

Aus dem Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie der Anatomischen Anstalt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr.med. Christoph Schmitz

**Mehr als 85% aller Granularzellen im menschlichen  
Kleinhirn entstehen postnatal - ohne Unterschied  
zwischen plötzlichem Kindstod und Kontrollfällen**

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

vorgelegt von  
Maren Kiessling  
aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.med. Christoph Schmitz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h. c. Hans A. Kretzschmar Priv. Doz. Dr. Inga Sinicina
Dekan:	Prof. Dr.med. Dr. h.c. M. Reiser; FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	21.05.2013

Meinen „Mäusen“



# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	8
2.1	Untersuchtes Gewebe	8
2.2	Hauptuntersuchung (stereologische Analyse)	11
2.2.1	Herstellen der histologischen Präparate	11
2.2.1.1	Anfertigen von Schnittserien	11
2.2.1.2	Färben der Schnitte	12
2.2.2	Stereologische Auswertung der Gehirnschnitte	15
2.2.2.1	Verwendeter stereologischer Messplatz	15
2.2.2.2	Methodik stereologischer Analysen	16
2.2.2.3	Prinzip der <i>design-based</i> Stereologie	16
2.2.2.4	Konkret durchgeführte stereologische Untersuchungen	26
2.2.3	Untersuchte Schichten und Zellarten im menschlichen Kleinhirn	36
2.2.3.1	Purkinjezellen	36
2.2.3.2	Granularzellen	36
2.2.4	Statistische Auswertung	37
2.2.5	Kontrollanalysen	38
2.2.6	Fotografie	38
2.3	Nebenuntersuchungen (immunhistochemische Analyse)	39
2.3.1	Anfertigen der Schnitte	39
2.3.2	Immunhistochemischer Nachweis von <i>Sonic hedgehog</i>	40
2.3.3	Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin	44
2.3.4	Kontrollversuch zum immunhistochemischen Nachweis von <i>Sonic hedgehog</i>	48
2.3.5	Fotografie	50

3	Ergebnisse	51
3.1	Ergebnisse der Hauptuntersuchung	51
3.1.1	Ergebnisse der n=14 Kontrollen	51
3.1.1.1	Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht	51
3.1.1.2	Gesamtzahl von Granularzellen und Gesamtzahl von Purkinjezellen, sowie Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte	55
3.1.1.3	Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte	59
3.1.2	Ergebnisse der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle	63
3.1.2.1	Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht	63
3.1.2.2	Gesamtzahlen von Granularzellen und Gesamtzahlen von Purkinjezellen, und Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte	76
3.1.2.3	Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte	87
3.1.3	Gesamtzahl von Purkinjezellen aller n=14 Kontrollen und n=9 SIDS- Fälle als Funktion des Intervalls zwischen Tod und Autopsie	97
3.2	Ergebnisse der Nebenuntersuchung	100
3.2.1	Immunhistochemischer Nachweis von <i>Sonic hedgehog</i> und Calbindin	100
3.2.2	Kontrollversuch zum immunhistochemischen Nachweis von <i>Sonic hedgehog</i>	100
4	Diskussion	103
4.1	Validität der Ergebnisse der stereologischen Auswertung	103
4.2	Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die n=14 Kontrollen und die n=9 SIDS-Fälle mit Daten aus der Literatur	107

4.3	Vergleich der Ergebnisse für die n=9 gematchten Kontrollen mit denen der n=9 SIDS-Fälle	109
4.4	Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die n=9 SIDS-Fälle mit Daten aus der Literatur	110
4.5	Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die n=14 Kontrollen und die n=9 SIDS-Fälle in Bezug auf die altersabhängige Zunahme der mittleren Volumina der Kleinhirnrindenschichten mit Daten aus der Literatur	110
4.6	Bedeutung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die weitere Forschung zur Ätiologie und Pathogenese von SIDS	111
4.7	Bedeutung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die weitere Forschung zur Entwicklung des menschlichen Kleinhirns	112
4.7.1	Gegenwärtiger Stand des Wissens in der Literatur über einige - für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit relevante - Aspekte der Entwicklung von Purkinjezellen und Granularzellen im menschlichen Kleinhirn	113
4.7.2	Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezellen im Kleinhirn - die „numerical matching hypothesis“	120
4.7.3	Molekulare Schlüsselmechanismen bei der Einstellung der finalen Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle im Kleinhirn	121
4.8	Exogene und endogene Faktoren, die zu Beeinträchtigungen und Veränderungen des Kleinhirns führen können, und die Beteiligung von Kleinhirnveränderungen an verschiedenen Krankheitsbildern	123
4.9	Beteiligung des Kleinhirns an motorischen, kognitiven, emotionalen und psychischen Erkrankungen, und Auswirkungen von Veränderungen des Kleinhirns	124
4.10	Mögliche positive Beeinflussung der Kleinhirnentwicklung durch gezielte Stimulation in der frühkindlichen Phase	128
5	Zusammenfassung	130
6	Literatur	134
	Danksagung	V



# 1 Einleitung

Der plötzliche Kindstod („sudden infant death syndrome“; im folgenden Text wird durchweg die Abkürzung „SIDS“ verwendet) ist eine Erkrankung des ersten Lebensjahres (siehe z.B. Berry, 1992; Biondo et al., 2003; Berul und Perry, 2007; Kinney et al., 2009). SIDS ist dadurch gekennzeichnet, dass die betroffenen Kinder plötzlich ohne vorherige Anzeichen für das Ereignis tot im Bett liegen (siehe z.B. Beckwith, 1970; Bajanowski und Poets, 2004; Byard und Krous, 2004) - meist nach einer Schlafphase (siehe z.B. Ansari et al., 2002; Bajanowski und Poets, 2004; Byard und Krous, 2004; Kinney et al., 2009). Obwohl die Zahlen der an SIDS verstorbenen Kinder in Deutschland seit einigen Jahren rückläufig sind (wie in Tabelle 1.1 gezeigt), ist SIDS in den Industrienationen auch weiterhin eine der häufigsten Ursachen für Kindstod im ersten Lebensjahr (siehe z.B. Ansari et al., 2002; Hunt und Hauck, 2006).

**Tabelle 1.1:** Fallzahlen für plötzlichen Kindstod („sudden infant death syndrome“; SIDS) in Deutschland von 2004 und 2010 (Quelle: Statistisches Bundesamt, 2006; 2012).

Jahr	Lebend- geburten	Fälle gesamt	Risiko / 1000 Lebendgeburten	Fälle männlich	Fälle weiblich
2004	705.622	323	0,46	200	123
2010	677.947	164	0,24	103	61

Weder die Untersuchung der Orte des Versterbens noch eingehende postmortale Untersuchungen konnten Aufschluss über die jeweilige Ursache des plötzlichen Versterbens der Kinder geben (siehe z.B. Beckwith, 1970; Berry, 1992; Biondo et al., 2003; Bajanowski und Poets, 2004; Byard und Krous, 2004; Hunt und Hauck, 2006; Berul und Perry, 2007). Dementsprechend handelt sich bei SIDS um eine Ausschlussdiagnose (siehe z.B. Berry, 1992; Bajanowski und Poets, 2004; Opdal und Rognum, 2004; Siren und Siren, 2011).

Dass die Diagnose „SIDS“ eine postmortale Ausschlussdiagnose ist, hat mehrere wichtige Konsequenzen:

- Bis heute stehen keine allgemein akzeptierten Tiermodelle zur Ursachenforschung zur Verfügung (eine Suche in PubMed mit „*SIDS animal model*“ erbringt gegenwärtig zwar 136 Treffer – die Relevanz dieser Tiermodelle wird jedoch sehr kritisch diskutiert; siehe z.B. Blood-Siegfried und Shelton, 2004).
- Bis heute konnten keine *kausalen* präventiven Maßnahmen für SIDS etabliert werden (eine Suche in PubMed mit „*SIDS prevention*“ ergibt derzeit 1933 Treffer – darunter 127 Publikationen, die auf das 1992 eingeführte „*Back to Sleep*“ Programm des „*U.S. National Institute of Child Health & Human Development*“ verweisen [siehe z.B. Havens

und Zink, 1994; Willinger et al., 1994; Miller et al., 2011]. Durch das fehlende Wissen um die kausalen Ursachen von SIDS müssen diese präventiven Maßnahmen aber letztlich als empirisch [„*trial and error*“] angesehen werden, und es bleibt unklar, ob die bisher diskutierten und angewendeten präventiven Maßnahmen tatsächlich optimal sind.)

Daher wurden in den letzten Jahren sehr viele Bemühungen unternommen, der Ursache von SIDS auf den Grund zu gehen. Es wurden u.a. verschiedenste Organsysteme auf Auffälligkeiten untersucht: (i) das Herz-Kreislauf-System (siehe z.B. Anderson et al., 1974; Maron et al., 1976; Kelly et al., 1977; Perticone et al., 1991; Schwartz et al., 1998; Guntheroth und Spiers, 1999; Maturri et al., 2000; Skinner, 2005; Wedekind et al., 2006; Berul und Perry, 2007; Witcombe et al., 2012); (ii) das Atemsystem einschließlich verschiedener, an seiner neuronalen Kontrolle beteiligten Strukturen (siehe z.B. Guilleminault et al., 1975; Harper et al., 1982; Konrat et al., 1992; Paterson et al., 2009); (iii) das Zwerchfell (siehe z.B. Lamont et al., 1995a; Weis et al., 1998; Siren und Siren, 2011) und die glatte Muskulatur in den unteren Atemwegen (siehe z.B. Elliot et al., 1999); (iv) die Lunge selber (siehe z.B. Becker und Takashima, 1985; Ogbuihi und Zink, 1987; Entrup und Brinkmann, 1990; Haque et al., 1991), einschließlich möglicher Veränderungen im Surfactant (siehe z.B. Gibson und McMurchie, 1988; Berry, 1992; Hills et al., 1995); (v) die Schilddrüse (Risse und Weiler, 1984); (vi) die Bauchspeicheldrüse (siehe z.B. Hisaoka et al., 1992); und (vii) die Nebenniere (Naeye, 1976; Pérez-Platz et al., 1994) – allesamt ohne einheitliche und eindeutige Befunde (d.h. ohne das Finden der sogenannten „*smoking gun*“). Auch andere mögliche Ursachen für SIDS wurden in Betracht gezogen, so z.B. (viii) eine Beteiligung von Zytokinen (siehe z.B. Howat et al., 1997; Ferrante et al., 2010a; Vennemann et al., 2012) oder (ix) Stress (Tester et al., 2007); (x) Magnesiummangel (Caddell, 2001); (xi) Abweichungen in der Erythropoese (Naeye et al., 1976); (xii) genetische Faktoren (siehe z.B. Opdal und Rognum, 2004; Kinney et al., 2009; van Norstrand und Ackerman, 2010); oder (xiii) das Vorkommen leptomeningealer Neurone (Rickert et al., 2009).

Die Hypothese möglicher Beeinträchtigungen der neuronalen Kontrolle von Kreislauf- und Atemsystem bei SIDS (siehe z.B. Kinney und Filiano, 1988; Konrat et al., 1992; Paterson et al., 2009) führte dann zu einer eingehenden Untersuchung verschiedener Anteile des Gehirns (siehe z.B. Wunscher et al., 1971; Takashima et al., 1978; Ansari et al., 2002; Kinney et al., 2009), insbesondere des Hirnstamms (siehe z.B. Baba et al., 1983; Becker und Takashima, 1985; Pamphlett und Treloar, 1996; Ansari et al., 2002; Kinney et al., 2009; Lavezzi et al., 2009; Kadhim et al., 2010) als zentrale Steuereinheit lebenswichtiger Funktionen (siehe z.B. Maturri et al., 2008; Kadhim et al., 2010), Teile des Hypothalamus (Filiano und Kinney, 1992; Biondo et al., 2003), und diverser Hirnnervenkerne (Konrat et al., 1992; O`Kusky und Norman, 1992; Lamont et al., 1995b; Loeliger et al., 2000).

Zusammenfassend erbrachten diese Untersuchungen durchaus einzelne Hinweise auf Veränderungen in den untersuchten Anteilen des Gehirns bei SIDS – aber keine einheitlichen Befunde und somit keine „*smoking gun*“.

Schließlich kam die Hypothese auf, dass dem – an der respiratorischen und kardiovaskulären Kontrolle beteiligten - Kleinhirn (siehe z.B. Cruz-Sánchez et al., 1997; Harper et al., 2000) eine wichtige Rolle in der Pathogenese von SIDS zukommen könnte, da die betroffenen Kinder möglicherweise plötzlich aufhören zu atmen (Guilleminault et al., 1975) bzw. unter anhaltenden Atemaussetzern leiden (Steinschneider, 1972). Dabei wurde speziell den Purkinjezellen - den einzigen Efferenzen der Kleinhirnrinde (Squire et al., 2008) - in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit zuteil.

Insbesondere sind in diesem Zusammenhang die folgenden fünf Studien zu erwähnen:

- Oehmichen et al. (1989) untersuchten die Kleinhirne von n=12 an SIDS verstorbenen Kindern (im folgenden Text „SIDS-Fälle“ genannt) sowie n=12 nicht an SIDS verstorbenen, alters- und geschlechtsgematchten Kindern (im folgenden Text „Kontrollen“ genannt) auf möglicherweise hypoxiebedingte morphologische Veränderungen der Kleinhirnrinde, genauer gesagt auf Veränderungen der Zelldichte der Purkinjezellen. Die Autoren fanden jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und den Kontrollen.
- Riedel et al. (1989) untersuchten bei n=30 SIDS-Fällen und n=7 (größtenteils nicht gematchten) Kontrollen die Anzahl von Zellen in der äußeren und inneren Granularzellschicht, der Purkinjezellschicht und der Molekularschicht des Kleinhirns. Außerdem wurden Volumenveränderungen in den genannten Schichten erfasst, wie auch vom gesamten Kleinhirnkortex und dem gesamten Kleinhirn. Die Autoren fanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und den Kontrollen.
- Cruz-Sánchez et al. (1997) fanden bei der Untersuchung von n=19 SIDS-Fällen und n=12 (im Alter ähnlichen) Kontrollen für die äußere Granularzellschicht im Kleinhirn eine erhöhte Zelldichte bei den SIDS-Fällen gegenüber den Kontrollen, woraus sie auf eine Entwicklungsverzögerung im Kleinhirn schlossen, entweder aufgrund einer Reifeverzögerung oder auch einer verzögerten Wanderung der Granularzell-Vorläufer von der äußeren in die innere Granularzellschicht. Die Daten von Cruz-Sánchez et al. (1997) könnten allerdings auch auf eine vermehrte Anlage von Zellen in der äußeren Granularzellschicht bei den SIDS-Fällen gegenüber den Kontrollen hindeuten.
- Lavezzi et al. (2006) und Lavezzi et al. (2007) untersuchten die Kleinhirne von SIDS-Fällen und Kontrollen mit immunhistochemischen Methoden. Während Lavezzi et al. (2006) die Kleinhirne von n=20 SIDS-Fällen und n=18 Kontrollen analysierten,

untersuchten Lavezzi et al. (2007) die Kleinhirne von n=20 SIDS-Fällen und n=11 (nicht gematchten) Kontrollen. Aus der Beschreibung der Studie von Lavezzi et al. (2006) ist nicht ersichtlich, ob die Kontrollen zu den SIDS-Fällen gematcht waren oder nicht. Individuelle Alters- und Geschlechtsangaben fehlen in der Arbeit von Lavezzi et al. (2006) völlig. In beiden Untersuchungen fanden die Autoren diverse Veränderungen im Kleinhirnkortex bei SIDS. Allerdings waren die Ergebnisse nicht einheitlich. Im speziellen Fall eines zum Todeszeitpunkt einen Monat alten Kindes berichteten die Autoren in beiden Untersuchungen vom programmierten Zelltod (d.h. der Apoptose) fast aller Zellen in der inneren Granularzellschicht und im Fall eines sieben Monate alten Kindes sogar den (angeblichen) immunhistochemischen Nachweis der Apoptose *aller* Purkinjezellen im Kleinhirn.

Zu diesen Studien ist aber folgendes anzumerken:

- Die Befunde von Lavezzi et al. (2006) und Lavezzi et al. (2007) sind zu uneinheitlich, um daraus dem Kleinhirn eine signifikante Rolle in der Pathogenese von SIDS zuzuschreiben. Darüber hinaus fehlten beiden Untersuchungen die Analyse einer gematchten Kontrollgruppe. Außerdem ist die von Lavezzi et al. (2006, 2007) zur Detektion von Apoptose verwendete TUNEL-Methode keineswegs spezifisch für den Nachweis von Apoptose, sondern kann auch bei DNA-Reparaturprozessen in Zellen positiv ausfallen (siehe z.B. Kanoh et al., 1999). Schließlich stehen die Daten von Lavezzi et al. (2006) und Lavezzi et al. (2007) im Widerspruch zu einer Hypothese von Becker (1990), der einen Zusammenhang zwischen einer *verzögerten Entwicklung* neuronaler Anteile des Kleinhirns und der Entstehung von SIDS diskutierte.
- Die Untersuchungen von Oehmichen et al. (1989) wurden an Fotografien von 3 µm dicken Kleinhirnschnitten durchgeführt und bezogen sich auf die Dichte von Purkinjezellen im Kleinhirn, nicht jedoch auf Gesamtzahlen dieser Zellen. Nach heutigem Maßstab müssen die von Oehmichen et al. (1989) verwendeten Methoden jedoch als veraltet angesehen werden, und zwar in mehrfacher Hinsicht: (i) Veränderungen von Zelldichten können Veränderungen der Gesamtzahlen der entsprechenden Zellen aufzeigen (bzw. das Fehlen von Veränderungen von Zelldichten kann durchaus das Fehlen von Veränderungen der Gesamtzahlen der entsprechenden Zellen indizieren) – aber dem muss nicht so sein (ausführlich diskutiert in Schmitz et al., 2005). (ii) Die Analyse 3 µm dicker Gehirnschnitte erlaubt keine „*unbiased*“ Untersuchungen in Bezug auf Gesamtzahlen von Zellen mit modernen, *design-based* stereologischen Methoden (siehe z.B. Glaser et al., 2006; der Begriff „*unbiased*“ bedeutet, dass die Ergebnisse keinem systematischen Fehler unterliegen; eine ausführliche Erläuterung erfolgt in Kapitel „Material und Methoden“ unten im Text der vorliegenden Arbeit). (iii) Die

Auswertung von Fotografien – und damit von zweidimensionalen Strukturen oder nur dünnen Schnitten – erweisen sich in der Ermittlung von absoluten Zellzahlen als ungenügend (zur theoretischen und experimentellen Evidenz für diese Feststellung siehe z.B. Coggeshall und Lekan, 1996; Schmitz und Hof, 2005; Ishiyama et al., 2011). (iv) Schließlich müssen isolierte Untersuchungen nur der Purkinjezellen während der Entwicklung des Kleinhirns als unvollständig angesehen werden. Vielmehr gibt erst die gemeinsame Untersuchung der Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen im Kleinhirn Aufschlüsse über mögliche Entwicklungsstörungen des Kleinhirns, basierend auf der sogenannten „*numerical matching hypothesis*“ (ausführlich diskutiert in [z.B.] Katz und Grenander, 1982; Wetts und Herrup, 1983; Herrup und Sunter, 1987). Die „*numerical matching hypothesis*“ beruht auf der Hypothese, dass in der Entwicklung des Kleinhirns das Überleben der Granularzellen vom Vorhandensein intakter Purkinjezellen abhängt (siehe z.B. Herrup et al., 1996). Die Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle stellt sich demnach in einem festen Verhältnis ein; überzählig gebildete Granularzellen sterben physiologischerweise ab (Herrup und Sunter, 1987; Vogel und Herrup, 1989; Herrup et al., 1996). Stehen den Granularzellen während der Synaptogenese keine oder zu wenig intakte Purkinjezellen als Ziel zu Verfügung, sterben die Granularzellen dagegen pathologischerweise ab (die „*numerical matching hypothesis*“ wird in Kapitel „Diskussion“ unten wieder aufgegriffen). Da Oehmichen et al. (1989) lediglich die Purkinjezellen untersucht haben, nicht jedoch gleichzeitig die Granularzellen, müssen ihre Ergebnisse als nicht aussagekräftig zur Untersuchung möglicher Entwicklungsstörungen des Kleinhirns bei SIDS gewertet werden.

- Die Untersuchungen von Riedel et al. (1989) fanden überwiegend an SIDS-Fällen ohne gematchte Kontrollen statt. Die Aussagekraft einer so durchgeführten Untersuchung entspricht nicht den Regeln einer wissenschaftlich fundiert angelegten Studie. Außerdem beruhen die Untersuchungen von Riedel et al. (1989) auf einer Probengrundlage von Gewebeblöcken, die jeweils ausschließlich aus einem kleinen Anteil des Kleinhirns, dem Culmen, entnommen wurden. Die Repräsentanz der Auswahl der Anzahl der Proben sowie der Probengröße scheint vor allem vor dem Hintergrund einer „*unbiased*“ Probenauswahl sehr fragwürdig. Die aus dem Culmen entnommenen Blöcke wurden in 10 µm dicke Schnitte geschnitten, aus denen pro Block nur ein einziger Schnitt ausgewertet wurde. Auf dem ausgesuchten Schnitt wurden dann für die innere und äußere Granularzellschicht je zehn Gesichtsfelder, für die Purkinjezellschicht 15 Gesichtsfelder und für die Molekularschicht 20 Gesichtsfelder in die Auswertung einbezogen. Die Erfassung der Zellzahlen wurde mit einem automatischen Bildanalyse-Gerät realisiert. Es ist nicht ersichtlich, wie groß die ausgewerteten Gesichtsfelder waren.

Da aber die Zellzahlbestimmung automatisch durchgeführt wurde, ist eine zufällige Auswahl der Gesichtsfelder wahrscheinlich und unterliegt hier keiner Auswahl nach sogenannten „*systematic and random*“ Kriterien (ausführlich in Kapitel „Material und Methoden“ unten im Text erläutert) mit allen sich daraus ergebenden Konsequenzen. Die Auswahl der Gesichtsfelder kann demnach auch nicht als „*unbiased*“ angesehen werden. Für die Zellen selber verwendeten Riedel et al. (1989) den Nukleolus als für die Zählung einer Zelle ausschlaggebende Struktur. Fand sich z.B. auf dem Schnitt kein Nukleolus in einer angeschnittenen Purkinjezelle, wurde diese nicht gezählt. Die so ermittelten Ergebnisse wurden dann, von der kleinen gewählten Stichprobe von Schnitten und Gesichtsfeldern ausgehend, auf das gesamte Kleinhirn hochgerechnet. Riedel et al. (1989) gaben für ihre Befunde keine absoluten Zellzahlen an. Vielmehr publizierten sie Graphiken zur Entwicklung von Gesamtzellzahlen sowie Volumina der einzelnen Kleinhirnrindenschichten in Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Fälle, und zwar in relativen Werten im Vergleich zu Mittelwerten von adulten Fällen. Dabei wurde keine Unterscheidung zwischen SIDS-Fällen und Kontrollen getroffen; vielmehr wurden die ermittelten Daten in einer Gruppe zusammengefasst und als solche dargestellt. Es sei angemerkt, dass die von Riedel et al. (1989) ermittelten absoluten Zellzahlen erheblich von anderen in der Literatur berichteten Daten wie auch von den in der vorliegenden Arbeit ermittelten absoluten Zellzahlen abweichen; dies wird in Kapitel „Diskussion“ unten ausführlich diskutiert.

- Cruz-Sánchez et al. (1997) verwendeten für ihre Untersuchungen im Alter nicht gematchte SIDS-Fälle und Kontrollen und dabei ebenso wie Riedel et al. (1989) ausschließlich Proben aus dem Culmen. Je eine Probe verarbeiteten sie zu 5 µm bzw. 25 µm dicken Schnitten, und ermittelten an diesen Schnitten mittels der stereologischen „*optical dissector*“ Methode Zelldichten (die Einwände zur Bestimmung von Zelldichten entsprechen den schon für Oehmichen et al. (1989) diskutierten). Darüber hinaus maßen Cruz-Sánchez et al. (1997) die Dicke der einzelnen Kortexschichten. Dabei fanden die Autoren, dass die äußere Granularzellschicht der SIDS-Fälle gegenüber den Kontrollen dünner ausfiel (es bleibt unklar, ob diese Messungen an den 5 µm dicken Schnitten oder aber an den 25 µm dicken Schnitten durchgeführt wurden). Außerdem ermittelten die Autoren für die äußere Granularzellschicht der SIDS-Fälle gegenüber den Kontrollen eine zeitliche Verzögerung um 87 Tage, bis die Schicht vollständig abgebaut war. Diese Ergebnisse, die möglicherweise auf eine Überproduktion an Granularzell-Vorläufern hindeuten, würden damit deutlich den Ergebnissen von Oehmichen et al. (1989) und Riedel et al. (1989) widersprechen. Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass Cruz-Sánchez et al. (1997) keinerlei Details ihrer stereologischen Zählmethode angaben,

sondern in diesem Zusammenhang lediglich auf eine Übersichtsarbeit von Coggeshall und Lekan (1996) verwiesen. Es bleibt also unbekannt, wie Cruz-Sánchez et al. (1997) ihre Zelldichtebestimmungen tatsächlich durchführten.

Insgesamt erscheint vor diesem Hintergrund eine neue Analyse des Kleinhirns bei SIDS angezeigt, und zwar mit modernsten, *state-of-the-art design-based* stereologischen Methoden, wie ausführlich z.B. in Schmitz (1998), Schmitz und Hof (2005) und Glaser et al., (2006) diskutiert. Dies war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Basierend auf den oben beschriebenen Befunden orientierte sich die vorliegende Arbeit dabei konkret an der Überprüfung der folgenden **Hypothese**:

Bei SIDS finden sich im Kleinhirn veränderte Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen im Vergleich zu alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen (d.h. Kinder, die innerhalb des ersten Lebensjahres nicht an SIDS verstorben sind).

Zusätzlich zu den Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen wurden auch die Volumina derjenigen Kleinhirnschichten mit modernsten, *design-based* stereologischen Methoden bestimmt, auf deren Größe die Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen Einfluss haben. Außerdem wurde (in einer Nebenuntersuchung) mit immunhistochemischen Methoden überprüft, ob die Purkinjezellen im menschlichen Kleinhirn im ersten Lebensalter *Sonic hedgehog* exprimieren (eine ausführliche Begründung für diese Nebenuntersuchung findet sich in Kapitel „Diskussion“ unten im Text).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchtes Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden 25 linke und 4 rechte Kleinhirnhälften von Kindern im Alter zwischen 0,03 Monaten (d.h. gestorben am Tag der Geburt) und 11 Monaten untersucht. Die Kleinhirnhälften stammten aus einer Sammlung des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, wurden dort in den Jahren 1999 bis 2001 durch Herrn Univ.Prof. Dr.med. Andreas Büttner (heute: Direktor des Instituts für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Rostock) im Rahmen von Autopsien gesammelt und bis zur Untersuchung in der vorliegenden Arbeit in 10% neutral gepufferter Formalinlösung aufbewahrt.

Die Verwendung dieser Kleinhirnhälften für die vorliegende Arbeit wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock unter der Nummer A2012-0053 genehmigt. Die Genehmigung liegt im Original in der Anatomischen Anstalt der LMU München vor.

Insgesamt wurden je eine Kleinhirnhälfte von  $n=13$  Kindern mit Todesursache SIDS ( $n=13$  SIDS-Fälle) sowie von  $n=16$  Kindern mit Todesursache anders als SIDS ( $n=16$  Kontrollen) untersucht. Dabei existierte in der Hauptuntersuchung (stereologische Bestimmung von Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte) für jeden einzelnen von insgesamt  $n=9$  SIDS-Fällen jeweils genau eine hinsichtlich Alter und Geschlecht korrespondierende (gematchte) Kontrolle (d.h.  $n=9$  gematchte Kontrollen). Die genaue Verteilung der Kleinhirnhälften auf die Hauptuntersuchung bzw. die Nebenuntersuchung (immunhistochemischer Nachweis von *Sonic hedgehog*) ist in Tabelle 2.1 zusammengefasst, wie auch das Alter der untersuchten Kinder zum Todeszeitpunkt, ihr Geschlecht, die individuellen Diagnosen, die jeweils ausgewertete Kleinhirnhälfte und dem Zeitintervall, das zwischen dem Tod und der Autopsie verstrichen war.

Die Todesursachen wurden von Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der LMU München diagnostiziert. Da es sich bei SIDS um eine Ausschlussdiagnose handelt (siehe z.B.: Berry, 1992; Bajanowski und Poets, 2004; Siren und Siren, 2011), galten alle Kinder, die unter einem Jahr alt waren und nicht an einer nach gründlichster Untersuchung feststellbaren Todesursache verstorben waren, als SIDS-Fälle. Für die Kontrollen lagen bekannte (pathologische bzw. gewaltsame) Ursachen des Versterbens vor.

**Tabelle 2.1:** Individuelle Werte für Alter, Geschlecht, Todesursache und ausgewertete Kleinhirnhälfte und das mittlere *post mortem interval* (Zeit zwischen Tod und Autopsie) der in der vorliegenden Arbeit untersuchten n=9 gematchten Kontrollen, der n=9 SIDS-Fälle, der n=5 nicht gematchten Kontrollen, sowie weiterer n=6 nicht gematchter Kontrollen der Nebenuntersuchung. Alter [Mo]: Alter in Monaten. Ausgew. Kleinhirnhälfte: Ausgewertete Kleinhirnhälfte. PMI [h]: *post mortem interval* (Zeit zwischen Tod und Autopsie) in Stunden (für die Fallnummer 10/48 lag kein *post mortem interval* vor).

Fallnr.	Alter [Mo]	Geschlecht	Todesursache	Ausgew. Kleinhirnhälfte	PMI [h]
<b>Hauptuntersuchung: n=9 gematchte Kontrollen</b>					
10/79	1,5	männlich	Wahrscheinlich Herzfehler	links	36
10/71	3	männlich	Infekt	rechts	28
10/80	3	männlich	Waterhouse-Friedrichsen Syndrom	links	27
10/99	4	männlich	Unklar	rechts	25
10/92	7	männlich	Erwürgen	links	11
10/84	9	weiblich	MCAD- / Adrenogenitales Syndrom	links	29
10/45	10	männlich	Sepsis	links	29
10/58	10	weiblich	CO-Intoxikation	links	76
10/65	10	weiblich	Wahrscheinlich Myokarditis	links	7
<b>Hauptuntersuchung: weitere, n=5 nicht gematchte Kontrollen</b>					
10/46	0,03	weiblich	Ersticken	rechts	33
10/76	0,03	weiblich	Erwürgen	links	10
10/70	0,83	männlich	Tötung (Ersticken)	links	42
10/64	8	männlich	Otitis media	links	53
10/77	11	männlich	Herzfehler	links	56

**Fortsetzung Tabelle 2.1)**

<b>Hauptuntersuchung: n=9 SIDS-Fälle</b>					
<b>10/67</b>	2	männlich	SIDS	links	24
<b>10/50</b>	3	männlich	SIDS	links	56
<b>10/68</b>	3	männlich	SIDS	links	18
<b>10/54</b>	6	männlich	SIDS	links	39
<b>10/55</b>	7	männlich	SIDS	links	33
<b>10/47</b>	9	weiblich	SIDS	links	64
<b>10/73</b>	10	männlich	SIDS	links	5
<b>10/78</b>	10	weiblich	SIDS	links	32
<b>10/88</b>	10	weiblich	SIDS	links	6
<b>Nebenuntersuchung: n=6 SIDS-Fälle und Kontrollen</b>					
<b>10/90</b>	1	männlich	Subdurales Hämatom (Schütteltrauma)	links	82
<b>10/59</b>	3	männlich	SIDS	links	4
<b>10/96</b>	6	männlich	Unklar	links	74
<b>10/44</b>	8	weiblich	SIDS	rechts	26
<b>10/56</b>	9	weiblich	SIDS	links	27
<b>10/48</b>	10	weiblich	Ersticken	links	-

Die vier Gruppen (n=9 gematchte Kontrollen [K9], n=5 nicht gematchte Kontrollen [K5], n=9 SIDS-Fälle [SIDS] und n=6 Fälle der Nebenuntersuchung [N]) unterschieden sich nicht statistisch signifikant in Bezug auf das mittlere Alter (K9:  $6,4 \pm 1,2$  Monate [Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts]; K5:  $4,0 \pm 2,3$  Monate; SIDS:  $6,7 \pm 1,1$  Monate; N:  $6,2 \pm 1,5$  Monate; Kruskal-Wallis test;  $p = 0,601$ ) sowie das mittlere *post mortem interval* (Zeit zwischen Tod und Autopsie; K9:  $29,8 \pm 6,5$  h; K5:  $38,8 \pm 8,3$  h; SIDS:  $30,8 \pm 6,8$  h; N:  $42,6 \pm 15,1$  h; Kruskal-Wallis test;  $p = 0,751$ ).

## 2.2 Hauptuntersuchung (stereologische Analyse)

### 2.2.1 Herstellung der histologischen Präparate

#### 2.2.1.1 Anfertigen von Schnittserien

Zur Herstellung lückenloser Serien 100 µm dicker Sagittalschnitte wurden die Kleinhirnhälften zunächst (je nach Größe der Kleinhirnhälften) bis zu einer Woche unter fließendem Leitungswasser gewässert und anschließend zum Schutz vor Gefrierartefakten einige Tage in Sucroslösung im Kühlschrank bei ca. 4° C gelagert (erst 10% in 0,1M TBS Puffer [Tabelle 2.2] [Sucrose: Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland], dann 20% in 0,1M TBS, und dann 30% in 0,1M TBS; jeweils bis zum vollständigen Absinken der Kleinhirnhälften). Anschließend wurden die Kleinhirnhälften mit Aluminiumfolie umhüllt, mittels Trockeneis durchgefroren, und mit einem Kryostaten (Typ CM 1950; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in sagittaler Schnittrichtung (jeweils von lateral beginnend) unter Verwendung von C35-Klingen (Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan) in lückenlose 100 µm dicke Schnittserien aufgeschnitten. Dazu wurden die Kleinhirnhälften mit Frozen Section Medium (Neg 50; Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) auf dem Probenhalter des Kryostaten fixiert. Die Temperatur im Innenraum des Kryostaten betrug -20° C; die des Probenhalters -18° C.

**Tabelle 2.2:** Herstellung des 0,1M TBS Puffers für die Sucroslösung

0,1 M TBS Puffer	<ul style="list-style-type: none"><li>- 24,2 g Tris ultra pur (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)</li><li>- 17,0 g NaCl (Natriumchlorid; Merck, Darmstadt, Deutschland)</li><li>- In 1.900 ml Aqua dest. lösen</li><li>- Mit Eisessig (Merck) auf pH 7,4 einstellen</li><li>- Mit Aqua dest. auf 2.000 ml auffüllen (Lagern bei 4°C)</li></ul>
---------------------	--

Die lückenlosen Serien der 100 µm dicken Sagittalschnitte einer jeden Kleinhirnhälfte wurden jeweils in insgesamt 48 Schnittserien mit immer gleichem Abstand zwischen den Schnitten aufgeteilt (Serie 1: Schnitte Nr. 1, 49, 97,...; Serie 2: Schnitte Nr. 2, 50, 98, ...; Serie 48: Schnitte Nr. 48, 96, 144,...). Von dieser Regel wurde nur bei den besonders kleinen Kleinhirnhälften der Fallnummern 10/46 und 10/76 abgewichen (beides nicht-gematchte Kontrollen; Alter jeweils 0,03 Monate). Bei diesen beiden Kontrollen wurden die Schnitte in insgesamt 24 (Fallnummer 10/76) bzw. 36 (Fallnummer 10/46) Schnittserien mit immer gleichem Abstand zwischen den Schnitten aufgeteilt.

Im nächsten Schritt wurde von jeder Kleinhirnhälfte genau eine Schnittserie zufällig herausgesucht und gefärbt (z.B. für Fallnummer 10/45: Schnitte Nr. 10, 58, 106, 154, 202, 250, 298, 346 und 394; und für Fallnummer 10/76: Schnitte Nr. 21, 45, 69, 93, 117, 141, 165,

189, 213 und 237). Die anderen Schnittserien wurden in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

#### **2.2.1.2. Färben der Schnitte**

Die ausgewählten Schnitte wurden zunächst je nach Größe der Schnitte entweder auf Superfrost Plus Objektträger (25 x 75 mm; Fa. Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) oder auf mit Gelatine beschichtete Objektträger (30 x 76 mm bzw. 52 x 76 mm; Fa. Gerhard Menzel) aufgezogen und anschließend mit einer Cresyl-Violett-Färbung gefärbt. Tabelle 2.3 fasst die Arbeitsschritte zur Beschichtung der Objektträger mit 5%iger Gelatine zusammen, Tabelle 2.4 die Herstellung der für die Cresyl-Violett-Färbung benötigten Lösungen, und Tabelle 2.5 die Arbeitsschritte zum Färben der Schnitte.

Nach dem Färben wurden die Schnitte mit Deckgläschen (je nach Größe des Objektträgers: 24 x 32 mm, 30 x 57 mm, oder 50 x 66 mm; Fa. Gerhard Menzel) unter Zuhilfenahme von Malinol (Waldeck Division Chroma, Münster, Deutschland) eingedeckt. Die anschließende Aushärtezeit betrug mindestens drei Tage.

**Tabelle 2.3:** Arbeitsschritte zur Beschichtung der Objektträger mit 5%iger Gelatine

Nr.	Ausführung
1	<b>Reinigen der Objektträger:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Waschen in der Spülmaschine, in Metallständern gelagert</li> <li>- Trocknen bei 37° C für 1 Stunde im Brutschrank</li> </ul>
2	<b>Herstellen der Gelatine:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 g gepulverte Gelatine (Merck) auf 1.000 ml Aqua dest. durch sehr langsames Erwärmen auf 60°C lösen</li> <li>- Abkühlen lassen</li> <li>- 0,32 g Chromalaun (Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat; Merck) zugeben</li> <li>- Gelatinelösung in ein Glasgefäß filtrieren</li> </ul>
3	<b>Beschichtung der Objektträger:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Objektträger in Metallständern für ca. 2 Sekunden bedeckend in die Gelatinelösung eintauchen</li> <li>- Auf einem Tuch abtropfen lassen</li> <li>- Über Nacht bei 37°C im Brutschrank trocknen</li> </ul>
4	<b>Fixieren der Gelatine</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Am folgenden Tag Objektträger für 30 min in eine 4,5%ige Formaldehydlösung (säurefrei, pH7, phosphatgepuffert; Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) tauchen</li> <li>- Unter dem Abzug über Nacht ausdampfen lassen</li> </ul>

**Tabelle 2.4:** Für die Cresyl-Violett-Färbung benötigte Lösungen und deren Herstellung

Acetatpuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2,721 g Natriumacetat x 3H<sub>2</sub>O (Merck) in 100 ml Aqua dest. lösen</li> <li>- 4,804 ml Eisessig (Merck) in 400 ml Aqua dest. einbringen</li> <li>- Die beiden Flüssigkeiten vermischen (500 ml)</li> <li>- Mit Eisessig (Merck) auf pH 3,8 einstellen</li> </ul>
Cresyl-Violett-Acetat-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,5 g Cresylviolett-Acetat (Waldeck-Division Chroma) in 100 ml Acetatpuffer (pH 3,8) auflösen</li> <li>- Lösung 1:1 mit Acetatpuffer (pH 3,8) verdünnen</li> <li>- Vor Gebrauch filtrieren</li> </ul>

**Tabelle 2.5:** Arbeitsschritte zum Färben der Schnitte mit einer Cresyl-Violett-Färbung

Alkohol: Ethanol 99% vergällt (CLN, Niederhummel, Deutschland)

<b>Nr.</b>	<b>Arbeitsschritt (Schnitte jeweils einbringen in...)</b>	<b>Zeit</b>
1	- Acetatpuffer mit 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie) (pH 3,8)	30 min
2	- Aufsteigende Alkoholreihe: 70%, 70%, 90%	Je 5 min
3	- Alkohol 96%	Über Nacht
4	- Absteigende Alkoholreihe: 90%, 70%, 70%	Je 5 min
5	- Aqua dest.	5 min
6	- Cresyl-Violett-Acetat-Lösung in Acetatpuffer (pH 3,8)	5 min
7	- Aqua dest.	Kurz schwenken
8	- Alkohol 70% + 3 Tropfen Eisessig (Merck)	Bis die Farbintensität der angefärbten Zellen und des Hintergrunds dem gewünschten Ergebnis entspricht
9	- Aufsteigende Alkoholreihe: 90%, 96% + 3 Tropfen Eisessig (Merck) (solange in Lösung belassen, bis der Hintergrund soweit entfärbt ist, dass der Kontrast zum auszuwertenden Anteil des Gewebes den gewünschten Anforderungen entspricht); 100%, 100%	Bis die Feinabstimmung der Farbintensität dem gewünschten Ergebnis entspricht
10	- Xylol, Xylol (Merck)	Je 5 min

## 2.2.2 Stereologische Auswertung der Gehirnschnitte

Die gesamte Auswertung erfolgte unter Blindbedingungen an kodierten Präparaten; d.h. die untersuchende Person (M.K.) hatte bis zum Abschluss aller Auswertungen keine Kenntnis darüber, welche der untersuchten Kleinhirnhälften von SIDS-Fällen und welche von Kontrollen stammten.

### 2.2.2.1 Verwendeter stereologischer Messplatz

Bei dem verwendeten stereologischen Messplatz handelte es sich um ein computergesteuertes System auf Grundlage eines modifizierten, motorgetriebenen Lichtmikroskops mit folgenden Komponenten:

- Lichtmikroskop (Axioskop, Fa. Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Feinkalibrierbarer Revolver mit folgenden Objektiven (alle von Zeiss; die jeweils erste Zahl gibt den Abbildungsmaßstab an und die jeweils zweite Zahl die numerische Apertur; das Symbol "∞" besagt, dass das entsprechende Objektiv auf unendlich korrigiert war, und die Zahl 0,17, dass das entsprechende Objektiv für Deckglasdicken von 0,17 mm korrigiert war):
  - Plan-Neofluar 1,25x / 0,035            ∞/-
  - Plan-Neofluar 2,5x / 0,075            ∞/-
  - Plan-Neofluar 10x / 0,30            ∞/0,17
  - Plan-Neofluar 20x / 0,50            ∞/0,17
  - Plan-Neofluar 40x / 0,75            ∞/0,17
  - Plan-Neofluar 100x / 1,30 Öl        ∞/0,17
- motorgetriebener Objektträgertisch mit Steuereinheit (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland)
- Steuereinheit zur Bestimmung der Fokusebene (LEP MAC 6000 System; Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) mit zugehörigem Joystick (MAC 6XY JSTICK DIGPT; Ludl Electronic Products) und Messtaster (MT 1271, Fa. Dr. Johannes Heidenhain, Traunreut, Deutschland)
- Kamera: CCD-Color 1600 x 1200 Bildpunkte (MBF Bioscience, Williston, VT, USA)
- Computer für die Steuerung und die Auswertung: 3,33 GHz Intel Core 2 Duo (Intel, Santa Clara, CA, USA) mit 24" Monitor (Flex Scan SX2462W; EIZO, Ishikawa, Japan)
- Auswerte- und Steuersoftware: Stereo Investigator 10.0 (MBF Bioscience)

### 2.2.2.2 Methodik stereologischer Analysen

*Design-based* stereologische Methoden ermöglichen - auch in dicken Gewebeschnitten - die quantitative Analyse ausgewählter Strukturen im dreidimensionalen Raum. Diese Methoden gelten heute als *state-of-the-art* bei der Bestimmung von Gesamtzellzahlen einzelner Zellarten (in der vorliegenden Arbeit die Gesamtzahlen von Granularzellen und Purkinjezellen im menschlichen Kleinhirn) und der Volumina bestimmter Hirnregionen (in der vorliegenden Arbeit die Schichten der menschlichen Kleinhirnrinde sowie der weißen Substanz im menschlichen Kleinhirn) (vgl. z.B. Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006). Dabei ist für die Auswertung weder die Größe und Lage der zu untersuchenden Strukturen noch deren Form relevant (vgl. z.B. Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006).

### 2.2.2.3 Prinzip der *design-based* Stereologie

Das Prinzip der *design-based* Stereologie kann an der Bestimmung der Gesamtzahl von Fischen in einem See exemplarisch verdeutlicht werden. Dazu sei die folgende Aufgabenstellung angenommen: *Ermitteln Sie die Gesamtzahl von Fischen im See.*

Zur Bearbeitung dieser Aufgabe wird in einem ersten Schritt der gesamte See als die für die Analyse der Gesamtzahl von Fischen relevante Struktur festgelegt – und zwar als fiktive Momentaufnahme, so wie man auch ein Fernsehbild z.B. einer Sportveranstaltung als fiktive Momentaufnahme „einfrieren“ kann. Jeden einzelnen Fisch im See (also im kompletten Volumen des Sees) zu erfassen, wäre viel zu aufwändig. Viel einfacher, weniger aufwändig und zeitsparender ist es, die Anzahl von Fischen nur in definierten Teilen des Sees zu bestimmen und die ermittelten Daten auf den gesamten See hochzurechnen.

Diejenigen Teile des Sees, die in die Analyse eingehen sollen, werden folgendermaßen ermittelt: ausschließlich an Stellen gehäuften Fischvorkommens zu zählen und das Ergebnis auf den gesamten See hochzurechnen, würde ein viel zu hohes Endergebnis liefern (das Ergebnis wäre „*biased*“). An Stellen mit wenig oder gar keinem Fischvorkommen zu zählen hingegen würde die daraus hochgerechnete Gesamtzahl von Fischen im See wesentlich zu niedrig (im Vergleich zur tatsächlichen Gesamtzahl von Fischen im See) ausfallen lassen - das Ergebnis wäre wiederum „*biased*“. Um der unterschiedlichen Fischverteilung im See bei möglichst geringem Arbeitsaufwand gerecht zu werden, erfolgt die Zählung der Fische in Wasserstichproben, die systematisch und gleichzeitig zufällig über den gesamten See verteilt gewonnen werden (Prinzip des sogenannten „*systematic and random sampling*“). Dies ist im folgenden Absatz erläutert.

