Rubens DD, Vohr BR, Tucker R, O'Neil CA, Chung W. Newborn oto-acoustic emission hearing screening tests preliminary evidence for a marker of susceptibility to SIDS. *Early Hum Dev*, 2007, doi. 10.1016/j.
- Sawaguchi T, Franco P, Kato I, Shimizu S, Kadhim H, Groswasser J, Sottiaux M, Togari H, Kobayashi M, Takashima S, Nishida H, Sawaguchi A, Kahn A. From epidemiology to physiology and pathology: Apnea and arousal deficient theories in sudden infant death syndrome (SIDS) - with particular reference to hypoxic brainstem gliosis. *Forensic Sci Int* 130S: 21-29, 2002.

- Sawguchi T, Kato I, Franco P, Sottiaux M, Kadhim H, Shimizu S, Groswasser J, Togari H, Kobayashi M, Nishida H, Sawaguchi A, Kahn A. Apnea, glial apoptosis and neuronal plasticity in the arousal pathway of victims of SIDS. *Forensic Sci Int* 149: 205-217, 2005.
- Siarakas S, Brown AJ, Murrell WG. Immunological evidence for a bacterial toxin aetiology in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 37-50, 1999.
- 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 III JC. The pineal gland in sudden infant death syndrome: Preliminary observations. *J Pineal Res* 5: 111-118, 1988.
- Sparks DL, Hunsaker JC. 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, Coyne CM, Sparks LM, Hunsaker JC. Recommended technique for brain removal to retain anatomic integrity of the pineal gland in order to determine its size in sudden infant death syndrome. *J Forensic Sci* 42: 100-102, 1997.
- 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.
- Statistisches Bundesamt Deutschland. Kapitel 1.4.4: Säuglingssterblichkeit in: Gesundheit in Deutschland. 2006a. <http://www.gbebund.de/>
- Statistisches Bundesamt Deutschland. Todesursachen. Gestorbene Säuglinge nach Alter und ausgewählten Todesursachen der International Statistical Classification of diseases and Related Health Problems (ICD10). 2006b. <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content100/GestorbeneSaeuglinge.psml>
- Steinschneider A. Prolonged apnea and the sudden infant death syndrome: Clinical and laboratory observations. *Pediatrics* 50: 646-654, 1972.
- Storm H, Nylander G, Saugstad OD. The amount of brainstem gliosis in sudden infant death syndrome (SIDS) victims correlates with maternal cigarette smoking during pregnancy. *Acta Paediatr* 88: 13-18, 1999.
- Storm H, Rognum TO, Saugstad OD, Skullerud K, Reichelt KL. Beta-endorphin immunoreactivity in spinal fluid and hypoxanthine in vitreous humor related to brain stem gliosis in sudden infant death victims. *Eur J Pediatr* 153: 675-681, 1994a.
- Storm H, Rognum TO, Reichelt KL. Inverse relationship between Beta-endorphin immunoreactivity in cerebrospinal fluid and nucleus tractus solitarius in sudden infant

- death. *Eur J Pediatr* 153: 381-386, 1994b.
- 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, Kincaid-Colton CA. Das Immunsystem des Gehirns. *Spektrum der Wissenschaft* 80-85, 1996.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Pro Neurobiol* 57: 563-581, 1999.
- 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.
- Summers CG, Parker VC. The brainstem in the sudden infant death syndrome: A postmortem survey. *Am J Forensic Med Pathol* 2: 23-30, 1981.
- Takashima S, Mito T, Becker LE. Neuronal development in the medullary reticular formation in sudden infant death syndrome and premature infants. *Neuropediatrics* 21: 24-26, 1985.
- Task Force on Sudden Infant Death Syndrome. The changing concept of sudden infant death syndrome: Diagnostic coding shifts, controversies regarding the sleeping environment, and new variables to consider in reducing risk. *Pediatrics* 116: 1245-1255, 2005.
- Vege A, Rognum TO, Aasen AO, Saugstad OD. Are elevated cerebrospinal fluid levels of IL-6 in sudden unexplained deaths, infectious deaths and deaths due to heart/lung disease in infants and children due to hypoxia? *Acta Paediatr* 87: 819-824, 1998.
- Vege A, Rognum TO. Inflammatory responses in sudden infant death syndrome-past and present views. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 67-78, 1999.
- Vege A, Rognum T, Anestad G. IL-6 cerebrospinal fluid levels are related to laryngeal IgA and epithelial HLA-DR response in sudden infant death syndrome. *Pediatric research* 6: 803-809, 1999.
- Vege A, Rognum TO. Mini review. Sudden infant death syndrome, infection and inflammatory responses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42: 3-10, 2004.
- Vennemann MMT, Höffgen M, Bajanowski T, Hense HW, Mitchell EA. Review: Do immunisations reduce the risk for SIDS? A Meta-analysis. *Vaccine* 25: 4875-4879, 2007.
- Waters KA, Meehan B, Huang JQ, Gravel RA, Michaud J, Côte A. Neuronal apoptosis in sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 45: 166-172, 1999.