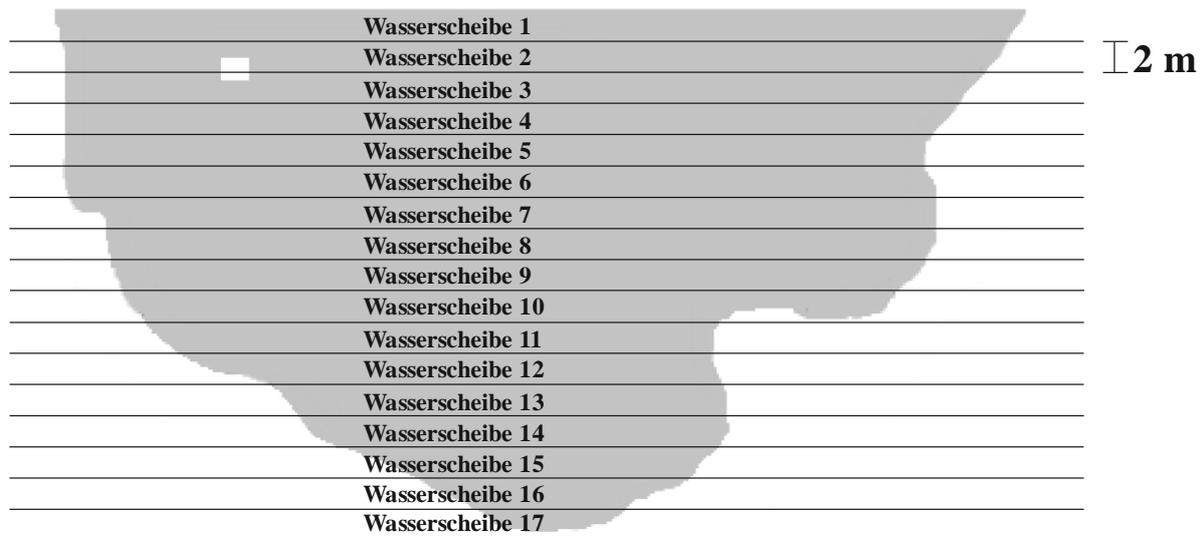
Um dem Aufwand, die gesamte Tiefe des Sees als Zählbereich zu erfassen, zu entgehen, werden Wasserscheiben als Stichproben genommen. Dazu wird der See in seiner

gesamten Tiefenausdehnung von der Oberfläche bis zum Grund im hier vorliegenden Beispiel in zwei Meter dicke Wasserscheiben unterteilt (Abbildungen 2.1 und 2.2). Aus diesen Wasserscheiben wird eine definierte Auswahl getroffen, z.B. jede dritte Wasserscheibe. Insgesamt ließen sich somit drei Stichproben von Wasserscheiben untersuchen (erste Stichprobe: Wasserscheiben 1, 4, 7, 10, 13 und 16; zweite Stichprobe: Wasserscheiben 2, 5, 8, 11, 14 und 17; dritte Stichprobe: Wasserscheiben 3, 6, 9, 12 und 15).

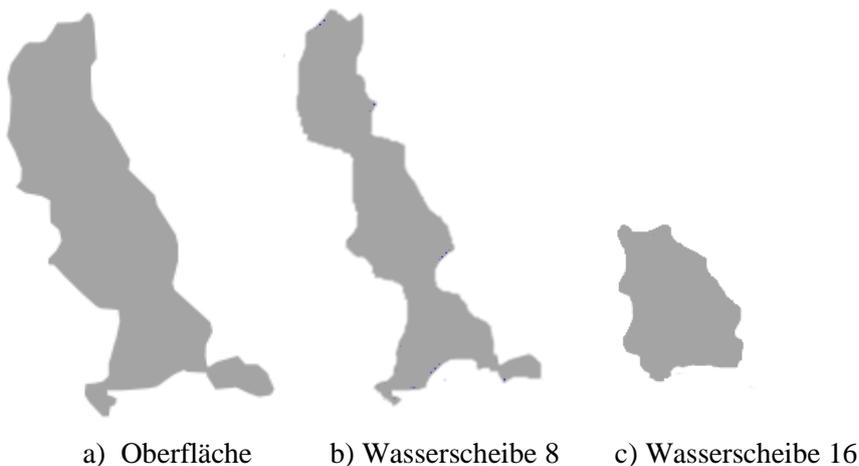
Der Abstand der Wasserscheiben zueinander ist also systematisch (jede dritte Wasserscheibe); die Auswahl derjenigen Stichprobe von Wasserscheiben, die tatsächlich untersucht werden (erste, zweite oder dritte Stichprobe) ist dagegen zufällig. Ein solches Vorgehen nennt man in der Stereologie *systematic and random sampling*, und die untersuchte Serie von Wasserscheiben eine *systematically and randomly sampled* (SRS)-Serie (Gundersen, 1986; Gundersen und Jensen, 1987; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006).

Für die Bestimmung der Gesamtzahl von Fischen im See werden im hier beschriebenen Beispiel die sechs Wasserscheiben der zweiten Stichprobe verwendet (Wasserscheiben 2, 5, 8, 11, 14 und 17); die anderen elf Wasserscheiben aus der ersten und der dritten Stichprobe werden in der Auswertung nicht berücksichtigt. Der Zählaufwand, auf die gesamte Tiefenausdehnung des Sees bezogen, ist durch die Auswahl einer SRS-Serie von Wasserscheiben also bereits um  $2/3$  vermindert (nur eine von drei SRS-Serien von Wasserscheiben wird auf das Vorkommen von Fischen untersucht).

## Seeoberfläche



**Abbildung 2.1:** Querschnitt durch einen gedachten See. Der 33 Meter tiefe See wurde in seiner gesamten Tiefenausdehnung von der Oberfläche bis zum Grund in siebzehn jeweils zwei Meter dicke Wasserscheiben aufgeteilt (Wasserscheibe 17 ist in der Dicke nicht komplett mit Wasser gefüllt). Jede Linie entspricht der Grenze zur nächsten zwei Meter dicken Wasserscheibe. Das weiße Quadrat (links oben) stellt eine Stelle fiktiven gehäuften Fischvorkommens (z.B. einen Schwarm von Fischen) dar.

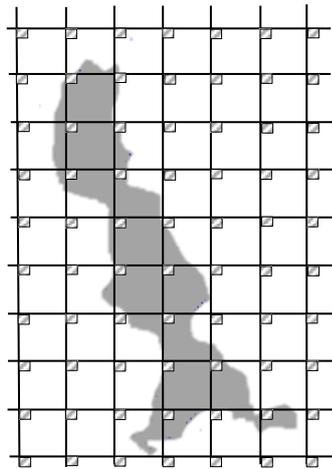


**Abbildung 2.2:** Aufsichten auf die in Abbildung 2.1 gezeigten Wasserscheiben 1, 8 und 16. Die verschiedenen Wasserscheiben weisen in der Aufsicht ein vollkommen unterschiedliches Erscheinungsbild auf, da sich die Breite des Sees zum Seegrund hin verjüngt. **a)** zeigt den Umriss des Sees in der Aufsicht auf Wasserscheibe 1 (entspricht der Oberfläche des Sees), **b)** den Umriss des Sees in der Aufsicht auf Wasserscheibe 8, und **c)** den Umriss des Sees in der Aufsicht auf Wasserscheibe 16.

Der Arbeitsaufwand im nächsten Schritt, in jeder der sechs ausgewählten Wasserscheiben die Anzahl von Fischen zu ermitteln, und das Endergebnis dann mit 3 zu multiplizieren (jede dritte Wasserscheibe ausgewertet) wäre immer noch enorm. Also werden auch in jeder Wasserscheibe nur Teile ausgewertet. Die entsprechende Vorgehensweise wird im nächsten Abschnitt erläutert.

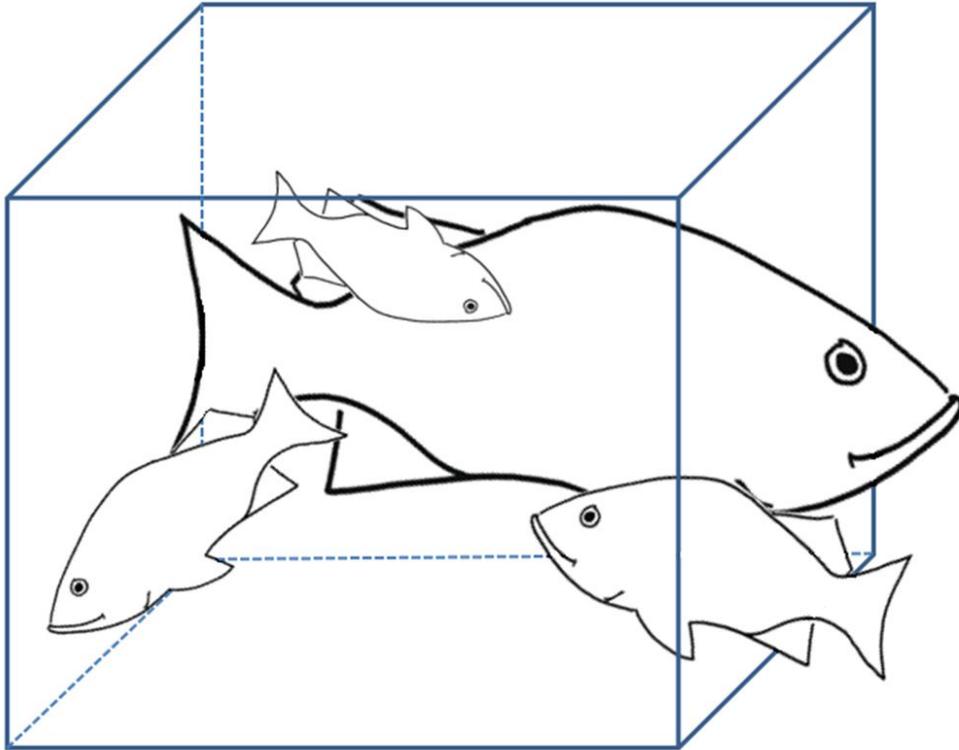
Die Oberfläche von Wasserscheibe 8 wird exemplarisch in viele kleine Quadrate unterteilt (Abbildung 2.3). Innerhalb dieser Quadrate werden jeweils wieder Teile definiert, die die eigentlichen, immer gleich großen Zählbereiche darstellen (weitere Erklärung siehe unten). Dazu wird ein Gitter mit einer definierten Kantenlänge von  $5 \times 5$  Metern (Länge  $\times$  Breite) auf die gesamte Oberfläche der Wasserscheibe gelegt (Abbildung 2.3), durch das der Abstand der Zählbereiche in X- und Y-Richtung festgelegt wird. Die Größe des Gitters (und damit der Abstand der Zählbereiche zueinander) ist systematisch, die Lage des Gitters auf der Wasserscheibe ist zufällig (SRS-Prinzip). Nachfolgend wird in jedem Gitterquadrat derjenige Teil der Wasserscheibe festgelegt, der letztendlich der eigentliche Zählbereich ist (kleine schraffierte Quadrate in Abbildung 2.3). Der zweidimensionale Zählrahmen wird zunächst mit einer Kantenlänge von  $1 \times 1$  Meter definiert (in der Stereologie *unbiased counting frame* genannt). Das bedeutet, dass mit diesen Parametern nur solche Fische gezählt werden, die sich innerhalb der Wasserscheibe unmittelbar an der Oberfläche innerhalb eines schraffierten Quadrats befinden. Um die Auswertung präziser zu gestalten, wird das Quadrat noch um den Parameter Tiefe von 1 Meter erweitert. So entsteht ein dreidimensionaler Raum in Form eines Quaders (in der Stereologie als *unbiased virtual counting space* bezeichnet). Der *unbiased virtual counting space* ist der endgültige Zählbereich, in dem die Anzahl der Fische je Gitterquadrat ermittelt wird. Der *unbiased virtual counting space* wiederholt sich in jedem Gitterquadrat jeweils an derselben Stelle (schraffierte Quadrate in Abbildung 2.3) über die gesamte Fläche der Wasserscheibe. Abbildung 2.3 zeigt auch, dass *unbiased virtual counting spaces* (schraffierte Quadrate) auch außerhalb des Sees (also „an Land“) definiert werden können – und zwar beliebig viele. Auf das Endergebnis (Gesamtzahl von Fischen im See) hat dies keinen Einfluss (ausführliche Erklärung weiter unten).

Mit den fünf anderen Wasserscheiben der SRS-Serie wird ebenso verfahren wie mit Wasserscheibe 8.



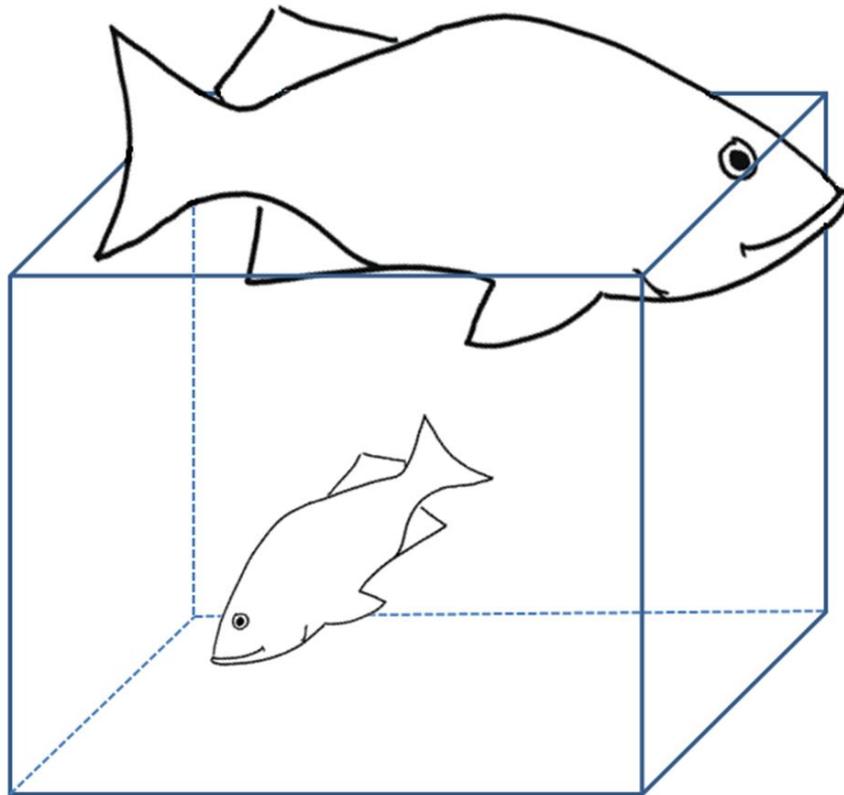
**Abbildung 2.3:** Die gesamte gedachte Wasserscheibe 8 ist mit einem Gitter von  $5 \times 5$  m Kantenlänge bedeckt. Die kleinen schraffierten Quadrate stellen die Stellen dar, an denen je Gitterquadrat der  $1 \text{ m} \times 1 \text{ m} \times 1 \text{ m}$  (Länge  $\times$  Breite  $\times$  Tiefe) große *unbiased virtual counting space* liegt (Erläuterung im Text).

Nun kann die eigentliche Zählung der Fische nach definierten Kriterien beginnen. Die Fische im See sind unterschiedlich groß und bewegen sich in unterschiedlichen Richtungen im See – und damit auch in den *unbiased virtual counting spaces*. Im hier gedachten Beispiel mag ein Fisch den Kopf leicht angehoben Richtung Wasseroberfläche gerichtet haben, ein anderer hat seinen Kopf Richtung Boden gerichtet, wieder ein anderer liegt parallel zur Oberfläche des Sees, und ein vierter Fisch hat seinen Rücken zum Boden gerichtet (Abbildung 2.4). Außerdem befinden sich im See sowohl sehr große als auch ganz kleine Fische. Ein kleiner Fisch kann z.B. mit seinem ganzen Körper in einem *unbiased virtual counting space* liegen, wohingegen von einem großen Fisch nur ein Teil des Bauches in einem *unbiased virtual counting space* sichtbar ist (Abbildung 2.5). Der sich in Abbildung 2.5 ganz im *unbiased virtual counting space* befindliche kleine Fisch kann also gezählt werden; für den großen Fisch jedoch, von dem nur ein kleiner Teil des Bauches im *unbiased virtual counting space* liegt, müssen weitere Kriterien zur eindeutigen Zuordnung des Fisches zu einem bestimmten *unbiased virtual counting space* definiert werden.

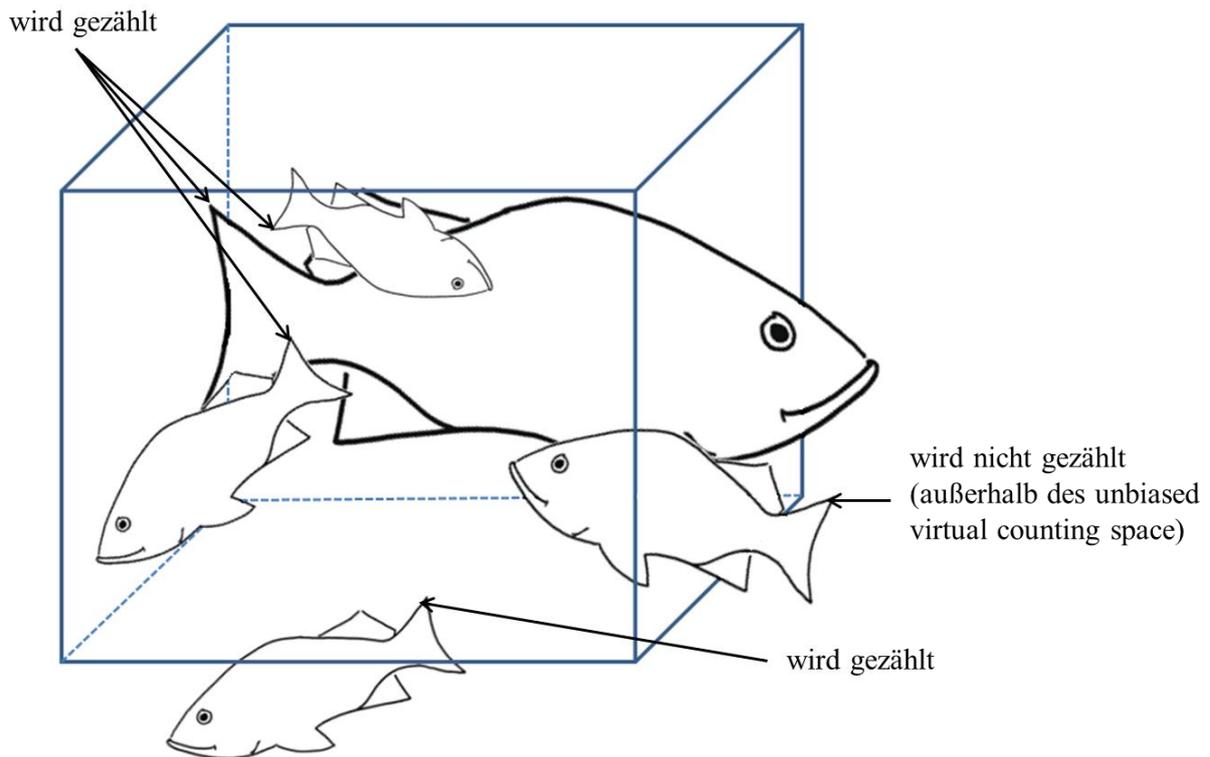


**Abbildung 2.4:** Gedachte Fische mit unterschiedlicher Größe, Position und räumlicher Ausrichtung in einem dreidimensionalen *unbiased virtual counting space*, dessen Oberseite als schraffiertes Quadrat in Abbildung 2.3 dargestellt ist.

Der Bauch der Fische kann sehr groß (Abbildungen 2.4 und 2.5) und als solcher nur schwer vom Rest des Körpers abgrenzbar sein, und eignet sich deswegen nicht als eindeutiges Zählkriterium. Die Schwanzflosse hingegen ist eine vergleichsweise kleine Struktur des Fisches, die eindeutig zuzuordnen ist. Aber auch hier besteht das gleiche Problem wie vorher beim Bauch. Es kann sich beispielsweise nur die untere Hälfte oder das untere Drittel der Schwanzflosse im *unbiased virtual counting space* befinden. Dementsprechend muss die Definition des eindeutigen Kriteriums zum Zählen eines Fisches noch weiter präzisiert werden: ein Fisch wird dann (und nur dann) gezählt, wenn sich die obere Spitze (zum Rücken hin) seiner Schwanzflosse im vorgegebenen *unbiased virtual counting space* befindet (Abbildung 2.6). Dabei ist es nicht relevant, wieviel von der Schwanzflosse sich sonst noch im *unbiased virtual counting space* befindet. Auch ist es unerheblich, wieviel sich außerdem vom Körper des Fisches im *unbiased virtual counting space* befindet und wie die Lage des Fisches im Raum relativ zum *unbiased virtual counting space* ist.



**Abbildung 2.5:** Ein kleiner gedachter Fisch liegt mit seinem ganzen Körper in einem *unbiased virtual counting space*; von einem großen Fisch befindet sich dagegen nur ein Teil des Bauches im *unbiased virtual counting space*.



**Abbildung 2.6:** Im hier gezeigten *unbiased virtual counting space* werden beispielhaft fünf gedachte Fische nach den im Text genannten Zählkriterien überprüft: drei der vier kleinen Fische und der große Fisch haben die obere Spitze (zum Rücken hin) ihrer Schwanzflosse im *unbiased virtual counting space*. Dabei ist es vollkommen unerheblich, dass der große Fisch mit seinem Vorderkörper außerhalb und der kleine Fisch im unteren Teil der Abbildung mit dem Großteil seines Körpers außerhalb und nur mit dem oberen Teil seines Hinterkörpers innerhalb des *unbiased virtual counting space* liegt. Zusammen mit dem oberen Teil seines Hinterkörpers liegt auch die für die Zählung relevante obere Spitze der Schwanzflosse im *unbiased virtual counting space*. Dagegen liegt zwar der gesamte Vorderkörper des kleinen Fisches rechts innerhalb des *unbiased virtual counting space*; die obere Spitze der Schwanzflosse liegt aber nicht im *unbiased virtual counting space*. Somit wird der kleine Fisch rechts nicht im gezeigten *unbiased virtual counting space* gezählt. Vielmehr würde man den kleinen Fisch rechts im *unbiased virtual counting space* rechts von dem hier gezeigten *unbiased virtual counting space* zählen. Dieser *unbiased virtual counting space* rechts von dem hier gezeigten *unbiased virtual counting space* gehört jedoch nicht zur SRS-Serie von ausgewählten *unbiased virtual counting spaces* (vgl. Abbildung 2.3).

Die Bestimmung der Gesamtzahl von Fischen im See erfolgt nun mittels der folgenden Variablen und Gleichungen (vgl. West et al., 1996; Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2000; Glaser et al., 2006):

- Die sogenannte *section sampling fraction* (*ssf*) errechnet sich aus dem Intervall der untersuchten Wasserscheiben (im hier besprochenen Beispiel gilt  $ssf = 1/3$ ).
- Die sogenannte *area sampling fraction* (*asf*) errechnet sich als Quotient aus der Grundfläche der *unbiased virtual counting spaces* und der Größe des auf die untersuchten Wasserscheiben aufgelegten Gitters (im hier geschilderten Beispiel gilt  $asf = \{1 \text{ m} \times 1 \text{ m}\} / \{5 \text{ m} \times 5 \text{ m}\} = 1/25$ ).
- Die sogenannte *thickness sampling fraction* (*tsf*) errechnet sich als Quotient aus der Höhe der *unbiased virtual counting spaces* und der Dicke der untersuchten Wasserscheiben (im hier geschilderten Beispiel gilt  $tsf = 1 \text{ m} / 2 \text{ m} = 1/2$ ).
- Die - geschätzte - Gesamtzahl von Fischen im See ergibt sich aus  $N_{est} = \sum n \times (ssf \times asf \times tsf)^{-1}$ . Dabei ist  $\sum n$  die Anzahl der gezählten Fische in allen *unbiased virtual counting spaces*, und  $N_{est}$  bedeutet „*estimated total number of...*“ (West et al., 1991).
- Aus dieser Formel erkennt man auch – und dies ist ein ganz wesentliches Merkmal des in der vorliegenden Arbeit verwendeten sogenannten *optical fractionator* (West et al., 1991) – dass die Gesamtzahl von *unbiased virtual counting spaces* nicht in die Berechnung des Endergebnis eingeht. Dementsprechend können im hier beschriebenen Beispiel auch beliebig viele *unbiased virtual counting spaces* außerhalb des Sees („auf Land“) zu liegen kommen – es werden dort keine Fische angetroffen bzw. gezählt, und dies hat keinerlei Einfluss auf das Endergebnis.
- Natürlich ist das Endergebnis nur eine Schätzung (eine Hochrechnung) der tatsächlichen Gesamtzahl von Fischen im See. Würde man das beschriebene Beispiel aber unendlich oft wiederholen, entspräche der arithmetische Mittelwert der verschiedenen Ergebnisse für  $N_{est}$  jedoch genau der tatsächlichen Gesamtzahl von Fischen im See. Somit liefert der *optical fractionator* eine *unbiased* Schätzung der Gesamtzahl von Fischen im See – und die Streubreite von *optical fractionator* Schätzungen kann bestimmt werden (Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006).
- Würde man den gesamten See in unmittelbar aneinandergrenzende *unbiased virtual counting spaces* aufteilen, wäre  $ssf = asf = tsf = 1$ , und  $N_{est} = \sum n$ . Da in diesem Fall jedoch alle Fische gezählt werden, entspricht die geschätzte Gesamtzahl von Fischen im See genau der tatsächlichen Gesamtzahl von Fischen im See.
- Die Verteilung der Fische im See hat keinen Einfluss auf die *unbiasedness* der Schätzung (was sich aus der Betrachtung des Extremfalls  $ssf = asf = tsf = 1$  und somit  $N_{est} = \sum n$  unmittelbar ergibt), wohl aber auf die Streubreite wiederholter Schätzungen

(Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2005). Insbesondere bei sehr unregelmäßiger Verteilung von Fischen (z.B. Schwärme, Cluster) muss man die Schätzung der Gesamtzahl von Fischen im See mit einer großen Zahl von *unbiased virtual counting spaces* ( $> 100$ ) durchführen, die möglichst gleichförmig über die gesamte dreidimensionale Ausbreitung des Sees zu verteilen sind. Die Analyse von nur wenigen, dafür aber großen *unbiased virtual counting spaces* vermindert die Wahrscheinlichkeit, einen *unbiased virtual counting space* innerhalb eines Fischschwarms zu platzieren. Daraus ergeben sich bei unendlicher Wiederholung der Schätzung viele Schätzungen mit zu niedrigem Endergebnis, sowie einige wenige Schätzungen mit erheblich zu hohem Endergebnis (bei diesen Schätzungen lägen ein oder mehrere *unbiased virtual counting spaces* innerhalb eines Fischschwarms) (Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2005). Die geschätzten Gesamtzahlen von Fischen im See sind wiederum *unbiased*, aber wegen der sehr hohen Streubreite unbrauchbar. (Ein ähnliches Gedankenexperiment gibt es in der Statistik, bei dem man die mittlere Körpergröße und das mittlere Vermögen der US-Amerikaner aus einer Stichprobe von 100 US-Amerikanern bestimmt. Die entscheidende Frage ist dabei, ob es Bill Gates in die Stichprobe schafft oder nicht. Auf die Schätzung der mittleren Körpergröße hat die An- oder Abwesenheit von Bill Gates in der Stichprobe nur geringen Einfluss, weil die Körpergrößen der US-Amerikaner relativ ähnlich sind. Auf die Schätzung des mittleren Vermögens hat die An- oder Abwesenheit von Bill Gates in der Stichprobe aber erheblichen Einfluss, weil das individuelle Vermögen der US-Amerikaner extrem inhomogen verteilt ist. Deshalb ist die Schätzung der mittleren Körpergröße der US-Amerikaner aus einer SRS-Stichprobe von 100 US-Amerikanern zulässig, die Schätzung des mittleren Vermögens der US-Amerikaner aber nicht.)

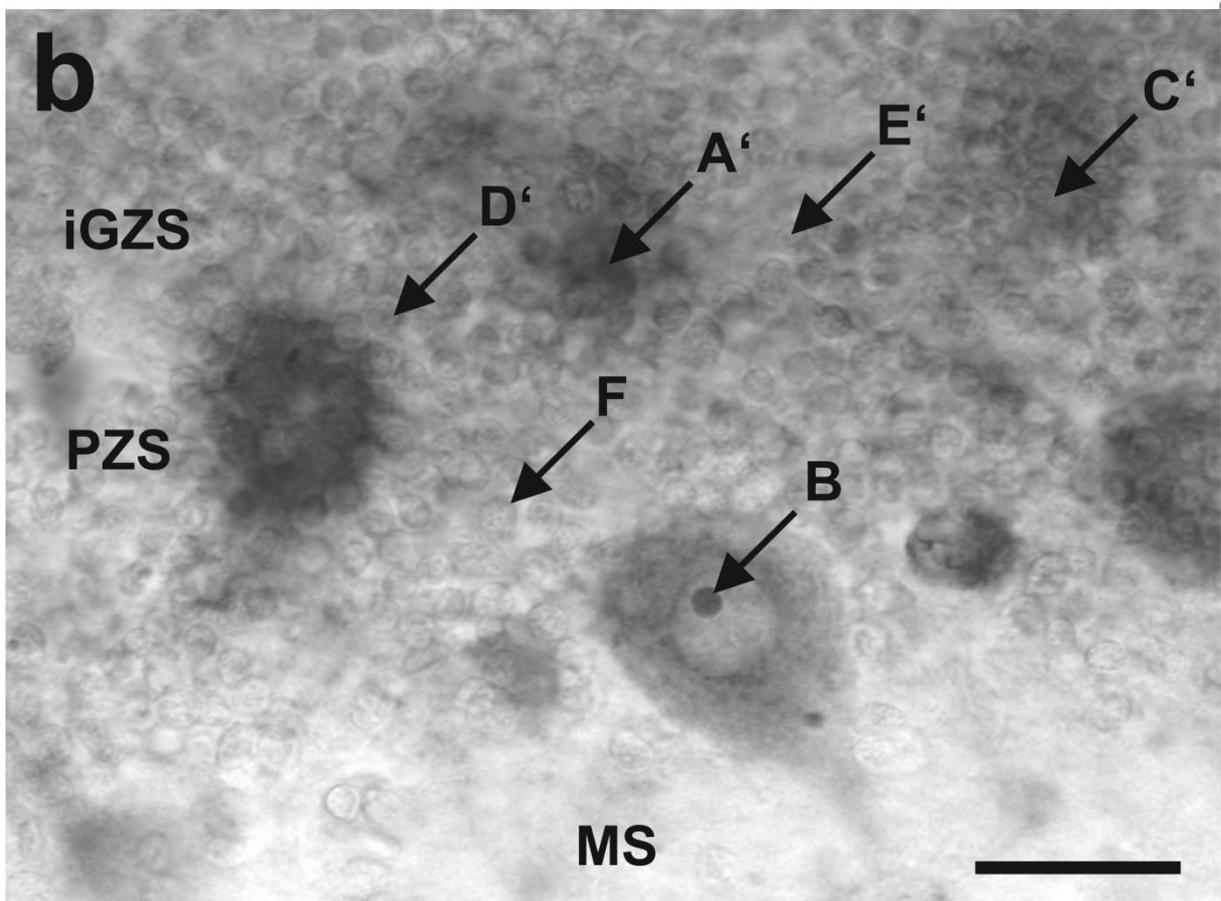
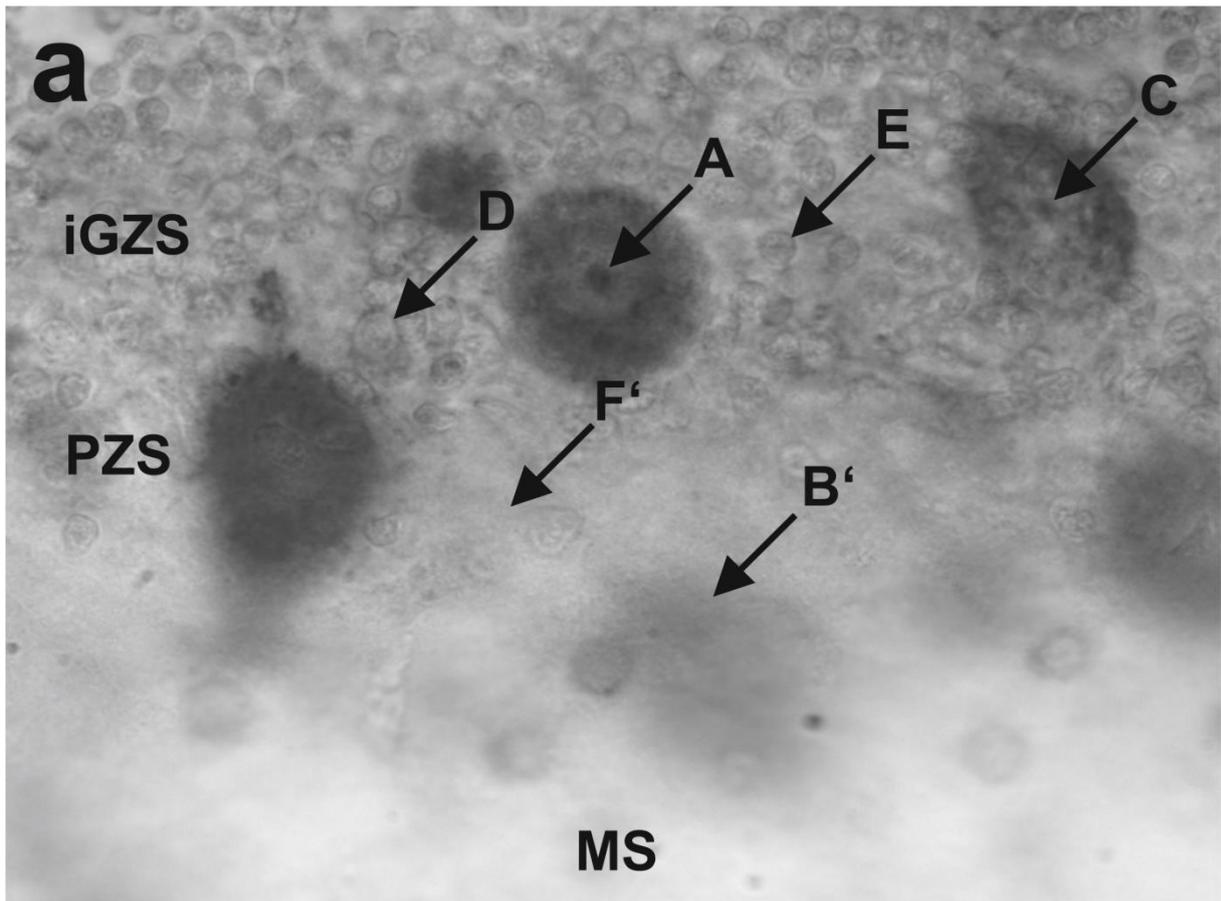
- Auch das Volumen des Sees lässt sich im beschriebenen Beispiel sehr einfach bestimmen: nach Cavalieri (Cavalieri, 1635; Schmitz und Hof, 2005) lässt es sich wie folgt schätzen:  $V_{est} = \sum a \times d \times ssf^1$ . Dabei ist  $\sum a$  die Summe der Flächen aller untersuchten Wasserscheiben entweder an der Ober- oder der Unterkante der Wasserscheiben (aber für alle untersuchten Wasserscheiben dasselbe Kriterium), und  $d$  die gleichförmige Dicke der Wasserscheiben.

#### **2.2.2.4 Konkret durchgeführte stereologische Untersuchungen**

Im folgenden Text wird nun das in Abschnitt 2.2.2.3 vorgestellte Beispiel zur Bestimmung der Gesamtzahl von Fischen in einem See sowie des Volumens des Sees auf die experimentelle Situation der hier vorliegenden Arbeit übertragen:

- Insgesamt wurden drei ineinanderliegende „Seen“ untersucht: (i) Molekularschicht des menschlichen Kleinhirns in einer Kleinhirnhälfte, (ii) Purkinje- und innere Granularzellschicht des menschlichen Kleinhirns in einer Kleinhirnhälfte, und (iii) weiße Substanz des menschlichen Kleinhirns in einer Kleinhirnhälfte.
- Außerdem wurden zwei Arten von „Fischen“ untersucht: (i) Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht einer menschlichen Kleinhirnhälfte, und (ii) Gesamtzahl von Purkinjezellen in einer menschlichen Kleinhirnhälfte (Abbildung 2.7). Die Morphologie dieser Zellarten wird weiter unten beschrieben. (Nachfolgend bezieht sich die Beschreibung „Gesamtzahl von Granularzellen“ immer und ausschließlich auf die innere Granularzellschicht. Die äußere Granularzellschicht wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.)

**Abbildung 2.7:** (siehe nächste Seite)



Fortsetzung **Abbildung 2.7**: Ausschnitt aus der untersuchten Kleinhirnhälfte von Fallnummer 10/77 (Schnitt 202). Die Abbildung zeigt bei hohem Abbildungsmaßstab eine Detailansicht der Molekularschicht (MS), der Purkinjellschicht (PZS) und der inneren Granularzellschicht (iGZS) in zwei unterschiedlichen Fokusebenen innerhalb des Schnittes, der bei einer ursprünglichen Schnittdicke von 100  $\mu\text{m}$  nach histologischer Aufarbeitung eine mittlere Schnittdicke von 50,4  $\mu\text{m}$  aufwies (**a**: Fokusebene 13  $\mu\text{m}$  unter der oberen Oberfläche des Schnittes; **b**: Fokusebene 42  $\mu\text{m}$  unter der oberen Oberfläche des Schnittes). An den Stellen A (in **a**) und B (in **b**) erkennt man die Nukleoli von zwei Purkinjellen; an den entsprechenden Stellen A' (in **b**) und B' (in **a**) kann man die entsprechenden Purkinjellen erahnen, sie sind aber nicht scharf im Fokus abgebildet. Dies gilt auch für die Purkinjelle C (in **a**) bzw. C' (in **b**), die in keiner der dargestellten Ebenen scharf abgebildet ist. An den Stellen D, E (in **a**) und F (in **b**) erkennt man die Umrisse von drei Granularzellen; an den entsprechenden Stellen D', E' (in **b**) und F' (in **a**) sind diese Zellen nicht mehr zu erkennen (an der Stelle D' (in **b**) erkennt man dagegen eine andere Zelle, die man an der Stelle D (in **a**) nicht sieht). Die beiden Abbildungen verdeutlichen, dass es in der vorliegenden Arbeit möglich war, die untersuchten Zellarten eindeutig in den dicken Schnitten bei der verwendeten Färbung zu erkennen und ihre exakte Lage im dreidimensionalen Raum zu bestimmen. Die hier gezeigten Fotografien wurden mit dem folgenden Mikroskop erstellt: Mikroskop: Eclipse 50i (Nikon Corporation, Tokio, Japan); Objektiv: 100x/1,25 Öl  $\infty$ /0,17 (Nikon; das Symbol " $\infty$ " besagt, dass das entsprechende Objektiv auf unendlich korrigiert war, und die Zahl 0,17, dass das entsprechende Objektiv für Deckglasdicken von 0,17 mm korrigiert war); Kamera: AxioCam HRc (4164 x 3120 Bildpunkte; Zeiss); Software: AxioVision (Version 4.8.; Zeiss). Die Originalfotos wurden mit der Software Corel Photo-Paint X5 (Version 15; Corel Corporation, Ottawa, Kanada) in 8 Bit Graustufenbilder umgewandelt und anschließend nicht weiter bearbeitet. Die Montage und Beschriftung der Bilder erfolgte mit Corel Draw X5 (Corel Corporation). Die Kamera des verwendeten stereologischen Arbeitsplatzes (in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben) eignete sich hervorragend für die stereologischen Analysen im Live-Modus; mit einer maximalen Auflösung von 1600 x 1200 Bildpunkten ist diese Kamera aber zur Erstellung von publikationsfähigen Fotografien ungeeignet. Der Balken in **b** repräsentiert 25  $\mu\text{m}$ .

- Der Wert für *ssf* ergab sich aus der Anfertigung lückenloser Serien 100  $\mu\text{m}$  dicker Sagittalschnitte jeder untersuchten Kleinhirnhälfte, und anschließender *SRS*-Auswahl entweder jeden 48sten Schnittes (*ssf* = 1/48) bzw. jeden 24sten Schnittes (Fallnummer 10/76; *ssf* = 1/24) oder jeden 36sten Schnittes (Fallnummer 10/46; *ssf* = 1/36).
- Die *SRS*-Auswahl der Positionen der *unbiased virtual counting spaces* innerhalb der untersuchten Schnitte (vgl. Abbildung 2.3) (und somit die Werte für *asf*) erfolgte über die Stereo Investigator Software (MBF Bioscience). Dazu wurde die äußere Kontur des Kleinhirns bei jedem untersuchten Schnitt mit dem 1,25x Objektiv mit der Software

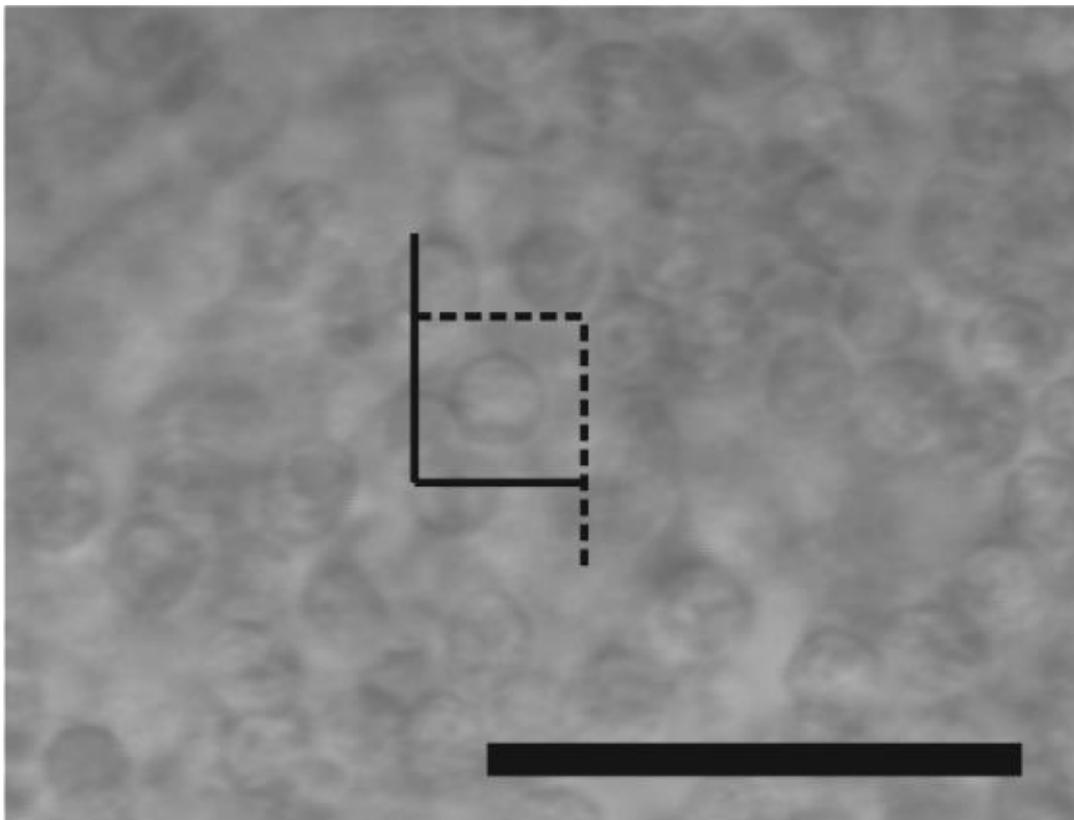
umfahren („getraced“). Bedingt durch die erheblichen interindividuellen Unterschiede der Größen der untersuchten Kleinhirnhälften wurde anschließend für jede untersuchte Kleinhirnhälfte ein individuelles Gitter festgelegt, so dass für die Purkinjezellen im Mittel 948 *unbiased virtual counting spaces* pro Kleinhirnhälfte untersucht wurden, und für die Granularzellen im Mittel 931 *unbiased virtual counting spaces* pro Kleinhirnhälfte. Dies übererfüllte die Mindestanforderungen an eine wissenschaftlich fundierte *optical fractionator* Analyse erheblich (vgl. Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006). Die individuellen Werte für die Kantenlänge des Gitters und die Gesamtzahlen der untersuchten *unbiased virtual counting spaces* sind in den Tabellen 2.6 und 2.7 zusammengefasst.

- Bei der Lagebestimmung der *unbiased virtual counting spaces* wurde auch einer möglicherweise unplanen Schnittoberfläche Rechnung getragen. Dazu wurde die Oberkante der *unbiased virtual counting spaces* für die Purkinjezellen 5 µm unter der Schnittoberfläche platziert, und für die Granularzellen 10 µm unter der Schnittoberfläche. Somit wurde ein „Sicherheitsabstand“ zur Schnittoberfläche eingehalten (in der *design-based* Stereologie „*guard zone*“ genannt). Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass bei der Verwendung von Kryostatschnitten (wie in der vorliegenden Arbeit) „*guard zones*“ nicht zwingend notwendig sind (Schmitz et al., 2000).
- Die *unbiased virtual counting spaces* wurden dadurch generiert, dass das Live-Bild des Mikroskops bei hohem Abbildungsmaßstab (Purkinjezellen: 20× Objektiv; Granularzellen: 100× Öl Objektiv) mittels der Kamera auf den Bildschirm übertragen und dort an jeder Position der *unbiased virtual counting spaces* (vgl. Abbildung 2.3) von der Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) mit einem zweidimensionalen *unbiased counting frame* überlagert wurde (Abbildung 2.8).
- Auch die Größe der *unbiased counting frames* wurde individuell gewählt, um dem Umstand der großen interindividuellen Unterschiede der Größen der untersuchten Kleinhirnhälften Rechnung zu tragen. Die entsprechenden Werte sind in den Tabellen 2.6 und 2.7 zusammengefasst.
- Die Generierung der *unbiased virtual counting spaces* (mit den *unbiased counting frames* als Basis) erfolgte dadurch, dass die Fokusebene des verwendeten Objektivs durch eine genau definierte Höhe der Schnittdicke geführt wurde (Werte in den Tabellen 2.6 und 2.7).
- Bei der Bestimmung der Gesamtzahlen von Purkinjezellen wurde für die rechte obere Ecke jedes *unbiased virtual counting spaces* geprüft, in welcher Schicht des Kleinhirns sie sich befand („Treffer“ entweder in der Molekularschicht, der Purkinjezellschicht und inneren Granularzellschicht, oder der weißen Substanz).

**Tabelle 2.6:** In der vorliegenden Arbeit verwendete stereologische Variablen zur Bestimmung der Gesamtzahlen von Purkinjezellen in menschlichen Kleinhirnhälften. Die Definitionen von  $G$ ,  $ucf$ ,  $asf^1$ ,  $H$ ,  $T$ ,  $tsf^1$ ,  $\sum uvcs$ ,  $\sum n$ ,  $\sum S$  und  $ssf^1$  finden sich in der Tabellenunterschrift.

Fall-Nr.	$G$ [ $\mu\text{m}$ ]	$ucf$ [ $\mu\text{m}$ ]	$asf^1$ [ $10^3$ ]	$H$ [ $\mu\text{m}$ ]	$T$ [ $\mu\text{m}$ ]	$tsf^1$	$\sum uvcs$	$\sum n$	$\sum S$	$ssf^1$
<b>n=9 gematchte Kontrollen</b>										
10/79	2300	130	0,313	45	47,6	1,14	611	605	7	48
10/71	2400	150	0,256	45	48,6	1,13	913	937	9	48
10/80	2300	150	0,235	45	50,5	1,18	658	877	7	48
10/99	2800	150	0,348	45	56,0	1,24	853	720	8	48
10/92	2900	150	0,374	45	58,7	1,30	943	744	9	48
10/84	2300	150	0,235	45	54,3	1,22	1.032	631	8	48
10/45	2800	130	0,464	45	55,2	1,26	1.123	491	9	48
10/58	2800	150	0,348	45	58,7	1,30	1.000	640	8	48
10/65	3000	150	0,400	45	54,5	1,24	1.023	617	9	48
<b>Weitere, n=5 nicht gematchte Kontrollen</b>										
10/46	1300	130	0,100	25	35,4	1,42	1.435	2.377	8	36
10/76	2000	130	0,237	30	43,2	1,44	998	1.381	10	24
10/70	1800	100	0,324	30	41,4	1,38	883	606	7	48
10/64	3200	150	0,455	45	50,4	1,14	986	549	10	48
10/77	3100	150	0,427	45	49,7	1,14	925	573	8	48
<b>n=9 SIDS-Fälle</b>										
10/67	2300	130	0,313	45	44,9	1,14	720	693	7	48
10/50	2800	130	0,464	45	53,8	1,21	584	551	8	48
10/68	2800	150	0,348	45	50,1	1,16	834	637	8	48
10/54	2800	130	0,464	45	53,3	1,19	821	550	8	48
10/55	2800	150	0,348	45	60,8	1,35	964	571	8	48
10/47	2800	150	0,348	45	56,1	1,25	1.116	538	8	48
10/73	2800	130	0,464	45	58,5	1,30	1.181	439	8	48
10/78	3200	150	0,455	45	49,2	1,14	1.053	595	10	48
10/88	2800	150	0,348	45	57,4	1,28	1.142	560	9	48
<b>Mittelwerte</b>										
			<b>0,351</b>		<b>51,7</b>	<b>1,24</b>	<b>948</b>	<b>734</b>	<b>8</b>	

$G$ : Kantenlänge des Gitters in X- und Y-Richtung zur Festlegung der SRS-Positionen der *unbiased virtual counting frames* (vgl. Abbildung 2.3).  $ucf$ : Kantenlänge der *unbiased counting frames* (vgl. Abbildung 2.8).  $asf^1$ : Kehrwert der *area sampling fraction*.  $H$ : Höhe der *unbiased virtual counting spaces*.  $T$ : mittlere gemessene Schnittdicke nach histologischer Aufarbeitung.  $tsf^1$ : Kehrwert der *thickness sampling fraction*.  $\sum uvcs$ : Gesamtzahl der ausgewerteten *unbiased virtual counting frames* (verteilt auf alle untersuchten Schnitte).  $\sum n$ : Gesamtzahl der (in allen untersuchten Schnitten) gezählten Zellen.  $\sum S$ : Anzahl der untersuchten Schnitte.  $ssf^1$ : Kehrwert der *section sampling fraction*.



**Abbildung 2.8:** Ausschnitt aus der untersuchten Kleinhirnhälfte von Fallnummer 10/77 (Schnitt 202). Die Abbildung zeigt bei hohem Abbildungsmaßstab eine Detailansicht der inneren Granularzellschicht, die mit einem *unbiased counting frame* überlagert wurde. Der hier gezeigte *unbiased counting frame* hatte die gleichen Dimensionen wie derjenige *unbiased counting frame*, der während der Messungen von der Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) generiert und auf dem Computermonitor auf das mikroskopische Live-Bild projiziert wurde. Die durchgezogenen schwarzen Linien stellen die Ausschlusslinien des *unbiased counting frames* dar, die gestrichelten schwarzen Linien die Einschlusslinien des *unbiased counting frames*. Gezählt wird eine Zelle, wenn sich das entsprechende Zählkriterium innerhalb des *unbiased counting frames* oder auf einer Einschlusslinie befindet. Eine Zelle wird dann nicht gezählt, wenn das Zählkriterium außerhalb des *unbiased counting frames* oder auf einer Ausschlusslinie liegt. Der Balken repräsentiert 25  $\mu\text{m}$ .

**Tabelle 2.7:** In der vorliegenden Arbeit verwendete stereologische Variablen zur Bestimmung der Gesamtzahlen von Granularzellen in menschlichen Kleinhirnhälften. Die Definitionen von  $G$ ,  $ucf$ ,  $asf^1$ ,  $H$ ,  $T$ ,  $tsf^1$ ,  $\Sigma uvcs$ ,  $\Sigma n$ ,  $\Sigma S$  und  $ssf^1$  finden sich in der Tabellenunterschrift.

Fall-Nr.	$G$ [ $\mu\text{m}$ ]	$ucf$ [ $\mu\text{m}$ ]	$asf$ [ $10^3$ ]	$H$ [ $\mu\text{m}$ ]	$T$ [ $\mu\text{m}$ ]	$tsf^1$	$\Sigma uvcs$	$\Sigma n$	$\Sigma S$	$ssf^1$
<b>n=9 gematchte Kontrollen</b>										
10/79	2300	10	52,9	5	47,6	9,5	607	377	7	48
10/71	2400	10	57,6	5	48,6	9,7	900	668	9	48
10/80	2300	10	52,9	5	50,5	10,1	635	473	7	48
10/99	2800	8	122,5	5	56,0	11,2	829	467	8	48
10/92	2900	10	84,1	5	58,7	11,7	933	592	9	48
10/84	2300	8	82,7	5	54,3	10,9	1.004	600	8	48
10/45	2800	8	122,5	5	55,2	11,0	1.116	558	9	48
10/58	2800	8	122,5	5	58,7	11,7	980	561	8	48
10/65	3000	8	140,6	5	54,5	10,9	1.002	548	9	48
<b>Weitere, n=5 nicht gematchte Kontrollen</b>										
10/46	1300	10	16,9	5	35,4	7,1	1.393	793	8	36
10/76	2000	10	40,0	5	43,2	8,6	965	734	10	24
10/70	1800	10	32,4	5	41,4	8,3	864	639	7	48
10/64	3200	8	160,0	5	50,4	10,1	975	480	10	48
10/77	3100	8	150,2	5	49,7	9,9	914	489	8	48
<b>n=9 SIDS-Fälle</b>										
10/67	2300	10	52,9	5	44,9	9,0	716	471	7	48
10/50	2800	10	78,4	5	53,8	10,8	581	410	8	48
10/68	2800	10	78,4	5	50,1	10,0	836	586	8	48
10/54	2800	10	78,4	5	53,3	10,7	802	562	8	48
10/55	2800	8	122,5	5	60,8	12,2	948	461	8	48
10/47	2800	8	122,5	5	56,1	11,2	1.086	509	8	48
10/73	2800	8	122,5	5	58,5	11,7	1.172	616	8	48
10/78	3200	10	102,4	5	49,2	9,8	1.024	837	10	48
10/88	2800	8	122,5	5	57,4	11,5	1.123	658	9	48
<b>Mittelwerte</b>										
			<b>92,1</b>		<b>51,7</b>	<b>10,3</b>	<b>931</b>	<b>569</b>	<b>8</b>	

$G$ : Kantenlänge des Gitters in X- und Y-Richtung zur Festlegung der SRS-Positionen der *unbiased virtual counting frames* (vgl. Abbildung 2.3).  $ucf$ : Kantenlänge der *unbiased counting frames* (vgl.

Abbildung 2.8).  $asf^1$ : Kehrwert der *area sampling fraction*.  $H$ : Höhe der *unbiased virtual counting spaces*.  $T$ : mittlere gemessene Schnittdicke nach histologischer Aufarbeitung.  $tsf^1$ : Kehrwert der *thickness sampling fraction*.  $\sum uvcs$ : Gesamtzahl der ausgewerteten *unbiased virtual counting frames* (verteilt auf alle untersuchten Schnitte).  $\sum n$ : Gesamtzahl der (in allen untersuchten Schnitten) gezählten Zellen.  $\sum S$ : Anzahl der untersuchten Schnitte.  $ssf^1$ : Kehrwert der *section sampling fraction*.

- Darüber hinaus wurde die tatsächliche Schnittdicke der untersuchten Kleinhirnschnitte nach histologischer Aufarbeitung (Färben, Entwässern, Eindecken) mit der Stereo Investigator Software (MBF Bioscience) gemessen, indem an der Stelle jeden sechsten *unbiased virtual counting spaces* (bei kleineren Schnitten auch in geringeren Intervallen) die Fokusebene des verwendeten Objektivs zunächst auf die obere Oberfläche des Schnittes (d.h. die Oberseite des Schnittes) eingestellt wurde, und dann auf die untere Oberfläche des Schnittes (d.h. die Unterseite des Schnittes). Mit dem Messtaster wurde die Distanz zwischen der oberen und der unteren Oberfläche des Schnittes gemessen. Aus diesen Messungen ergaben sich für jede untersuchte Kleinhirnhälfte leicht unterschiedliche mittlere Schnittdicken nach histologischer Aufarbeitung (Werte in den Tabellen 2.6 und 2.7).
- Aus der Anzahl der individuellen „Treffer“ für jede Schicht des Kleinhirns ergab sich das Volumen der entsprechenden Kleinhirnschicht wie folgt (vgl. Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006):  $V_{est} = \sum T \times G^2 \times T \times ssf^1$   
 ( $V_{est}$ : geschätztes Volumen der entsprechenden Kleinhirnschicht.  $\sum T$ : Anzahl der „Treffer“ in der entsprechenden Kleinhirnschicht [summiert über alle untersuchten Schnitte pro Kleinhirnhälfte].  $G$ : Kantenlänge des Gitters in X- und Y-Richtung zur Festlegung der SRS-Positionen der *unbiased virtual counting frames*.  $T$ : mittlere gemessene Schnittdicke nach histologischer Aufarbeitung.  $ssf^1$ : Kehrwert der *section sampling fraction*). Die individuellen Anzahlen von „Treffern“ in der Molekularschicht, in der Purkinjzellschicht und inneren Granularzellschicht sowie in der weißen Substanz sind in Tabelle 2.8 zusammengefasst. Mit den genannten Variablen und Einstellungen ergaben sich (bei der Bestimmung der Gesamtzahlen von Purkinjzellen) im Mittel pro untersuchter Kleinhirnhälfte 234 „Treffer“ in der Molekularschicht, 348 Treffer in der Purkinjzellschicht und inneren Granularzellschicht, und 189 Treffer in der weißen Substanz (Werte in Tabelle 2.8). Somit konnten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bestimmungen der Volumina der untersuchten Schichten in den Kleinhirnhälften als „*high precision design-based stereologic analyses*“ klassifiziert werden (Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006).

**Tabelle 2.8:** Anzahl der „Treffer“ der rechten oberen Ecke der *unbiased virtual counting spaces* (bei der Bestimmung der Gesamtzahlen von Purkinjezellen) in den unterschiedlichen Schichten der untersuchten Kleinhirnhälften zur Bestimmung des Volumens dieser Schichten (Details sind im Text ausführlich beschrieben).

Fall-Nr.	„Treffer“ der rechten oberen Ecke der <i>unbiased virtual counting spaces</i> in der...		
	Molekularschicht	Purkinje- und inneren Granularzellschicht	weißen Substanz
<b>n=9 gematchte Kontrollen</b>			
10/79	76	251	148
10/71	198	344	197
10/80	110	258	142
10/99	180	291	165
10/92	259	317	191
10/84	338	327	213
10/45	362	501	203
10/58	284	354	183
10/65	338	340	177
<b>Weitere, n=5 nicht gematchte Kontrollen</b>			
10/46	71	614	404
10/76	84	433	275
10/70	125	342	212
10/64	312	323	198
10/77	317	333	147
<b>n=9 SIDS-Fälle</b>			
10/67	95	300	169
10/50	126	210	117
10/68	198	310	168
10/54	221	297	143
10/55	265	350	149
10/47	339	392	183
10/73	385	420	161
10/78	355	341	186
10/88	349	351	209
<b>Mittelwerte</b>			
	<b>234</b>	<b>348</b>	<b>189</b>

- Im nächsten Schritt wurden die Zählkriterien für die Purkinjezellen und Granularzellen im Gewebeschnitt festgelegt. Für die Purkinjezellen war dies der Nukleolus, für die Granularzellen der gesamte Zellkern. Konkret wurden Purkinjezellen und Granularzellen dann (und nur dann) gezählt, wenn der Nukleolus (Purkinjezelle) bzw. der Zellkern (Granularzelle) (i) innerhalb eines *unbiased virtual counting space* zum ersten Mal in den Fokus kam (Zählkriterium in Z-Richtung) und dabei (ii) entweder keine der Ausschlusslinien des *unbiased counting frame* (vgl. Abbildung 2.8) berührte oder aber außerhalb eines *unbiased virtual counting frames lag* und eine Einschlusslinie berührte oder kreuzte (Zählkriterium in X- und Y-Richtung). Analog zur oberen Spitze der Schwanzflosse der in Abschnitt 2.2.2.3 exemplarisch beschriebenen Fische wurde somit ebenfalls für jede Zelle ein potentielles singuläres Ereignis definiert, und zwar völlig unabhängig von der Form, Größe und Orientierung der Zellen im Gewebe.
- Aus der Anzahl der individuell gezählten Purkinjezellen und Granularzellen (jeweils summiert über alle untersuchten Schnitte pro Kleinhirnhälfte) ergab sich die geschätzte Gesamtzahl der jeweiligen Zellen in der entsprechenden Kleinhirnhälfte wie folgt (vgl. Schmitz, 1998; Glaser et al., 2006):  $N_{est} = \sum n \times ssf^{-1} \times asf^{-1} \times tsf^{-1}$   
( $N_{est}$ : geschätzte Gesamtzahl von Zellen.  $\sum n$ : Anzahl der gezählten Zellen [jeweils summiert über alle untersuchten Schnitte pro Kleinhirnhälfte].  $ssf^{-1}$ : Kehrwert der *section sampling fraction*.  $asf^{-1}$ : Kehrwert der *area sampling fraction*.  $tsf^{-1}$ : Kehrwert der *thickness sampling fraction*).
- Mit den genannten Variablen und Einstellungen wurden im Mittel pro untersuchter Kleinhirnhälfte 734 Purkinjezellen und 569 Granularzellen gezählt (Werte in den Tabellen 2.6 und 2.7). Somit konnten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zur Bestimmung von Gesamtzellzahlen als „*high precision design-based stereologic analyses*“ klassifiziert werden (Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006).
- Die Genauigkeit der Schätzungen der Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen ergab sich wie folgt (Schmitz, 1998; Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006):  $CE = 1 / \text{SQR} (\sum n)$ .  
( $CE$ : coefficient of error.  $\text{SQR}$ : Quadratwurzel [square root].  $\sum n$ : Anzahl der gezählten Zellen [jeweils summiert über alle untersuchten Schnitte pro Kleinhirnhälfte]). Da bei „*high precision*“ *design-based* stereologischen Analysen die CE-Werte keine Rolle in der statistischen Analyse spielen (vgl. Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006), wird auf sie in der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen.

### **2.2.3 Untersuchte Schichten und Zellarten im menschlichen Kleinhirn**

In der Kleinhirnrinde des Menschen lassen sich insgesamt fünf Schichten voneinander abgrenzen:

1. Äußere Granularzellschicht (nach Abschluss der Kleinhirnentwicklung spätestens im zweiten Lebensjahr nicht mehr vorhanden)
2. Molekularschicht
3. Purkinjzellschicht (einreihig; kann bedingt durch die Analyse von Gehirnschnitten und der damit verbundenen Möglichkeit des tangentialen Anschnitts der Purkinjzellschicht stellenweise auch mehrreihig aussehen)
4. Innere Granularzellschicht
5. Weiße Substanz

In der vorliegenden Arbeit wurden die Molekularschicht, die Purkinjzellschicht und innere Granularzellschicht, sowie die weiße Substanz untersucht. Die Abgrenzung dieser Schichten ist lichtmikroskopisch sehr einfach anhand der Morphologie der Purkinjzellen und Granularzellen möglich.

#### **2.2.3.1 Purkinjzellen**

Die Purkinjzellen waren schon anhand ihrer Größe eindeutig von den Granularzellen zu unterscheiden (vgl. Abbildung 2.7). Sie liegen zwischen der zellarmen Molekularschicht und der inneren Granularzellschicht. In der modifizierten Nissl-Färbung waren sie klar als Schicht großer, stark angefarbter Zellen mit gut erkennbaren Nissl-Schollen identifizierbar. Das Perikaryon war groß, mit einem in Richtung Molekularschicht weisenden Dendritenbaum. Der Zellkern setzte sich als helle Struktur eindeutig von der Zelle ab; der darin befindliche Nukleolus war stark angefärbt.

#### **2.2.3.2 Granularzellen**

Die Granularzellen waren schon anhand ihrer Lage zwischen der Purkinjzellschicht und der nach innen angrenzenden, mit nur wenigen Zellen ausgestatteten weißen Substanz klar als solche zu bestimmen. Die rundlichen, dicht an dicht liegenden Granularzellen erschienen dunkel und vergleichsweise homogen angefärbt. Golgizellen waren zahlenmäßig erheblich weniger und hatten wesentlich größere Zellkerne als die Granularzellen; Astrozyten dagegen hatten kleinere, dunkler gefärbte und eher ovale Zellkerne im Vergleich zu den Granularzellen.

## 2.2.4 Statistische Auswertung

Für jede untersuchte Kleinhirnhälfte wurden die folgenden Variablen bestimmt:

- Alter des Kindes
- *post mortem* Intervall
- Körperlänge des Kindes
- Körpergewicht des Kindes
- Gehirngewicht des Kindes
- Verhältnis Gehirngewicht zu Körpergewicht
- Gesamtzahl von Granularzellen
- Gesamtzahl von Purkinjezellen
- Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle
- Volumen der Molekularschicht
- Volumen der Granularzellschicht (einschliesslich des Volumens der Purkinjezellschicht)
- Volumen der weißen Substanz

In einem ersten Schritt erfolgte die statistische Analyse dieser Variablen für alle n=14 Kontrollen:

- Für jede untersuchte Variable wurden Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*; SEM) berechnet.
- Anschließend erfolgte eine lineare Regressionsanalyse aller Variablen als Funktion des Alters der Kinder.

In einem zweiten Schritt wurde die beschriebene statistische Analyse dieser Variablen für die n=9 gematchten Kontrollen sowie die n=9 SIDS-Fälle wiederholt. Darüber hinaus wurden alle Variablen der n=9 gematchten Kontrollen sowie der n=9 SIDS-Fälle einer quadratischen Regressionsanalyse ( $y = B_0 + B_1 \cdot x + B_2 \cdot x^2$ ) nach der *least-squares-(ordinary) fitting*-Methode unterworfen. Anschließend wurden die folgenden Vergleiche durchgeführt:

- Der Vergleich der individuellen Werte der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle erfolgte mit dem Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test.
- Der Vergleich der Regressionsgeraden der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle erfolgte mit einer in der Software GraphPad Prism (Version 5.04 für Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) enthaltenen und in Zar (1984) beschriebenen Methode.

Alle Berechnungen erfolgten mit der Software GraphPad Prism (GraphPad Software). P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

### 2.2.5 Kontrollanalysen

Zur internen Qualitätskontrolle wurden einzelne Analysen (Bestimmungen von Gesamtzahlen von Zellen bzw. Volumina von Kleinhirnschichten) ganz oder teilweise mit jeweils von den in den Tabellen 2.6 und 2.7 aufgelisteten stereologischen Variablen abweichenden Werten wiederholt. Die Ergebnisse lagen jeweils innerhalb der Messgenauigkeit. Dies sei am folgenden Beispiel erläutert:

- Aus den in Tabelle 2.6 zusammengestellten Daten errechnete sich für Fall-Nr. 10/77 bei der Zählung von insgesamt 573 Purkinjezellen eine geschätzte Gesamtzahl von 13.410.762 Purkinjezellen in der linken Kleinhirnhälfte.
- Mit  $CE = 1 / \text{SQR}(573) = 0,042$  ergab sich, dass die tatsächliche Gesamtzahl von Purkinjezellen in der linken Kleinhirnhälfte von Fall-Nr. 10/77 mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% im Bereich zwischen 12.284.258 und 14.537.266 lag ( $N_{est} \pm \{2 \times [N_{est} \times CE]\}$ ; Schmitz und Hof, 2005).
- Wurde also bei einer Kontrollanalyse eine geschätzte Gesamtzahl von z.B. 13.000.000 Purkinjezellen in der linken Kleinhirnhälfte von Fall-Nr. 10/77 gefunden, so lag das Ergebnis innerhalb der Messgenauigkeit der Originalanalyse ( $12.284.258 < 13.000.000 < 14.537.266$ ).

Auf die Ergebnisse der Kontrollanalysen wird im folgenden Text nicht weiter eingegangen.

### 2.2.6 Fotografie

Einzelne Gehirnschnitte wurden mit dem folgenden Mikroskop fotografiert: Mikroskop: Eclipse 50i (Nikon Corporation); Objektive: 10x (numerische Apertur = 0,25;  $\infty/-$ ) und 100x Öl (numerische Apertur = 1,25;  $\infty/0,17$ ; Nikon; das Symbol " $\infty$ " besagt, dass das entsprechende Objektiv auf unendlich korrigiert war, und die Zahl 0,17, dass das entsprechende Objektiv für Deckglasdicken von 0,17 mm korrigiert war); Kamera: AxioCam HRc (4164 x 3120 Bildpunkte; Zeiss); Software: AxioVision (Version 4.8.; Zeiss). Die Originalfotos wurden mit der Software Corel Photo-Paint X5 (Version 15; Corel Corporation) in 8 Bit Graustufenbilder umgewandelt und in Bezug auf Helligkeit und Kontrast einander angeglichen, ohne die zytoarchitektonischen Details zu verändern. Die Montage und Beschriftung der Bilder erfolgte mit Corel Draw X5 (Corel Corporation).

## 2.3 Nebenuntersuchung (immunhistochemische Analyse)

### 2.3.1 Anfertigen der Schnitte

Zur Herstellung von Paraffinschnitten für den immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* und Calbindin wurden zunächst von den Kleinhirnhälften der n=6 Kontrollen und SIDS-Fälle (siehe Tabelle 2.1) parasagittal vom lateralen Rand nach medial mit einer Klinge (Nr. 23; C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland) jeweils ein ca. 1 cm breites Gewebestück entnommen. Diese Gewebestücke wurden mit einer Pinzette in eine (in der Größe passende) Einbettkassette (Mega-Cassette; Bio Optica Milano, Mailand, Italien) eingelegt und für fünf Tage unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin (Paraplast Plus, Schmelzpunkt 56-57°C; Sigma-Aldrich Chemie) in einem Einbettautomaten (Typ ASP200S; Leica) nach dem in Tabelle 2.9 genannten Protokoll.

**Tabelle 2.9:** Protokoll zur Einbettung von Gewebeproben in Paraffin im Einbettautomaten Leica ASP200S. Alkohol: Ethanol: 99% vergällt (CLN)

Nr.	Arbeitsschritt (Schnitte jeweils einbringen in...)	Zeit
1	- Aufsteigende Alkoholreihe: 50% , 50%, 70%, 70%, 80%, 96%, 100%, 100%	Je 90 min
2	- Xylol , Xylol (Merck)	Je 90 min
3	- Paraffin, Paraffin, Paraffin	Je 90 min

Die Kleinhirnpräparate wurden nach Durchlaufen des Protokolls entnommen und an einer Gewebeausgießstation (Typ Mikrom EC350-1; ThermoScientific, Bonn, Deutschland) weiter bearbeitet. Dazu wurden die Kleinhirnpräparate mit einer Pinzette aus den Einbettkassetten entnommen und in (in der Größe passende) Metallausgießformen (Medite GmbH; Burgdorf, Deutschland) mit der Schnittseite nach unten eingelegt. Daraufhin wurden die Metallausgießformen mit bei 57°C geschmolzenem Paraffin (Sigma-Aldrich Chemie) aufgefüllt und mit einer Einbettkassette (Medite) ohne Deckel gedeckt. Diese wurden dann soweit mit Paraffin aufgefüllt, dass die auf den Metallausgießformen aufliegenden deckellosten Einbettkassetten mit Paraffin gefüllt waren. Anschließend wurden die Metallausgießformen bis zum vollständigen Erhärten bei -6° C auf eine Kühlplatte gelegt, die erhärteten Paraffinblöcke aus der Metallform entnommen, und daraufhin bis zum Schneiden bei Zimmertemperatur gelagert.

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte mittels eines Paraffin-Schlittenmikrotoms (SM2000R; Leica) unter der Verwendung von S35 Einmalklingen (Feather). Von jedem Kleinhirnpräparat wurden lückenlos 10 bis 20 4-µm dicke Schnitte vom Paraffinblock

geschnitten, direkt mit einem nassen Seiden-Papierstreifen aufgenommen, und in ein 45° C warmes Wasserbad (Aqua dest.) überführt, wodurch sich die Schnitte streckten. Dann wurden die Schnitte in der Schnittreihenfolge aus dem Wasserbad einzeln auf Superfrost Plus Objektträger (25 x 75 mm; Menzel) aufgezogen und zum Trocknen über Nacht bei 48° C im Wärmeschrank gelagert.

An den so entstandenen Schnittserien wurden nun verschiedene immunhistochemische Nachweise durchgeführt. Dazu wurden jeweils die Schnitte mit der besten Schnittqualität ausgewählt. Konkret wurde

- für den immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* jeweils der fünfte Schnitt gewählt (Ausnahme: Fall 10/96: Schnitt 67),
- für die entsprechende Negativkontrolle exemplarisch Schnitt 3 von Fall 10/96,
- für den immunhistochemischen Nachweis von Calbindin jeweils der vierte Schnitt,
- für die entsprechende Negativkontrolle exemplarisch Schnitt 6 von Fall 10/96, und
- für eine Absättigungskontrolle mit *Sonic hedgehog*-Protein die Schnitte 55 und 64 von Fall 10/96.

Die übrigen Schnitte wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verwendet.

### **2.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von *Sonic hedgehog***

Die für den immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* ausgewählten Schnitte wurden mit einem Primärantikörper gegen *Sonic hedgehog* (monoklonaler Kaninchen Anti-*Sonic hedgehog* Antikörper [EP1190Y]; Abcam Inc, Cambridge, MA, USA) unter Verwendung eines Färbe-Kits (ZytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spectrum; Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) behandelt. Die Herstellung der für den immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* benötigten Lösungen ist in Tabelle 2.10 zusammengefasst; die einzelnen Arbeitsschritte dieses immunhistochemischen Nachweises sind in Tabelle 2.11 zusammengestellt. Nach dem immunhistochemischen Nachweis wurden die Schnitte mit Deckgläsern (24 x 32 mm; Fa. Gerhard Menzel) unter Verwendung von DPX (Sigma-Aldrich Chemie) eingedeckt. Die anschließende Aushärtezeit betrug mindestens einen Tag.

Die Negativkontrolle wurde mit den gleichen Arbeitsschritten wie in Tabelle 2.11 beschrieben durchgeführt; lediglich Schritt 10 (Inkubation mit dem Primärantikörper) wurde ausgelassen. Stattdessen blieb der für die Negativkontrolle verwendete Schnitt über Nacht in PBS-Tween (PBS-Tween 0,1% / BSA 1%).

**Tabelle 2.10:** Benötigte Lösungen und Substanzen zur Herstellung dieser Lösungen für den immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog*.

<p>0,04M EDTA-Puffer</p>	<p>Pufferansatz: Stammlösung</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 24,2 g Tris (Tris-(hydroxymethyl)-methan (ApplyChem)</li> <li>- 1,86 g Titriplex III (Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat; Merck)</li> <li>- auf 100 ml Aqua bidest. (B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland)</li> </ul> <p>Gebrauchslösung:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 250 ml Aqua dest. (B. Braun Melsungen)</li> <li>- 5 ml EDTA-Stammlösung</li> <li>- 1 N HCL (Fa. Carl Roth) auf pH 9,0 einstellen</li> </ul>
<p>0,01M PBS-Puffer; pH 7,45 (0,15 M NaCl)</p>	<p>Lösung A</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 27,6 g <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}</math> (Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Merck)</li> <li>- in 1.000 ml Aqua bidest. (B. Braun Melsungen)</li> </ul> <p>Lösung B</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 35,6 g <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}</math> (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat; Merck)</li> <li>- in 1.000 ml Aqua bidest. (B. Braun Melsungen)</li> </ul> <p>PBS-Puffer; pH 7,45</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 8,77 g NaCl (Merck) in ca. 900 ml Aqua dest. lösen</li> <li>- 10 ml Lösung A und</li> <li>- 40 ml Lösung B zugeben</li> <li>- pH-Wert mit Lösung B auf pH 7,45 einstellen</li> <li>- mit Aqua dest. auf 1.000 ml auffüllen</li> </ul>
<p>3% <math>\text{H}_2\text{O}_2</math></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 180 ml PBS- Puffer</li> <li>- 20 ml <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> (Wasserstoffperoxid 30%; Merck)</li> </ul>
<p>PBS-Tween (0,1% ) / BSA 1%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1.000 ml PBS</li> <li>- 1 ml Tween (Tween 20: Polyoxyethylensorbitan Monolaurate ; Sigma-Aldrich Chemie)</li> <li>- 10 g BSA (Albumin, bovine; Sigma-Aldrich Chemie)</li> <li>- gut lösen, pH nachstellen und filtrieren</li> </ul>

(Fortsetzung von **Tabelle 2.10**)

<p><i>Anti Sonic hedgehog</i> Antikörper (1:50) in PBS-Tween ( 0,1%) / BSA 1%</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Anti Sonic hedgehog</i> Antikörper (Abcam )</li> <li>- 980 µl PBS-Tween (0,1%) / BSA 1%</li> <li>- 20 µl <i>Anti Sonic hedgehog</i> Antikörper (Abcam)</li> </ul>
<p>DAB-Standard</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 Tabletten DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride - Tablette 10 mg; Sigma-Aldrich Chemie)</li> <li>- in 30 ml PBS auflösen (30 min im Dunkeln schütteln)</li> <li>- filtrieren</li> <li>- aliquotieren: 1 ml</li> <li>- einfrieren bis zum Gebrauch</li> <li>- kurz vor Gebrauch 1 ml aufgetaute Lösung mit</li> <li>- 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid 30%; Merck) mischen</li> </ul>
<p>Hämalaun</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 g Hämatoxylin (Sigma-Aldrich Chemie)</li> <li>- in 1000 ml Aqua dest. lösen</li> <li>- 200 mg NaIO<sub>3</sub> (Natriumjodat; Merck) zusammen mit</li> <li>- 50 g Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat; Merck) in der Hämatoxylinlösung unter Schütteln lösen (bis die so erhaltene Lösung blaviolett ist)</li> <li>- 50 g Chloralhydrat (Sigma-Aldrich Chemie)</li> <li>- 1 g Zitronensäure (Citronensäure Monohydrat; Merck) zugeben (Farbumschlag auf rotviolett)</li> </ul>

**Tabelle 2.11:** Arbeitsschritte für den immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog*.

Alkohol: Ethanol: 99% vergällt (CLN)

	<b>Arbeitsschritt (Schnitte jeweils einbringen in...)</b>	<b>Zeit</b>
1	- Xylol, Xylol (Merck)	2 x 10 min
2	- Xylol (Merck) / Ethanol (1:1)	5 min
3	- Absteigende Alkoholreihe: 100%, 100%, 96%, 80%, 70%, 50%	Je 2 min
4	- Aqua dest.	2 min
5	- EDTA-Puffer	4 x 5 min bei 600W in der Mikrowelle kochen; verkochten Puffer jeweils mit Aqua bidest. nachfüllen
6	- in PBS spülen (pH 7,45)	5 min
7	- 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15 min (Reaktion im Dunkeln ablaufen lassen)
8	- in PBS spülen	5 min
9	- Lösung A (ZytoChem-Plus HRP Kit; Zytomed)	20 min
10	- Anti <i>Sonic hedgehog</i> Antikörper (1:50; Abcam) in PBS-Tween (0,1%) / BSA 1%	30 min bei 37°C; danach weitere 24 h bei 26°C im Brutschrank inkubieren
11	- in PBS spülen	3 x 5 min
12	- Lösung B (ZytoChem-Plus HRP Kit; Zytomed)	10 min
13	- in PBS spülen	3 x 5 min
14	- Lösung C (ZytoChem-Plus HRP Kit; Zytomed)	10 min
15	- in PBS spülen	3 x 5 min
16	- DAB-Standard	10 min
17	- Spülen in Aqua dest.	2 x 5 min
18	- Hämalaun	5-10 sec
19	- Leitungswasser	5 min
20	- Aqua dest.	10 sec (Leitungswasser abspülen)
21	- Aufsteigende Alkoholreihe: 50%, 70%, 80%, 96%; 100%, 100%	Je 2 min
22	- Xylol (Merck) / Ethanol (1:1)	5 min
23	- Xylol, Xylol (Merck)	Je 10 min

### **2.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin**

Die für den immunhistochemischen Nachweis von Calbindin ausgewählten Schnitte wurden mit einem Kaninchen Anti-Calbindin Primärantikörper (Rabbit-anti-Calbindin D-28K; Swant, Bellinzona, Schweiz) unter Verwendung eines Färbe-Kits (Vektor-HRP-System: Streptavidin-HRP: Vectastain-Peroxidase Standard; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) behandelt. Die Herstellung der für den immunhistochemischen Nachweis von Calbindin benötigten Lösungen ist in Tabelle 2.12 zusammengefasst; die einzelnen Arbeitsschritte dieses immunhistochemischen Nachweises sind in Tabelle 2.13 zusammengestellt. Nach dem immunhistochemischen Nachweis wurden die Schnitte mit Deckgläsern (24 x 32 mm; Fa. Gerhard Menzel) unter der Verwendung von DPX (Sigma-Aldrich Chemie) eingedeckt. Die anschließende Aushärtezeit betrug mindestens einen Tag.

Die Negativkontrolle wurde mit den gleichen Arbeitsschritten wie in Tabelle 2.13 beschrieben durchgeführt; lediglich Schritt 9 (Inkubation mit dem Primärantikörper) wurde ausgelassen. Stattdessen blieb der für die Negativkontrolle verwendete Schnitt über Nacht in PBS.

**Tabelle 2.12:** Benötigte Lösungen und Substanzen zur Herstellung dieser Lösungen für den immunhistochemischen Nachweis von Calbindin.

<p>0,01M PBS-Puffer; pH 7,45 (0,15 M NaCl)</p>	<p>Lösung A</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 27,6 g <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}</math> (Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Merck)</li> <li>- in 1.000 ml Aqua bidest. (B. Braun Melsungen)</li> </ul> <p>Lösung B</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 35,6 g <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}</math> (Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat; Merck)</li> <li>- In 1.000 ml Aqua bidest. (B. Braun Melsungen)</li> </ul> <p>PBS-Puffer; pH 7,45</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 8,77 g NaCl (Merck) in ca. 900 ml Aqua dest. lösen</li> <li>- 10 ml Lösung A und</li> <li>- 40 ml Lösung B zugeben</li> <li>- pH-Wert mit Lösung B auf pH 7,45 einstellen</li> <li>- mit Aqua dest. auf 1.000 ml auffüllen</li> </ul>
<p>3% <math>\text{H}_2\text{O}_2</math></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 180 ml PBS- Puffer</li> <li>- 20 ml <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> (Wasserstoffperoxid 30%; Merck)</li> </ul>
<p>5% GOS-PBS</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 ml PBS</li> <li>- 50 <math>\mu\text{l}</math> GOS ( Normal-goat-serum; Vector Laboratories)</li> </ul>
<p>Anti Calbindin Antikörper 1:800 in 5% GOS-PBS</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 799 <math>\mu\text{l}</math> 5% GOS-PBS</li> <li>- 1 <math>\mu\text{l}</math> Anti Calbindin Antikörper (Rabbit-anti-Calbindin D-28 K; Swant)</li> </ul>
<p>PBS-Tween (0,1%)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1.000 ml PBS</li> <li>- 1 ml Tween (Tween 20: Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate ; Sigma-Aldrich Chemie)</li> </ul>
<p>Vektor # BA1000 Goat anti rabbit (biotinyliert), 1:200 in 5% GOS-PBS-Tween (0,1%)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 ml PBS-Tween (0,1%)</li> <li>- 50 <math>\mu\text{l}</math> 5% GOS</li> <li>- 5 <math>\mu\text{l}</math> Goat anti rabbit IgG(H+L), Biotin-konjugiert (Vector Laboratories)</li> </ul>

(Fortsetzung von Tabelle 2.12)

<p>Vectastain-Peroxidase-Standard-Kit in PBS-Tween (0,1%)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 ml PBS-Tween (0,1%)</li> <li>- 10 µl Lösung A (aus dem Vectastain-Peroxidase-Standard-Kit; Vector Laboratories)</li> <li>- 10 µl Lösung B (aus dem Vectastain-Peroxidase-Standard-Kit; Vector Laboratories)</li> </ul>
<p>DAB-Standard</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 Tabletten DAB ( 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride; Tablette:10 mg; Sigma-Aldrich Chemie)</li> <li>- in 30 ml PBS auflösen (30 min im Dunklen schütteln)</li> <li>- filtrieren</li> <li>- aliquotieren: 1 ml</li> <li>- einfrieren bis zum Gebrauch</li> <li>- 1 ml aufgetaute Lsg. kurz vor Gebrauch mit</li> <li>- 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid 30%; Merck) mischen</li> </ul>
<p>Hämalaun</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 g Hämatoxylin (Sigma-Aldrich Chemie)</li> <li>- in 1.000 ml Aqua dest. lösen</li> <li>- 200 mg NaIO<sub>3</sub> (Natriumjodat; Merck) zusammen mit</li> <li>- 50 g Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat; Merck) in der Hämatoxylinlösung unter Schütteln lösen (bis die so erhaltene Lösung blauviolett ist)</li> <li>- 50 g Chloralhydrat (Merck)</li> <li>- 1 g Zitronensäure (Citronensäure Monohydrat, Sigma-Aldrich Chemie) zugeben (Farbumschlag auf rotviolett)</li> </ul>

**Tabelle 2.13:** Arbeitsschritte für den immunhistochemischen Nachweis von Calbindin. Alkohol:  
Ethanol: 99% vergällt (CLN)

Nr.	Arbeitsschritt (Schnitte jeweils einbringen in...)	Zeit
1	- Xylol, Xylol (Merck)	2 x 10 min
2	- Xylol (Merck) / Ethanol (1:1)	5 min
3	- Absteigende Alkoholreihe: 100%, 100%, 96%, 80%, 70%, 50%	Je 2 min
4	- Aqua dest.	2 min
5	- in PBS spülen	5 min
6	- 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15 min
7	- in PBS spülen	5 min
8	- 5% GOS (Ziegen-0-Serum)	30 min
9	- Anti Calbindin Antikörper in der Verdünnung 1:800 in 5% GOS-PBS	3 h bei Raumtemperatur; Über Nacht bei 4 °C
10	- in PBS spülen	3 x 5 min
11	- Vektor # BA1000 Goat anti rabbit (biotinyliert), 1:200 in 5% GOS-PBS-Tween (0,1%)	45 min
12	- in PBS spülen	3 x 5 min
13	- Vectastain-Peroxidase-Standard-Kit in PBS-Tween (0,1%; 30 min vor Gebrauch ansetzen)	45 min
14	- in PBS spülen	3 x 5 min
15	- DAB-Standard	10 min
16	- Spülen in Aqua dest.	2 x 5 min
17	- Hämalau	5-10 sec
18	- Leitungswasser	5 min
19	- Aqua dest.	10 sec
20	- Aufsteigende Alkoholreihe: 50%, 70%, 80%, 96%; 100%, 100%	Je 2 min
21	- Xylol (Merck) / Ethanol (1:1)	5 min
22	- Xylol, Xylol (Merck)	Je 10 min

### 2.3.4 Kontrollversuch zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog*

Der Kontrollversuch zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* wurde bis auf die zusätzliche Verwendung des rekombinanten Proteins Human *Sonic hedgehog* (H-SHH; BioVision Inc., Milpitas, CA, USA) als Antigen und die damit verbundene Verdünnungsreihe gegenüber dem in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* bewußt gleich gehalten.

Die in Tabelle 2.10 verwendeten Lösungen und Substanzen zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* wurden im hier beschriebenen Kontrollversuch lediglich um das in Tabelle 2.14 dargestellte Antigen ergänzt; entsprechend sind die ausschließlich in Schritt 10 der Tabelle 2.11 abweichenden Arbeitsschritte zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* in Tabelle 2.15 aufgeführt. Die Angaben zur Verdünnungsreihe finden sich in Tabelle 2.16..

**Tabelle 2.14:** Zusätzliche zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* (Tabelle 2.10) benötigte Lösungen und Substanzen zur Herstellung der Lösungen für den hier beschriebenen Kontrollversuch.

<i>Sonic hedgehog</i> Antigen- Grundansatz in PBS	- Recombinant Human <i>Sonic hedgehog</i> (BioVision) - 100 µg in 180 µl PBS - Grundansatz: 50 µl Antigenverdünnung = 27,78 µg Antigen (AG)
<i>Sonic hedgehog</i> Antigen- Verdünnung in PBS-Tween (0,1%) / BSA 1%	- <i>Sonic hedgehog</i> -Verdünnungsreihe in Tabelle 2.16 - PBS-Tween (0,1%) / BSA 1%

**Tabelle 2.15:** Zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* (Tabelle 2.11) abweichender Arbeitsschritt 10 im hier beschriebenen Kontrollversuch.

Alkohol: Ethanol: 99% vergällt (CLN)

10	- <i>Sonic hedgehog</i> Antigen-Verdünnung in PBS-Tween (0,1%) / BSA 1% aus <i>Sonic hedgehog</i> Antigen-Grundansatz in PBS (Tabelle 2.16)	30 min bei 37°C; danach weitere 24 h bei 26°C im Brutschrank inkubieren (Ansatz am Vortag: 2 h bei 37°C, danach weitere 24 h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubieren)
----	---	---

**Tabelle 2.16:** Verdünnungsreihe des Kontrollversuchs zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog*. Antigen = rekombinantes Human *Sonic hedgehog* Protein (BioVision); *Sonic hedgehog* Antigen-Grundansatz in PBS: vor Verdünnung 50 µl Antigenverdünnung = 27,78 µg Antigen. Antikörper = Anti *Sonic hedgehog* Antikörper (Abcam).

Verdünnung Stufe	Verhältnis Antigen - Antikörper	Shh-Absättigung
1	Antigen 1:3 - Antikörper 1:50	50 µl <i>Sonic hedgehog</i> Antigen-Grundansatz + 97 µl PBS-Tween (0,1%) / BSA 1% + 3 µl Antikörper; 27,78 µg Antigen : 0,3 µg Antikörper = Faktor 92,6
2	Antigen 1:9 - Antikörper 1:50	50 µl von Verdünnung 1 + 98 µl PBS-Tween (0,1%) / BSA 1% + 2 µl Antikörper; Faktor 30,87
3	Antigen 1:27 - Antikörper 1:50	50 µl von Verdünnung 2 + 98 µl PBS-Tween (0,1%) / BSA 1% + 2 µl Antikörper; Faktor 10,29
4	Antigen 1:81 - Antikörper 1:50	50 µl von Verdünnung 3 + 98 µl PBS-Tween (0,1%) / BSA 1% + 2 µl Antikörper; Faktor 3,43
5	Antigen 1:243 - Antikörper 1:50	50 µl von Verdünnung 4 + 98 µl PBS-Tween (0,1%) / BSA 1% + 2 µl Antikörper; Faktor 1,14
6	Antigen 1:729 - Antikörper 1:50	50 µl von Verdünnung 5 + 98 µl PBS-Tween (0,1%) / BSA 1% + 2 µl Antikörper; Faktor 0,38
7	Antigen 1:2187 - Antikörper 1:50	50 µl von Verdünnung 6 + 98 µl PBS-Tween (0,1%) / BSA 1% + 2 µl Antikörper; Faktor 0,13
8	Antigen 1:6561 - Antikörper 1:50	50 µl von Verdünnung 7 + 98 µl PBS-Tween (0,1%) / BSA 1% + 2 µl Antikörper; Faktor 0,04

### **2.3.5 Fotografie**

Die Präparate wurden mit dem in Abschnitt 2.2.6 oben im Text beschriebenen Mikroskop fotografiert (Objektiv: 100x Öl / numerische Apertur = 1,25) und in Bezug auf Helligkeit, Kontrast und Farbe einander angeglichen, ohne die zytoarchitektonischen Details zu verändern. Die Montage und Beschriftung der Bilder erfolgte mit Corel Draw X5 (Corel Corporation).