- Weese-Mayer DE, Ackerman MJ, Marazita ML, Berry-Kravis EM. Research review. Sudden infant death syndrome: Review of implicated genetic factors. *Am J Med Genet Part A* 143A: 771-788, 2007.
- Wekerle H, Linington H, Lassmann H, Meyermann R. Cellular immune reactivity within the CNS. *TINS*: 271-277, 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.
- Wilson CE. Sudden infant death syndrome and canadian aboriginals: Bacteria and infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 221-226, 1999.
- Zhang WD, Tsukamoto T, Yamada Y, Itakura Y, Oono T, Nagao M, Takatori T. Immunohistochemical classification of astrocytes in infants by glial fibrillary acidic protein staining and application to forensic practice. *Nippon Hoigaku Zasshi* 46: 189-197, 1992.
- Zinka B, Rauch E, Buettner A, Penning R. Letter to the editor. Unexplained cases of sudden infant death shortly after hexavalent vaccination. *Vaccine* 24: 5779-5780, 2006.
- Zinka B, Rauch E, Penning R, Graw M. Sudden infant death (SID). Gibt es den plötzlichen Säuglingstod? *Pädiatrie hautnah* 1: 41-45, 2004.
- Zorgani A, Essery SD, Al Madani O, Bentley AJ, James VS, Mackenzie DAC, Keeling JW, Rambaud C, Hilton J, Blackwell CC, Weir DM, Busuttill A. Detection of pyrogenic toxins of staphylococcus aureus in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 103-108, 1999.
- Zuckermann FA, Peavey C, Schnitzlein WM, Schabacker D, Husmann RJ, Yang H, Saal-müller A, Lunney JK. Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the second international swine CD workshop. *Vet Immunol Immunopathol* 60: 367-387, 1998.

1. Anhang

1.1 Abkürzungsverzeichnis

2B11	Klon 2B11 des CD45-Antikörpers
A.	Arteria
AAP	American Academy of Pediatrics
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ALTE	apparent life threatening event
ANXA 1	Annexin 1
BAER	Brainstem acoustic evoked potentials
CD	Cluster determinant = Differenzierungsantigene
CMV	Cytomegalievirus
CoA	Coenzym A
Cu/Zn	Kupfer/Zink
DAB	Diaminobenzidin
DD	Dopa-Decarboxylase
DTTP	Diphtherie, Tetanus, Pertussis, Polyomyelitis
EEG	Elektroenzephalographie
ELISA	Enzymed-linked Immunosorbent Assay
EU	Europäische Union
GFAP	glial fibrillary acidic protein
gp 130	Glykoprotein 130
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
HIV	human immunodeficiency virus
HLA-DR	human leucocyte antigen-DR der Klasse 2
HT	5-Hydroxytryptamin
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
L26	Klon L26 des CD20-Antikörper
LCA	Leucocyten Common Antigen
LH-RH	Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon
MCAD	medium-chain-acyl-CoA-Dehydrogenase
MDP	Muramyl-Dipeptid
MHC	major histocompatibility complex