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Ergebnisse der Hauptuntersuchung**

#### **3.1.1 Ergebnisse der n=14 Kontrollen**

##### **3.1.1.1 Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht**

Tabelle 3.1 zeigt die individuellen Werte für Alter, Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und das Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=14 Kontrollen, sowie die entsprechenden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM). In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse dieser Variablen zusammengefasst.

Die Abbildungen 3.1 und 3.2 zeigen die individuellen Werte von Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und des Verhältnisses von Gehirngewicht zu Körpergewicht als Funktion des Alters der Kinder, sowie diejenigen Regressionsgeraden, deren Steigung statistisch signifikant (d.h.  $p < 0,05$ ) von Null verschieden war.

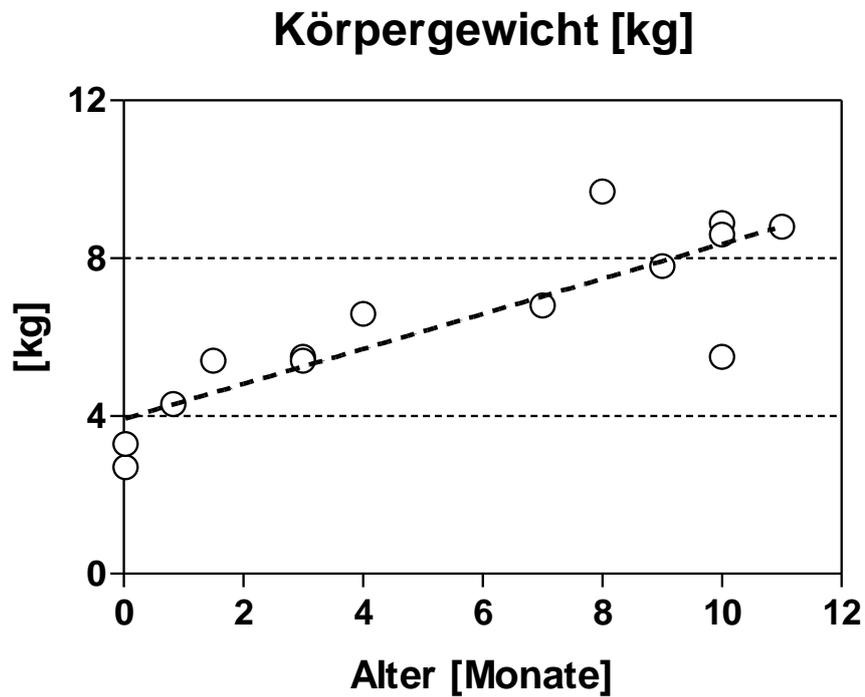
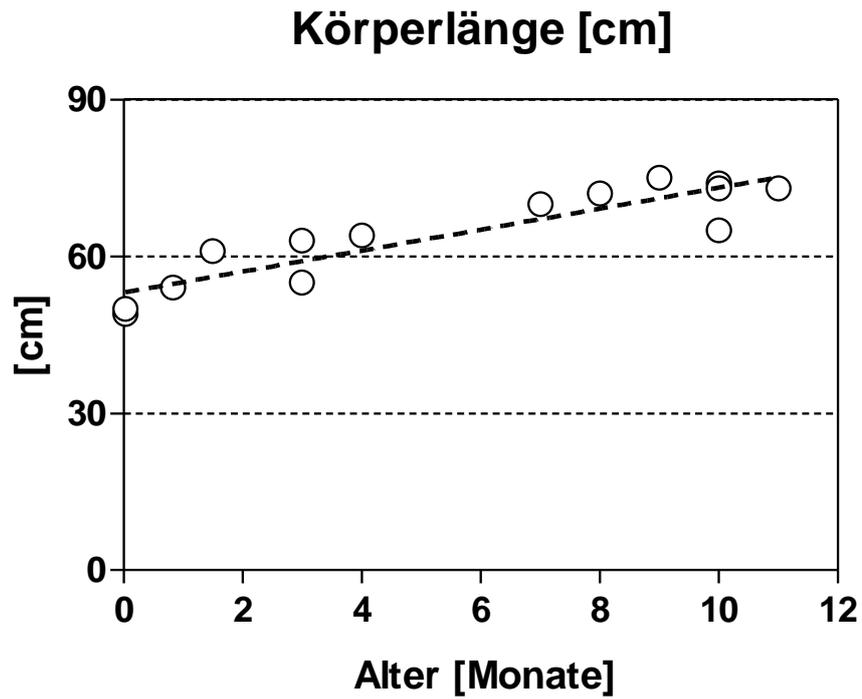
Die n=14 Kontrollen zeigten eine statistisch signifikante Zunahme der Körperlänge, des Körpergewichts und des Gehirngewichts als Funktion des Alters. Dagegen war das Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht unabhängig vom Alter der Kinder.

**Tabelle 3.1:** Individuelle Werte, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) von Alter, Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und des Verhältnisses von Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=14 Kontrollen (für die Fallnummer 10/76 lag kein Gehirngewicht vor).

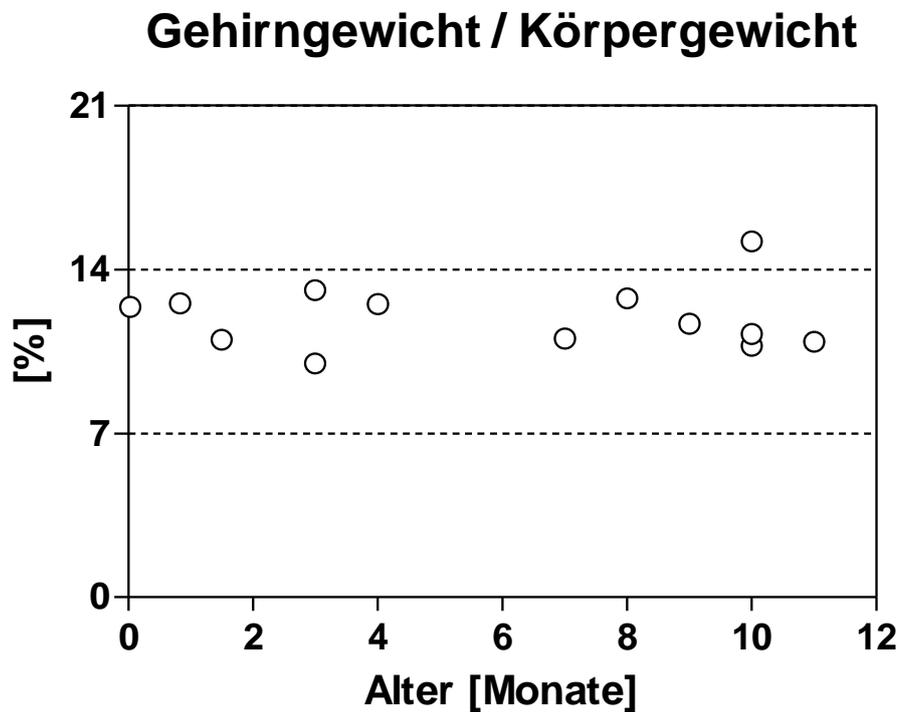
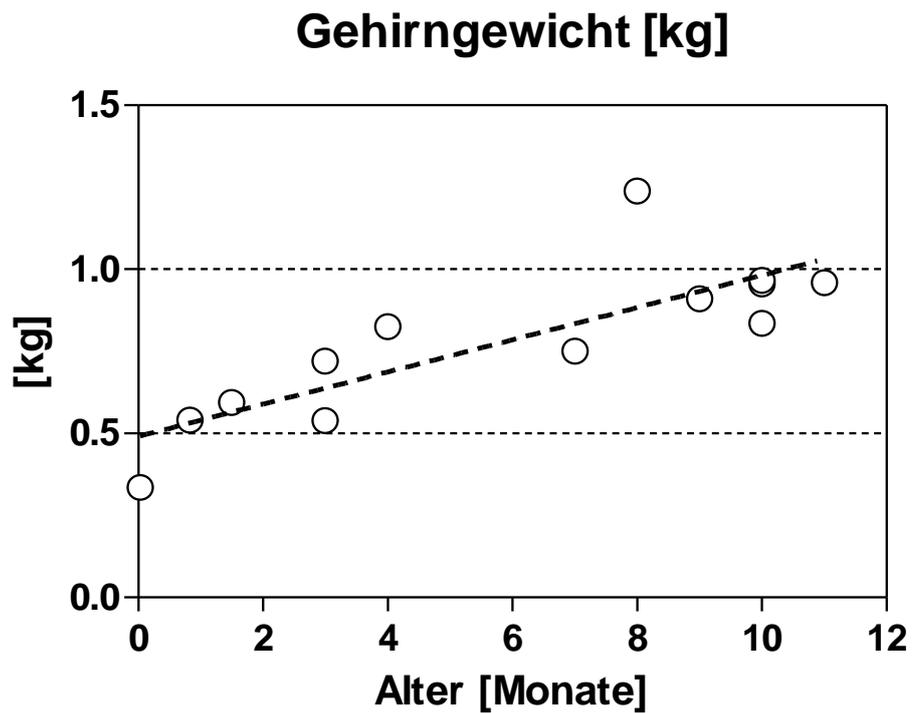
Fallnummer	Alter [Monate]	Körperlänge [cm]	Körpergewicht [kg]	Gehirngewicht [kg]	Gehirngewicht / Körpergewicht [%]
10/46	0,03	49	2,70	0,335	12,41
10/76	0,03	50	3,30		
10/70	0,83	54	4,30	0,540	12,56
10/79	1,5	61	5,40	0,594	11,00
10/71	3	63	5,50	0,721	13,11
10/80	3	55	5,40	0,539	9,98
10/99	4	64	6,60	0,826	12,52
10/92	7	70	6,80	0,751	11,04
10/64	8	72	9,70	1,239	12,77
10/84	9	75	7,80	0,911	11,68
10/45	10	74	8,90	0,956	10,74
10/58	10	65	5,50	0,836	15,20
10/65	10	73	8,60	0,967	11,24
10/77	11	73	8,80	0,960	10,91
<b>Mittelwert</b>	<b>5,53</b>	<b>64,1</b>	<b>6,38</b>	<b>0,783</b>	<b>11,94</b>
<b>SEM</b>	<b>1,11</b>	<b>2,45</b>	<b>0,58</b>	<b>0,064</b>	<b>0,36</b>

**Tabelle 3.2:** Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Variablen Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und des Verhältnisses von Gehirngewicht zu Körpergewicht als Funktion des Alters der n=14 Kontrollen.  $r^2$ : quadrierter Regressionskoeffizient (*goodness of fit*). F: F-Wert. p: p-Wert (p-Werte <0.05 sind fett markiert).

Variable	$r^2$	F	p
Körperlänge	0,822	55,4	< <b>0,001</b>
Körpergewicht	0,722	31,1	< <b>0,001</b>
Gehirngewicht	0,675	22,8	< <b>0,001</b>
Gehirngewicht / Körpergewicht	< 0,001	< 0,001	0,991



**Abbildung 3.1:** Körperlänge (oben) und Körpergewicht (unten) der n=14 Kontrollen als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die gestrichelte Linie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung der Regressionsgeraden).



**Abbildung 3.2:** Gehirn-gewicht (oben) und Verhältnis von Gehirn-gewicht zu Körper-gewicht (unten) der  $n=14$  Kontrollen als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die gestrichelte Linie im oberen Graphen die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung der Regressionsgeraden).

### **3.1.1.2 Gesamtzahl von Granularzellen und Gesamtzahl von Purkinjellen, sowie Anzahl von Granularzellen pro Purkinjelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte**

Tabelle 3.3 enthält neben den individuellen Werten für das Alter, die Gesamtzahl von Granularzellen und Gesamtzahl von Purkinjellen, sowie die Anzahl von Granularzellen pro Purkinjelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=14 Kontrollen auch die zugehörigen Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM). In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse dieser Variablen gelistet.

Die Abbildungen 3.3 und 3.4 stellen die individuellen Werte für die Gesamtzahl von Granularzellen und Gesamtzahl von Purkinjellen, sowie der Anzahl von Granularzellen pro Purkinjelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte dar. Außerdem sind darin diejenigen Regressionsgeraden dargestellt, deren Steigung (als Funktion des Alters der Kinder) statistisch signifikant (d.h.  $p < 0,05$ ) von Null verschieden waren.

Es fand sich eine statistisch signifikante Zunahme für die Gesamtzahl von Granularzellen und die Anzahl von Granularzellen pro Purkinjelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters für die n=14 Kontrollen. Im Gegensatz dazu zeigte sich für die Gesamtzahl von Purkinjellen in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte keine Altersabhängigkeit.

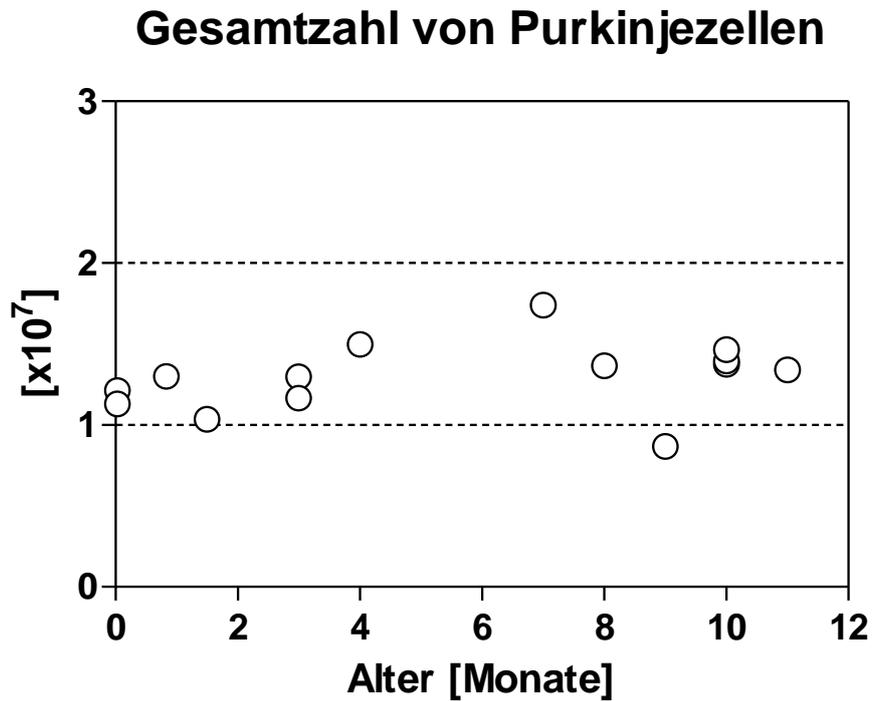
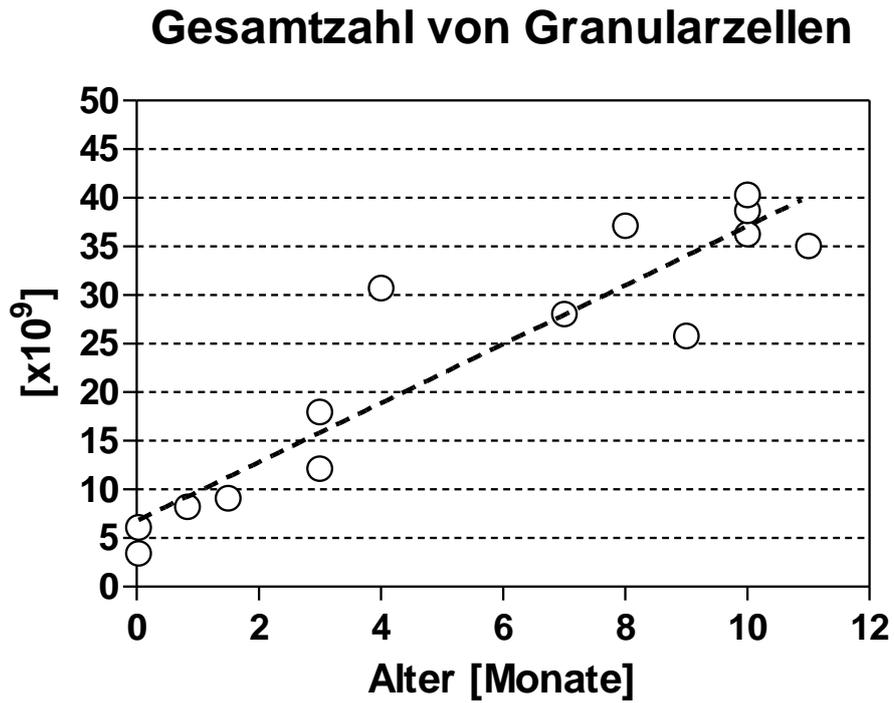
**Besonders hingewiesen sei auf den Befund, dass sich in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der jüngsten untersuchten Kinder (gestorben am Tag nach der Geburt) nur etwa 10% der Gesamtzahl von Granularzellen in der untersuchten Kleinhirnhälfte der ältesten untersuchten Kinder (gestorben im Alter von 10 bzw. 11 Monaten) fand.**

**Tabelle 3.3:** Individuelle Werte, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) der n=14 Kontrollen von Alter, Gesamtzahl von Granularzellen, Gesamtzahl von Purkinjezellen, sowie der Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte.

Fallnummer	Alter [Monate]	Gesamtzahl von Granularzellen	Gesamtzahl von Purkinjezellen	Anzahl von Granularzellen / Purkinjezelle
10/46	0,03	3.419.443.755	12.129.831	282
10/76	0,03	6.090.908.160	11.301.646	539
10/70	0,83	8.228.438.784	13.005.827	633
10/79	1,5	9.110.555.287	10.350.596	880
10/71	3	17.968.152.576	12.985.487	1.384
10/80	3	12.140.814.802	11.670.494	1.040
10/99	4	30.747.887.100	14.982.554	2.052
10/92	7	28.045.461.675	17.405.592	1.611
10/64	8	37.158.912.000	13.667.317	2.719
10/84	9	25.828.425.000	8.693.284	2.971
10/45	10	36.251.846.400	13.756.519	2.635
10/58	10	38.693.516.400	13.951.158	2.773
10/65	10	40.327.320.000	14.672.664	2.748
10/77	11	35.042.018.119	13.410.762	2.613
<b>Mittelwert</b>	<b>5,53</b>	<b>23.503.835.718</b>	<b>12.998.838</b>	<b>1.777</b>
<b>SEM</b>	<b>1,11</b>	<b>3.617.132.671</b>	<b>570.354</b>	<b>261</b>

**Tabelle 3.4:** Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Variablen Gesamtzahl von Granularzellen, Gesamtzahl von Purkinjezellen, und Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters der n=14 Kontrollen.  $r^2$ : quadrierter Regressionskoeffizient (*goodness of fit*). F: F-Wert. p: p-Wert (p-Werte <0.05 sind fett markiert).

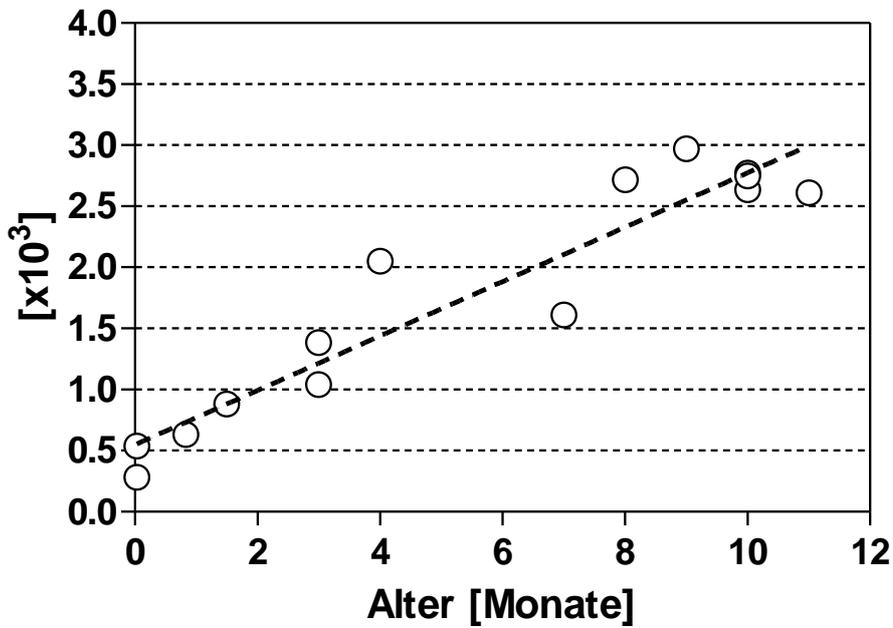
Variable	$r^2$	F	p
Gesamtzahl von Granularzellen	0,865	76,7	<b>&lt;0,001</b>
Gesamtzahl von Purkinjezellen	0,096	1,27	0,281
Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle	0,898	105,7	<b>&lt;0,001</b>



**Abbildung 3.3:** Gesamtzahl von Granularzellen (oben) und Gesamtzahl von Purkinjezellen (unten) in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der  $n=14$  Kontrollen als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die gestrichelte Linie im oberen Graphen die Ergebnisse der

linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung der Regressionsgeraden).

### Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle



**Abbildung 3.4:** Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=14 Kontrollen als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die gestrichelte Linie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung der Regressionsgeraden).

### **3.1.1.3 Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte**

Tabelle 3.5 fasst die individuellen Werte der n=14 Kontrollen für das Alter und die Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte zusammen. Außerdem zeigt die Tabelle die sich daraus ergebenden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM). Tabelle 3.6 enthält die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse dieser Variablen.

Die Abbildungen 3.5 und 3.6 zeigen neben den individuellen Werten für die Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte auch diejenigen Regressionsgeraden, deren Steigung sich altersabhängig statistisch signifikant (d.h.  $p < 0,05$ ) von Null unterscheiden.

Die n=14 Kontrollen zeigten für alle drei untersuchten Schichten in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte eine statistisch signifikante altersabhängige Volumenzunahme.

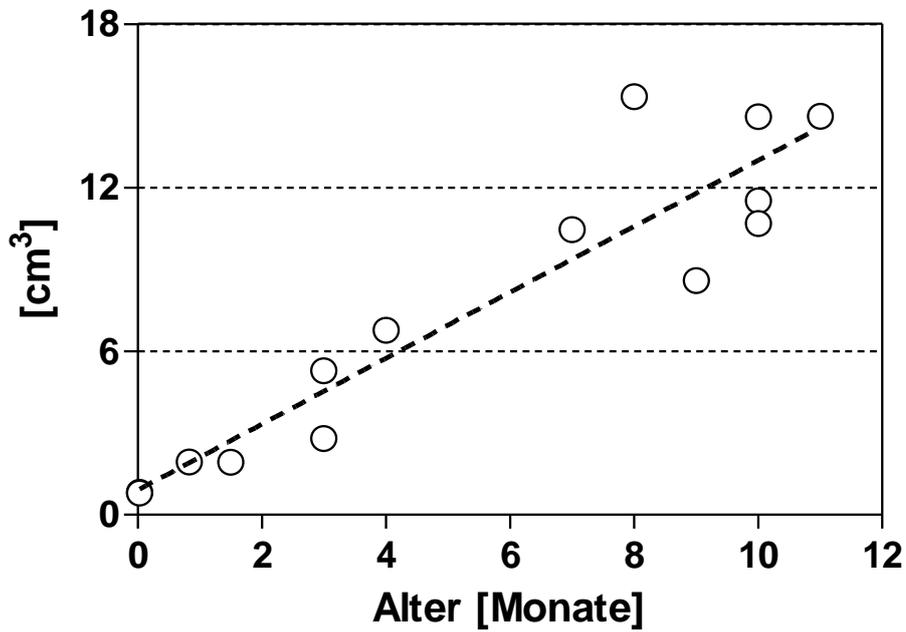
**Tabelle 3.5:** Individuelle Werte, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) der n=14 Kontrollen von Alter und Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte.

Fallnummer	Alter [Monate]	Volumen der Molekularschicht [cm <sup>3</sup> ]	Volumen der inneren Granularzellschicht [cm <sup>3</sup> ]	Volumen der weißen Substanz [cm <sup>3</sup> ]
10/46	0,03	0,83	3,77	2,44
10/76	0,03	0,81	4,16	2,64
10/70	0,83	1,94	5,32	3,30
10/79	1,5	1,93	6,37	3,76
10/71	3	5,29	9,29	5,22
10/80	3	2,79	6,55	3,61
10/99	4	6,77	10,95	6,21
10/92	7	10,46	12,80	7,71
10/64	8	15,34	15,88	9,73
10/84	9	8,58	8,30	5,41
10/45	10	11,52	16,05	7,03
10/58	10	10,69	13,32	6,89
10/65	10	14,60	14,69	7,65
10/77	11	14,62	15,36	6,78
<b>Mittelwert</b>	<b>5,5</b>	<b>7,58</b>	<b>10,20</b>	<b>5,60</b>
<b>SEM</b>	<b>1,11</b>	<b>1,44</b>	<b>1,21</b>	<b>0,59</b>

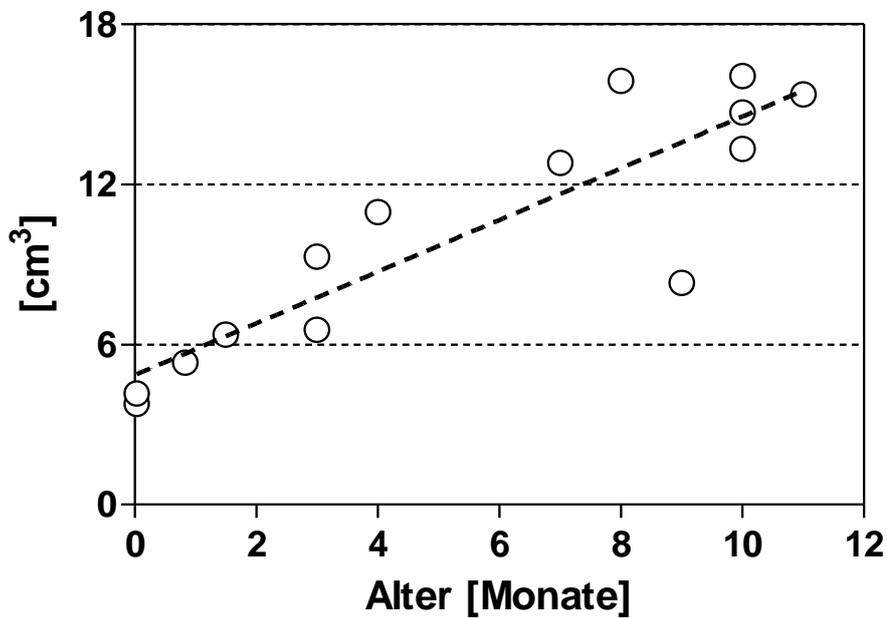
**Tabelle 3.6:** Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Variablen Volumen der Molekularschicht, Volumen der inneren Granularzellschicht und Volumen der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters der n=14 Kontrollen. r<sup>2</sup>: quadrierter Regressionskoeffizient (*goodness of fit*). F: F-Wert. p: p-Wert (p-Werte <0.05 sind fett markiert).

Variable	r <sup>2</sup>	F	p
Volumen der Molekularschicht	0,868	79,2	< <b>0,001</b>
Volumen der inneren Granularzellschicht	0,795	46,5	< <b>0,001</b>
Volumen der weißen Substanz	0,674	24,8	< <b>0,001</b>

### Volumen der Molekularschicht

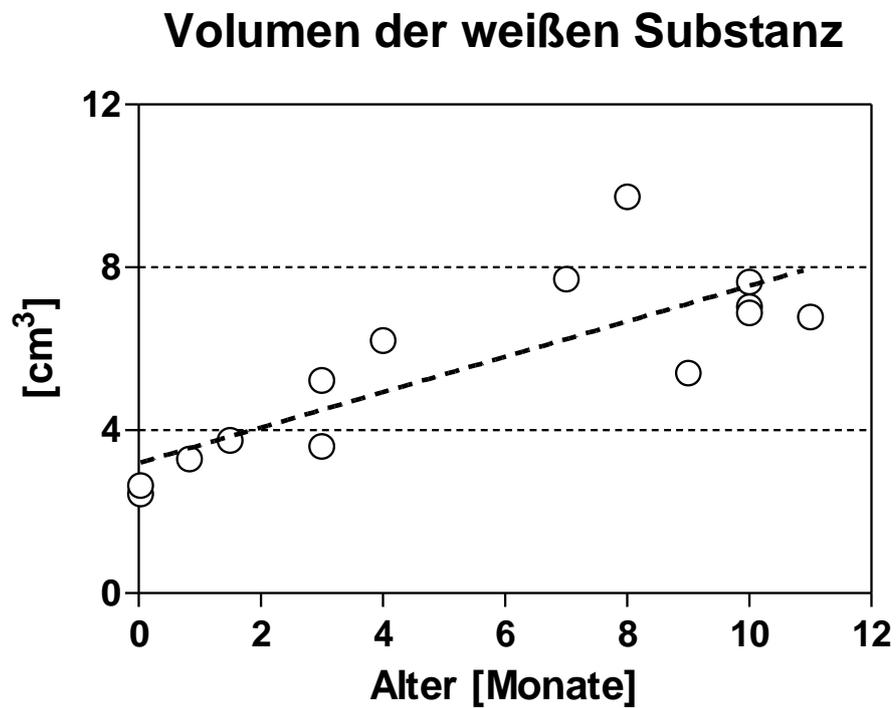


### Volumen der inneren Granularzellschicht



**Abbildung 3.5:** Volumen der Molekularschicht (oben) und Volumen der inneren Granularzellschicht (unten) in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=14 Kontrollen als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die gestrichelten Linien die Ergebnisse der linearen

Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung der Regressionsgeraden).



**Abbildung 3.6:** Volumen der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=14 Kontrollen als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die gestrichelte Linie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung der Regressionsgeraden).

### **3.1.2 Ergebnisse der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle**

#### **3.1.2.1 Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht**

Tabelle 3.7 stellt die individuellen Werte für Alter, Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und das Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle dar. Zudem berücksichtigt diese Tabelle die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean; SEM*) und die jeweilige Differenz zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen (ausgedrückt in Prozent der jeweiligen Variablen der n=9 gematchten Kontrollen). Tabelle 3.8 zeigt die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse für Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und das Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht, die in Tabelle 3.9 hinsichtlich des statistischen Vergleichs in Bezug auf die Steigungen und die Achsenabschnitte der Regressionsgeraden gegenübergestellt wurden. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels nicht-linearer Regressionsanalyse auf Grundlage einer quadratischen Regression finden sich in Tabelle 3.10. Tabelle 3.11 enthält die Ergebnisse des statistischen Vergleichs der genannten Variablen mit dem Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test.

Die Abbildungen 3.7, 3.9, 3.11 und 3.13 zeigen im oberen Teil die individuellen Werte von Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und dem Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle als Funktion des Alters der Kinder, sowie diejenigen Regressionsgeraden dieser Variablen, deren Steigung statistisch signifikant (d.h.  $p < 0,05$ ) von Null verschieden war. Der untere Teil dieser Abbildungen zeigt die entsprechenden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. Die Abbildungen 3.8, 3.10, 3.12 und 3.14 verdeutlichen die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse der jeweiligen Variablen (ebenfalls getrennt für die n=9 gematchten Kontrollen und die n=9 SIDS-Fälle).

Die Differenz zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen war für die Variablen Körperlänge (+1,6%) und Gehirngewicht (+5,7%) als auch für das Verhältnis Gehirngewicht zu Körpergewicht (+9,0%) bei den SIDS-Fällen erhöht. Beim Körpergewicht hingegen zeigte sich eine geringfügige Reduktion (-0,3%) bei den n=9 SIDS-Fällen gegenüber den n=9 gematchten Kontrollen.

Die n=9 gematchten Kontrollen und die n=9 SIDS-Fälle zeigten eine altersabhängige statistisch signifikante Zunahme von Körperlänge und Gehirngewicht. Bei den Kontrollen traf dies auch zusätzlich für das Körpergewicht zu. Für das Verhältnis Gehirngewicht zu Körpergewicht konnte keine statistisch signifikante Zunahme als Funktion des Alters gefunden werden.

Für keine der untersuchten Variablen fand sich im Vergleich der Gruppen mittels Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen. Auch der statistische Vergleich der Regressionsgeraden (in Bezug auf gleiche oder unterschiedliche Steigungen bzw. Achsenabschnitte) ergab keine Unterschiede zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen.

**Tabelle 3.7:** Individuelle Werte, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) und Differenz zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen bezüglich Alter, Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht (für die Fallnummern 10/47 und 10/50 lag kein Gehirngewicht vor).

<b>n=9 gematchte Kontrollen Fallnummer</b>	<b>Alter [Monate]</b>	<b>Körperlänge [cm]</b>	<b>Körpergewicht [kg]</b>	<b>Gehirngewicht [kg]</b>	<b>Gehirngewicht / Körpergewicht [kg]</b>
<b>10/79</b>	1,5	61	5,40	0,594	11,00
<b>10/71</b>	3	63	5,50	0,721	13,11
<b>10/80</b>	3	55	5,40	0,539	9,98
<b>10/99</b>	4	64	6,60	0,826	12,52
<b>10/92</b>	7	70	6,80	0,751	11,04
<b>10/84</b>	9	75	7,80	0,911	11,68
<b>10/45</b>	10	74	8,90	0,956	10,74
<b>10/58</b>	10	65	5,50	0,836	15,20
<b>10/65</b>	10	73	8,60	0,967	11,24
<b>Mittelwert:</b>	<b>6,4</b>	<b>66,7</b>	<b>6,72</b>	<b>0,789</b>	<b>11,84</b>
<b>SEM</b>	<b>1,17</b>	<b>2,26</b>	<b>0,47</b>	<b>0,506</b>	<b>0,52</b>

<b>n=9 SIDS- Fälle Fallnummer</b>	<b>Alter [Monate]</b>	<b>Körperlänge [cm]</b>	<b>Körpergewicht [kg]</b>	<b>Gehirngewicht [kg]</b>	<b>Gehirngewicht / Körpergewicht [kg]</b>
<b>10/67</b>	2	57	4,70	0,600	12,8
<b>10/50</b>	3	56	6,00		
<b>10/68</b>	3	63	5,70	0,702	12,3
<b>10/54</b>	6	69	7,80	0,797	10,2
<b>10/55</b>	7	69	5,90	0,919	15,6
<b>10/47</b>	9	75	8,10		
<b>10/73</b>	10	72	6,00	0,959	16,0
<b>10/78</b>	10	77	9,40	0,918	9,8
<b>10/88</b>	10	72	6,70	0,963	14,4
<b>Mittelwert:</b>	<b>6,7</b>	<b>67,8</b>	<b>6,70</b>	<b>0,837</b>	<b>13,00</b>
<b>SEM</b>	<b>1,11</b>	<b>2,51</b>	<b>0,49</b>	<b>0,535</b>	<b>0,93</b>

<b>Differenz SIDS zu Kontrollen</b>	+4,2%	+1,6%	-0,3%	+5,7%	+9,0%
---	-------	-------	-------	-------	-------

**Tabelle 3.8:** Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Variablen Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht als Funktion des Alters der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle.  $r^2$ : quadrierter Regressionskoeffizient (*goodness of fit*). F: F-Wert. p: p-Wert (p-Werte <0.05 sind fett markiert).

<b>Variable (Kontrollen)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Körperlänge	0,648	12,9	<b>0,009</b>
Körpergewicht	0,514	7,4	<b>0,030</b>
Gehirngewicht	0,731	19,0	<b>0,003</b>
Gehirngewicht / Körpergewicht	0,047	0,3	0,574

<b>Variable (SIDS)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Körperlänge	0,870	46,8	<b>&lt; 0,001</b>
Körpergewicht	0,399	4,7	0,068
Gehirngewicht	0,916	54,7	<b>&lt; 0,001</b>
Gehirngewicht / Körpergewicht	0,041	0,2	0,665

**Tabelle 3.9:** Ergebnisse des statistischen Vergleichs der linearen Regressionsanalysen der Variablen Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht als Funktion des Alters zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen. Gezeigt sind die F-Werte (F) und die p-Werte (p) der Berechnungen, ob die Regressionsgeraden der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle sich in Bezug auf die Steigung (oberer Teil der Tabelle) bzw. den Achsenabschnitt (unterer Teil der Tabelle) statistisch signifikant (d.h.  $p < 0,05$ ) voneinander unterscheiden.

<b>Variable - Steigung der Regressionsgeraden</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Körperlänge	1,122	0,307
Körpergewicht	0,003	0,955
Gehirngewicht	0,074	0,790
Gehirngewicht / Körpergewicht	0,022	0,885

<b>Variable - Achsenabschnitt der Regressionsgeraden</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Körperlänge	0,122	0,732
Körpergewicht	0,038	0,848
Gehirngewicht	0,762	0,399
Gehirngewicht / Körpergewicht	1,171	0,299

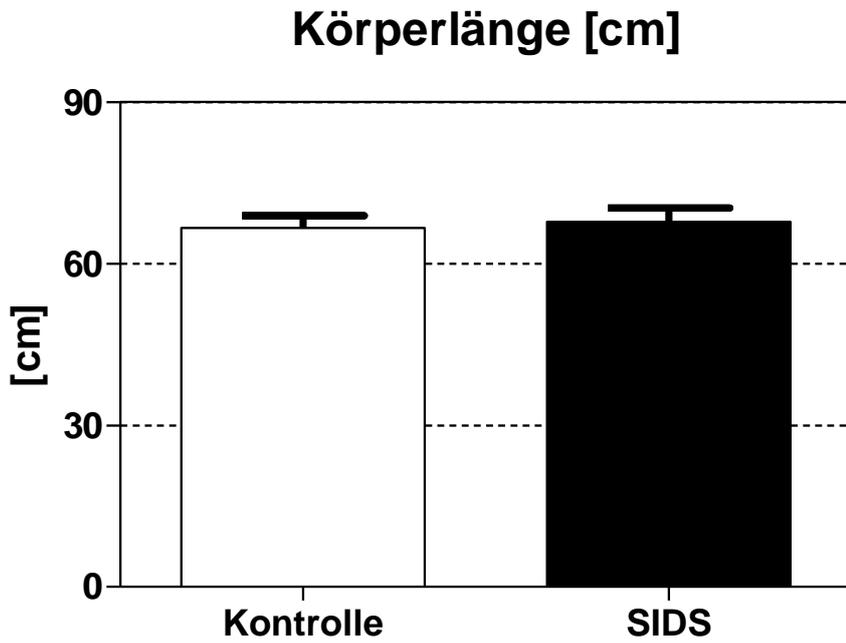
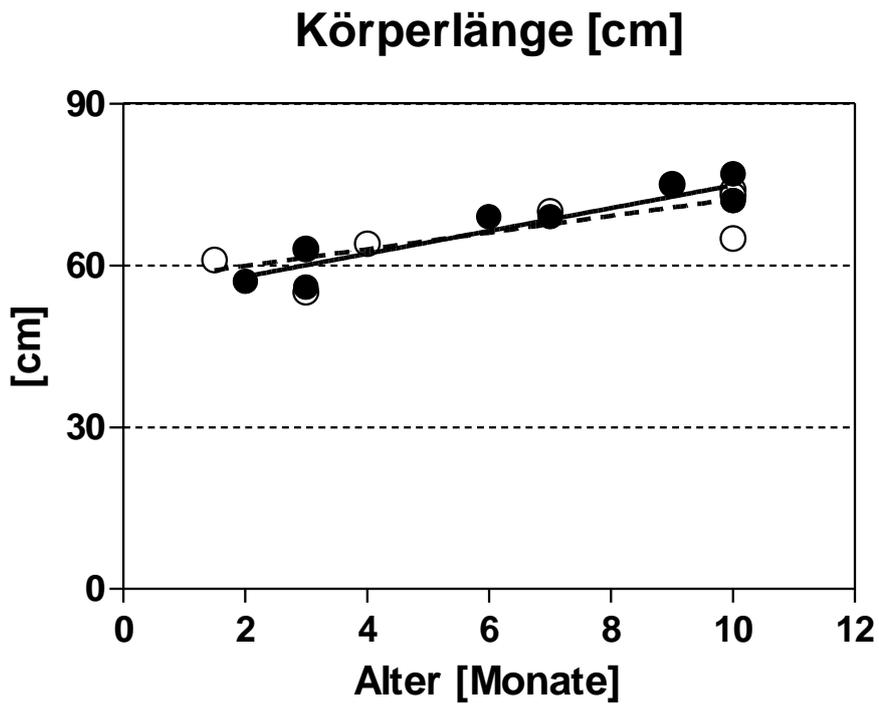
**Tabelle 3.10:** Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse der Variablen Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht als Funktion des Alters der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle. Die Analyse erfolgte mittels quadratischer Regression ( $y = B_0 + B_1 \cdot x + B_2 \cdot x^2$ ) nach der *Least-squares-(ordinary) fitting*-Methode.  $r^2$ : quadrierter Regressionskoeffizient (*goodness of fit*).

<b>Variable (Kontrollen)</b>	<b><math>r^2</math></b>
Körperlänge	0,660
Körpergewicht	0,516
Gehirngewicht	0,733
Gehirngewicht / Körpergewicht	0,048

<b>Variable (SIDS)</b>	<b><math>r^2</math></b>
Körperlänge	0,895
Körpergewicht	0,441
Gehirngewicht	0,955
Gehirngewicht / Körpergewicht	0,043

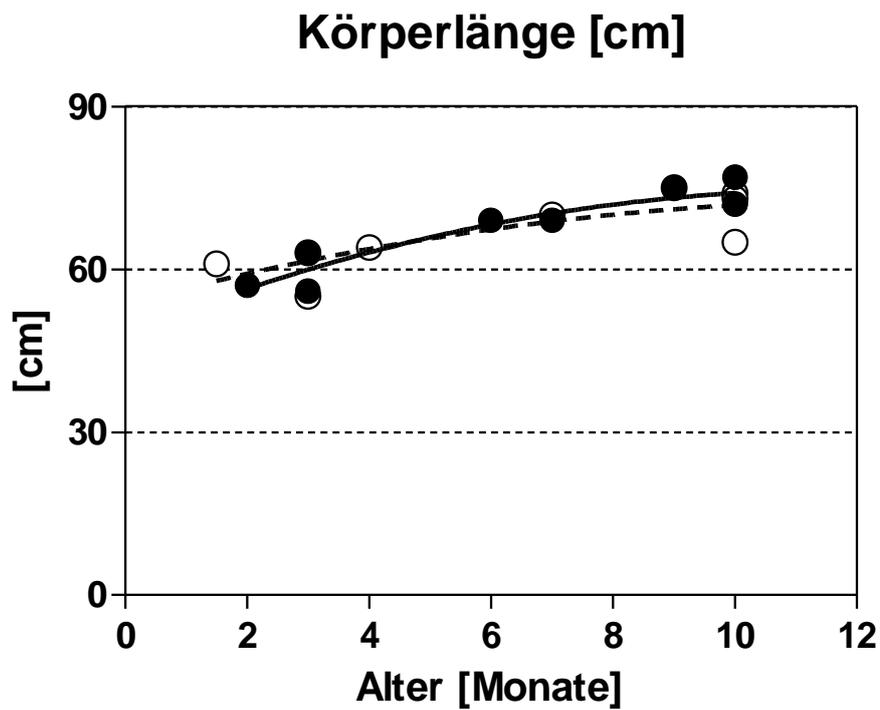
**Tabelle 3.11:** Ergebnisse des Vergleichs der Variablen Körperlänge, Körpergewicht, Gehirngewicht und Verhältnis von Gehirngewicht zu Körpergewicht zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen mittels Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test. p: p-Wert.

<b>Variable</b>	<b>p</b>
Körperlänge	0,833
Körpergewicht	0,910
Gehirngewicht	0,219
Gehirngewicht / Körpergewicht	0,469

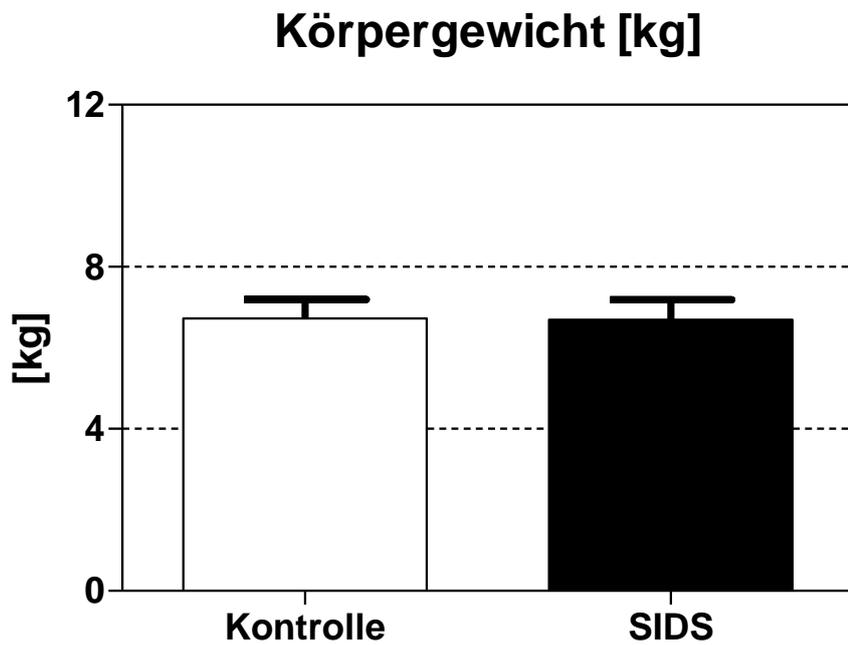
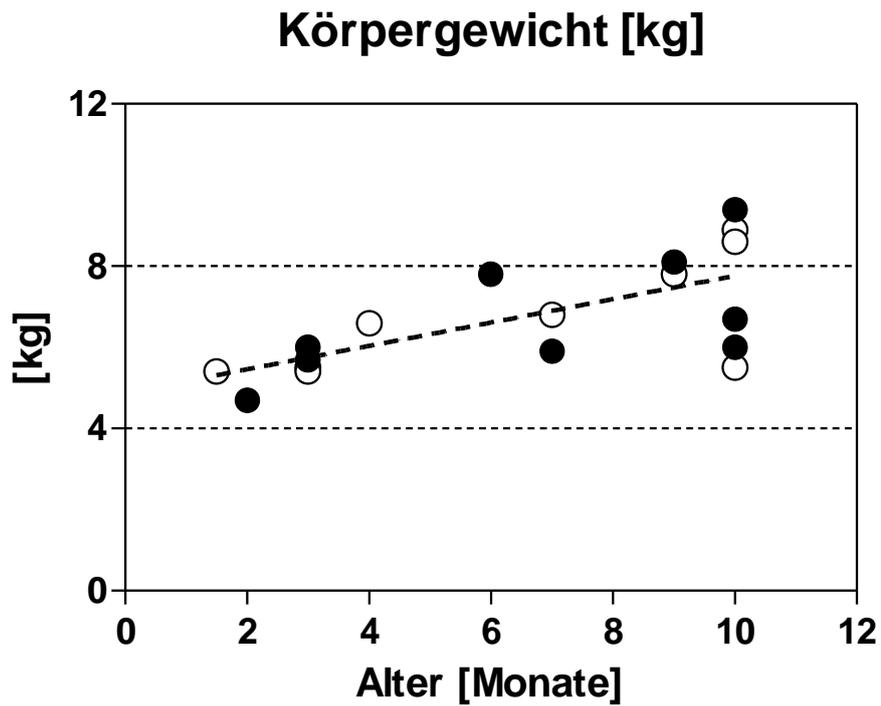


**Abbildung 3.7:** Körperlänge der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder sowie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedenen Steigungen der Regressionsgeraden). Gestrichelte Linie: Regressionsgerade der Werte

der n=9 gematchten Kontrollen. Durchgezogene Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 SIDS-Fälle. Der untere Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

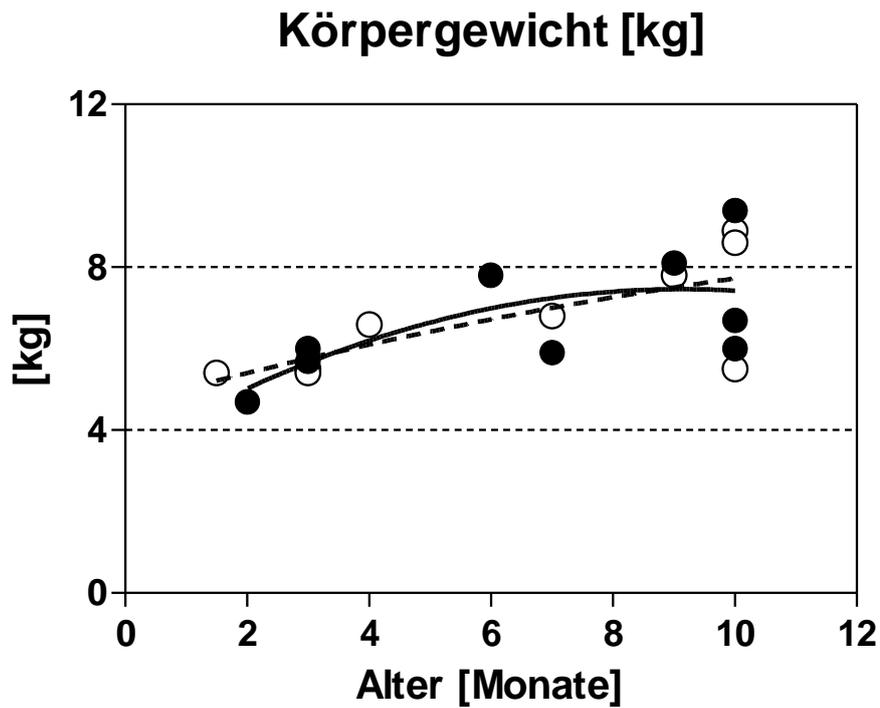


**Abbildung 3.8:** Körperlänge der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters der Kinder. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).

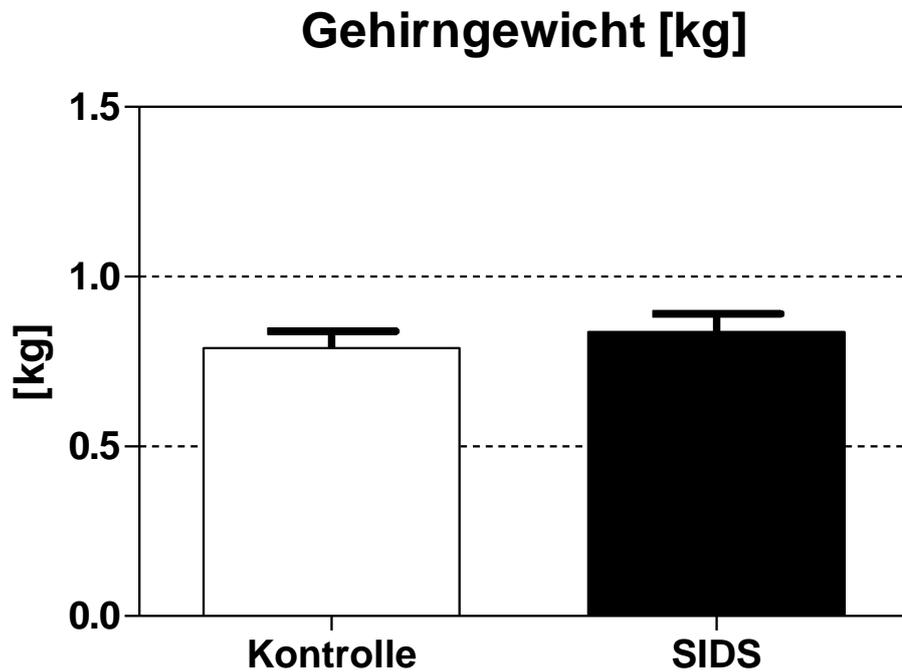
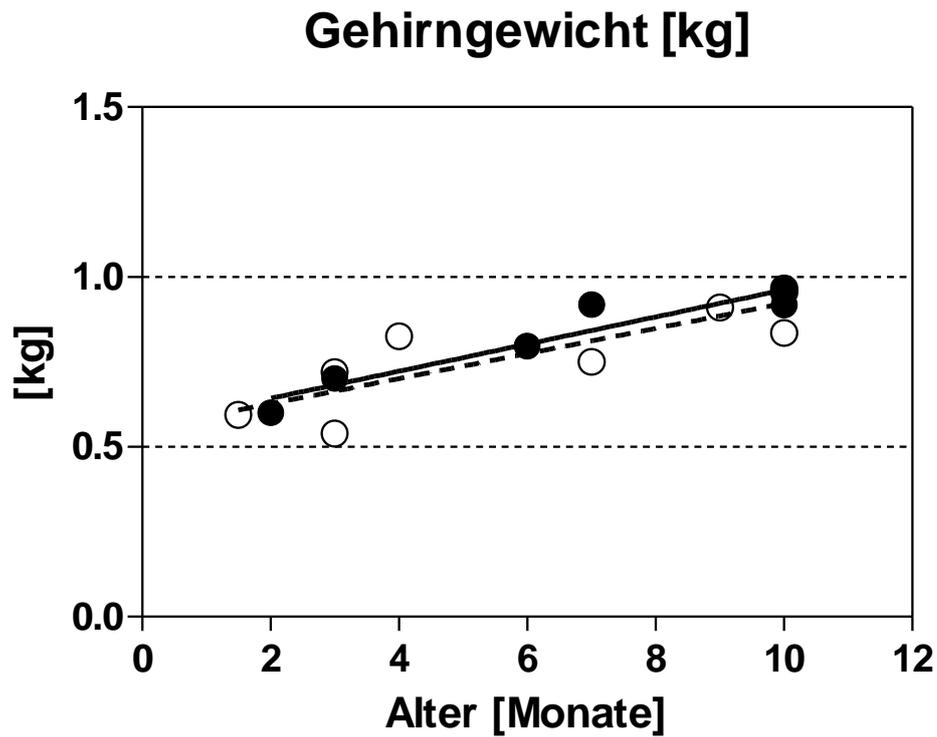


**Abbildung 3.9:** Körpergewicht der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder sowie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung der Regressionsgeraden). Gestrichelte Linie: Regressionsgerade der Werte der

n=9 gematchten Kontrollen. Der untere Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

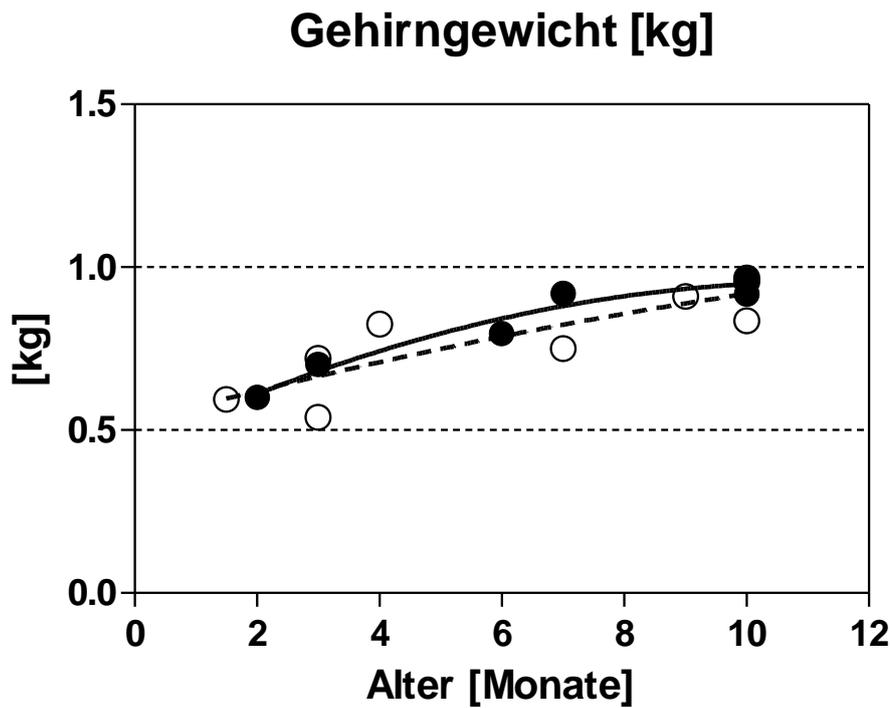


**Abbildung 3.10:** Körpergewicht der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters der Kinder. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).



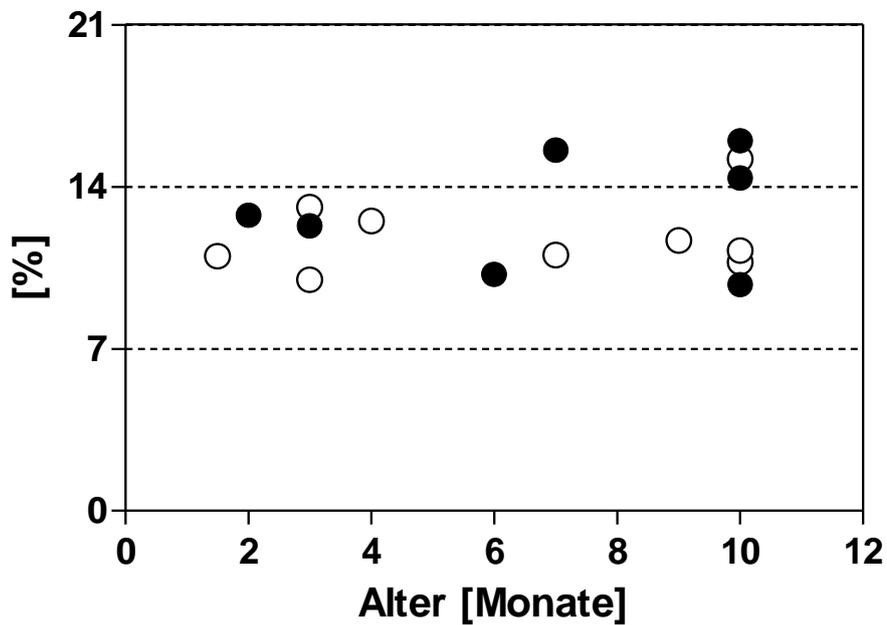
**Abbildung 3.11:** Gehirngewicht der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen), sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder sowie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedenen Steigungen der Regressionsgeraden). Gestrichelte Linie: Regressionsgerade der Werte

der n=9 gematchten Kontrollen. Durchgezogene Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 SIDS-Fälle. Der untere Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

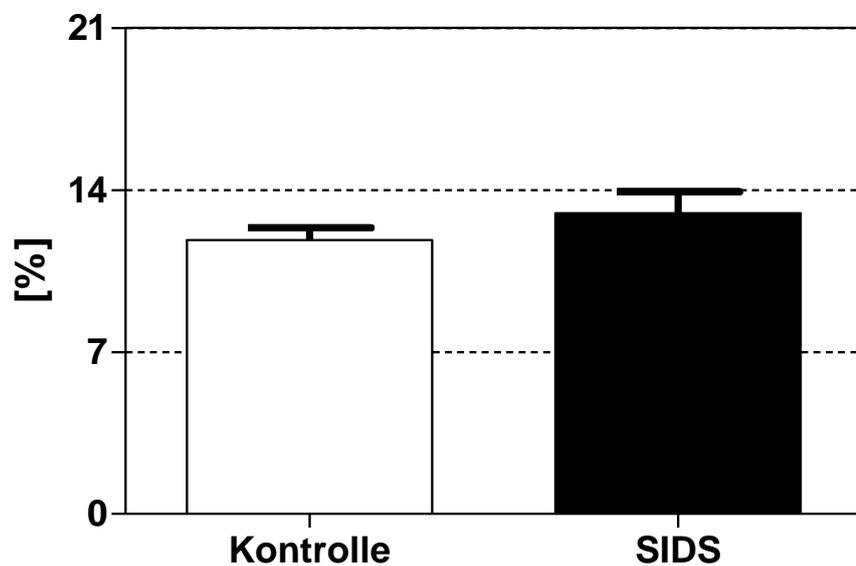


**Abbildung 3.12:** Gehirngewicht der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters der Kinder. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).

### Gehirngewicht / Körpergewicht

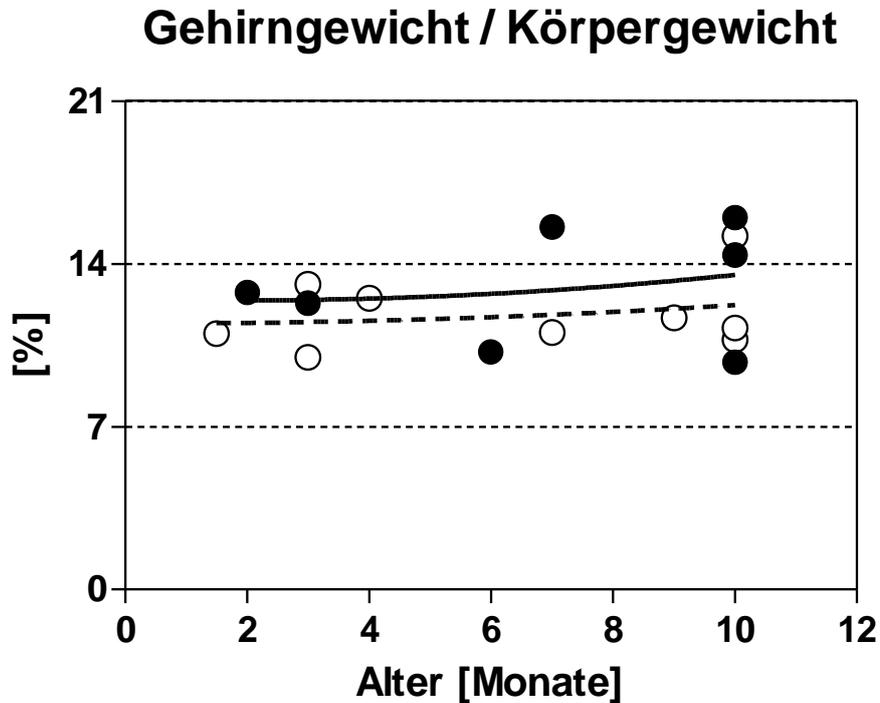


### Gehirngewicht / Körpergewicht



**Abbildung 3.13:** Verhältnis Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen), sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder (es ergaben sich keine linearen Regressionsgeraden mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung).

Der untere Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.



**Abbildung 3.14:** Verhältnis Gehirngewicht zu Körpergewicht der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters der Kinder. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).

### **3.1.2.2 Gesamtzahl von Granularzellen und Gesamtzahl von Purkinjezellen, und Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte**

Tabelle 3.12 listet die individuellen Werte für Alter, die Gesamtzahl von Granularzellen und Gesamtzahl von Purkinjezellen, sowie die Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte zusammen mit den jeweiligen Mittelwerten und Standardfehlern der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) und der jeweiligen prozentualen Differenz für die entsprechenden Variablen zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen. Tabelle 3.13 zeigt die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse dieser Variablen; der zugehörige statistische Vergleich hinsichtlich der Steigungen und der Achsenabschnitte der Regressionsgeraden findet sich in Tabelle 3.14. Tabelle 3.15 stellt die statistische Auswertung der nicht-linearen Regressionsanalyse auf Grundlage einer quadratischen Regression dar, und Tabelle 3.16 enthält die Ergebnisse des Vergleichs der genannten Variablen mit dem Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test.

Die Abbildungen 3.15, 3.17 und 3.19 veranschaulichen im oberen Teil graphisch die individuellen Werte der Gesamtzahl von Granularzellen und Gesamtzahl von Purkinjezellen, sowie der Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters, zusammen mit den jeweiligen Regressionsgeraden, deren Steigung statistisch signifikant (d.h.  $p < 0,05$ ) von Null verschieden war. Diese wurden durch den unteren Teil der jeweiligen Abbildungen ergänzt, der die jeweils zugehörigen Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte enthält. Die Abbildungen 3.16, 3.18 und 3.20 zeigen entsprechend der jeweiligen Variablen die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalysen der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle.

Die n=9 SIDS-Fälle zeigten gegenüber den n=9 gematchten Kontrollen teilweise erhebliche Differenzen. Dies betraf die mittlere Gesamtzahl von Granularzellen (+10,0%) und die mittlere Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle (+12,5%). Dagegen fiel die Differenz in der mittleren Anzahl von Purkinjezellen in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte (-1,1%) zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen nur sehr gering aus.

Sowohl für die Gesamtzahl von Granularzellen als auch für die Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte war bei beiden Gruppen eine vom Alter abhängige statistisch signifikante Zunahme gegeben. Die Gesamtzahl von Purkinjezellen war davon nicht betroffen. Der Vergleich der entsprechenden linearen Regressionsgeraden sowohl hinsichtlich der Achsenabschnitte als auch der Steigungen war nicht statistisch signifikant.

**Der Unterschied zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen in Bezug auf die mittlere Gesamtzahl von Granularzellen, die mittlere**

**Gesamtzahl von Purkinjezellen und die mittlere Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte war statistisch nicht signifikant.**

**Tabelle 3.12:** Individuelle Werte, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) und Differenz zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen bezüglich Alter, der Gesamtzahl von Granularzellen, Gesamtzahl von Purkinjezellen, sowie der Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte.

<b>n=9 gematchte Kontrollen Fallnummer</b>	<b>Alter [Monate]</b>	<b>Gesamtzahl von Granularzellen</b>	<b>Gesamtzahl von Purkinjezellen</b>	<b>Anzahl Granularzellen / Purkinjezelle</b>
<b>10/79</b>	1,5	9.110.555.287	10.350.596	880
<b>10/71</b>	3	17.968.152.576	12.985.487	1.384
<b>10/80</b>	3	12.140.814.802	11.670.494	1.040
<b>10/99</b>	4	30.747.887.100	14.982.554	2.052
<b>10/92</b>	7	28.045.461.675	17.405.592	1.611
<b>10/84</b>	9	25.828.425.000	8.693.284	2.971
<b>10/45</b>	10	36.251.846.400	13.756.519	2.635
<b>10/58</b>	10	38.693.516.400	13.951.158	2.773
<b>10/65</b>	10	40.327.320.000	14.672.664	2.748
<b>Mittelwert</b>	<b>6,4</b>	<b>26.568.219.916</b>	<b>13.163.150</b>	<b>2.011</b>
<b>SEM</b>	<b>1,17</b>	<b>3.795.444.382</b>	<b>871.700</b>	<b>269</b>

<b>n=9 SIDS-Fälle Fallnummer</b>	<b>Alter [Monate]</b>	<b>Gesamtzahl von Granularzellen</b>	<b>Gesamtzahl von Purkinjezellen</b>	<b>Anzahl Granularzellen / Purkinjezelle</b>
<b>10/67</b>	2	10.729.498.423	11.846.820	906
<b>10/50</b>	3	16.597.875.840	14.845.360	1.118
<b>10/68</b>	3	22.090.943.616	12.322.376	1.793
<b>10/54</b>	6	22.550.317.440	14.509.412	1.554
<b>10/55</b>	7	32.948.315.400	12.898.029	2.555
<b>10/47</b>	9	33.558.115.500	11.210.294	2.994
<b>10/73</b>	10	42.342.115.200	12.721.356	3.328
<b>10/78</b>	10	40.449.068.237	14.838.386	2.726
<b>10/88</b>	10	44.442.372.800	11.954.029	3.718
<b>Mittelwerte</b>	<b>6,7</b>	<b>29.523.180.273</b>	<b>13.016.229</b>	<b>2.299</b>
<b>SEM</b>	<b>1,11</b>	<b>4.011.129.671</b>	<b>459.999</b>	<b>332</b>

<b>Differenz SIDS zu Kontrollen</b>	+4,2%	+10,0%	-1,1%	+12,5%
---	-------	--------	-------	--------

**Tabelle 3.13:** Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Variablen Gesamtzahl von Granularzellen, Gesamtzahl von Purkinjezellen, sowie Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle.  $r^2$ : quadrierter Regressionskoeffizient (*goodness of fit*). F: F-Wert. p: p-Wert (p-Werte <0.05 sind fett markiert).

<b>Variable (Kontrollen)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Gesamtzahl von Granularzellen	0,769	23,3	<b>0,002</b>
Gesamtzahl von Purkinjezellen	0,050	0,37	0,564
Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle	0,838	36,1	<b>&lt; 0,001</b>

<b>Variable (SIDS)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Gesamtzahl von Granularzellen	0,921	81,8	<b>&lt; 0,001</b>
Gesamtzahl von Purkinjezellen	0,004	0,03	0,867
Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle	0,856	41,7	<b>&lt; 0,001</b>

**Tabelle 3.14:** Ergebnisse des statistischen Vergleichs der linearen Regressionsanalysen der Variablen Gesamtzahl von Granularzellen, Gesamtzahl von Purkinjezellen, sowie Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen. Gezeigt sind die F-Werte (F) und die p-Werte (p) der Berechnungen, ob die Regressionsgeraden der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle sich in Bezug auf die Steigung der Geraden (oberer Teil der Tabelle) bzw. den Achsenabschnitt (unterer Teil der Tabelle) statistisch signifikant (d.h.  $p < 0,05$ ) voneinander unterscheiden.

<b>Variable - Steigung der Regressionsgeraden</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Gesamtzahl von Granularzellen	0,813	0,383
Gesamtzahl von Purkinjezellen	0,363	0,556
Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle	1,516	0,239

<b>Variable - Achsenabschnitt der Regressionsgeraden</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Gesamtzahl von Granularzellen	0,834	0,376
Gesamtzahl von Purkinjezellen	0,028	0,871
Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle	1,495	0,240

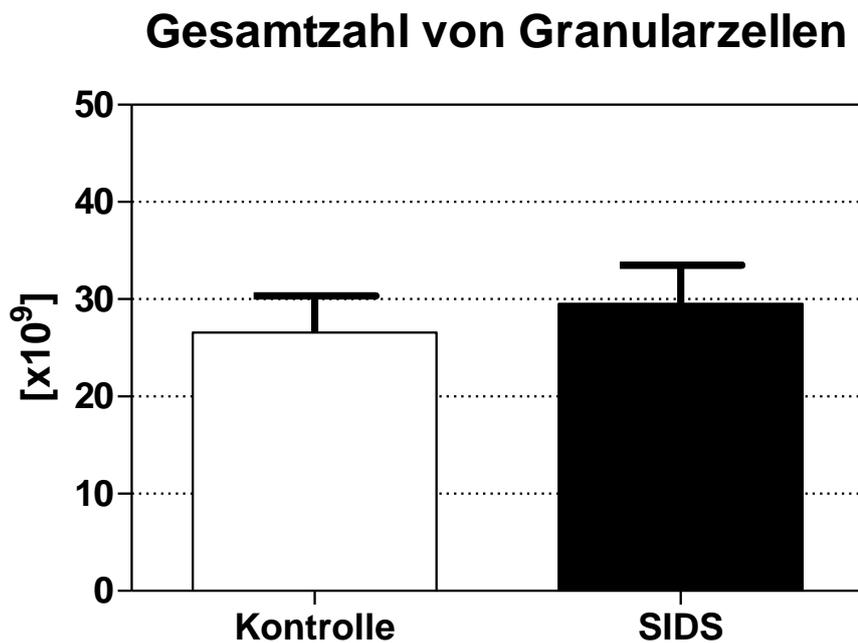
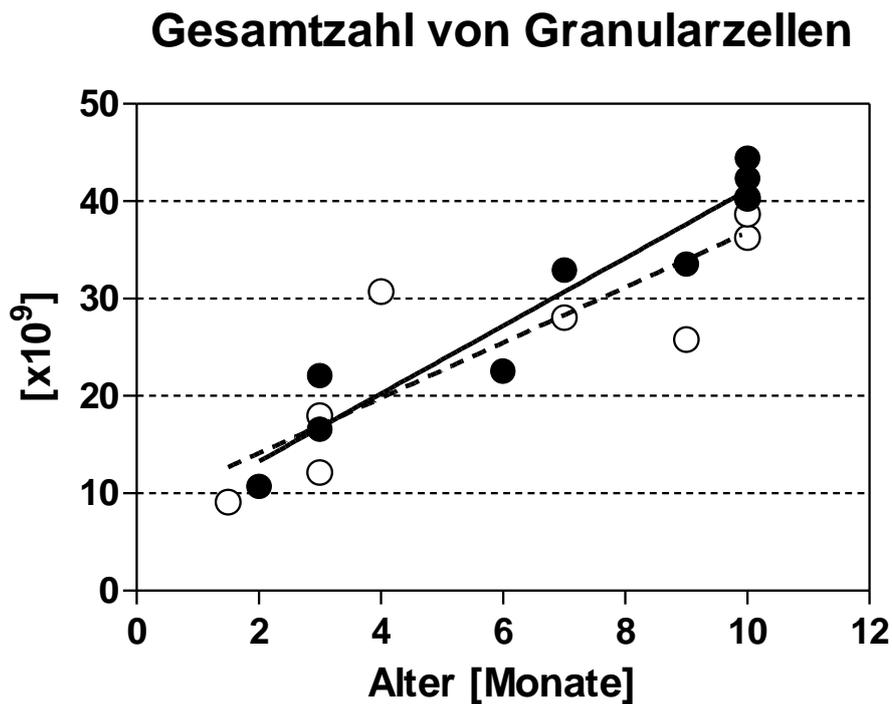
**Tabelle 3.15:** Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse der Gesamtzahl von Granularzellen, der Gesamtzahl von Purkinjezellen sowie der Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle. Die Analyse erfolgte mit quadratischer Regression ( $y = B_0 + B_1 \cdot x + B_2 \cdot x^2$ ) nach der *Least-squares-(ordinary) fitting*-Methode.  $r^2$ : quadrierter Regressionskoeffizient (*goodness of fit*).

<b>Variable (Kontrollen)</b>	<b><math>r^2</math></b>
Gesamtzahl von Granularzellen	0,780
Gesamtzahl von Purkinjezellen	0,253
Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle	0,838

<b>Variable (SIDS)</b>	<b><math>r^2</math></b>
Gesamtzahl von Granularzellen	0,924
Gesamtzahl von Purkinjezellen	0,061
Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle	0,862

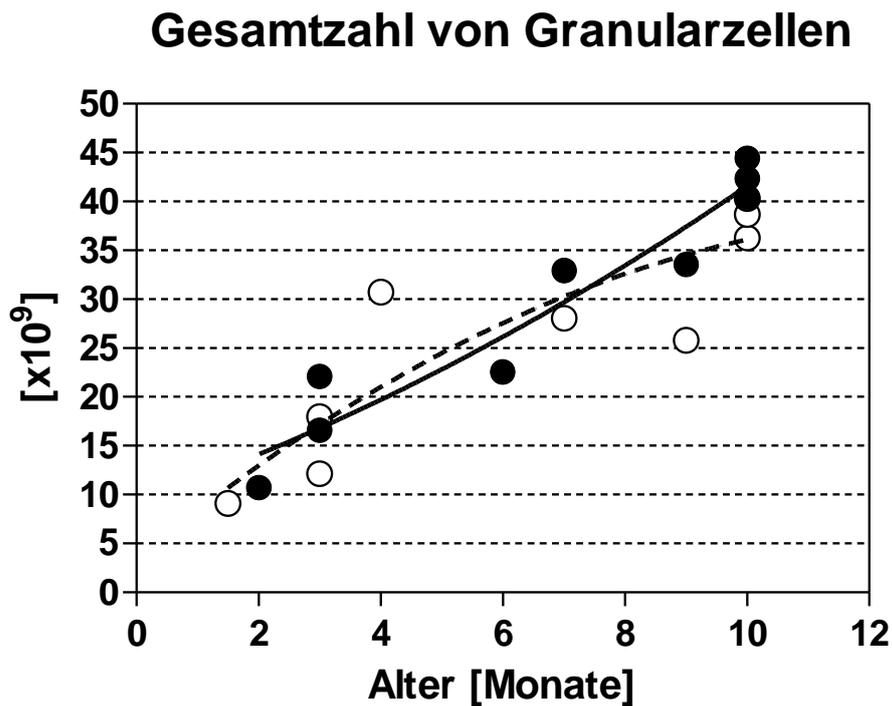
**Tabelle 3.16:** Ergebnisse des Vergleichs der Variablen Gesamtzahl von Granularzellen, Gesamtzahl von Purkinjezellen, sowie Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen mittels Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test. p: p-Wert.

<b>Variable</b>	<b>p</b>
Gesamtzahl von Granularzellen	0,129
Gesamtzahl von Purkinjezellen	1,000
Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle	0,250



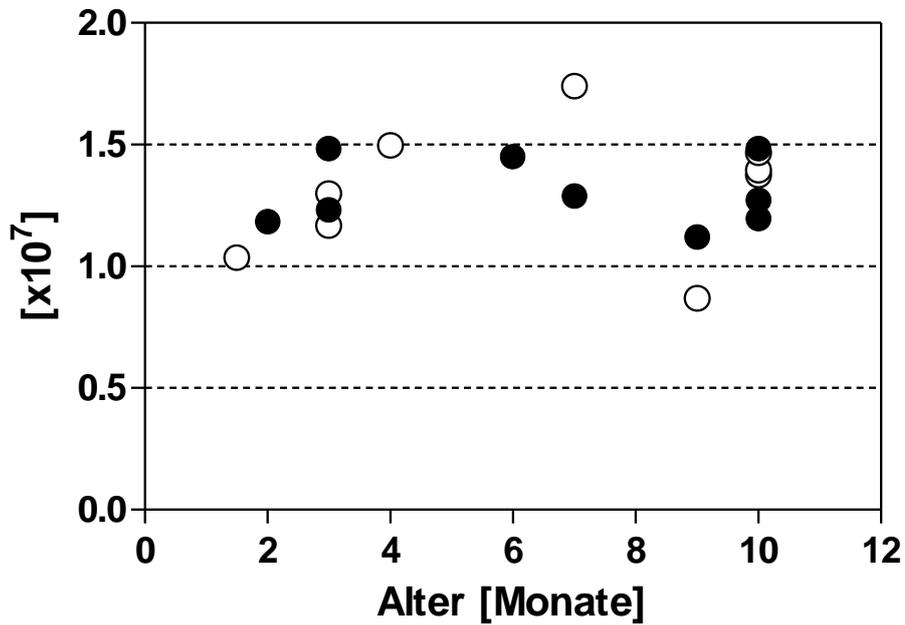
**Abbildung 3.15:** Gesamtzahl von Granularzellen in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder sowie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedenen Steigungen der

Regressionsgeraden). Gestrichelte Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 gematchten Kontrollen. Durchgezogene Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 SIDS-Fälle. Der untere Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

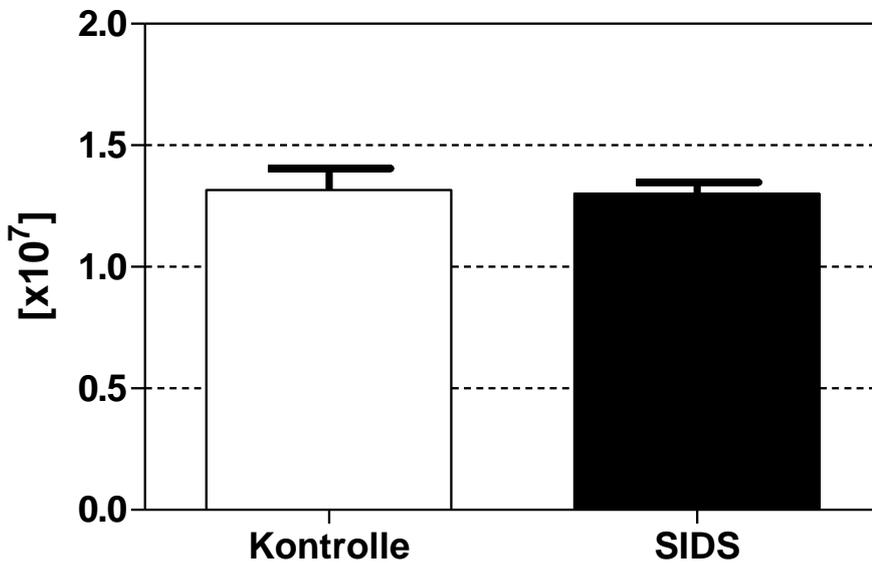


**Abbildung 3.16:** Gesamtzahl von Granularzellen in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).

### Gesamtzahl von Purkinjezellen

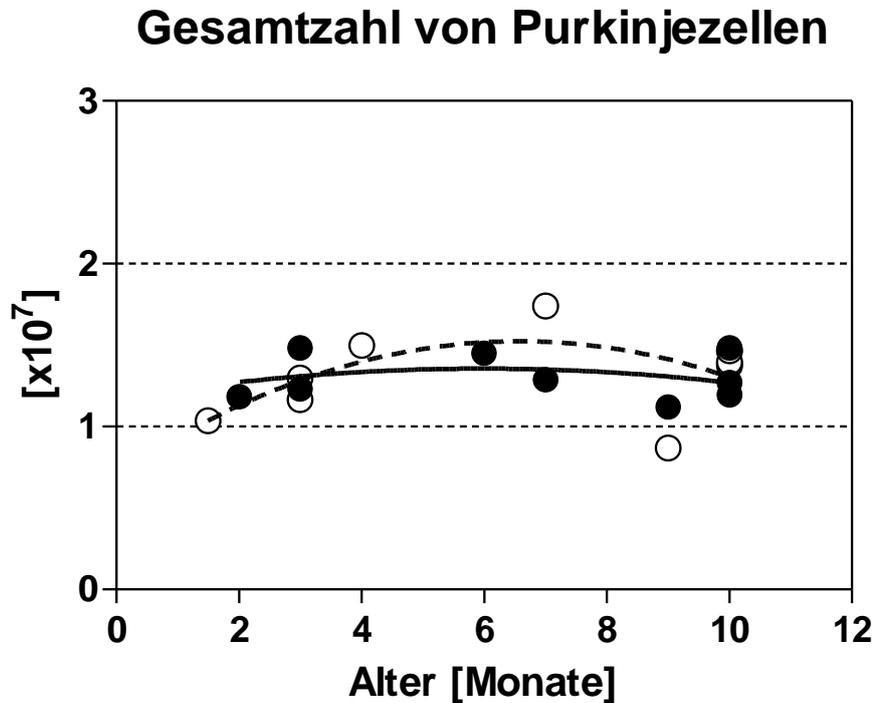


### Gesamtzahl von Purkinjezellen



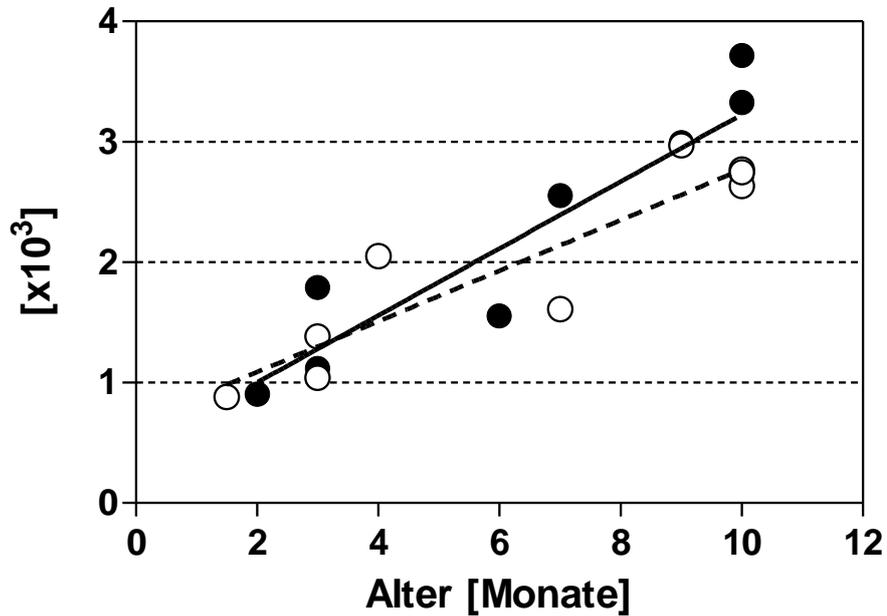
**Abbildung 3.17:** Gesamtzahl von Purkinjezellen in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen), sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder (es ergaben sich keine linearen Regressionsgeraden mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung). Der untere

Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

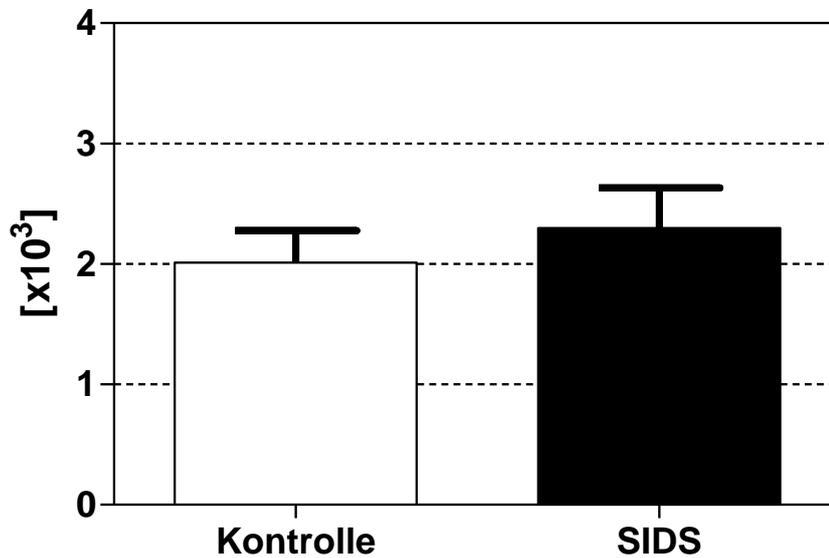


**Abbildung 3.18:** Gesamtzahl von Purkinjezellen in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).

## Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle



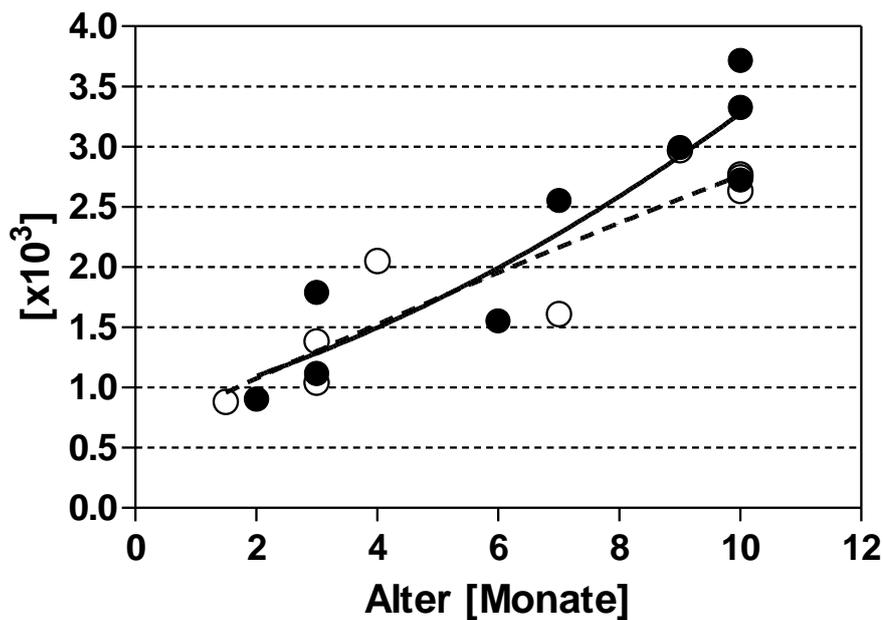
## Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle



**Abbildung 3.19:** Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der  $n=9$  gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen) sowie der  $n=9$  SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder sowie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedenen Steigungen der Regressionsgeraden). Gestrichelte Linie: Regressionsgerade der Werte der  $n=9$

gematchten Kontrollen. Durchgezogene Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 SIDS-Fälle. Der untere Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

## Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle



**Abbildung 3.20:** Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).

### 3.1.2.3 Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte

Tabelle 3.17 zeigt die individuellen Werte für Alter sowie die Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte und zusätzlich die jeweiligen Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) einschließlich der entsprechenden prozentualen Differenzen dieser Variablen zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen. Tabelle 3.18 listet die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse dieser Variablen; der statistische Vergleich der Regressionsgeraden in Bezug auf die Parameter Steigung und Achsenabschnitt ist aus Tabelle 3.19 ersichtlich. In Tabelle 3.20 ist die statistische Auswertung der nicht-linearen Regressionsanalyse auf Grundlage einer quadratischen Regression dargestellt, in Tabelle 3.21 sind die genannten Variablen nach dem Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test gegenübergestellt.

Die Abbildungen 3.21, 3.23 und 3.25 zeigen im oberen Teil die individuellen Werte der Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle und die sich daraus ergebenden Regressionsgeraden als Funktion des Alters, deren Steigung statistisch signifikant (d.h.  $p < 0,05$ ) von Null verschieden war. Im unteren Teil der Abbildungen finden sich die entsprechenden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. Die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalysen der jeweiligen Variablen der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle zeigen die Abbildungen 3.22, 3.24 und 3.26.

Die n=9 SIDS-Fälle unterschieden sich von den n=9 gematchten Kontrollen zum Teil erheblich. Dies machte sich besonders im Volumen der Molekularschicht (+19,9%) und im Volumen der inneren Granularzellschicht (+12,3%) bemerkbar, während die Differenz im mittleren Volumen der weißen Substanz (+4,4%) vergleichsweise gering ausfiel.

Alle drei genannten Schichten in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle zeigten eine altersabhängige statistisch signifikante Zunahme hinsichtlich ihres Volumens. **Der statistische Vergleich der linearen Regressionsgeraden ergab jedoch sowohl hinsichtlich der Steigung der Regressionsgeraden als auch hinsichtlich der Achsenabschnitte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Auch der Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS Fällen.**

**Tabelle 3.17:** Individuelle Werte, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) und Differenz zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen bezüglich Alter sowie der Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte.

n=9 gematchte Kontrollen Fallnummer	Alter [Monate]	Volumen der Molekularschicht [cm <sup>3</sup> ]	Volumen der inneren Granularzellschicht [cm <sup>3</sup> ]	Volumen der weißen Substanz [cm <sup>3</sup> ]
10/79	1,5	1,93	6,37	3,76
10/71	3	5,29	9,29	5,22
10/80	3	2,79	6,55	3,61
10/99	4	6,77	10,95	6,21
10/92	7	10,46	12,80	7,71
10/84	9	8,58	8,30	5,41
10/45	10	11,52	16,05	7,03
10/58	10	10,69	13,32	6,89
10/65	10	14,60	14,69	7,65
<b>Mittelwert</b>	<b>6,4</b>	<b>8,07</b>	<b>10,93</b>	<b>5,94</b>
<b>SEM</b>	<b>1,17</b>	<b>1,41</b>	<b>1,17</b>	<b>0,52</b>

n=9 SIDS-Fälle Fallnummer	Alter [Monate]	Volumen der Molekularschicht [cm <sup>3</sup> ]	Volumen der inneren Granularzellschicht [cm <sup>3</sup> ]	Volumen der weißen Substanz [cm <sup>3</sup> ]
10/67	2	2,41	7,62	4,29
10/50	3	4,74	7,90	4,40
10/68	3	7,45	11,67	6,32
10/54	6	8,32	11,18	5,38
10/55	7	9,97	13,17	5,61
10/47	9	12,76	14,75	6,89
10/73	10	14,49	15,81	6,06
10/78	10	17,45	16,76	9,14
10/88	10	13,13	13,21	7,87
<b>Mittelwert</b>	<b>6,7</b>	<b>10,08</b>	<b>12,45</b>	<b>6,22</b>
<b>SEM</b>	<b>1,11</b>	<b>1,61</b>	<b>1,07</b>	<b>0,52</b>

<b>Differenz SIDS zu Kontrollen</b>	+4,2%	+19,9%	+12,3%	+4,4%
-------------------------------------	-------	--------	--------	-------

**Tabelle 3.18:** Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Variablen Volumen der Molekularschicht, Volumen der inneren Granularzellschicht und Volumen der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle.  $r^2$ : quadrierter Regressionskoeffizient (*goodness of fit*). F: F-Wert. p: p-Wert (p-Werte <0,05 sind fett markiert).