mtDNA	maternal desoxyribonukleinacid
MW	Mittelwert
Nucl.	Nucleus
PBS	phosphate-buffered-saline
PD	Phosphodiesterase
PD7/26	Klon PD7/26 des CD45-Antikörpers
PMLZ	postmortale Liegezeit
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	respiratory-syncytial-virus
S.alba /grisea	Substantia alba/grisea
S. aureus	Staphylococcus
SD	standard deviation
SEM	standard error of mean
SIDS	sudden infant death syndrome
SNP	single nukleotide polymorphism
SNR	signal to noise ratio
SPSS	statistical package for the social sciences
	transient evoked otoacoustic emission = transiente otoakustisch evozierte Hirn-
TEOAE	stammpotentiale
TH	Tyrosin-Hydroxylase
USID	unclassified sudden infant death
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1.2 Daten der SIDS- und Kontrollfälle

1.2.1 Daten der SIDS- Fälle

Tabelle 1: Daten der SIDS- Fälle

Fall-Nr.	Alter/ Geschlecht	Körpergröße	Körpergewicht	Hirngewicht	PMLZ
BW 38	10Mo/m	75	8,6	1055	29
BW 80	3Mo/w	71	8,5	852	69
BW 84	3Mo/m	62	6,3	717	45
BW 86	3Mo/m	63	6,3	763	6
BW 91	3Mo/w	60	5,3	632	23
BW 102	1Mo/w	58	4,6	545	8
BW 226	1Mo/w	57	4,8	530	65
BW 237	4Mo/m	68	5,8	735	48
BW 273	11Mo/m	78	8,6	1054	78
BW 275	1Mo/w	55	3,2	479	29
BW 304	5Mo/w	63	6,1	649	30

1.2.2 Daten der „infektiösen“ Kontrollfälle

Tabelle 2: Daten der „infektiösen“ Kontrollfälle

Fall-Nr.	Alter/ Geschlecht	Körper- größe	Körpergewicht	Hirngewicht	PMLZ	Todesursache
BW201	4Mo/w	67	5,4	761	55	HHV-6-Infektion
BW219	6Mo/m	58	3,9	388	6	Virusinfekt
BW230	13Mo/m	85	10,7	1313	13	Infekt
BW233	24Mo/w	90	11,2	1131	14	Waterhouse- Friedrichsen- Syndrom
BW236	84Mo/w	127	24,4	1393	90	Myokarditis

BW258	2Mo/w	56	3,9	580	59	Viraler Infekt
BW259	5Mo/m	70	7,9	830	120	Viraler Infekt
BW276	18Mo/w	80	11,0	1042	23	Viraler Infekt
BW290	36Mo/m	88	12,5	1307	54	EBV
BW295	0Mo/w	51	3,6	383	26	HSV
BW103	3Mo/w	58	5,1	622	6	Infekt
1258/99	10Mo/m	74	8,9	956	29	Sepsis
2160/99	1Mo/m	47	2,5	387	30	Viraler Infekt
413/00	1Mo/m	53	3,9	NB	32	Sepsis
1134/00	3Mo/m	55	5,4	539	27	Waterhouse- Friedrichsen- Syndrom

1.2.3 Daten der „nicht-infektiösen“ Kontrollfälle

Tabelle 3: Daten der „nicht-infektiösen“ Kontrollfälle

Fall-Nr.	Alter/ Geschlecht	Körper- größe	Körpergewicht	Hirngewicht	PMLZ	Todes- ursache
BW3	7Mo/m	73	8,2	941	23	Ersticken
BW5	72Mo/w	118	19,5	1314	70	Stromtod
BW70	0Mo/w	43	1,5	205	12	Ertrinken
BW89	5Mo/w	65	6,7	676	10	Epilepsie
BW114	0Mo/w	53	3,3	407	6	Fruchtwasserasp- iration
852/99	5Mo/m	68	7,3	816	6	Tötung
BW115	0Mo/w	50	3,3	NB	10	Erwürgen
BW197	4Mo/m	57	4,1	554	36	Epilepsie
BW252	24Mo/w	90	13,3	1136	23	Kawasaki- Syndrom
1080/99	1Mo/w	55	4,1	482	10	Herzfehler
1461/99	22Mo/w	81	11,5	1229	NB	Ersticken