<b>Variable (Kontrollen)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Volumen der Molekularschicht	0,840	36,6	< <b>0,001</b>
Volumen der inneren Granularzellschicht	0,615	11,2	<b>0,012</b>
Volumen der weißen Substanz	0,594	10,2	<b>0,015</b>

<b>Variable (SIDS)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Volumen der Molekularschicht	0,899	62,4	< <b>0,001</b>
Volumen der inneren Granularzellschicht	0,809	29,7	<b>0,001</b>
Volumen der weißen Substanz	0,583	9,8	<b>0,017</b>

**Tabelle 3.19:** Ergebnisse des statistischen Vergleichs der linearen Regressionsanalysen der Variablen Volumen der Molekularschicht, Volumen der inneren Granularzellschicht und Volumen der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen. Gezeigt sind die F-Werte (F) und die p-Werte (p) der Berechnungen, ob die Regressionsgeraden der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle sich in Bezug auf die Steigung der Geraden (oberer Teil der Tabelle) bzw. den Achsenabschnitt (unterer Teil der Tabelle) statistisch signifikant (d.h.  $p < 0,05$ ) voneinander unterscheiden.

<b>Variable - Steigung der Regressionsgeraden</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Volumen der Molekularschicht	1,271	0,279
Volumen der inneren Granularzellschicht	0,089	0,769
Volumen der weißen Substanz	0,021	0,887

<b>Variable – Achsenabschnitt der Regressionsgeraden</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Volumen der Molekularschicht	4,114	0,061
Volumen der inneren Granularzellschicht	2,088	0,169
Volumen der weißen Substanz	0,133	0,721

**Tabelle 3.20:** Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse der Variablen Volumen der Molekularschicht, Volumen der inneren Granularzellschicht und Volumen der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Alters der n=9 gematchten Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle. Die Analyse erfolgte mit quadratischer Regression ( $y = B_0 + B_1 \cdot x + B_2 \cdot x^2$ ) nach der *Least-squares-(ordinary) fitting*-Methode.  $r^2$ : quadrierter Regressionskoeffizient (*goodness of fit*).

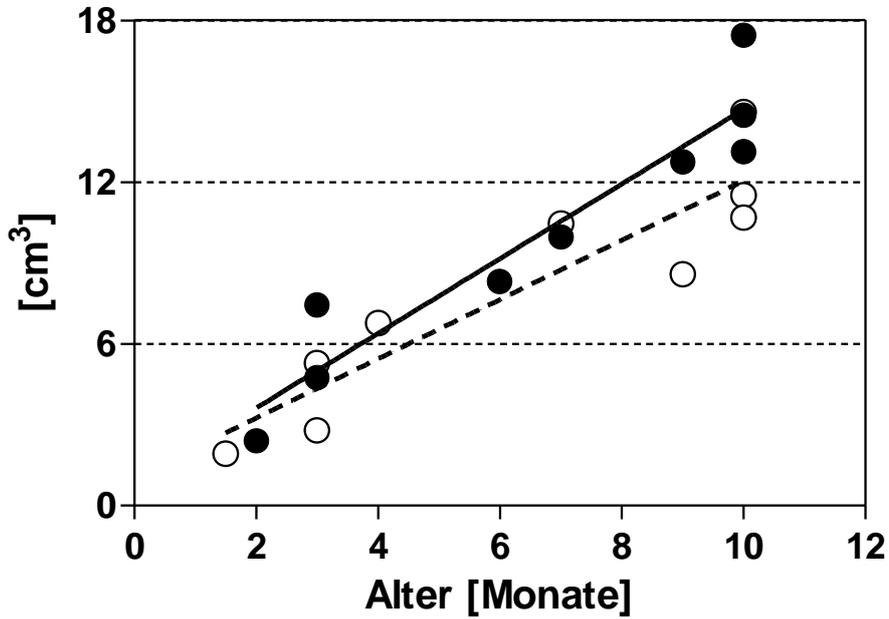
<b>Variable-Kontrollen</b>	<b><math>r^2</math></b>
Volumen der Molekularschicht	0,853
Volumen der inneren Granularzellschicht	0,618
Volumen der weißen Substanz	0,684

<b>Variable-SIDS</b>	<b><math>r^2</math></b>
Volumen der Molekularschicht	0,901
Volumen der inneren Granularzellschicht	0,810
Volumen der weißen Substanz	0,620

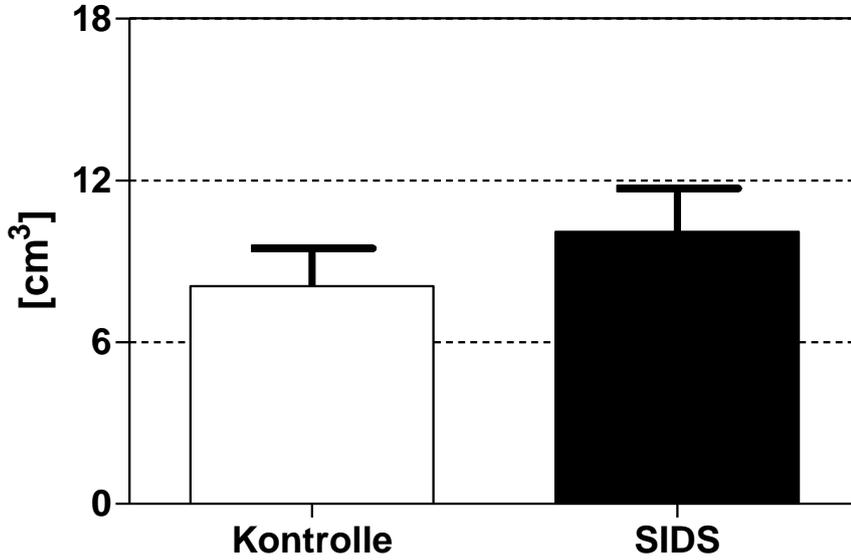
**Tabelle 3.21:** Ergebnisse des Vergleichs der Variablen Volumen der Molekularschicht, Volumen der inneren Granularzellschicht und Volumen der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen mittels Wilcoxon *matched-pairs signed rank* Test. p: p-Wert.

<b>Variable</b>	<b>p</b>
Volumen der Molekularschicht	0,129
Volumen der inneren Granularzellschicht	0,301
Volumen der weißen Substanz	0,734

### Volumen der Molekularschicht

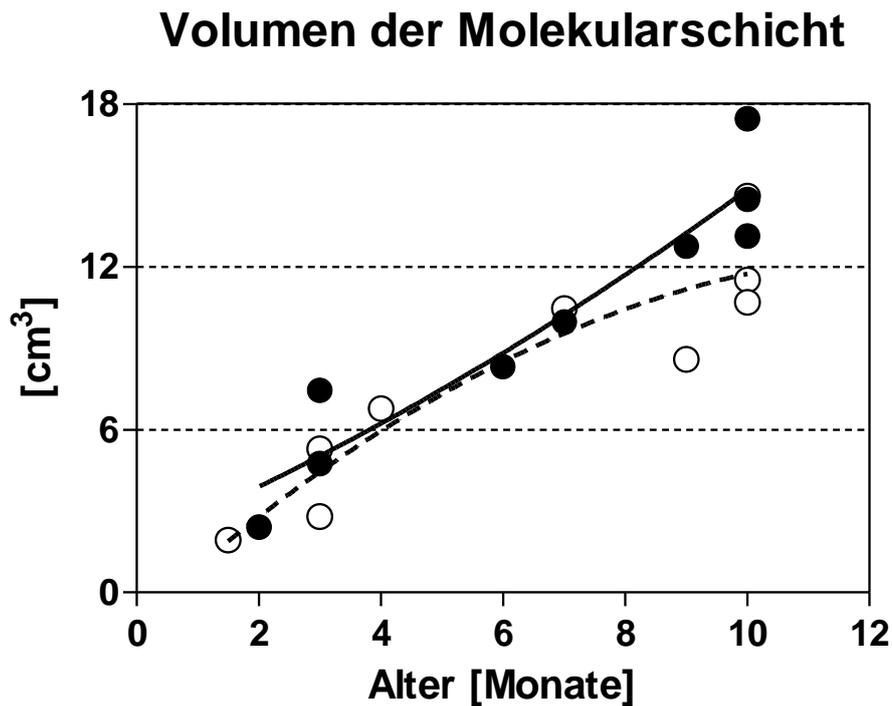


### Volumen der Molekularschicht



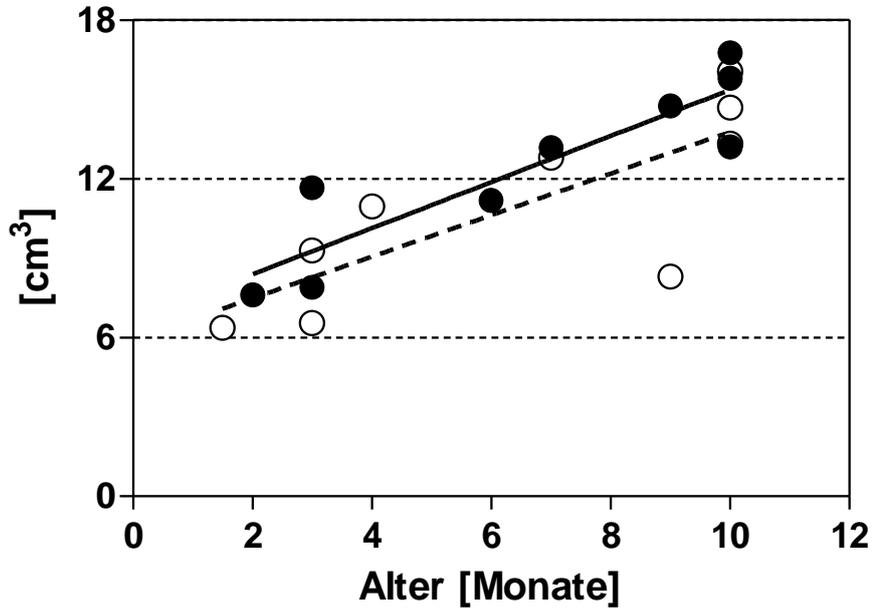
**Abbildung 3.21:** Volumen der Molekularschicht in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder sowie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedenen Steigungen der

Regressionsgeraden). Gestrichelte Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 gematchten Kontrollen. Durchgezogene Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 SIDS-Fälle. Der untere Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

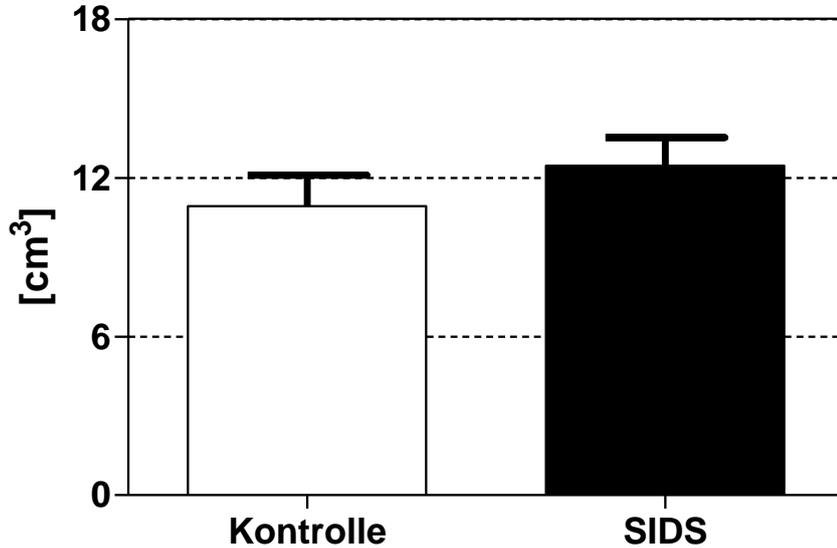


**Abbildung 3.22:** Volumen der Molekularschicht in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).

### Volumen der inneren Granularzellschicht



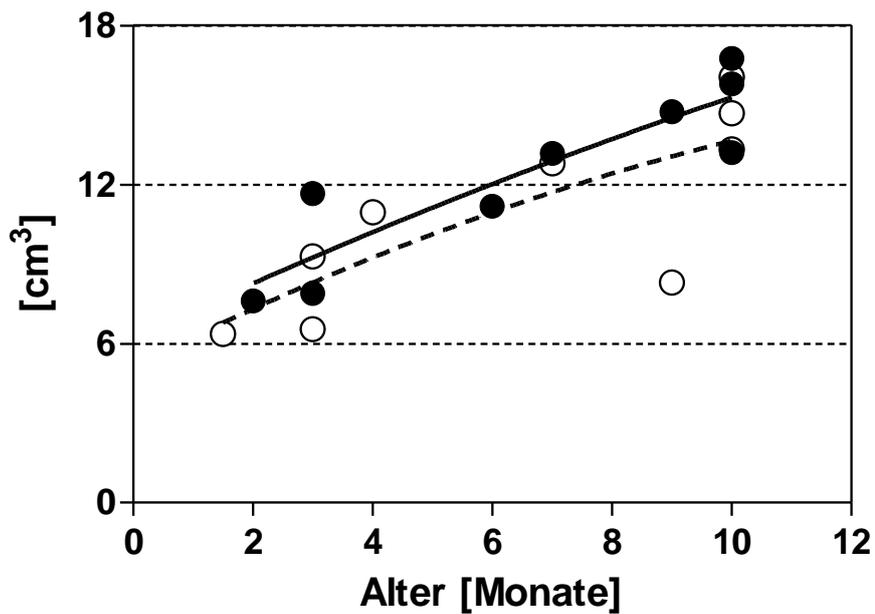
### Volumen der inneren Granularzellschicht



**Abbildung 3.23:** Volumen der inneren Granularzellschicht in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder sowie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedenen Steigungen der Regressionsgeraden). Gestrichelte Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9

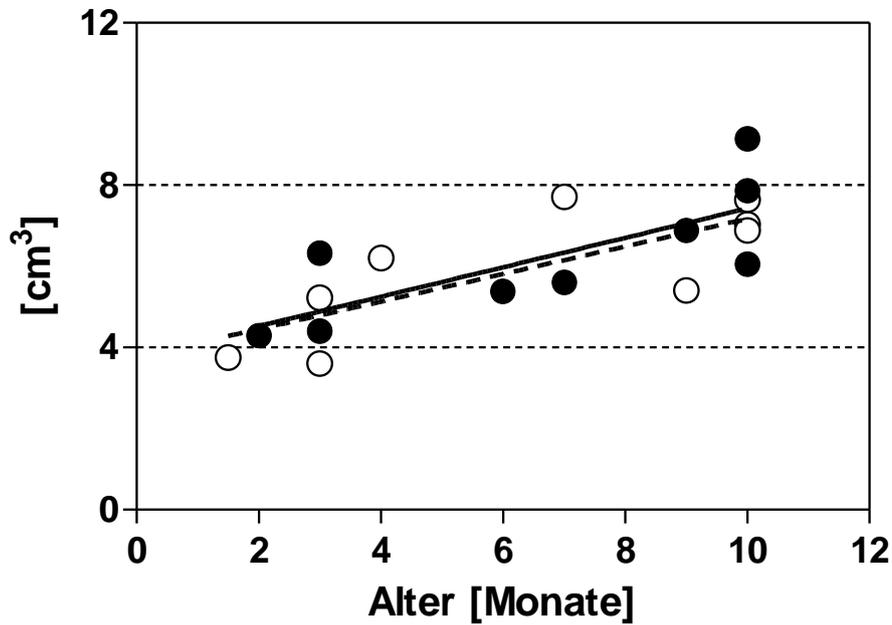
gematchten Kontrollen. Durchgezogene Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 SIDS-Fälle. Der untere Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

### Volumen der inneren Granularzellschicht

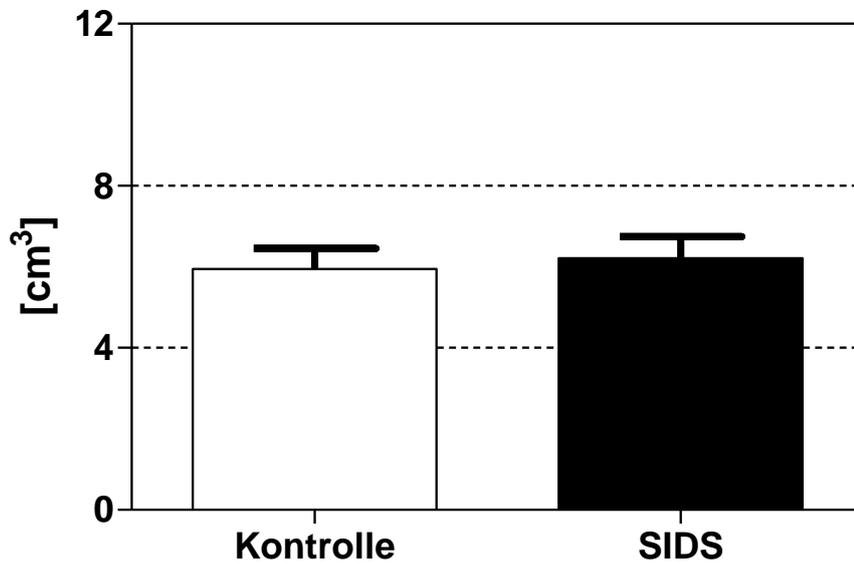


**Abbildung 3.24:** Volumen der inneren Granularzellschicht in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).

## Volumen der weißen Substanz

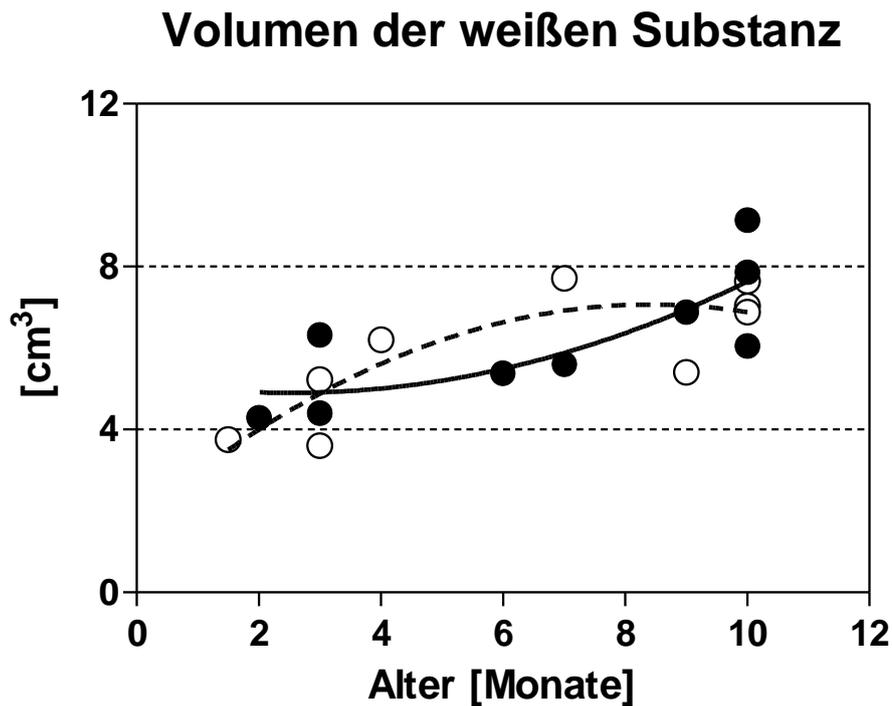


## Volumen der weißen Substanz



**Abbildung 3.25:** Volumen der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte im oberen Graphen; weißer Balken im unteren Graphen) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte im oberen Graphen, schwarzer Balken im unteren Graphen). Der obere Graph zeigt die Einzelwerte als Funktion des Alters der Kinder sowie die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (mit statistisch signifikant von Null verschiedenen Steigungen der

Regressionsgeraden). Gestrichelte Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 gematchten Kontrollen. Durchgezogene Linie: Regressionsgerade der Werte der n=9 SIDS-Fälle. Der untere Graph zeigt die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte der n=9 gematchten Kontrollen (weißer Balken) und der n=9 SIDS-Fälle (schwarzer Balken). Die Mittelwerte dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.



**Abbildung 3.26:** Volumen der weißen Substanz in der jeweils untersuchten Kleinhirnhälfte der n=9 gematchten Kontrollen (weiße Punkte) sowie der n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte) als Funktion des Alters. Die Punkte repräsentieren individuelle Kinder, die Kurven die Ergebnisse der nicht-linearen Regressionsanalyse (gestrichelte Kurve: Werte der n=9 gematchten Kontrollen; durchgezogene Kurve: Werte der n=9 SIDS-Fälle).

### 3.1.3 Gesamtzahl von Purkinjezellen aller n=14 Kontrollen und n=9 SIDS-Fälle als Funktion des Intervalls zwischen Tod und Autopsie

Tabelle 3.22 stellt die individuellen Werte der n=14 Kontrollen und der n=9 SIDS-Fälle für das Alter, die Todesursache, die Zeit zwischen Tod und Autopsie und die Gesamtzahl von Purkinjezellen in der untersuchten Kleinhirnhälfte dar. Zusätzlich sind die jeweiligen Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) für die n=9 gematchten Kontrollen, die n=5 weiteren, nicht gematchten Kontrollen und die n=9 SIDS-Fälle gelistet. Abbildung 3.27 zeigt die individuellen Werte der Gesamtzahl von Purkinjezellen in der untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Intervalls zwischen Tod und Autopsie für die n=14 Kontrollen und die n=9 SIDS-Fälle.

Für beide Gruppen zeigte die lineare Regressionsanalyse keine statistisch signifikante (d.h.  $p < 0,05$ ) Abhängigkeit der Gesamtzahl von Purkinjezellen in der untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Intervalls zwischen Tod und Autopsie (n=14 Kontrollen:  $r^2 = 0,005$ ;  $F = 0,062$ ;  $P = 0,808$ ; n=9 SIDS-Fälle:  $r^2 = 0,050$ ;  $F = 0,364$ ;  $P = 0,565$ ). Darüber hinaus ergab der *Mann-Whitney-U-Test* keinen statistisch signifikanten (d.h.  $p < 0,05$ ) Unterschied im mittleren Intervall zwischen Tod und Autopsie zwischen den n=14 Kontrollen ( $33,0 \pm 5,1$  h; Mittelwert  $\pm$  SEM) und den n=9 SIDS-Fällen ( $30,8 \pm 6,8$  h) ( $p = 0,777$ ).

**Tabelle 3.22:** Individuelle Werte, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of the mean*; SEM) der n=9 gematchten Kontrollen, der n=9 SIDS-Fälle und der n=5 nicht gematchten Kontrollen bezüglich Alter, Intervall zwischen Tod und Autopsie (*post mortem interval*: PMI [h]) und der Gesamtzahl von Purkinjezellen in der untersuchten Kleinhirnhälfte. Außerdem ist die jeweilige Todesursache gelistet.

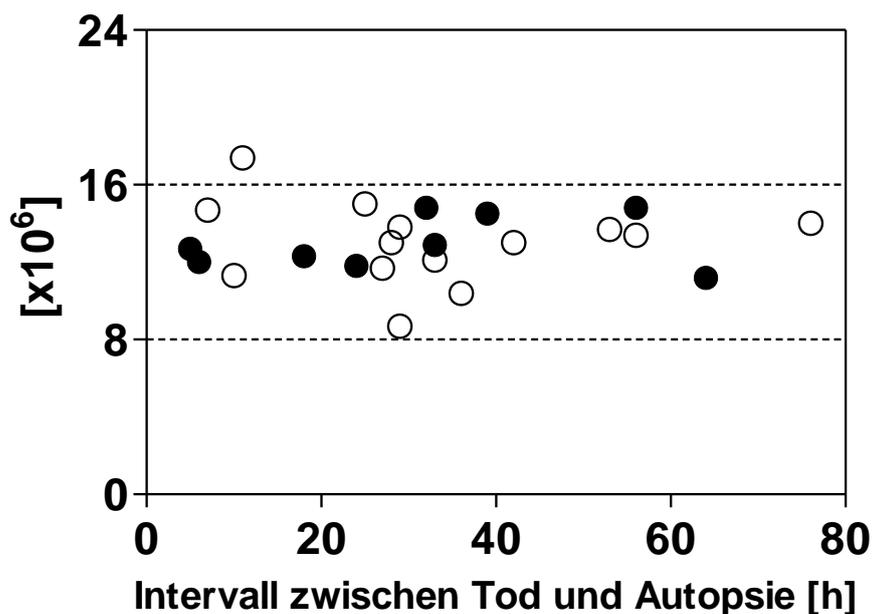
Fallnr.	Alter [Mo]	Todesursache	PMI [h]	Gesamtzahl von Purkinjezellen
<b>n=9 gematchte Kontrollen</b>				
10/79	1,5	Wahrscheinlich Herzfehler	36	10.350.596
10/71	3	Wahrscheinlich Infekt	28	12.985.487
10/80	3	Waterhouse-Friedrichsen Syndrom	27	11.670.494
10/99	4	Unklar - kein SIDS	25	14.982.554
10/92	7	Erwürgen	11	17.405.592
10/84	9	MCAD- / Adrenogenitales Syndrom	29	8.693.284
10/45	10	Sepsis	29	13.756.519
10/58	10	CO-Intoxikation	76	13.951.158
10/65	10	Wahrscheinlich Myokarditis	7	14.672.664
<b>Mittelwert</b>	<b>6,4</b>		<b>29,8</b>	<b>13.163.150</b>
<b>SEM</b>	<b>1,2</b>		<b>6,5</b>	<b>871.700</b>

<b>n=9 SIDS-Fälle</b>				
10/67	2	SIDS	24	11.846.820
10/50	3	SIDS	56	14.845.360
10/68	3	SIDS	18	12.322.376
10/54	6	SIDS	39	14.509.412
10/55	7	SIDS	33	12.898.029
10/47	9	SIDS	64	11.210.294
10/73	10	SIDS	5	12.721.356
10/78	10	SIDS	32	14.838.386
10/88	10	SIDS	6	11.954.029
<b>Mittelwert</b>	<b>6,7</b>		<b>30,8</b>	<b>13.016.229</b>
<b>SEM</b>	<b>1,1</b>		<b>6,8</b>	<b>459.999</b>

Fortsetzung Tabelle 3.22

weitere, n=5 nicht gemachte Kontrollen				
10/46	0,03	Ersticken	33	12.129.831
10/76	0,03	Erwürgen	10	11.301.646
10/70	0,83	Tötung (Ersticken)	42	13.005.827
10/64	8	Otitis media	53	13.667.317
10/77	11	Herzfehler	56	13.410.762
<b>Mittelwert</b>	<b>4,0</b>		<b>38,8</b>	<b>12.703.077</b>
<b>SEM</b>	<b>2,3</b>		<b>8,3</b>	<b>436.741</b>

### Abhängigkeit der Gesamtzahl von Purkinjezellen vom Intervall zwischen Tod und Autopsie



**Abbildung 3.27:** Gesamtzahl von Purkinjezellen in der untersuchten Kleinhirnhälfte als Funktion des Intervalls zwischen Tod und Autopsie für die n=14 Kontrollen (weiße Punkte) und die n=9 SIDS-Fälle (schwarze Punkte). Dargestellt sind die Einzelwerte der Kinder (es ergaben sich keine linearen Regressionsgeraden mit statistisch signifikant von Null verschiedener Steigung).

## **3.2 Ergebnisse der Nebenuntersuchung**

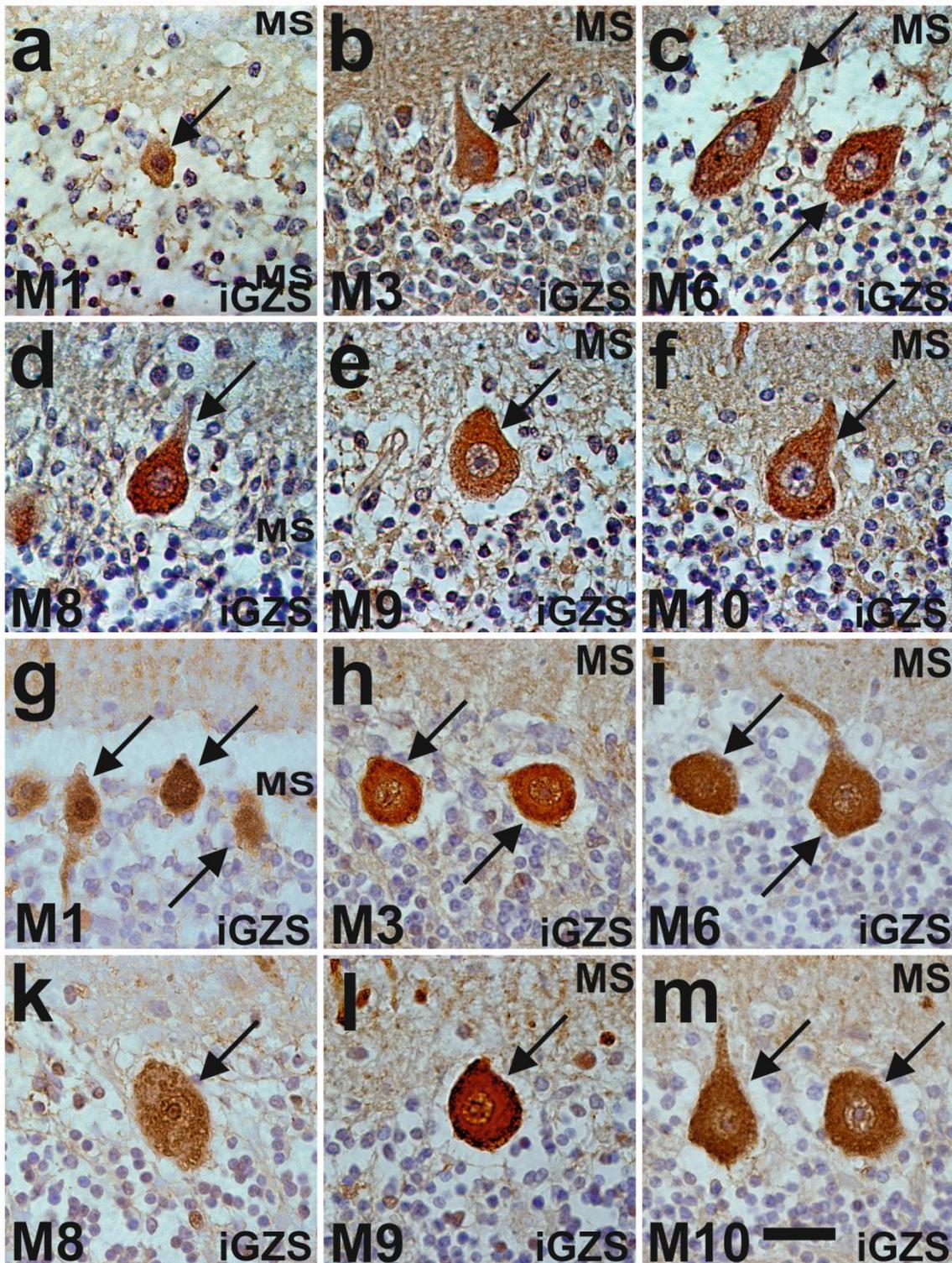
### **3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von *Sonic hedgehog* und Calbindin**

Abbildung 3.28 fasst die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen zusammen. **In allen untersuchten Kleinhirnen exprimierten die Purkinjezellen sowohl *Sonic hedgehog* als auch Calbindin.**

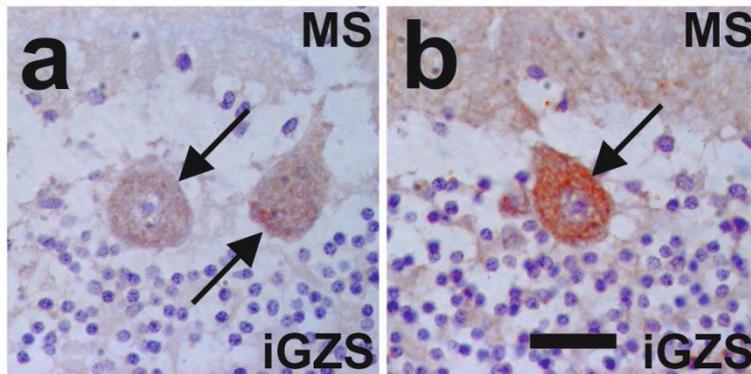
### **3.2.2 Kontrollversuch zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog***

Abbildung 3.29 zeigt die Ergebnisse des Kontrollversuchs zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* in Purkinjezellen im Kleinhirn.

Eine Vorinkubation des Primärantikörpers gegen *Sonic hedgehog* mit *Sonic hedgehog*-Protein ergab eine wesentlich schwächere immunhistochemische Markierung der Purkinjezellen als der Kontrollversuch ohne Vorinkubation des Primärantikörpers gegen *Sonic hedgehog* mit *Sonic hedgehog*-Protein.



**Abbildung 3.28:** Immunhistochemischer Nachweis von *Sonic hedgehog* (SHH) (a bis f) sowie von Calbindin (g bis m) in Purkinjezellen (Pfeile) im Kleinhirn von Kindern unterschiedlichen Alters (a und g: 1 Monat [M1; Fallnummer 10/90]; b und h: 3 Monate [M3; Fallnummer 10/59]; c und i: 6 Monate [M6; Fallnummer 10/96]; d und k: 8 Monate [M8; Fallnummer 10/44]; e und l: 9 Monate [M9; Fallnummer 10/56]; f und m: 10 Monate [M10; Fallnummer 10/48]). MS: Molekularschicht. iGZS: innere Granularzellschicht. Der Balken in m repräsentiert 25  $\mu$ m.



**Abbildung 3.29:** Kontrollversuch zum immunhistochemischen Nachweis von *Sonic hedgehog* (SHH) in Purkinjezellen (Pfeile) im Kleinhirn von Kindern (hier exemplarisch dargestellt für Fallnummer 10/96). Nach Vorinkubation des Primärantikörpers gegen SHH mit SHH-Protein (Verdünnungsstufe 4 in Tabelle 2.16) war die immunhistochemische Markierung der Purkinjezellen erheblich schwächer (**a**) als ohne Vorinkubation des Primärantikörpers gegen SHH mit SHH-Protein (**b**). Bei den anderen in Tabelle 2.16 genannten Verdünnungsstufen zeigte sich dieser Effekt nicht (nicht im Bild gezeigt). Die Abbildungen **a** und **b** repräsentieren vollständig identische Laborbedingungen bei der Immunhistochemie, der Mikroskopie und der digitalen Bildbearbeitung. MS: Molekularschicht. iGZS: innere Granularzellschicht. Der Balken in **b** repräsentiert 25  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Validität der Ergebnisse der stereologischen Auswertung

Die *design-based* Stereologie bietet gegenüber anderen Methoden zur Ermittlung von Zellzahlen und Zelldichten verschiedene Vorteile, die nachfolgend beispielhaft an der Bestimmung von Purkinjezellichten im Rattenkleinhirn dargestellt werden sollen (vgl. Glaser et al., 2006). Dafür soll in einer weiteren Modellanschauung (neben den Fischen in Kapitel „Material und Methoden“ oben im Text) die Hypothese überprüft werden, dass eine Behandlung mit einer neurotoxischen Substanz zu einer Verminderung der Anzahl von Purkinjezellen im Rattenkleinhirn führt.

*Einem Untersucher liegen zwanzig Rattenkleinhirne vor. Zehn der Tiere werden mit einer neurotoxischen Substanz behandelt, die anderen zehn Tiere dienen als Kontrollen. Von den den Tieren entnommenen Kleinhirnen fertigt der Untersucher im Labor 5  $\mu\text{m}$  dicke Nissl-gefärbte Paraffinschnitte an. Der Untersucher entscheidet sich, pro Rattenkleinhirn 15 repräsentative - im Sinne von „am schönsten gefärbte und viele Purkinjezellen enthaltende“ - Gesichtsfelder unter dem Mikroskop mit einem 40x-Objektiv, das über dem Gesichtsfeld mit einem Rechteck ausgestattet ist, auszuwerten. Dann zählt er in den Gesichtsfeldern alle Purkinjezellen, die er finden kann. Zur Bestimmung von Purkinjezellichten dividiert der Untersucher für jedes Tier die Anzahl der in jeweils allen Gesichtsfeldern gezählten Purkinjezellen durch das Produkt aus der Fläche des Rechtecks im Gesichtsfeld und der Anzahl der untersuchten Gesichtsfelder (im konkreten Fall 15). Die mittleren Purkinjezellichten der mit der neurotoxischen Substanz behandelten Ratten und der Kontrollen vergleicht er mit dem Student t-Test. Als Ergebnis erhält er eine Verminderung der mittleren Zelldichte der Purkinjezellen in den Kleinhirnen der mit der neurotoxischen Substanz behandelten Tiere. Die Verminderung ist aber nicht statistisch signifikant (d.h.  $p > 0,05$ ). Aus diesem Befund der Ermittlung der mittleren Zelldichten der Purkinjezellen im Rattenkleinhirn leitet der Untersucher ab, dass die Behandlung der Ratten mit der neurotoxischen Substanz nicht zu einer statistisch signifikanten Verminderung von Purkinjezellen im Kleinhirn führt.*

Diese Art der Ermittlung von Zelldichten und Unterschieden zwischen Gruppen z.B. von Versuchstieren entspricht nach heutigen Maßstäben, insbesondere vor dem Hintergrund der Möglichkeiten, die die *design-based* stereologischen Methoden bieten, nicht mehr dem *state-of-the-art*. Nach der oben beschriebenen Untersuchung von Purkinjezellichten im Rattenkleinhirn findet der Untersucher keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den mit einer neurotoxischen Substanz behandelten Tieren und den Kontrollen. Allerdings stellt sich die Frage, ob man mit der beschriebenen Methodik einen statistisch signifikanten Unterschied wirklich ausschließen kann, oder ob ein vorliegender statistisch signifikanter

Unterschied in der mittleren Gesamtzahl von Purkinjezellen zwischen den beiden Gruppen von Tieren möglicherweise mit einer anderen Methode der Datenerhebung sichtbar würde. Dazu sei folgendes angemerkt:

- Die Auswertung „repräsentativer Schnitte“ (hier des Rattenkleinhirns) und „repräsentativer Gesichtsfelder“ (üblicherweise die am schönsten gefärbten) setzt die Annahme voraus, dass die an diesen ausgesuchten Schnitten bzw. Gesichtsfeldern erzielten Ergebnisse dem Durchschnitt der Ergebnisse aller Schnitte bzw. aller möglichen Gesichtsfelder eines Rattenkleinhirns entsprechen, wenn alle Schnitte bzw. alle möglichen Gesichtsfelder auf exakt die gleiche Art und Weise ausgewertet würden. Tatsächlich können die Auswertungen subjektiv ausgewählter „repräsentativer“ Schnitte bzw. Gesichtsfelder jedoch erheblich von diesem Durchschnitt abweichen (vgl. Schmitz et al., 2005; Glaser et al., 2006). Dagegen basieren die *design-based* stereologischen Methoden, um dieser Problematik entgegenzuwirken, auf der Analyse systematisch-zufällig ausgewählter Serien (SRS Serien) von Schnitten und Gesichtsfeldern (vgl. z.B. Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006).
- Da die Purkinjezellen mit einem mittleren Durchmesser ihres Perikaryons von ca. 20  $\mu\text{m}$  verhältnismäßig große Zellen sind, erscheinen in dem oben geschilderten Beispiel in den 5  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten, die ja keinen Platz für eine ganze Purkinjezelle bieten, immer nur Teile von Purkinjezellen. Daraus ergibt sich, dass mit der Dicke des Schnitts bzw. mit der Größe der Zellen die Wahrscheinlichkeit steigt, dass sich eine Zelle in einem Schnitt befindet. Es könnte also passieren, dass eine Purkinjezelle sich über vier aufeinanderfolgende Schnitte erstreckt (20  $\mu\text{m}$  angenommener Durchmesser des Perikaryons in vier je 5  $\mu\text{m}$  dicken Gewebeschnitten) und so auch in jedem der Schnitte als Zelle gezählt werden kann. Dies könnte bei einer Analyse aller vier aufeinanderfolgenden Schnitte bis zu einem 4-fach erhöht falschen Ergebnis führen (vier Zellen anstatt nur einer Zelle). In der *design-based* Stereologie löst man dieses Problem dadurch, indem man (i) üblicherweise Schnitte mit einer viel größeren Dicke als 5  $\mu\text{m}$  für die Auswertung verwendet und (ii) nicht die gesamte Zelle oder bestimmte Teile davon, sondern einen genau einmal in der Zelle vorkommenden Punkt als Zählkriterium definiert und nur diesen Punkt zählt (z.B. den Mittelpunkt des Zellkerns). Befindet sich nun dieser genau definierte und nur genau einmal in der Zelle vorkommende Punkt in dem aktuell auszuwertenden Schnitt, kann die Zelle maximal einmal in die Zählung eingehen, da in allen anderen möglichen Schnitten zwar Teile der Zelle, nicht aber der genau einmal in der Zelle vorkommende Punkt vorhanden sein können. Dadurch werden in der Auswertung sowohl die Größe und die Form der gezählten Zellen, wie auch deren Lage im Raum, unerheblich.

- Eine Bestimmung alleine der Zelldichte in einem Gewebe kann sich als vollkommen irreführend erweisen, da diese immer auch vom untersuchten Volumen abhängig ist. So führt beispielsweise eine Verminderung der Gesamtzahl von Zellen in einem Gewebe nicht automatisch auch zu einer Verminderung der Zelldichte. Vielmehr kann bei gleichzeitiger Verminderung des Volumens des Gewebes die Zelldichte in diesem Gewebe trotz Verminderung der Gesamtzahl der Zellen unverändert bleiben (für ein besonders eindrucksvolles Beispiel siehe Schmitz et al., 2005).

Somit konnten im eingangs geschilderten Beispiel die Ergebnisse durch eine Vielzahl von Umständen beeinflusst sein. Konkret konnte der Untersucher bei der Bestimmung von mittleren Purkinjzelldichten im Rattenkleinhirn nach der Gabe einer neurotoxischen Substanz nicht entscheiden, ob (i) sich die durchschnittliche Größe der Rattenkleinhirne durch die Gabe der neurotoxischen Substanz geändert hatte, (ii) die durchschnittliche Größe der Perikaryen der Purkinjzellen durch die Gabe der neurotoxischen Substanz verändert wurde, (iii) die durch den Untersucher subjektiv als „repräsentativ“ ausgewählten Schnitte tatsächlich repräsentativ für das gesamte jeweils zu untersuchende Rattenkleinhirn waren, und (iv) die darin befindlichen, durch den Untersucher subjektiv als „repräsentativ“ ausgewählten Gesichtsfelder tatsächlich repräsentativ für die ausgewählten Schnitte waren. Da diese Aspekte nicht überprüft wurden, kann auch keine Aussage über die wirklich vorliegenden biologischen Verhältnisse getroffen werden.

Die *design-based* stereologischen Methoden berücksichtigen diese Aspekte, indem die Art der Auswertung grundsätzlich für jedes auszuwertende Objekt im Gewebe (hier: Purkinjzellen im Rattenkleinhirn) die gleiche Wahrscheinlichkeit ermöglicht, in die Auswertung einzugehen, d.h. in der Auswertung einer SRS-Stichprobe von Schnitten und Gesichtsfeldern gezählt zu werden.

Daraus ergibt sich der folgende adäquate Weg, mit *design-based* stereologischen Methoden die Hypothese zu überprüfen, dass eine Behandlung mit einer neurotoxischen Substanz zu einer Verminderung der Anzahl von Purkinjzellen im Rattenkleinhirn führt:

*Dem Untersucher liegen wiederum zwanzig Rattenkleinhirne vor. Zehn der Tiere werden mit einer neurotoxischen Substanz behandelt, die anderen zehn Tiere dienen als Kontrollen. Von den den Tieren entnommenen Kleinhirnen fertigt der Untersucher im Labor vollständige Kryostat-Schnittserien mit einer Schnittdicke von 50 µm an. Nun wählt er für jedes der Kleinhirne eine SRS-Schnittserie aus, die im vorliegenden Beispiel aus jedem fünften Schnitt besteht (der Abstand der Schnitte ist systematisch [jeder fünfte Schnitt]; der erste gewählte Schnitt der Serie ist zufällig [zwischen Schnitt 1 und Schnitt 5]). Beginnt die ausgewählte SRS-Schnittserie z.B. mit dem Schnitt Nummer 2, haben die folgenden Schnitte die Nummern 7, 12, 17, usw.. Die ausgewählten Schnitte färbt der Untersucher anschließend mit*

einer besonders für die Färbung dicker Schnitte modifizierten Nissl-Färbung. Die Auswertung der einzelnen Schnitte der SRS-Serie erfolgt an einem mit einer besonderen Software und dazu passender Hardware (PC, Mikroskop, Monitor, Kamera, motorgetriebener Objektisch, Messfühler für die Tiefenmessung) ausgestatteten stereologischen Arbeitsplatz. Der Untersucher bestimmt auf jedem auszuwertenden Schnitt den zu untersuchenden Bereich, den er mit der Computer-Maus bei geringem Abbildungsmaßstab auf dem Monitor umrandet. Dazu wird auf dem Monitor das mittels einer Videokamera generierte Live-Bild der Abbildung aus dem Mikroskop von der Software mit den umrandeten Konturen des auszuwertenden Bereichs überlagert. Anschließend legt der Untersucher den Abstand der Gesichtsfelder, die in die Auswertung eingehen, in X- und Y-Richtung fest, sowie - für jedes Gesichtsfeld gleich - die Größe des dreidimensionalen unbiased virtual counting spaces (der Bereich, in dem letztendlich die Auswertung der Purkinjezellen erfolgt). Die Software bewegt dann den motorgetriebenen Objektisch bei hohem Abbildungsmaßstab von Gesichtsfeld zu Gesichtsfeld, und der Untersucher markiert nun innerhalb der unbiased virtual counting spaces mit der Maus auf dem Monitor jeden Purkinjezellanschnitt bzw. jede Purkinjezelle, die den vorher festgelegten, genau einmal in der Zelle vorkommenden Punkt aufweist. Außerdem bestimmt der Untersucher für jeden Schnitt die durchschnittliche Schnittdicke, womit er mögliche verarbeitungsbedingte Schrumpfungartefakte in der Auswertung berücksichtigt. Die Software liefert für jeden Schnitt die Summe der auf dem jeweiligen Schnitt markierten Zellen (also der vom Untersucher gesetzten Marker), mittels derer der Untersucher nach Abschluss der Analyse aller Schnitte einer SRS-Serie die geschätzte Gesamtzahl von Purkinjezellen im Rattenkleinhirn ermittelt. Nach dem Abschluss der Auswertung der Kleinhirne der zehn mit einer neurotoxischen Substanz behandelten Ratten und der zehn Kontrolltiere vergleicht der Untersucher die mittleren Gesamtzahlen von Purkinjezellen beider Gruppen mittels Student t-Test. In dieser Auswertung ermittelt der Untersucher eine statistisch signifikante (d.h.  $p < 0,05$ ) Abnahme der mittleren Gesamtzahl von Purkinjezellen im Rattenkleinhirn um etwa 25% nach Behandlung mit der neurotoxischen Substanz. Der Untersucher schließt daraus, dass die Behandlung mit dieser neurotoxischen Substanz zu einer Reduktion der Gesamtzahl von Purkinjezellen im Rattenkleinhirn führt. Dieses Ergebnis widerspricht dem Ergebnis der eingangs geschilderten Untersuchung derselben Fragestellung mit nicht design-based stereologischen Methoden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der beachtet werden sollte, betrifft die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. So können z.B. subjektiv nach der Färbeintensität ausgewählte Schnitte bzw. Gesichtsfelder nahe zusammenliegen und z.B. Randbereiche eventuell gar nicht erfassen. Laterale Parasagittalschnitte des Kleinhirns weisen überwiegend Rindensubstanz auf, während mediale Parasagittalschnitte des Kleinhirns vergleichsweise mehr weiße

Substanz aufweisen. Bei unabhängig ausgewählten SRS-Schnittserien, wie sie in der *design-based* stereologischen Methodik verwendet werden und die das gesamte Kleinhirn berücksichtigen, tritt dieses Problem nicht auf, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse substantiell erhöht (vgl. z.B. Schmitz und Hof, 2005; Glaser et al., 2006).

Basierend auf diesen Überlegungen und der in Kapitel „Material und Methoden“ oben im Text geschilderten methodischen Vorgehensweise werden in der Gesamtschau die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als valide beurteilt.

#### **4.2 Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die n=14 Kontrollen und die n=9 SIDS-Fälle mit Daten aus der Literatur**

In der Literatur finden sich von verschiedenen Autoren Daten zu mittleren Gesamtzahlen von Granular- und Purkinjezellen, zur mittleren Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle sowie zu den mittleren Volumina der Molekularschicht, der Granularzellschicht und der weißen Substanz im menschlichen Kleinhirn (Lange, 1975; Andersen et al., 1992; Andersen und Pakkenberg, 2003; Andersen et al., 2003; Andersen, 2004). Diese Daten sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt

Zur Validität der von Riedel et al. (1989) vorgelegten Daten, die in Tabelle 4.1 nicht berücksichtigt sind, sei angemerkt, dass die Autoren für adulte Fälle eine mittlere Gesamtzahl von Purkinjezellen von  $879,7 \pm 13,6 \times 10^3$  für das gesamte Kleinhirn angaben, was aber nur etwa 3% der tatsächlichen Gesamtzahl von Purkinjezellen in einer menschlichen Kleinhirnhälfte entspricht (die mittlere Gesamtzahl von Purkinjezellen wurde von Riedel et al. [1989]) für das gesamte Kleinhirn angeben; für den Vergleich mit den Daten der vorliegenden Arbeit und anderen Daten aus der Literatur wurde die Hälfte der mittleren Gesamtzahl von Purkinjezellen für eine Kleinhirnhälfte angenommen). Die von Riedel et al. (1989) angegebene mittlere Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht des gesamten Kleinhirns von  $19,84 \pm 3,06 \times 10^9$  beträgt nur etwa 18,4% der tatsächlichen mittleren Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht einer Kleinhirnhälfte (die mittlere Gesamtzahl von Granularzellen wurde von Riedel et al. [1989] für das gesamte Kleinhirn angeben; für den Vergleich mit den Daten der vorliegenden Arbeit und anderen Daten aus der Literatur wurde die Hälfte der mittleren Gesamtzahl von Granularzellen für eine Kleinhirnhälfte angenommen) und das mittlere Verhältnis von Granularzellen pro Purkinjezelle entspricht im menschlichen Kleinhirn nicht, wie von Riedel et al. (1989) publiziert,  $22.776 \pm 3.218$ , sondern ca. 3.500 (vgl. Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1:** Daten aus der Literatur zu mittleren Gesamtzahlen von Granular- und Purkinjezellen, zur mittleren Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle, sowie zu mittleren Volumina der Molekularschicht, der Granularzellschicht und der weißen Substanz im menschlichen Kleinhirn (Spalte A: Lange, 1975; Spalte B: Andersen et al., 1992; Spalte C: Andersen und Pakkenberg, 2003; Spalte D: Andersen et al., 2003; Spalte E: Andersen, 2004). Die Werte in Spalte F repräsentieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Alle angegebenen Werte beziehen sich auf eine Kleinhirnhälfte. (Für alle hier angeführten Werte aus der Literatur – mit Ausnahme der Werte für das Verhältnis der Granularzellen pro Purkinjezelle – wurden für den Vergleich mit den Werten der vorliegenden Arbeit die in der Literatur angeführten Werte halbiert.)

Quelle:	A	B	C	D	E	F
Gesamtzahl von Granularzellen (x 10 <sup>9</sup> ):		50,5	56,2	54,4	54,7	37,4 <sup>1</sup>
Gesamtzahl von Purkinjezellen (x 10 <sup>6</sup> ):		15,3	14,3	14,3	14,9	13,0 <sup>2</sup>
Granularzellen pro Purkinjezelle:	2.991	3.301 <sup>3</sup>	3.930 <sup>3</sup>	3.804 <sup>3</sup>	3.671 <sup>3</sup>	2.877 <sup>5</sup>
Volumen der Molekularschicht (cm <sup>3</sup> ):				26,4 <sup>4</sup>	27,2 <sup>4</sup>	13,1 <sup>1</sup>
Volumen der inneren Granularzellschicht (cm <sup>3</sup> ):				18,9 <sup>4</sup>	19,0 <sup>4</sup>	14,3 <sup>1</sup>
Volumen der weißen Substanz (cm <sup>3</sup> ):		16,6	14,6	16,0	16,6	7,1 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>: Mittelwerte für die in der vorliegenden Arbeit stereologisch untersuchten Kleinhirne von SIDS-Fällen und Kontrollen mit einem Alter von neun oder mehr Lebensmonaten (Fallnummern: 10/45, 10/47, 10/58, 10/65, 10/73, 10/77, 10/78, 10/84, 10/88). Die anderen in der vorliegenden Arbeit untersuchten SIDS-Fälle und Kontrollen waren jünger und wiesen z.T. deutlich niedrigere Werte auf. Solch junge Fälle wurden aber in den Studien von Lange (1975), Andersen et al. (1992), Andersen und Pakkenberg (2003), Andersen et al. (2003) und Andersen (2004) nicht untersucht. <sup>2</sup>: Mittelwert für alle in der vorliegenden Arbeit stereologisch untersuchten n=23 Kleinhirne von SIDS-Fällen und Kontrollen. <sup>3</sup>: Daten aus den publizierten mittleren Gesamtzahlen von Granularzellen und Purkinjezellen errechnet. <sup>4</sup>: Bei Andersen et al. (2003) und Andersen (2004) wurden die hier genannten Werte mit der Einheit Kubikmillimeter (mm<sup>3</sup>) angegeben. Dies ist aber aller Wahrscheinlichkeit nach nicht korrekt. Ein Volumen von 26,4 mm<sup>3</sup> würde z.B. in etwa einem Quader mit den Kantenlängen 5 x 5 x 1 mm entsprechen. Es ist viel wahrscheinlicher, dass diese Daten ebenfalls Kubikzentimeter (cm<sup>3</sup>) repräsentieren (zumindest erscheint ein Quader von 5 x 5 x 1 cm Kantenlänge im Vergleich mit der Größe eines menschlichen Kleinhirns viel wahrscheinlicher). <sup>5</sup>: Errechnet aus den Daten der vorliegenden Arbeit für die mittleren Gesamtzahlen von Granularzellen der Kinder im Alter zwischen neun und mehr Monaten ((Fallnummern: 10/45, 10/47, 10/58, 10/65,

10/73, 10/77, 10/78, 10/84, 10/88) und den Purkinjezellen aller n=23 Kontrollen und SIDS-Fälle der Hauptuntersuchung.

Darüber hinaus finden sich in der Literatur noch die folgenden Berichte über mittlere Gesamtzahlen von Purkinjezellen pro menschlicher Kleinhirnhälfte:  $15,3 \times 10^6$  (Korbo und Andersen, 1995) sowie  $11,2 \times 10^6$  (Agashiwala et al., 2008). Andersen et al. (2012) stellten zwar Gesamtzahlen von Zellen im Kleinhirn graphisch dar, nannten diese aber nicht explizit. Mit ca.  $27 \times 10^6$  Purkinjezellen und ca.  $70 \times 10^9$  Granularzellen liegen die von Andersen et al. (2012) ermittelten Gesamtzahlen für das gesamte Kleinhirn aber im Rahmen der in Tabelle 4.1 zusammengestellten Daten (das mittlere Verhältnis von Granularzellen pro Purkinjezelle in den Ergebnissen von Andersen et al. [2012] ist etwa 2.600).

Insgesamt passen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gut zu den genannten Daten aus der Literatur. Dabei muss insbesondere berücksichtigt werden, dass die genannten Daten aus der Literatur ausnahmslos an Gehirnen von adulten Menschen erhoben wurden, in der vorliegenden Arbeit aber Kinder mit einem Lebensalter von unter einem Jahr untersucht wurden. Dies erklärt die etwas kleineren Werte für die mittlere Gesamtzahl von Granularzellen sowie die mittleren Volumina der Molekularschicht, der inneren Granularzellschicht und der weißen Substanz in der vorliegenden Arbeit (vgl. Tabelle 4.1).

#### **4.3 Vergleich der Ergebnisse für die n=9 gematchten Kontrollen mit denen der n=9 SIDS-Fälle**

In der vorliegenden Arbeit wurde für keine der gemessenen Variablen *Körperlänge*, *Körpergewicht*, *Gehirngewicht* und *Verhältnis Gehirngewicht zu Körpergewicht* sowie für keine der stereologisch untersuchten Variablen *Gesamtzahl von Granularzellen*, *Gesamtzahl von Purkinjezellen*, *Anzahl Granularzellen pro Purkinjezelle*, *Volumen der Molekularschicht*, *Volumen der inneren Granularzellschicht* und *Volumen der weißen Substanz* pro Kleinhirnhälfte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den n=9 gematchten Kontrollen und den n=9 SIDS-Fällen gefunden. Dementsprechend eignen sich die in der vorliegenden Arbeit stereologisch untersuchten Variablen nicht, um eventuell entwicklungsbedingte Störungen des Kleinhirns im Zusammenhang mit SIDS zu postulieren. Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Hypothese muss demnach verworfen werden.

Einschränkend muss jedoch darauf verwiesen werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht dahingehend interpretiert werden dürfen, dass das Kleinhirn bei der Ätiologie und Pathogenese von SIDS keine Rolle spielt. Vielmehr wurden in der vorliegenden Arbeit weder andere möglicherweise relevante morphologische Variablen (z.B.

Veränderungen auf der Ebene der synaptischen Verschaltung) untersucht, noch eventuell mögliche funktionelle Störungen des Kleinhirns bei SIDS (eventuell sogar ohne fassbares morphologisches Korrelat).

#### **4.4 Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die n=9 SIDS-Fälle mit Daten aus der Literatur**

Die hier vorliegenden Ergebnisse stehen in Einklang mit den bereits eingangs erwähnten Daten von Oehmichen et al. (1989) – diese Autoren hatten im Kleinhirn von SIDS-Fällen im Vergleich zu Kontrollen keine statistisch signifikante Veränderung der mittleren Purkinjezellichte gefunden. Auch passen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gut zu den Beobachtungen von Riedel et al. (1989), die keine statistisch signifikanten Veränderungen der Gesamtzellzahlen und der Volumina der einzelnen Kleinhirnschichten zwischen Kontrollen und SIDS-Fällen feststellen konnten. Dagegen konnte für den ebenfalls eingangs erwähnten Befund von Lavezzi et al. (2006, 2007), die bei einem einzelnen SIDS-Fall angeblich Apoptose fast aller Granularzellen der inneren Granularzellschicht und bei einem anderen SIDS-Fall den angeblichen Verlust aller Purkinjezellen im Kleinhirn beschrieben, in der vorliegenden Arbeit kein Korrelat gefunden werden. Möglicherweise handelte es sich bei den geschilderten Beobachtungen von Lavezzi et al. (2006, 2007) um Einzelbefunde, die eventuell sogar gar nicht im Zusammenhang mit SIDS zu werten sind. Für die von Cruz-Sánchez et al. (1997) postulierte Entwicklungsverzögerung des Kleinhirns bei SIDS konnte in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis gefunden werden. Die von Riedel et al. (1989) postulierte, hauptsächlich postnatal stattfindende Granularzellentwicklung läuft mit den Daten der vorliegenden Arbeit konform, die diesen Befund eindeutig bestätigen und präzisieren konnte (Details werden in Kapitel 4.7 weiter unten erläutert).

#### **4.5. Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die n=14 Kontrollen und die n=9 SIDS-Fälle in Bezug auf die altersabhängige Zunahme der mittleren Volumina der Kleinhirnrindenschichten mit Daten aus der Literatur**

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Volumenzunahmen der einzelnen Schichten des Kleinhirns in Abhängigkeit vom Alter der Fälle stimmen gut mit Daten aus der Literatur überein (Dobbing und Sands, 1973; Riedel et al., 1989).

#### **4.6 Bedeutung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die weitere Forschung zur Ätiologie und Pathogenese von SIDS**

Wie bereits eingangs angedeutet, finden sich in der Literatur verschiedenste Hypothesen zur Ätiologie und Pathogenese von SIDS sowie Berichte über die damit verbundenen Forschungsaktivitäten. Diese Hypothesen und Forschungsansätze konzentrieren sich derzeit hauptsächlich auf die folgenden Aspekte:

- Neuronale Kontrolle lebenswichtiger Funktionen: z.B. mögliche Veränderungen...
  - ... des serotonergen Systems im Hirnstamm (z.B. Duncan et al., 2010; Mage und Kollander, 2010; Gdovin et al., 2010; Penatti et al., 2011; vgl. auch Kinney et al., 2009; Broadbelt et al., 2011),
  - ... der Perfusion des Hirnstamms im Sinne einer Hypoperfusion, basierend auf Untersuchungen der Arteria basilaris während verschiedener Rotationsintensitäten des Kopfes (Deeg und Reisig, 2010),
  - ... von Zytokinen im Hirnstamm: Interleukin 2-Expression in den für die Vitalfunktionen notwendigen Zentren (Kadhim et al., 2010),
  - ... verschiedener Neurotransmittersysteme im Gehirn (z.B. Broadbelt et al., 2010; Gorini et al., 2010; Broadbelt et al., 2011),
  - ... von Gliazellen (Mitterauer, 2011) und Neurotrophenen (Tang et al., 2012) im Gehirn, sowie
  - ... von Nervus hypoglossus (Gao et al., 2011) und Nucleus hypoglossus (Lavezzi et al., 2010b);
- Geschlechtsabhängige Verzögerung der kortikalen Reifung und damit verbundene Verzögerung der kortikalen Aktivierung in verschiedenen Schlafphasen (Richardson et al., 2010b);
- Schlafposition im Zusammenhang mit daraus resultierender möglicher Sauerstoffunterversorgung des Gehirns (Wong et al., 2011);
- Zusammenhang zwischen Körperkerntemperatur und hirnstammgesteuerter Verschlussintensität des Kehlkopfes (Wadie et al., 2011);
- Nervensystementwicklung und -schädigung unter Nikotineinfluss (z.B. Blood-Siegfried und Rende, 2010; Lavezzi et al., 2010a; Sekizawa et al., 2011; Slotkin et al., 2011), dabei insbesondere die Area postrema (Lavezzi et al., 2012); sowie
- Mögliche Beeinträchtigungen des Eisenhaushalts des Gehirns (Lavezzi et al., 2011).

Darüber hinaus werden in der Literatur aber auch etliche mehr generelle Aspekte als möglicherweise bei der Ätiologie und Pathogenese von SIDS beteiligte Faktoren diskutiert und entsprechend untersucht:

- Genetische Faktoren (z.B. Courts und Madea, 2010; Ferrante et al., 2010b; Opdal et al., 2010; Poetsch et al., 2010; Courts und Madea, 2011; Hu et al., 2012; Klaver et al., 2011; Opdal et al., 2011; Brion et al., 2012);
- Virusinfektionen (Drexler et al., 2011);
- Zytokine: Konzentration von Interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 6 sowie TNF $\alpha$  in Serum und Liquor (Vennemann et al., 2012);
- Muskelentzündungen des Zwerchfells (Eisenhut, 2011);
- Aspiration von Fruchtwasser (Fracasso et al., 2010);
- Das Herz betreffende Channelopathien (Tfelt-Hansen et al., 2011);
- Der Einfluss des Stillens durch die Mutter (Chapman, 2011; Rossato, 2011); sowie
- Der Einfluss von Wickeln auf den Schlaf und die autonome Kontrolle auf die Entstehung von SIDS (Richardson et al., 2010a).

Insgesamt ergibt sich aus dieser Übersicht kein klares Bild und auch keine Hypothese zur Ätiologie und Pathogenese von SIDS, die man verallgemeinern könnte. Dementsprechend ist es auch unmöglich, aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Empfehlungen für die weitere Forschung zu SIDS abzuleiten. Vielmehr können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit – zusammen mit den Befunden von Oehmichen et al. (1989) und Riedel et al. (1989) – dahingehend eingeordnet werden, dass die Suche nach möglichen, lichtmikroskopisch fassbaren morphologischen Veränderungen im Kleinhirn nach Färbung von Gehirnschnitten mit Routinefärbungen bei der Forschung zu SIDS als „*dead end*“ angesehen werden muss.

#### **4.7 Bedeutung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die weitere Forschung zur Entwicklung des menschlichen Kleinhirns**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ein wichtiges Element in der Entwicklung des menschlichen Kleinhirns auf: der größte Teil (>85%) der Granularzellen in der inneren Granularzellschicht wird erst postnatal angelegt. Daraus ergibt sich, dass wesentliche Aspekte der Kleinhirnentwicklung des Menschen erst postnatal stattfinden. Dieser Befund wurde in früheren Untersuchungen zwar schon angedeutet, bisher aber nicht mit adäquater Methodik untersucht – und fand wahrscheinlich deswegen auch bislang nur sehr wenig Beachtung.

In den folgenden Abschnitten werden einige dieser Aspekte vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet.

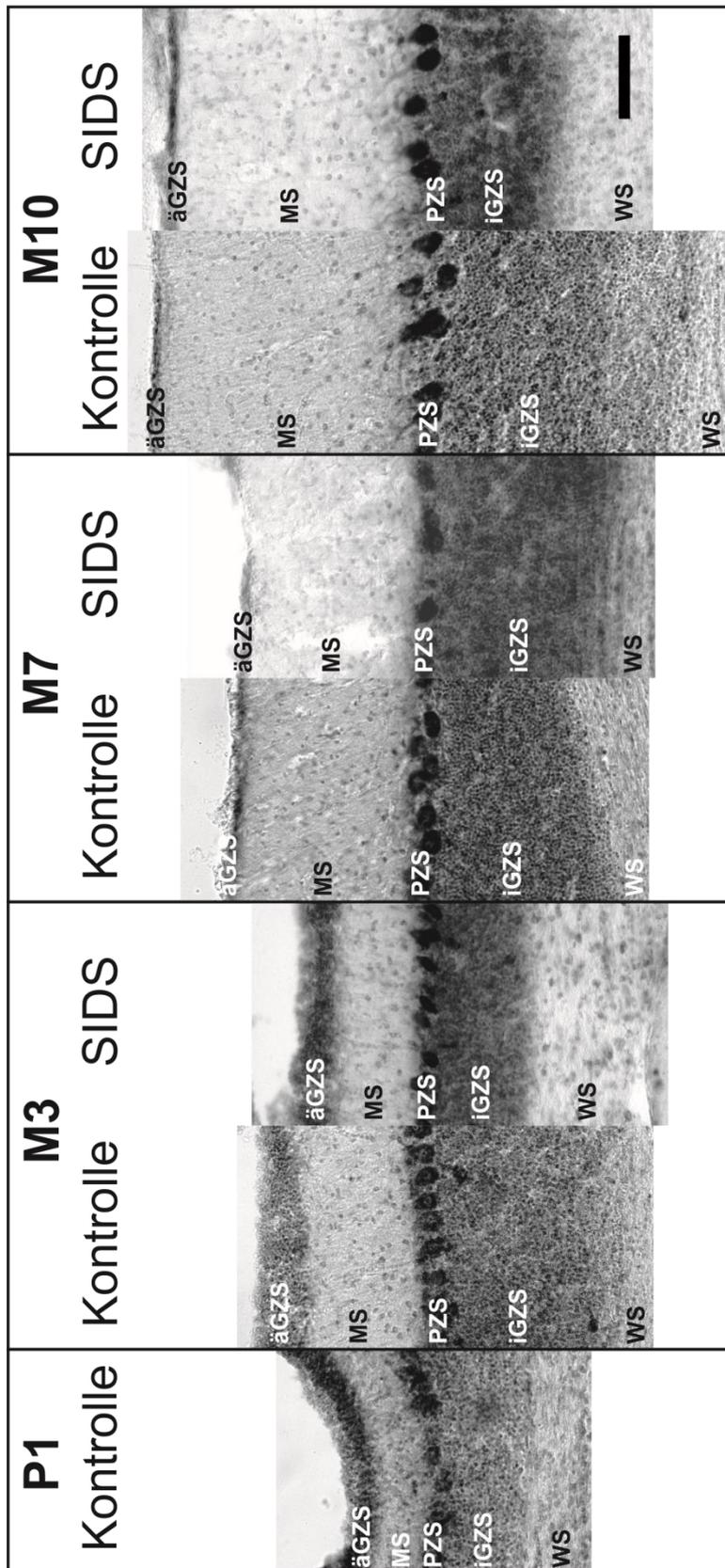
#### **4.7.1 Gegenwärtiger Stand des Wissens in der Literatur über einige – für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit relevante – Aspekte der Entwicklung von Purkinjezellen und Granularzellen im menschlichen Kleinhirn**

Die Vorläufer der Purkinjezellen entstehen bereits früh in der embryonalen Entwicklung in der Ventrikulärzone des vierten Ventrikels, wo sie auch proliferieren (Abrahám et al., 2001). Von hier wandern die postmitotischen Vorläufer der Purkinjezellen bereits in der neunten und zehnten Schwangerschaftswoche radial an ihren Bestimmungsort, die spätere Purkinjezellschicht, aus (Sidman und Rakic, 1973). Die endgültige Anzahl von Purkinjezellen scheint schon in der 13. Schwangerschaftswoche angelegt zu sein, und zwar unbeeinflusst von anderen Neuronen der Kleinhirnrinde (Rakic und Sidman, 1970). Zwischen der 20. und 22. Schwangerschaftswoche wird dann zunächst die unreife, im weiteren Verlauf der Schwangerschaft mehrreihig vorliegende Purkinjezellschicht erkennbar (Lavezzi et al., 2007), die sich bereits ab der 25. Schwangerschaftswoche zu einer einreihigen Schicht von Purkinjezellen umorganisiert (Rakic und Sidman, 1970). Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Purkinjezellschicht dann einreihig (Sidman und Rakic, 1973), wie es auch in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde (vgl. Abbildung 4.1 weiter unten im Text). Ergänzend sei erwähnt, dass Lavezzi et al. (2006, 2007) angaben, dass die Purkinjezellschicht bis in die ersten Lebensstage hinein ihre mehrreihige Struktur beibehalten kann und erst im 2. Lebensmonat einreihig vorliegt. In der vorliegenden Arbeit wurde dies aber nicht beobachtet (Abbildung 4.1).

Dementsprechend haben die Vorläufer der Purkinjezellen zum Zeitpunkt der Geburt ihre Wanderung aus der Ventrikulärzone des vierten Ventrikels abgeschlossen und befinden sich alle an ihrem finalen Bestimmungsort, d.h. in der Purkinjezellschicht. In der vorliegenden Arbeit fand dieses Phänomen seine Entsprechung in der Tatsache, dass die Gesamtzahl von Purkinjezellen bei allen untersuchten Kleinhirnhälften keine Altersabhängigkeit zeigte (vgl. Abbildungen 3.3 und 3.17 im Teil „Ergebnisse“ oben im Text). Ein vergleichbarer Befund – allerdings mit völlig falschen absoluten Gesamtzahlen von Purkinjezellen (vgl. Kapitel „Einleitung“ oben im Text) wurde von Riedel et al. (1989) publiziert.

Im Gegensatz zu den Vorläufern der Purkinjezellen wandern die Vor-Vorläufer der Granularzellen etwa zwischen der zehnten und elften Schwangerschaftswoche aus der subventrikulären Schicht der Rautenlippe an die Oberfläche der Kleinhirnanlage, wo sie proliferieren und etwa ab der elften bis 13. Schwangerschaftswoche die äußere Granularzellschicht bilden (Rakic und Sidman, 1970; Sidman und Rakic, 1973). Ist die äußere Granularzellschicht etwa in der 19. Schwangerschaftswoche lediglich fünf bis sechs Zellen dick, hat sie in der 20. bis 21. Schwangerschaftswoche bereits eine Dicke von sechs bis neun Zellen erreicht (Rakic und Sidman, 1970). Die bei der Proliferation dieser Zellen

entstehenden eigentlichen Vorläufer der Granularzellen wandern dann etwa ab der 21. Schwangerschaftswoche entlang der Bergmann-Glia (Hatten, 1999) tangential von außen nach innen an ihren Bestimmungsort, d.h. die innere Granularzellschicht (Rakic und Sidman, 1970). Die innere Granularzellschicht selber wird etwa in der 27. bzw. 28. Schwangerschaftswoche sichtbar (Rakic und Sidman, 1970). Dabei durchqueren die Vorläufer der Granularzellen sowohl die Molekularschicht als auch die Purkinjezellschicht (Sidman und Rakic, 1973; Hatten, 1999). Während dieser Migration belassen die Granularzellen ihre Axone in der Molekularschicht, die sie somit teilweise mit ihren Axonen selber bilden.



**Abbildung 4.1:** Ausschnitte aus der Kleinhirnrinde verschiedener in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kleinhirne. P1: postnataler Tag 1. M3, M7 und M10: dritter, siebter und zehnter

Lebensmonat. äGZS: äußere Granularzellschicht. MS: Molekularschicht. PZS: Purkinjzellschicht. iGZS: innere Granularzellschicht. WS, weiße Substanz. Der Balken repräsentiert 100 µm.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zu dem (postnatalen) Zeitpunkt, ab dem die äußere Granularzellschicht nicht mehr nachweisbar ist. Nach Rakic und Sidman (1970) liegt dieser Zeitpunkt etwa im 12. Lebensmonat, nach Abrahám et al. (2001) zwischen dem achten und dem elften Lebensmonat, nach Cruz-Sánchez et al. (1997) im siebten Lebensmonat und nach Riedel et al. (1989) etwa am Ende des zweiten Lebensjahres. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erscheinen der siebte, achte und neunte Lebensmonat zu früh (Abbildung 4.1; vgl. auch Abbildungen 3.3 und 3.15 im Teil „Ergebnisse“ oben im Text).

Die prä- und postnatale Bildung von Granularzellen im menschlichen Kleinhirn – und insbesondere die damit einhergehenden Proliferationsvorgänge in der äußeren Granularzellschicht – wurden in der Literatur wiederholt untersucht (z.B. Rakic und Sidman, 1970; Sidman und Rakic, 1973; vgl. z.B. auch Riedel et al., 1989; Abrahám et al., 2001; unten im Text im Detail erläutert). Dagegen liegen zu der Frage nach dem „Nettoeffekt“ dieser Proliferationsvorgänge in der äußeren Granularzellschicht – also konkret zu der Frage, ob die Granularzellen in der inneren Granularzellschicht des menschlichen Kleinhirns denn nun überwiegend pränatal oder aber überwiegend postnatal angelegt werden – in der Literatur überraschenderweise praktisch keine Daten vor. Eine der älteren Quellen hierzu ist Abbildung 7 in der hier bereits mehrfach zitierten Publikation von Sidman und Rakic (1973) – eine Schemazeichnung zum zeitlichen Verlauf der Entwicklung des menschlichen Kleinhirns (Abbildung 4.2).

Dieser Schemazeichnung kann man entnehmen, dass Sidman und Rakic (1973) davon ausgehen, dass die Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht zum Zeitpunkt der Geburt bereits in etwa 65 bis 70% der Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht im Alter von sieben Lebensmonaten entspricht. Dies steht in eindeutigem Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, nach denen die Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht kurz nach der Geburt nur etwa 15% der Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht im Alter von zehn bis elf Lebensmonaten entspricht (vgl. die Abbildungen 3.3 und 3.15 im Teil „Ergebnisse“ oben im Text). Dementsprechend muss man davon ausgehen, dass Sidman und Rakic (1973) annahmen, dass die Granularzellen in der inneren Granularzellschicht des menschlichen Kleinhirns überwiegend pränatal angelegt werden – tatsächlich werden sie aber überwiegend postnatal angelegt. Interessanterweise haben Sidman und Rakic (1973)

keine quantitativen Ergebnisse vorgelegt, sondern lediglich Schemazeichnungen, die von Gehirnschnitten von nur einzelnen Fällen angefertigt wurden (vgl. Rakic und Sidman, 1970).

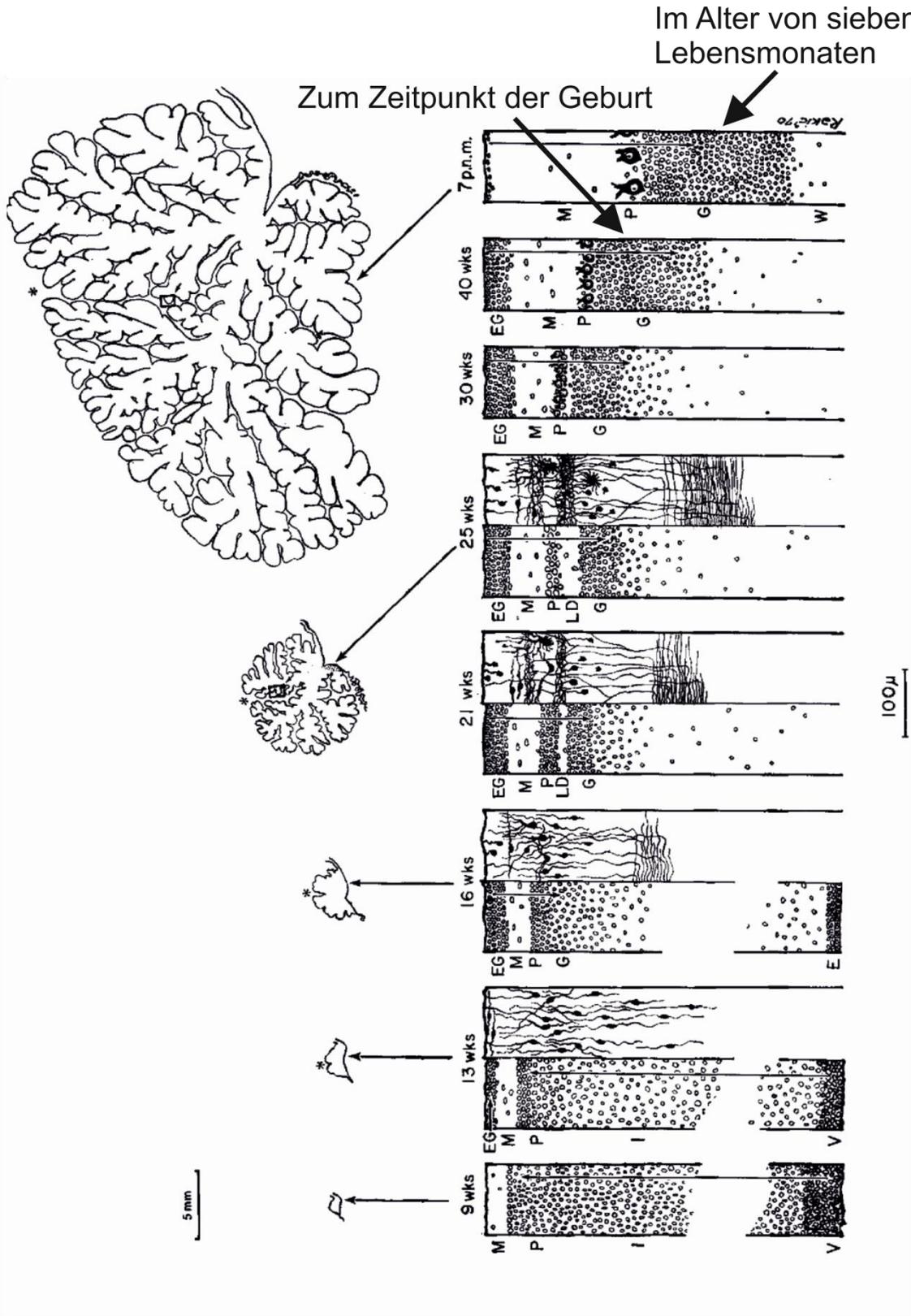


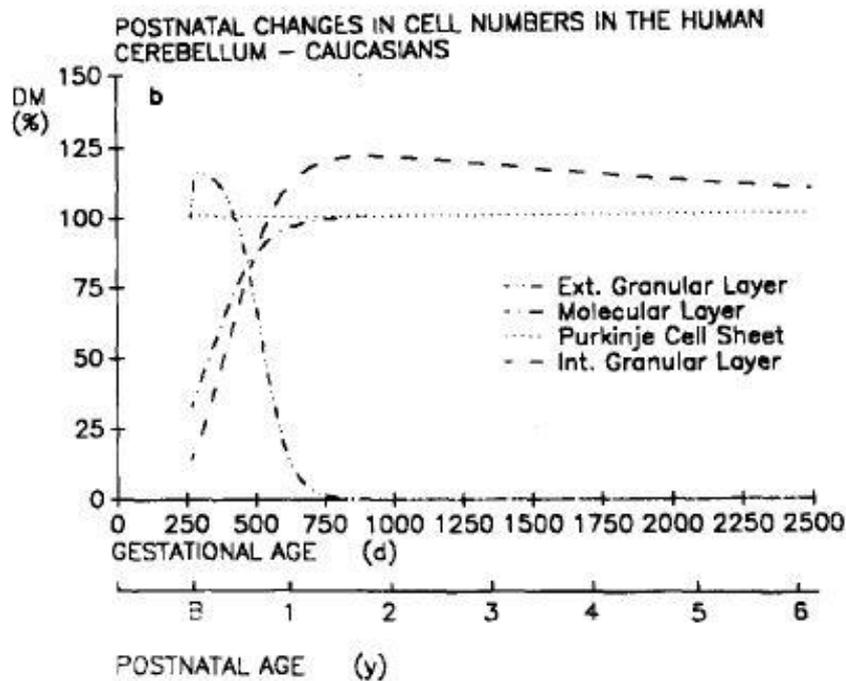
Abbildung 4.2: Schemazeichnung zum zeitlichen Verlauf der Entwicklung des menschlichen Kleinhirns nach Sidman und Rakic (1973; Abbildung 7 aus dieser Publikation). Die von Sidman und Rakic (1973) postulierten Entwicklungsstufen der inneren Granularzellschicht zum Zeitpunkt der Geburt bzw. im Alter von sieben Lebensmonaten sind im oberen Teil der Abbildung hervorgehoben.

Im Nachgang zu Sidman und Rakic (1973) haben Abrahám et al. (2001) die Proliferationsaktivität in der äußeren und inneren Granularzellschicht des menschlichen Kleinhirns immunhistochemisch unter Verwendung des Antikörpers Ki-67 untersucht. Ki-67 ist ein zellulärer Marker für Proliferation (vgl. z.B. Scholzen und Gerdes, 2000). Nach Abrahám et al. (2001) unterliegt die pränatale Proliferationsrate zwar Schwankungen; im Mittel sind aber etwa knapp 50% aller Zellen in der äußeren Granularzellschicht pränatal immunpositiv für Ki-67. Vergleichbare Zahlen fanden die Autoren auch postnatal bis zu einem Alter von fünf Lebensmonaten, an dem immer noch etwa ein Drittel aller Zellen in der äußeren Granularzellschicht immunpositiv für Ki-67 waren (für spätere Zeitpunkte liegen in der Arbeit von Abrahám et al. [2001] keine Daten vor).

Auf den ersten Blick scheinen die Daten von Abrahám et al. (2001) die Ergebnisse von Sidman und Rakic (1973) zu unterstützen. Entscheidend ist aber, dass die Daten von Abrahám et al. (2001) auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gut vereinbar sind. Tatsächlich sagt der prozentuale Anteil Ki-67 immunpositiver Zellen in der äußeren Granularzellschicht nämlich nichts über das Schicksal dieser Zellen aus – also weder darüber, ob die Nachkommen dieser Zellen (nach der durch die Immunpositivität für Ki-67 angenommenen Zellteilung) auch tatsächlich in die innere Granularzellschicht migrieren, noch darüber, ob sie in der inneren Granularzellschicht auch tatsächlich überleben (dieser Aspekt wird im nächsten Abschnitt wieder aufgenommen). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass Abrahám et al. (2001) auch in der inneren Granularzellschicht des menschlichen Kleinhirns in den ersten postnatalen Lebensmonaten vereinzelt Ki-67 immunpositive Zellen beschrieben. Bei diesen Zellen handelt es sich jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach um proliferierende Vorläufer von Gliazellen.

Den Daten von Sidman und Rakic (1973) stehen eindeutig die von Riedel et al. (1989) ermittelten Daten entgegen, die bisher die verlässlichste Quelle hinsichtlich einer überwiegend postnatalen Granularzellentwicklung im menschlichen Kleinhirn darstellten. Riedel et al. (1989) haben, ebenso wie Sidman und Rakic (1973), ihre Ergebnisse graphisch verdeutlicht (Abbildung 4 rechts in Riedel et al. 1989; in der vorliegenden Arbeit in Abbildung 4.3 gezeigt), ohne absolute Zellzahlen anzugeben. Die von Riedel et al. (1989) publizierte Graphik veranschaulicht einen massiven Anstieg der Zellzahl in der inneren Granularzellschicht vom Zeitpunkt der Geburt bis zu einem Alter von ca. 1,5 Jahren, mit

anschließendem Abfall der Gesamtzahl von Granularzellen im Kleinhirn um ca. 25% bis zu einem Alter von sechs Jahren. Ein Vergleich des Entwicklungsverlaufes nach dem ersten Lebensjahr ist basierend auf der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da in der vorliegenden Arbeit nur Kleinhirne von Kindern bis zu einem Alter von elf Monaten untersucht wurden.



**Abbildung 4.3:** Schemazeichnung zum zeitlichen Verlauf der Entwicklung des menschlichen Kleinhirns nach Riedel et al. (1989, Abbildung 4 in der genannten Publikation). Die Abbildung zeigt eine altersabhängige Entwicklung der Anzahl von Zellen in den einzelnen Schichten des Kleinhirns. DM: „degree of maturity“, d.h. Ausmaß der Reifung – relative Werte im Vergleich zu Mittelwerten von adulten Kontrollen. B: „birth“ - Zeitpunkt der Geburt.

Überraschenderweise entsprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstaunlich gut den Ergebnissen von Riedel et al. (1989), trotz der erheblichen methodischen Probleme der Untersuchung von Riedel et al. (1989) (bereits im Kapitel „Einleitung“ oben im Text ausführlich dargelegt): (i) keine Analyse mit stereologischen Methoden; (ii) keine Auswahl des zu untersuchenden Gewebes nach *systematic random sampling* Kriterien; (iii) wohl daraus resultierend falsche Daten zu Gesamtzahlen von Granularzellen und Purkinjezellen, sowie (iv) falsche Daten zur Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle im menschlichen Kleinhirn. Möglicherweise ist der Arbeit von Riedel et al. (1989) auch deswegen in der Literatur praktisch keine Bedeutung geschenkt worden; bis heute wurde diese Arbeit insgesamt nur elf Mal zitiert, wobei die hier in Abbildung 4.3 gezeigten postnatalen

Veränderungen von Zellzahlen im menschlichen Kleinhirn praktisch überhaupt keine Berücksichtigung fanden. Ein weiterer Aspekt in dieser Hinsicht könnte sein, dass Riedel et al. (1989) die grundlegenden, oben zitierten Ergebnisse von Sidman und Rakic (1973) zwar zitierten, aber in keinster Weise kommentierten.

#### **4.7.2 Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle im Kleinhirn – die „*numerical matching hypothesis*“**

Nach der in der Literatur allgemein formulierten und für Mäuse experimentell bestätigten „*numerical matching hypothesis*“ geht man davon aus, dass während der Entwicklung des Kleinhirns die Gesamtzahl von (zuerst angelegten) Purkinjezellen die Gesamtzahl von (später angelegten) Granularzellen determiniert (siehe z.B. Herrup und Sunter, 1987; Chen und Hillman, 1989; Vogel et al., 1989; Herrup et al., 1996). Dabei scheint es so zu sein, dass zunächst mehr Granularzellen angelegt werden als später in der inneren Granularzellschicht vorhanden sind, und die überzähligen Granularzellen durch fehlenden Support seitens der Purkinjezellen durch Apoptose absterben (siehe z.B. Herrup et al., 1996). Dieses „*numerical matching*“ reguliert wohl nicht nur die spezies-spezifische physiologische Gesamtzahl von Granularzellen (bzw. die spezies-spezifische physiologische Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle), sondern ermöglicht auch Korrekturen bei falsch ausgebildeten Projektionen sowie bei Fehlern in der räumlichen Anordnung der Neurone (Herrup et al., 1996; Vogel et al., 1989).

Stehen nun während der Entwicklung des Kleinhirns nicht genügend „normale“ (d.h. normal ausgebildete und normal positionierte) Purkinjezellen zur Verfügung (z.B. experimentell induziert durch Injektion von Methylazoxymethanolacetat [MAM] in ein Versuchstier zum Zeitpunkt der Bildung der Purkinjezellen im sich entwickelnden Kleinhirn), ist die finale Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht ebenfalls entsprechend vermindert (und zwar so, dass die Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle normal ist [Chen und Hillman, 1989]). Wird umgekehrt z.B. experimentell nach der Anlage der Purkinjezellen die Anlage der Granularzellen behindert (z.B. durch Injektion von MAM), wird dadurch zwar die finale Gesamtzahl von Granularzellen vermindert, nicht aber die finale Gesamtzahl von Purkinjezellen (Chen und Hillman, 1989). Aus diesen experimentellen Daten sowie den Ergebnissen einer Vielzahl von weiteren Untersuchungen an bestimmten Mausmutanten schlossen Chen und Hillman (1989) sowie insbesondere die Arbeitsgruppe von Karl Herrup (siehe z.B. Wetts und Herrup, 1983; Herrup und Sunter, 1987; Williams und Herrup, 1988), dass den Purkinjezellen eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Granularzellen im sich entwickelnden Kleinhirn zukommt – und zwar nicht primär in Bezug auf die Proliferation der Vorläufer der Granularzellen, sondern vielmehr in Bezug auf das

Überleben von in die innere Granularzellschicht migrierten Granularzellen u.a. durch adäquate synaptische Kontakte zwischen den Granularzellen und den Purkinjezellen in der Molekularschicht.

Diese Erkenntnisse haben dazu geführt, dass das Verhältnis der Gesamtzahl von Granularzellen und der Gesamtzahl von Purkinjezellen bei Experimenten als Indikator für den möglichen Zeitpunkt einer Schädigung während der Entwicklung des Kleinhirns herangezogen werden kann (Tabelle 4.2) – und grundsätzlich wäre gleiches auch in der Neuropathologie möglich. Für die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben diese Überlegungen aber keine direkte Relevanz, da keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und den Kontrollen gefunden wurden.