2080/99	10Mo/w	65	5,5	836	76	Ersticken
2133/99	3Mo/m	64	5,1	631	4	Diabetes
442/00	1Mo/m	54	4,3	540	42	Ersticken
986/00	11Mo/m	73	8,8	960	56	Herzfehler
71/00	5Mo/w	65	7,0	821	29	Impffall
1568/05	3Mo/m	52	3,9	527	5	Impffall

1.3 Vergleich von Körpergröße, Gewicht, Hirngewicht und postmortaler Liegezeit

Tabelle 4: Vergleich von Körpergröße, Gewicht, Hirngewicht und postmortaler Liegezeit

	Kontrollen		SIDS		p
	MW	SEM	MW	SEM	
Größe (cm)	69,94	2,74	64,61	1,14	0,43
Gewicht (kg)	7,58	0,68	6,12	0,26	0,40
Hirngewicht (g)	826,26	50,84	744,88	30,67	0,26
Postmortale Liegezeit (h)	52,45	20,89	33,31	3,55	0,99

1.4 Tabellen der Ergebnisse

1.4.1 Ergebnisse der LCA-Färbung

1.4.1.1 LCA-SIDS versus Kontrollgruppe

Tabelle 5: LCA-SIDS versus Kontrollgruppe

Region	Kontrollen			SIDS			p
	MW	SD	SEM	MW	SD	SEM	
fro-co	0,61	0,50	0,09	0,64	0,50	0,15	0,89
fro-wm	0,71	0,53	0,09	0,91	0,54	0,16	0,30
fro-lm	1,00	0,72	0,14	1,09	0,70	0,21	0,72
orb-co	0,41	0,59	0,13	0,27	0,65	0,19	0,37
orb-wm	0,36	0,49	0,10	0,64	0,67	0,20	0,25
orb-lm	0,86	0,77	0,21	0,67	0,71	0,24	0,56
occ-co	0,70	0,53	0,09	0,82	0,60	0,18	0,56
occ-wm	0,61	0,50	0,09	0,91	0,30	0,09	0,06
occ-lm	1,04	0,66	0,13	1,09	0,54	0,16	0,83
par-co	0,63	0,49	0,09	0,82	0,40	0,12	0,24
parwm	0,78	0,55	0,10	0,91	0,30	0,09	0,40
par-lm	1,04	0,71	0,14	0,89	0,60	0,20	0,57
tem-co	0,63	0,49	0,09	0,64	0,50	0,15	0,95
tem-wm	0,69	0,47	0,08	0,91	0,30	0,09	0,15
hipca	1,03	0,80	0,14	0,73	0,79	0,24	0,27
thal	0,91	0,68	0,12	0,91	0,70	0,21	1,00
bggl	0,82	0,73	0,13	0,73	0,79	0,24	0,69
kh-co	0,73	0,58	0,11	0,60	0,52	0,16	0,56
kh-wm	0,80	0,41	0,07	0,80	0,42	0,13	1,00
kh-lm	0,90	0,55	0,10	1,00	0,47	0,15	0,59
mes	0,85	0,70	0,12	0,90	0,57	0,18	0,79

mes-lm	0,85	0,73	0,14	1,00	0,71	0,24	0,57
pons	0,88	0,60	0,10	0,55	0,52	0,16	0,11
pons-lm	0,82	0,72	0,14	1,13	0,83	0,30	0,33
med	0,85	0,56	0,10	0,60	0,52	0,16	0,21
med-lm	0,61	0,62	0,11	0,89	0,60	0,20	0,22

1.4.1.2 LCA-„infektiöse“ Kontrollgruppe versus „nicht-infektiöse“ Fälle

Tabelle 6: LCA-„infektiöse“ Kontrollgruppe versus „nicht-infektiöse“ Fälle

Region	„nicht-infektiöse“ Fälle			„infektiöse“ KG			p
	MW	SD	SEM	MW	SD	SEM	
fro-co	0,57	0,50	0,10	0,71	0,47	0,13	0,37
fro-wm	0,79	0,57	0,11	0,71	0,47	0,13	0,75
fro-lm	0,96	0,77	0,15	1,15	0,55	0,15	0,43
orb-co	0,24	0,54	0,12	0,58	0,67	0,19	0,08
orb-wm	0,48	0,60	0,13	0,42	0,51	0,15	0,86
orb-lm	0,69	0,79	0,20	1,00	0,58	0,22	0,28
occ-co	0,70	0,53	0,10	0,79	0,58	0,15	0,65
occ-wm	0,70	0,47	0,09	0,64	0,50	0,13	0,71
occ-lm	0,92	0,56	0,11	1,36	0,67	0,20	0,05
par-co	0,66	0,48	0,09	0,71	0,47	0,13	0,70
par-wm	0,83	0,47	0,09	0,79	0,58	0,15	0,75
par-lm	0,83	0,65	0,14	1,31	0,63	0,17	0,04
tem-co	0,61	0,50	0,09	0,67	0,49	0,13	0,70
tem-wm	0,82	0,39	0,07	0,60	0,51	0,13	0,12
hipca	0,78	0,80	0,15	1,27	0,70	0,18	0,05
thal	0,83	0,70	0,13	1,07	0,62	0,16	0,26
bggl	0,73	0,83	0,15	0,93	0,47	0,13	0,27
kh-co	0,64	0,57	0,11	0,80	0,56	0,14	0,38
kh-wm	0,80	0,41	0,08	0,80	0,41	0,11	1,00
kh-lm	0,88	0,53	0,11	1,00	0,53	0,14	0,49
mes	0,83	0,60	0,11	0,93	0,80	0,21	0,69
mes-lm	0,78	0,74	0,15	1,08	0,67	0,19	0,23

pons	0,72	0,59	0,11	0,93	0,59	0,15	0,27
pons-lm	0,84	0,85	0,17	1,00	0,45	0,13	0,46
med	0,72	0,65	0,12	0,93	0,26	0,07	0,16
med-lm	0,63	0,63	0,12	0,77	0,60	0,17	0,47

1.4.1.3 LCA-„infektiöse“ Kontrollgruppe versus „nicht-infektiöse“ Kontrollgruppe

Tabelle 7: LCA-„infektiöse“ Kontrollgruppe versus „nicht-infektiöse“ Kontrollgruppe

Region	„nicht-infektiöse“ KG			„infektiöse“ KG			p
	MW	SD	SEM	MW	SD	SEM	
fro-co	0,53	0,51	0,12	0,71	0,47	0,13	0,30
fro-wm	0,71	0,59	0,14	0,71	0,47	0,13	0,89
fro-lm	0,87	0,83	0,22	1,15	0,55	0,15	0,29
orb-co	0,20	0,42	0,13	0,58	0,67	0,19	0,14
orb-wm	0,30	0,48	0,15	0,42	0,51	0,15	0,58
orb-lm	0,71	0,95	0,36	1,00	0,58	0,22	0,41
occ-co	0,63	0,50	0,11	0,79	0,58	0,15	0,46
occ-wm	0,58	0,51	0,12	0,64	0,50	0,13	0,71
occ-lm	0,80	0,56	0,14	1,36	0,67	0,20	0,03
par-co	0,56	0,51	0,12	0,71	0,47	0,13	0,37
par-wm	0,78	0,55	0,13	0,79	0,58	0,15	0,98
par-lm	0,79	0,70	0,19	1,31	0,63	0,17	0,06
tem-co	0,59	0,51	0,12	0,67	0,49	0,13	0,65
tem-wm	0,76	0,44	0,11	0,60	0,51	0,13	0,32
hipca	0,81	0,83	0,21	1,27	0,70	0,18	0,12
thal	0,79	0,71	0,16	1,07	0,62	0,16	0,23
bggl	0,74	0,87	0,20	0,93	0,47	0,13	0,31
kh-co	0,67	0,62	0,16	0,80	0,56	0,14	0,50
kh-wm	0,80	0,41	0,11	0,80	0,41	0,11	1,00
kh-lm	0,80	0,56	0,14	1,00	0,53	0,14	0,32
mes	0,79	0,63	0,14	0,93	0,80	0,21	0,61
mes-lm	0,64	0,74	0,20	1,08	0,67	0,19	0,11

pons	0,83	0,62	0,15	0,93	0,59	0,15	0,63
pons-lm	0,71	0,85	0,21	1,00	0,45	0,13	0,20
med	0,79	0,71	0,16	0,93	0,26	0,07	0,35
med-lm	0,50	0,62	0,15	0,77	0,60	0,17	0,20

1.4.2 Ergebnisse der CD3- und CD20-Färbung

1= positiv

0= negativ

9= fehlend

Tabelle 8: Ergebnisse der CD3- und CD20-Färbung

Präparatnummer	CD3	CD3	CD20	CD20
	Meningen	Restschnitt	Meningen	Restschnitt
BW3	1	1	0	0
BW5	1	1	0	0
BW38	1	1	0	0
BW70	9	0	0	0
BW80	1	1	0	0
BW84	1	1	0	0
BW86	0	1	0	0
BW89	0	1	0	0
BW91	0	1	0	0
BW103	0	1	0	0
BW114	0	1	0	1

BW115	0	0	0	0
BW197	0	1	0	0
BW201	1	1	0	0
BW219	0	1	0	0
BW226	0	0	0	0
BW230	0	1	0	0
BW236	1	1	9	1
BW237	0	1	0	0
BW252	0	1	1	1
BW258	0	1	0	0
BW259	0	1	0	0
BW273	1	1	0	0
BW275	0	1	0	0
BW276	0	1	0	0
BW290	1	1	0	0
BW295	0	1	1	1
BW304	0	1	1	1
15/99	0	1	0	0
H16/05	0	1	0	0
71/00	0	1	0	0
1568/05	0	1	0	0
852/99	0	1	0	0
1080/99	0	0	0	1
1258/99	0	1	0	0

1461/99	0	1	9	0
2080/99	9	1	0	0
2133/99	9	1	9	0
2160/99	0	9	0	0
413/00	0	0	0	0
986/00f	9	9	9	9
1134/00	0	0	0	0
BW195	0	1	0	0

1.4.3 Ergebnisse der Interleukin-6-Färbung

1.4.3.1 Vergleich SIDS mit Kontrollfällen

Tabelle 9: Vergleich SIDS mit Kontrollfällen

Region	Kontrollen			SIDS			p-Wert
	MW	SD	SEM	MW	SD	SEM	
Pons	0,57	0,74	0,14	0,60	0,70	0,22	0,82
Med	0,90	0,90	0,17	1,10	1,10	0,35	0,63
Fro-co	0,46	0,81	0,16	1,00	0,87	0,29	0,06
Fro-lm	0,20	0,41	0,08	0,56	1,01	0,34	0,35

1.4.3.2 IL-6: Vergleich „infektiöse“ Kontrollfälle versus „nicht-infektiöse“ Kontrollfälle

Tabelle 10: IL-6: Vergleich „infektiöse“ Kontrollfälle versus „nicht-infektiöse“ Kontrollfälle

Region	Fehlende Infektion			Infektion			p-Wert
	MW	SD	SEM	MW	SD	SEM	
Pons	0,50	0,63	0,16	0,67	0,89	0,26	0,75
Med	0,53	0,62	0,15	1,42	1,00	0,29	0,01
Fro-co	0,53	0,92	0,24	0,36	0,67	0,20	0,82
Fro-lm	0,14	0,36	0,10	0,27	0,47	0,14	0,43

1.5 Chemikalien

1.5.1 Antikörper

Monoclonal Mouse Anti-Human CD45, Leucocyte Common Antigen

Clones: 2B11 und PD7/26

Isotyp: igG1, Kappa

Bezugsquelle: DakoCytomation GmbH, Hamburg. **Code Nr. A 0452**

Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy

Clone: L26

Isotyp: IgG2a, Kappa

Bezugsquelle: DakoCytomation GmbH, Hamburg. **Code Nr. M 0755**

Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3

Bezugsquelle: DakoCytomation GmbH, Hamburg. **Code Nr. A 0542**

Interleukin-6-Antikörper

Bezugsquelle: Abcam Inc., Cambridge, USA. **Code Nr. ab 6672**

1.5.2 Lösungen, Puffer und Kits

Target Retrieval Solution

DakoCytomation GmbH, Hamburg. Code Nr. S1700

PBS-Puffer (pH 7.4- 7.5):

Herstellung:

- 16,1 g Na₂HPO₄ H₂
- 2,2 g NaH₂PO₄ H₂O
- 40,0 g NaCl

Die Zutaten müssen in 5 Liter Aqua destillata aufgelöst werden.

Histostain-Plus (Peroxidase) Kit

Bezugsquelle: Zytomed GmbH, Berlin. Kat. Nr. 85-9043

DAB-(3,3` - Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) Substrat-Kit

Inhalt:

- Tropfflasche A: Pufferkonzentrat

- Tropfflasche B: DAB-Lösung
- Tropfflasche C: konzentriertes H₂O₂

Aktivierung der DAB-Lösung: 1 Tropfen Reagens A in 1 ml Aqua destillata geben und mischen. Jeweils 1 Tropfen Reagens B und Reagens C auf die 1 ml verdünnte Pufferkonzentratlösung geben und erneut mischen.

Bezugsquelle: DakoCytomation GmbH, Berlin. Kat. Nr. 00-2014.

LSAB+System-HRP:

DakoCytomation GmbH, Berlin. Kat. Nr. 0690

2. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Eisenmenger, ehemaliger Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität in München, für die Möglichkeit, die hier vorgelegte Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Andreas Büttner danke ich sehr für das interessante Thema, die fachliche, zwischenmenschliche und konstruktive Unterstützung während der gesamten Zeit sowie für die ansteckende Begeisterung für die Neuropathologie.

Mein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Serge Weis, Leiter des Bereichs Neuropathologie am Institut für klinische Pathologie und Neuropathologie der Landesnervenklinik Wagner-Jauregg, Linz, für die Durchführung der Statistiken.

Ich bedanke mich bei Susanne Ring, labortechnische Assistentin am Institut für Rechtsmedizin in München, für das Erstellen der Paraffinschnitte. Sie stand mir in allen Fragen immer hilfsbereit und mit Rat und Tat zur Seite.

Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung während dieser Arbeit. Sie ermöglichten es mir großzügig, soviel Zeit wie erforderlich für die Doktorarbeit zu nehmen.

Mein besonderer Dank gilt Martin der mich in jeder Hinsicht unterstützte und mir immer wieder Kraft und Motivation im richtigen Moment gab. Ich danke ihm sehr, dass er immer zu konstruktiver und ehrlicher Kritik bereit war.

3. Lebenslauf

Name: Michaela Maria Hengstler
 Geburtsdatum: 2. September 1982
 Geburtsort: München
 Wohnort: Steinheilstraße 3, 80333 München

Schulausbildung:

1989 – 1993	Besuch der Rothpletzschule (Grundschule) in München
1993 – 2002	Besuch des Oskar-von-Miller-Gymnasiums in München

Hochschulstudium:

09/2002 – 03/2005	Grundstudium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München
Seit 04/2005	Hauptstudium der Humanmedizin
08/2005	Famulatur Innere Medizin (Schwabinger Krankenhaus)
03/2006	Famulatur Gynäkologie (Krankenhaus Dritter Orden)
07 – 08/2006	Famulatur Orthopädie (Orthopädische Gemeinschaftspraxis)
04 – 05/2007	Famulatur Dermatologie (Schwabinger Krankenhaus)
Seit 08/2006	Doktorarbeit am Institut für Rechtsmedizin in München
02/2008 – 01/2009	Praktisches Jahr <ol style="list-style-type: none"> 1. Terial: Allgemein- und Unfallchirurgie, KH München Harlaching 2. Terial: Innere Medizin, KH München Schwabing 3. Terial: Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsklinikum München Innenstadt
06/2009	Staatsexamen der Humanmedizin

Ehrenamtliches Engagement:

1998 - 2003	Leitung einer Jugendgruppe und Jugendarbeit in der Pfarrei 14 Nothelfer in München
Seit 08/2002	Sanitätsdienste und Krankentransport bei der Johanniter – Unfall – Hilfe München als Rettungssanitäterin