**Tabelle 4.2:** Mögliche Änderungen des Verhältnisses der Gesamtzahl von Granularzellen und der Gesamtzahl von Purkinjezellen im Kleinhirn, sowie ihre Bedeutung für Entwicklungsprozesse des Kleinhirns nach der „numerical matching hypothesis“

Gesamtzahl von Granularzellen	Gesamtzahl von Purkinjezellen	Interpretation
normal	normal	Normale Entwicklung
vermindert	normal	Granularzellschädigung bei normal ausgebildeten Purkinjezellen; oder Purkinjezellen zwar vorhanden, aber geschädigt
normal	vermindert	Purkinjezellschädigung nach normaler Anlage der Granularzellen
vermehrt	vermehrt	Anlage einer unphysiologisch hohen Anzahl von Purkinjezellen

#### 4.7.3 Molekulare Schlüsselmechanismen bei der Einstellung der finalen Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle im Kleinhirn

Dem Protein *Sonic hedgehog* wird eine Schlüsselfunktion bei der Einstellung der finalen Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle in der Entwicklung des Kleinhirns zugesprochen (Wallace, 1999). Bei Ratten (Charytoniuk et al., 2002), Mäusen (Wallace, 1999) und auch Hühnern (Marti und Bovolenta, 2002) wird *Sonic hedgehog* sowohl von migrierenden Vorläufern der Purkinjezellen als auch von in der Purkinjezellschicht etablierten Purkinjezellen sezerniert. Beim Menschen ist bekannt, dass in der Purkinjezellschicht etablierte Purkinjezellen *Sonic hedgehog* exprimieren (Haldipur et al., 2012). *Sonic hedgehog* ist sowohl an der Regulation der Proliferation der Vorläufer der Granularzellen in

der äußeren Granularzellschicht beteiligt (Dahmane und Ruiz i Altaba, 1999; Marti und Bovolenta, 2002; Haldipur et al., 2012), als auch indirekt - über die Differenzierung der Bergmann-Glia - an der korrekten Migration der Vorläufer der Granularzellen auf ihrem Weg von der äußeren in die innere Granularzellschicht (Dahmane und Ruiz i Altaba, 1999). Darüber hinaus scheint *Sonic hedgehog* auch unabhängig von der Einflussnahme durch die Purkinjezellen auf die Zellproliferation innerhalb der äußeren Granularzellschicht zu wirken (Haldipur et al., 2012). Störungen der *Sonic hedgehog*-Signaltransduktionskaskade können fatale Auswirkungen auf die Entwicklung des Kleinhirns haben. Konkret führt die Blockade der Funktion von *Sonic hedgehog* während der Entwicklung des Kleinhirns zu einer Blockade der normalen Differenzierung sowohl der Purkinjezellen als auch der Bergmann-Glia, und verursacht eine massive Reduktion der Anzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht (Dahmane und Ruiz i Altaba, 1999).

Nach Goodrich et al. (1996) handelt es sich bei der *Sonic hedgehog*-Signaltransduktionskaskade um einen in der Evolution für Insekten und Säuger konservierten Pathway zur Etablierung wichtiger zytoarchitektonischer Merkmale („pattern formation“) im Gehirn. Dabei scheint *Sonic hedgehog* nicht nur für die embryonale Entwicklung notwendig zu sein, sondern spielt auch im erwachsenen Gehirn offenbar eine wichtige Rolle (Traiffort et al., 1998; Lewis et al., 2004).

Nun zeigten Haldipur et al. (2012) kürzlich, dass beim Menschen die Ausschüttung von *Sonic hedgehog* durch die Purkinjezellen postnatal herunterreguliert werden soll. Wenn nun aber im menschlichen Kleinhirn der größte Teil der Granularzellen erst postnatal angelegt wird und in diesem Zeitraum von den Purkinjezellen kein *Sonic hedgehog* exprimiert wird, so würden die Ergebnisse von Haldipur et al. (2012) bedeuten, dass die molekulare Kontrolle der Einstellung der finalen Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle – und somit die molekulare Kontrolle des *numerical matchings* – bei der Entwicklung des menschlichen Kleinhirns fundamental anders geregelt sein müsste als bei Mäusen und Ratten. Die immunhistochemischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen jedoch eindeutig dagegen. *Sonic hedgehog* wird im menschlichen Kleinhirn auch während des gesamten Zeitraums der postnatalen Anlage der inneren Granularzellschicht von den Purkinjezellen exprimiert (vgl. Abbildung 3.28 im Teil „Ergebnisse“ oben im Text). Warum Haldipur et al. (2012) zu einem anderen Ergebnis gekommen sind, muss unklar bleiben. Eventuell haben diese Autoren einen nicht optimalen Primärintikörper gegen *Sonic hedgehog* verwendet.

#### **4.8 Exogene und endogene Faktoren, die zu Beeinträchtigungen und Veränderungen des Kleinhirns führen können, und die Beteiligung von Kleinhirnveränderungen an verschiedenen Krankheitsbildern**

Aus der langen Zeitspanne der Kleinhirnentwicklung, die embryonal beginnt und sich postnatal fortsetzt (Sidman und Rakic, 1973), ergibt sich ein hohes Potential für Entwicklungsstörungen (Ten Donkelaar et al., 2003). Dabei begünstigt die Art der Kleinhirnentwicklung die Möglichkeit zur Entstehung von Entwicklungsstörungen. Wie oben bereits im Detail ausgeführt, entstammen die Neurone der Kleinhirnrinde nicht nur zwei unterschiedlichen Keimzentren (Hajashi und Jakob, 1924), sondern entstehen zudem zeitversetzt (Ten Donkelaar et al., 2003) und differenzieren auch zeitversetzt. Grundsätzlich sind im Kleinhirn für die Migration der Vorläufer der Purkinjezellen und der Granularzellen zwei gegenläufige Richtungen gegeben: die Vorläufer der Purkinjezellen wandern von innen nach außen und legen die Purkinjezellschicht an. Dagegen wandern die Vorläufer der Granularzellen erst anschließend von außen nach innen durch die Molekularschicht und die - dann schon angelegte - Purkinjezellschicht hindurch in die so entstehende innere Granularzellschicht (Rakic und Sidman, 1970; Sidman und Rakic, 1973). Für diese relativ lange Zeitspanne der Migration der Purkinjezellen und Granularzellen kann man daher von einer hohen Plastizität des Kleinhirns ausgehen.

Vielfältige Faktoren können sowohl pränatal als auch postnatal Veränderungen am Kleinhirn verursachen. Bei dieser Betrachtung liegt das Augenmerk auf den verschiedenen Einflüssen, die Kleinhirnveränderungen verursachen können. Dabei spielen nicht nur genetisch bedingte (siehe z.B. Giunti et al., 1998; Svetel et al., 1999; Baloh und Jen, 2002; Lax et al., 2012; Yevenes et al., 2012) und degenerative (Svetel et al., 1999; Conte et al., 2012) Veränderungen eine Rolle; vielmehr kommen auch vielfältige andere endogene und exogene Ursachen in Frage: zum Beispiel Durchblutungsstörungen (Schmahmann, 2004), metabolische Inbalancen (Schmahmann, 2004), Entzündungsreaktionen (Bakshi et al., 1998; Teive et al., 2001; Karunarathne et al., 2012), Infektionen (Oshinowo et al., 1998; Kato et al., 2011; Karunarathne et al., 2012), iatrogene Störungen (Schmahmann, 2004), Traumata (Seo et al., 2010; Luan et al., 2012) oder auch Tumore (Kim et al., 2011; Ogiwara et al., 2011). Zum Beispiel können Infarkte (Savic und Savic, 2010; Jo et al., 2012), Probleme im Vitamin E-Haushalt (Yevenes et al., 2012), Alkoholkonsum (Varnas et al., 2007; Rogers et al., 2012), HIV (Tagliati et al., 1998; Klunder et al., 2008) oder auch Multiple Sklerose (Waxman, 2005; Shields et al., 2012) Beeinträchtigungen hervorrufen, die mit Kleinhirnveränderungen einhergehen können.

Andererseits können Kleinhirnveränderungen auch als pathologische Komponente eines Krankheitsbildes maßgeblich an dessen Erscheinungsbild beteiligt sein. Dazu zählen zum

Beispiel Schizophrenie (siehe z.B. Joyal et al., 2004; Andreasen und Pierson, 2008), *Attention Deficit Hyperactivity Disorder* (ADHD) (siehe z.B. Mostofsky et al., 1998; Castellanos et al., 2001; Durston et al., 2011), bipolare Störungen (siehe z.B. Strakowski et al., 2005; Baldaçara et al., 2011b), Demenzerkrankungen (siehe z.B. Wegiel et al., 1999; Baldaçara et al., 2011a; Bermejo-Pareja und Medscape, 2011) und Autismus (Hashimoto et al., 1995; Christakou et al., 2012) (die genannten Zitate stehen jeweils repräsentativ für eine Vielzahl von Arbeiten in der Literatur zu den genannten Erkrankungen). Bei all diesen Erkrankungen scheint zumindest ein Teil des Krankheitsbildes auf eine Kleinhirnbeteiligung zurückzuführen zu sein.

#### **4.9 Beteiligung des Kleinhirns an motorischen, kognitiven, emotionalen und psychischen Erkrankungen, und Auswirkungen von Veränderungen des Kleinhirns**

Dem Kleinhirn kommt, wie lange Zeit vermutet, nicht nur eine wichtige Rolle in der Bewegungskoordination zu (siehe z.B. Holmes, 1939; Perlman, 2000; Picard et al., 2008; Misciagna, 2011). Vielmehr hat es auch massiven Einfluss auf diverse kognitive (siehe z.B. Dreher und Grafman, 2002; Picard et al., 2008; Timmann, 2012), emotionale (Stoodley et al., 2012; Villanueva, 2012) und psychische (siehe z.B. Frank et al., 2007; Picard et al., 2008) Prozesse des täglichen Lebens und die Persönlichkeit eines Menschen. Darunter fallen auch Aspekte wie die Aufmerksamkeit (Dreher und Grafman, 2002), die Geschwindigkeit der Informationsverarbeitung, das Arbeitsgedächtnis (Ding et al., 2012), Lernprozesse (siehe z.B. Steinlin, 2008; Lagarde et al., 2009), die Sprache (Steinlin, 2008; Lagarde et al., 2009) sowie das räumliche Sehen (Silveri et al., 2001; Steinlin, 2008; Misciagna, 2011). Beeinträchtigungen des Kleinhirns werden unter anderem auf der motorischen Ebene mit Ataxien (Kovacevic et al., 1992; Toru et al., 2000; Bonthius, 2011) in Verbindung gebracht, und auf der nicht-motorischen Ebene im kognitiven Bereich mit Lernschwierigkeiten sowie im emotionalen Bereich mit Abstumpfung bis hin zur Depression oder Enthemmung oder zu psychotischen Ausprägungen (Schmahmann, 2004).

Die von Kleinhirn-Veränderungen betroffenen Aspekte der menschlichen Gehirnfunktion gehen also weit über rein motorische Dysfunktionen hinaus. Die funktionellen Auswirkungen richten sich erheblich nach der von der Kleinhirnveränderung betroffenen Stelle (Stoodley und Schmahmann, 2010). So sind den verschiedenen Kleinhirnarealen verschiedene Systeme zugeordnet: (i) die Hemisphären repräsentieren unter anderem das kognitive System, (ii) Affekt und Psychosen finden im posterioren Vermis ihre Entsprechung, (iii) die Motorik im anterioren Vermis (Joyal et al., 2004), (iv) das Ego im Vestibulocerebellum (Frick, 1982), (v) der Nucleus dentatus mit seinen Assoziationsgebieten hat Verbindungen mit dem

Sprachsystem (Schmahmann, 2004), und (vi) die lateralen Anteile des Kleinhirns werden mit der Emotion in Verbindung gebracht (Reiman et al., 1997).

Die Auswirkungen können sich dann beispielsweise folgendermaßen darstellen: eine Agenesese des Kleinhirns wirkt sich auf alle genannten Lebensbereiche aus und manifestiert sich als motorisches, intellektuelles, emotionales und psychiatrisches Defizit. Eine Kleinhirnatrophie hingegen wird mit bipolaren Störungen (Baldaçara et al., 2011b) und Stimmungsschwankungen assoziiert, während das Kleinhirnvolumen bei Demenzerkrankungen verringert ist (Baldaçara et al., 2011a). Eine Atrophie des Kleinhirnkortex zusammen mit einer Beeinträchtigung des olivo-ponto-cerebellären Systems hat kognitive Auswirkungen und betrifft die Lernfähigkeit und die Erinnerung (vgl. z.B. Gasbarri et al., 2003). Bei Kindern mit einer Störung des Vermis, die im Kleinhirn den Bereich der Affektregulierung repräsentiert (Levisohn et al., 2000), wurden autistische Merkmale beobachtet (Hashimoto et al., 1995), und auch für die Entstehung von ADHD scheint die Ausprägung des Vermis eine erhebliche Rolle zu spielen (Berquin et al., 1998; Mostofsky et al., 1998; Castellanos et al., 2001). Der Vermis zeigt auch Veränderungen im anterior-superioren Anteil bei Schizophrenie (siehe z.B. Martin und Albers, 1995) und Alkoholmissbrauch (siehe z.B. Phillips et al., 1987). Der posterior-inferiore Anteil hingegen zeigt sich bei bipolaren Störungen (Baldaçara et al., 2011b) mit multiplen Episoden und ADHD beeinträchtigt (Berquin et al., 1998; Mostofsky et al., 1998; Castellanos et al., 2001). Zusätzlich zu den im Vermis vorhandenen Veränderungen fanden sich bei Autismus auch Veränderungen in den Kleinhirnhemisphären (siehe z.B. Palmen et al., 2004).

Alle diese beispielhaft angeführten Auswirkungen und Erkrankungen haben diverse Erscheinungsformen in unterschiedlichen Gehirnarealen, wobei das Kleinhirn aber an der Ausprägung dieser Erkrankungen maßgeblich beteiligt zu sein scheint. So haben Kleinhirnveränderungen auch hier je nach dem betroffenen Bereich des Kleinhirns Auswirkungen auf die jeweils zugeordnete motorische, emotionale, psychische oder kognitive Komponente. Daraus lässt sich ein Zusammenhang zwischen Entwicklungsstörungen des Kleinhirns und neurologisch bedingten Verhaltensauffälligkeiten erahnen (Schmahmann, 2004). Das Dandy-Walker-Syndrom zum Beispiel, charakterisiert durch eine auf Entwicklungsprobleme zurückzuführende Fehlbildung in der Vermislobulation (Steinlin, 2008), geht unter anderem mit kognitiven Störungen einher.

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit soll nun insbesondere die postnatale Vulnerabilität des Kleinhirns und die sich daraus möglicherweise ergebenden Folgen exemplarisch an einem aktuellen Beispiel erläutert werden.

Frühgeburten haben in den letzten Jahren zunehmend klinische Relevanz bekommen (die Weltgesundheitsorganisation [WHO] definiert Frühgeburt als Geburt vor Vollendung der

37. Schwangerschaftswoche bzw. vor dem 259. Tag nach Gestation; vgl. z.B. Beck et al., 2010). Die Rate von Frühgeburten beläuft sich in den westlichen Industriegesellschaften heute auf etwa 8%, mit steigender Tendenz (Beinder, 2006). Frühgeburten sind immer noch in einem erheblichen Ausmaß für Sterbefälle rund um die Geburt verantwortlich. Die Prävalenz einer Frühgeburt zwischen der 28. und 31. Schwangerschaftswoche beträgt etwa 15% (Goldenberg et al., 2008).

Bei drohender Gefahr einer Frühgeburt werden die Feten zur Unterstützung der Lungenreifung intrauterin mit Glukokortikoiden (speziell: Betamethason) behandelt, woraus sich keine Beeinträchtigung des Kleinhirns abzuleiten scheint (Tam et al., 2011). Im Gegensatz dazu kann eine früh-postnatale Behandlung mit Glukokortikoiden (z.B. zur Verhinderung einer bronchopulmonalen Dysplasie; Aden et al., 2008) neben möglichen negativen Auswirkungen z.B. auf den Gastrointestinaltrakt (Subhedar et al., 1997; The Vermont Oxford Network Steroid Study Group, 2001) fatale Folgen für die Kleinhirnentwicklung haben (Parikh et al., 2007). Eine kürzlich durchgeführte Magnetresonanztomografie-Untersuchung an frühgeborenen Kindern, die früh-postnatal mit Glukokortikoiden behandelt wurden, zeigte eine mittlere Volumenverminderung des Kleinhirns von 8-10% im Vergleich zu nicht mit Glukokortikoiden behandelten frühgeborenen Kindern (Tam et al., 2011). Eine frühere Studie von Parikh et al. (2007) zur gleichen Problematik war sogar auf eine mittlere Volumenverminderung des Kleinhirns von etwas mehr als 20% gekommen, aber nur etwas weniger als 9% Volumenverminderung der Großhirnrinde nach früh postnataler Gabe von Dexamethason bei sogenannten „*extremely low birth weight infants*“ mit einem Geburtsgewicht von weniger als 1000 g. Die Gründe für diese Verminderung des Kleinhirnvolumens beim Menschen nach früh-postnataler Gabe von Glukokortikoiden sind bis heute völlig unbekannt.

Aus Versuchen an Mäusen und Ratten weiß man jedoch, dass die früh-postnatale Gabe von Glukokortikoiden zum Zeitpunkt der Existenz der äußeren Granularzellschicht im Kleinhirn zu einem vorzeitigen Verschwinden der äußeren Granularzellschicht führt, verbunden mit einer Verringerung der Anzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht bei den behandelten Tieren (Bohn und Lauder, 1980; Noguchi et al., 2008). Darüber hinaus scheinen Glukokortikoide einen hemmenden Einfluss auf den *Sonic hedgehog*-Signalweg auszuüben, dem ja, wie bereits beschrieben (vgl. Abschnitt 4.7.3 oben im Text), eine wichtige mitogene Rolle bei der Entstehung der Granularzell-Vorläufer zugeschrieben wird (Heine et al., 2011). Schließlich weiß man aus Versuchen an Küken, dass eine frühe postnatale Glukokortikoidgabe nicht nur Auswirkungen auf die äußere Granularzellschicht hat; vielmehr kann sie auch einen zusätzlichen, direkten Effekt auf die Zellen in der inneren Granularzellschicht haben, und zwar im Sinne einer vermehrten

Apoptoserate (Aden et al., 2008). Insgesamt kann also bei Versuchstieren eine früh-postnatale Gabe von Glukokortikoiden zu einer irreversiblen Verminderung der Anzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht des Kleinhirns führen.

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und dem geschilderten Wissen aus der Literatur scheint nun die Hypothese vertretbar, dass der Volumenverminderung des Kleinhirns bei früh-postnataler Gabe von Glukokortikoiden bei frühgeborenen Kindern eine (ohne adäquate Therapie möglicherweise irreversible) Verminderung der Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht des Kleinhirns zugrunde liegt – und somit eine (ohne adäquate Therapie möglicherweise irreversible) Störung des *numerical matchings* im Kleinhirn. Zwar ist bekannt, dass auch andere Regionen des Gehirns nach früh-postnataler Glukokortikoidgabe Veränderungen aufweisen können (Parikh et al., 2007). Die besondere Beeinträchtigung des Kleinhirns nach früh-postnataler Glukokortikoidgabe ist aber möglicherweise damit zu erklären, dass im Kleinhirn postnatal gegenüber anderen Regionen des Gehirns mehr Glukokortikoidrezeptoren vorhanden sind (Pavlik und Buresova, 1984).

Von entscheidender klinischer Bedeutung ist nun die Tatsache, dass Volumenvermindernungen des Kleinhirns mit massiven Auswirkungen auf die Entwicklung einhergehen können, die sich im Schulalter als Defizit der motorischen und kognitiven Fähigkeiten manifestieren können (Yeh et al., 2004). Auch zu dieser Problematik liegen in der Literatur Berichte über entsprechende Untersuchungen an Versuchstieren vor. So beschrieb Gramsbergen (2003) die früh-postnatale Behandlung von Ratten mit Glukokortikoiden zu einem Zeitpunkt, der beim Menschen dem siebten bzw. achten Schwangerschaftsmonat entspricht. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren entwickelten die mit Glukokortikoiden behandelten Tiere eine weniger flüssige Motorik sowie Abweichungen in der Körperhaltung. Außerdem zeigten die behandelten Tiere einen dem Intentionstremor ähnlichen Tremor. Die motorischen Defizite beinhalteten auch unübliche Schrittlängen und ein unsicheres Gangbild. Die flüssige Abfolge und die Art der Bewegungen verbesserte sich zwar mit zunehmendem Alter; die Hinterbeine der mit Glukokortikoiden behandelten Tiere behielten aber viele Tage eine Außenrotation bei. Zusammenfassend schloß Gramsbergen (2003) bei einer früh-postnatalen Glukokortikoidgabe bei Frühchen auf langanhaltende motorische Defizite aufgrund von Veränderungen im Kleinhirn, und verwies auf die Wichtigkeit dieser Beeinträchtigung auf die motorischen Defizite bei Kindern.

Heine et al. (2011) haben die Reduktion des Volumens des Kleinhirns nach früh-postnataler Glukokortikoidgabe als Problem erkannt und versuchten, den negativen Auswirkungen dieser Behandlung entgegenzusteuern. Aus Voruntersuchungen von z.B. Wang et al. (2010) war bekannt, dass Glukokortikoide das sogenannte „*sonic hedgehog*–

*smoothened (Shh-Smo) signaling*“ inhibieren, wobei das „*Shh-Smo signaling*“ das wichtigste mitogene Signal für die Proliferation der Vorläufer der Granularzellen in der äußeren Granularzellschicht darstellt. Heine et al. (2011) behandelten Mäuse am Postnataltag 0 oder 1 systemisch mit Glukokortikoiden und gleichzeitig mit einem „*Shh-Smo signaling*“-Agonisten (SAG). Im Vergleich zu Kontrolltieren, die lediglich mit Glukokortikoiden behandelt wurden, zeigten die auch mit SAG behandelten Tiere ebenfalls eine beschleunigte Lungenreifung, aber keine negativen Auswirkungen auf die Entwicklung des Kleinhirns. Es bleibt abzuwarten, ob sich aus diesen experimentellen Befunden eines Tages neue Therapiemöglichkeiten für den Menschen zur Verhinderung von Störungen der Kleinhirnentwicklung (und dabei insbesondere wohl von Störungen der Etablierung der Granularzellen in der inneren Granularzellschicht) nach früh-postnataler Gabe von Glukokortikoiden ergeben.

#### **4.10 Mögliche positive Beeinflussung der Kleinhirnentwicklung durch gezielte Stimulation in der frühkindlichen Phase**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der überwiegende Teil der Granularzellen in der inneren Granularzellschicht des menschlichen Kleinhirns erst postnatal innerhalb des ersten Lebensjahres entsteht, und daher auch die Migration und nachfolgende Differenzierung der Vorläufer dieser Zellen postnatal stattfindet. Daraus lässt sich schließen, dass das Kleinhirn in dieser Zeit eine sehr hohe Plastizität aufweist. Dies bedingt, dass das Kleinhirn in dieser Zeit sehr empfindlich auf innere und äußere Einflüsse reagieren kann. Einerseits ergibt sich daraus zwar die Gefahr einer Schädigung des Kleinhirns durch negative Einflüsse insbesondere im ersten Lebensjahr (vgl. die Abschnitte 4.8 und 4.9 oben im Text); andererseits ermöglicht die Plastizität des Kleinhirns gegebenenfalls die Gelegenheit zur positiven Beeinflussung der Kleinhirnentwicklung gerade im ersten Lebensjahr.

Insgesamt muss man festhalten, dass die in der Vergangenheit angestellten Untersuchungen zwar von einer postnatalen Weiterentwicklung des Kleinhirns ausgingen, dabei aber entweder das Ausmaß dieser postnatalen Entwicklung (Rakic and Sidman, 1970; Sidman und Rakic, 1973) oder aber die Bedeutung dieser postnatalen Entwicklung (Riedel et al., 1989) erheblich unterschätzten. Daher erscheint es dringend geboten, die bisher durchgeführten Untersuchungen zur postnatalen Entwicklung des Kleinhirns und alle sich daraus ergebenden funktionellen Konsequenzen nicht nur für die Entwicklung der Motorik neu zu bewerten. Es erscheint durchaus plausibel, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu völlig neuen Ansatzpunkten z.B. zur gezielten Stimulation der Motorik im ersten Lebensjahr führen könnten, die ihrerseits positiv auf die postnatale Neurogenese im

Kleinhirn, auf die weitere frühkindliche Entwicklung des Kleinhirns, aber auch insgesamt auf die generelle Entwicklung von motorischen, emotionalen und kognitiven Fähigkeiten des Menschen in späteren Lebensjahren wirken könnten. Im Extremfall könnte man daran denken, eines Tages eventuell sogar Krankheiten, die mit dem Kleinhirn in Verbindung stehen – wie beispielsweise Schizophrenie oder Autismus – durch gezielte Stimulation der Motorik im ersten Lebensjahr präventiv entgegenzuwirken.

Als möglicher klinischer Indikator einer solchen positiven Beeinflussung der Kleinhirnentwicklung könnten dabei Volumenveränderungen des Kleinhirns dienen, die mittels Magnetresonanztomografie *in vivo* untersucht werden können. In der vorliegenden Arbeit ging die Zunahme der Gesamtzahl von Granularzellen in der inneren Granularzellschicht des Kleinhirns mit zunehmendem Lebensalter mit einer Zunahme des Volumens der drei untersuchten Kleinhirnschichten (Molekularschicht, innere Granularzellschicht, weiße Substanz) einher. Wie aber weiter oben erwähnt wurde, muss die Korrelation zwischen dem Volumen einer Gehirnregion und der Gesamtzahl von Nervenzellen in dieser Gehirnregion insbesondere unter pathologischen Bedingungen immer mit Vorsicht interpretiert werden. Hier sind weitere, umfangreiche Studien sowohl am Menschen als auch an Versuchstieren angezeigt.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der Hauptuntersuchung der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung der Hypothese, dass sich beim plötzlichen Kindstod („sudden infant death syndrome“; SIDS) im Vergleich zu alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen (d.h. bei Kindern, die innerhalb des ersten Lebensjahres nicht an SIDS verstorben waren), im Kleinhirn veränderte Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen finden. Hintergrund dieser Hypothese waren (i) Spekulationen in der Literatur über eine mögliche Rolle des Kleinhirns in der Pathogenese von SIDS sowie (ii) wiederholte Berichte in der neuropathologischen Literatur über mögliche Veränderungen der oben genannten Parameter bei SIDS. Diese neuropathologischen Berichte widersprechen sich jedoch gegenseitig teilweise erheblich, d.h. manche dieser Studien berichteten Veränderungen der oben genannten Parameter bei SIDS, andere Studien hingegen nicht. Wichtig ist dabei, dass keine dieser Untersuchungen in der Literatur mit „*design-based*“ stereologischen Methoden (d.h. dem „*state of the art*“ der quantitativen Histologie) durchgeführt wurde. Dementsprechend muss unklar bleiben, ob (und wenn ja, in welchem Ausmaß) die beschriebenen Widersprüche in der neuropathologischen Literatur zur Beteiligung des Kleinhirns an der Pathogenese von SIDS auf die verwendeten Methoden zurückzuführen sind. Dies machte eine Neuauswertung der genannten Parameter im Kleinhirn bei SIDS mit *design-based* stereologischen Methoden notwendig. Darüber hinaus wurde in einer Nebenuntersuchung der Frage nachgegangen, ob im menschlichen Kleinhirn von den Purkinjezellen im ersten Lebensjahr *Sonic hedgehog* exprimiert wird, dem bei Labortieren (Maus, Ratte, Huhn) bei der Entstehung der inneren Granularzellschicht im Kleinhirn eine zentrale Steuerfunktion zukommt. Die Beantwortung dieser Frage bezog sich auf einen Bericht in der jüngeren Literatur, nach dem dies bei der Entwicklung des menschlichen Kleinhirns anders sein sollte.

Für die Hauptuntersuchung wurden insgesamt  $n=23$  Kleinhirnhälften (je eine Kleinhirnhälfte pro Fall) von Kindern untersucht, die im ersten Lebensjahr verstorben waren. Von diesen  $n=23$  Kleinhirnhälften stammten  $n=9$  von SIDS-Fällen (im Alter zwischen zwei und zehn Monaten verstorben),  $n=9$  von alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen, sowie  $n=5$  weitere von Kontrollen, die entweder in einem früheren oder einem späteren Alter als die SIDS-Fälle gestorben waren (sowie ein Kind, das im Alter von 8 Monaten gestorben war). Die Nebenuntersuchung erfolgte an insgesamt  $n=6$  Kleinhirnhälften (davon  $n=4$  SIDS-Fälle und  $n=2$  Kontrollen, die im Alter zwischen einem und zehn Monaten gestorben waren). Alle Kleinhirnhälften stammten aus einer Sammlung des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München und wurden dort in den Jahren 1999 bis 2001 durch Herrn Univ.Prof. Dr.med. Andreas Büttner (heute: Direktor des Instituts für Rechtsmedizin,

Universitätsklinikum Rostock) im Rahmen von Autopsien gesammelt. Die Verwendung dieser Kleinhirnhälften für die vorliegende Arbeit wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock unter der Nummer A2012-0053 genehmigt.

Bei der Hauptuntersuchung wurden für jede Kleinhirnhälfte an mit Nissl gefärbten 100 µm dicken parasagittalen Serienschnitten die folgenden Parameter mittels „*high-precision design-based stereology*“ bestimmt: (i) Volumen der Molekularschicht; (ii) Volumen der inneren Granularzellschicht (einschliesslich der Purkinjezellschicht); (iii) Volumen der weißen Substanz; (iv) Gesamtzahl von Purkinjezellen; (v) Gesamtzahl von Granularzellen (in der inneren Granularzellschicht); und (vi) Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle. Die Bestimmung der Volumina erfolgte mit dem sogenannten Cavalieri-Prinzip, und die Bestimmung der Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen mit dem sogenannten „*optical fractionator*“. Bei der Nebenuntersuchung erfolgte ein immunhistochemischer Nachweis von *Sonic hedgehog* und Calbindin in den Purkinjezellen.

Keiner der beschriebenen Parameter zeigte in der Hauptuntersuchung einen statistisch signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen den  $n=9$  SIDS-Fällen und den  $n=9$  alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen. Darüber hinaus zeigten die insgesamt  $n=14$  Kontrollen – bis auf die Gesamtzahl von Purkinjezellen – einen statistisch signifikanten ( $p < 0,05$ ) altersabhängigen Anstieg aller beschriebenen Parameter, wobei die jüngsten Kontrollen (am Tag der Geburt gestorben) im Vergleich zu den ältesten Kontrollen (im Alter von zehn bzw. elf Monaten gestorben) die folgenden relativen Mittelwerte aufwiesen: (i) Volumen der Molekularschicht: 6,4% ( $0,8 \text{ cm}^3$  gegenüber  $12,9 \text{ cm}^3$ ); (ii) Volumen der Granularzellschicht: 26,7% ( $4,0 \text{ cm}^3$  gegenüber  $14,9 \text{ cm}^3$ ); (iii) Volumen der weißen Substanz: 35,8% ( $2,5 \text{ cm}^3$  gegenüber  $7,1 \text{ cm}^3$ ); (iv) Gesamtzahl von Purkinjezellen: 84% ( $11,7 \times 10^6$  gegenüber  $13,9 \times 10^6$ ); (v) Gesamtzahl von Granularzellen: 12,7% ( $4,8 \times 10^9$  gegenüber  $37,6 \times 10^9$ ); und (vi) Anzahl von Granularzellen pro Purkinjezelle: 15,2% (411 gegenüber 2.692). Bei der Nebenuntersuchung gelang bei allen untersuchten Kleinhirnhälften der immunhistochemische Nachweis von *Sonic hedgehog* und Calbindin.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Gesamtzahlen von Purkinjezellen und Granularzellen bei den Kontrollen stimmten gut mit Daten aus der Literatur überein; gleiches gilt für die ermittelten Volumenzunahmen der einzelnen Schichten des Kleinhirns in Abhängigkeit vom Alter.

Die eingangs beschriebene Hypothese konnte nicht bestätigt werden. Somit können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dahingehend eingeordnet werden, dass die Suche nach möglichen, lichtmikroskopisch fassbaren morphologischen Veränderungen im Kleinhirn nach Färbung von Gehirnschnitten mit Routinefärbungen bei der Forschung zu SIDS als „*dead end*“ angesehen werden muss. Es erscheint auch unmöglich, aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Empfehlungen für die weitere Forschung zu SIDS abzuleiten. Darüber hinaus zeigte der immunhistochemische Nachweis von *Sonic hedgehog* bei allen in der Nebenuntersuchung analysierten Kleinhirnhälften, dass *Sonic hedgehog* auch beim Menschen bei der Entstehung der inneren Granularzellschicht im Kleinhirn eine zentrale Steuerfunktion zukommen kann.

Der entscheidende Aspekt der vorliegenden Arbeit war der Befund, dass mehr als 85% aller Granularzellen im menschlichen Kleinhirn postnatal entstehen. Es war in der Literatur bekannt, dass die Neurogenese der Granularzellen im menschlichen Kleinhirn sowohl prä- als auch postnatal stattfindet; das genaue Ausmaß der prä- und postnatalen Neurogenese der Granularzellen im menschlichen Kleinhirn war jedoch nicht bekannt. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass neben der Bildung der Granularzellen auch andere wichtige Aspekte der Kleinhirnentwicklung (Migration der Vorläuferzellen der Granularzellen aus der äußeren in die innere Granularzellschicht, synaptische Verschaltung der Granularzellen mit den Purkinjezellen sowie der Granularzellen mit den Moosfasern, etc.) im menschlichen Kleinhirn zum größten Teil postnatal stattfinden, und zwar während des gesamten ersten Lebensjahres. In Bezug auf diese zum größten Teil postnatal ablaufende Entwicklung unterscheidet sich das Kleinhirn höchstwahrscheinlich von sämtlichen anderen Regionen des menschlichen Zentralnervensystems. Der lange postnatale Zeitraum (erstes Lebensjahr) der menschlichen Kleinhirnentwicklung birgt die Gefahr vielfältiger (und bisher möglicherweise noch gar nicht bekannter) Schädigungsmöglichkeiten des Kleinhirns. So kann z.B. die kürzlich berichtete Volumenverminderung des Kleinhirns bei frühgeborenen Kindern, die früh-postnatal mit Glukokortikoiden behandelt wurden (im Vergleich zu nicht mit Glukokortikoiden behandelten frühgeborenen Kindern), durchaus auf einer (möglicherweise irreversiblen) Störung der oben genannten Aspekte der postnatalen Kleinhirnentwicklung beruhen, basierend auf einer gestörten Neurogenese der Granularzellen. Dabei ist von besonderer Bedeutung, dass das Kleinhirn nicht nur eine wichtige Rolle in der Bewegungskoordination, sondern auch massiven Einfluss auf diverse kognitive, emotionale und psychische Prozesse des täglichen Lebens und die Persönlichkeit eines Menschen hat (z.B. Aufmerksamkeit, die Geschwindigkeit der Informationsverarbeitung, das Arbeitsgedächtnis, Lernprozesse, die Sprache sowie das räumliche Sehen). Umgekehrt

bietet der lange postnatale Zeitraum der menschlichen Kleinhirnentwicklung jedoch auch vielfältige neue Möglichkeiten zur gezielten Prävention bzw. Therapie entsprechender Kleinhirnentwicklungsstörungen, z.B. durch gezielte Stimulation der motorischen Entwicklung. Dies sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

## 6 Literatur

Abrahám H, Tornoczky T, Kosztolanyi G, Seress L. Cell formation in the cortical layers of the developing human cerebellum. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19: 53-62.

Aden P, Goverud I, Liestol K, Loberg EM, Paulsen RE, Maehlen J, Lomo J. Low-potency glucocorticoid hydrocortisone has similar neurotoxic effects as high-potency glucocorticoid dexamethasone on neurons in the immature chicken cerebellum. *Brain Res* 2008; 1236: 39-48.

Agashiwala RM, Louis ED, Hof PR, Perl DP. A novel approach to non-biased systematic random sampling: a stereologic estimate of Purkinje cells in the human cerebellum. *Brain Res* 2008; 1236: 73-8.

Andersen BB. Reduction of Purkinje cell volume in cerebellum of alcoholics. *Brain Res* 2004; 1007: 10-8.

Andersen BB, Pakkenberg B. Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia. *Br J Psychiatry* 2003; 182: 354-61.

Andersen BB, Korbo L, Pakkenberg B. A quantitative study of the human cerebellum with unbiased stereological techniques. *J Comp Neurol* 1992; 326: 549-60.

Andersen BB, Gundersen HJ, Pakkenberg B. Aging of the human cerebellum: a stereological study. *J Comp Neurol* 2003; 466: 356-65.

Andersen K, Andersen BB, Pakkenberg B. Stereological quantification of the cerebellum in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 197.e11-20.

Anderson RH, Bouton J, Burrow CT, Smith A. Sudden death in infancy: a study of cardiac specialized tissue. *Br Med J* 1974; 2: 135-9.

Andreasen NC, Pierson R. The role of the cerebellum in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 81-8.

- Ansari T, Sibbons PD, Parsons A, Rossi ML. Quantitative neuropathological analysis of sudden infant death syndrome. *Child Care Health Dev* 2002; 28 Suppl. 1: 3-6.
- Baba N, Quattrochi JJ, Reiner CB, Adrion W, McBride PT, Yates AJ. Possible role of the brain stem in sudden infant death syndrome. *J Am Med Assoc* 1983; 249: 2789-91.
- Bajanowski T, Poets C. Der plötzliche Säuglingstod. *Dtsch Arztebl* 2004; 47: A 3185-90.
- Bakshi R, Bates VE, Kinkel PR, Mechtler LL, Kinkel WR. Magnetic resonance imaging findings in acute cerebellitis. *Clin Imaging* 1998; 22: 79-85.
- Baldaçara L, Borgio JG, Moraes WA, Lacerda AL, Montano MB, Tufik S, Bressan RA, Ramos LR, Jackowski AP. Cerebellar volume in patients with dementia. *Rev Bras Psiquiat*. 2011a; 33: 122-9.
- Baldaçara L, Nery-Fernandes F, Rocha M, Quarantini LC, Rocha GG, Guimaraes JL, Araújo C, Oliveira I, Miranda-Scippa A, Jackowski A. Is cerebellar volume related to bipolar disorder? *J Affect Disord* 2011b; 135: 305-9.
- Baloh RW, Jen JC. Genetics of familial episodic vertigo and ataxia. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 956: 338-45.
- Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PF. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* 2010; 88: 31-8.
- Becker LE. Neural maturational delay as a link in the chain of events leading to SIDS. *Can J Neurol Sci* 1990; 17: 361-71.
- Becker LE, Takashima S. Chronic hypoventilation and development of brain stem gliosis. *Neuropediatrics* 1985; 16: 19-23.
- Beckwith JB. Discussion of terminology and definition of the sudden infant death syndrome. In: *Sudden Infant Death Syndrome; Proceedings of the Second International Conference on the Causes of Sudden Death in Infants*. University of Washington Press, Seattle, 1970, pp. 14-22.

Beinder E. Drohende Frühgeburt. *Der Gynäkologe* 2006; 39: 299-310.

Bermejo-Pareja F, Medscape. Essential tremor--a neurodegenerative disorder associated with cognitive defects? *Nat Rev Neurol* 2011; 7: 273-82.

Berquin PC, Giedd JN, Jacobsen LK, Hamburger SD, Krain AL, Rapoport JL, Castellanos FX. Cerebellum in attention-deficit hyperactivity disorder: a morphometric MRI study. *Neurology* 1998; 50: 1087-93.

Berry PJ. Pathological findings in SIDS. *J Clin Pathol* 1992; 45 (11 Suppl): 11-6.

Berul CI, Perry JC. Contribution of long-QT syndrome genes to sudden infant death syndrome: is it time to consider newborn electrocardiographic screening? *Circulation* 2007; 115: 294-6.

Biondo B, Lavezzi A, Tosi D, Turconi P, Maturri L. Delayed neuronal maturation of the medullary arcuate nucleus in sudden infant death syndrome. *Acta Neuropathol* 2003; 106: 545-51.

Blood-Siegfried J, Shelton B. Animal models of sudden unexplained death. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 42: 34-41.

Blood-Siegfried J, Rende EK. The long-term effects of prenatal nicotine exposure on neurologic development. *J Midwifery Womens Health* 2010; 55: 143-52.

Bohn MC, Lauder JM. Cerebellar granule cell genesis in the hydrocortisone-treated rats. *Dev Neurosci* 1980; 3: 81-9.

Bonthius DJ. Ataxia and the cerebellum. *Semin Pediatr Neurol* 2011; 18: 69-71.

Brion M, Allegue C, Santori M, Gil R, Blanco-Verea A, Haas C, Bartsch C, Poster S, Madea B, Campuzano O, Brugada R, Carracedo A. Sarcomeric gene mutations in sudden infant death syndrome (SIDS). *Forensic Sci Int* 2012; 219: 278-81

- Broadbelt KG, Paterson DS, Rivera KD, Trachtenberg FL, Kinney HC. Neuroanatomic relationships between the GABAergic and serotonergic systems in the developing human medulla. *Auton Neurosci* 2010; 154: 30-41.
- Broadbelt KG, Paterson DS, Belliveau RA, Trachtenberg FL, Haas EA, Stanley C, Krous HF, Kinney HC. Decreased GABAA receptor binding in the medullary serotonergic system in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; 70: 799-810.
- Byard RW, Krous HF. Research and sudden infant death syndrome: definitions, diagnostic difficulties and discrepancies. *J Paediatr Child Health* 2004; 40: 419-21.
- Caddell JL. Magnesium deficiency promotes muscle weakness, contributing to the risk of sudden infant death (SIDS) in infants sleeping prone. *Magnes Res* 2001; 14: 39-50.
- Castellanos FX, Giedd JN, Berquin PC, Walter JM, Sharp W, Tran T, Vaituzis AC, Blumenthal JD, Nelson J, Bastain TM, Zijdenbos A, Evans AC, Rapoport JL. Quantitative brain magnetic resonance imaging in girls with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 289-95.
- Cavalieri B. *Geometria indivisibilibus continuorum*. Bononi: Typis Clementis Ferronij Reprint from (1966) "Geometria degli indivisibili" Torino: Unione Tipografico-Editrice Torinese 1635.
- Chapman DJ. New evidence: exclusive breastfeeding and reduced sudden infant death syndrome risk. *J Hum Lact* 2011; 27: 404-5.
- Charytoniuk D, Porcel B, Rodriguez Gomez J, Faure H, Ruat M, Traiffort E. Sonic hedgehog signalling in the developing and adult brain. *J Physiol Paris* 2002; 96: 9-16.
- Chen S, Hillman DE. Regulation of granule cell number by a predetermined number of Purkinje cells in development. *Brain Res Dev Brain Res* 1989; 45: 137-47.
- Christakou A, Murphy CM, Chantiluke K, Cubillo AI, Smith AB, Giampietro V, Daly E, Ecker C, Robertson D, MRC AIMS consortium, Murphy DG, Rubia K. Disorder-specific functional abnormalities during sustained attention in youth with attention deficit

- hyperactivity disorder (ADHD) and with autism. *Mol Psychiatry*; 2012; epub DOI: 10.1038/mp.2011.185.
- Coggeshall RE, Lekan HA. Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol* 1996; 364: 6-15.
- Conte C, Serrao M, Casali C, Ranavolo A, Silvia M, Draicchio F, Di Fabio R, Monami S, Padua L, Iavicoli S, Sandrini G, Pierelli F. Planned gait termination in cerebellar ataxias. *Cerebellum* 2012; epub DOI: 10.1007/s12311-011-0348-0.
- Courts C, Madea B. Genetics of the sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* 2010; 203: 25-33.
- Courts C, Madea B. Significant association of TH01 allele 9.3 and SIDS. *J Forensic Sci* 2011; 56: 415-7.
- Cruz-Sánchez FF, Lucena J, Ascaso C, Tolosa E, Quinto L, Rossi ML. Cerebellar cortex delayed maturation in sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 340-6.
- Dahmane N, Ruiz i Altaba A. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 1999; 126: 3089-100.
- Deeg KH, Reisig A. Doppler sonographic screening of the flow in the basilar artery during head rotation reduces the risk for sudden infant death. *Ultraschall Med* 2010; 31: 506-14.
- Ding H, Qin W, Jiang T, Zhang Y, Yu C. Volumetric variation in subregions of the cerebellum correlates with working memory performance. *Neurosci Lett* 2012; 508: 47-51.
- Dobbing J, Sands J. Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child* 1973; 48: 757-67.
- Dreher JC, Grafman J. The roles of the cerebellum and basal ganglia in timing and error prediction. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 1609-19.

- Drexler JF, Baumgarte S, Eschbach-Bludau M, Simon A, Kemen C, Bode U, Eis-Hübinger AM, Madea B, Drosten C. Human cardioviruses, meningitis, and sudden infant death syndrome in children. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 2313-5.
- Duncan JR, Paterson DS, Hoffman JM, Mokler DJ, Borenstein NS, Belliveau RA, Krous HF, Haas EA, Stanley C, Nattie EE, Trachtenberg FL, Kinney HC. Brainstem serotonergic deficiency in sudden infant death syndrome. *J Am Med Assoc* 2010; 303: 430-7.
- Durston S, van Belle J, de Zeeuw P. Differentiating frontostriatal and fronto-cerebellar circuits in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2011; 69: 1178-84.
- Eisenhut M. Features of diaphragmatic myositis in a case of sudden infant death. *Ups J Med Sci* 2011; 116: 220.
- Elliot J, Vullermin P, Carroll N, James A, Robinson P. Increased airway smooth muscle in sudden infant death syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 313-6.
- Entrup M, Brinkmann B. [Histologic findings in the lung in sudden infant death]. *Z Rechtsmed* 1990; 103: 425-33.
- Ferrante L, Opdal SH, Vege A, Rognum T. Cytokine gene polymorphisms and sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 2010a; 99: 384-8.
- Ferrante L, Opdal SH, Vege A, Rognum TO. IL-1 gene cluster polymorphisms and sudden infant death syndrome. *Hum Immunol* 2010b; 71: 402-6.
- Filiano JJ, Kinney HC. Arcuate nucleus hypoplasia in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51: 394-403.
- Fracasso T, Karger B, Vennemann M, Bajanowski T, Golla-Schindler UM, Pfeiffer H. Amniotic fluid aspiration in cases of SIDS. *Int J Legal Med* 2010; 124: 113-7.
- Frank B, Schoch B, Richter S, Frings M, Karnath HO, Timmann D. Cerebellar lesion studies of cognitive function in children and adolescents - limitations and negative findings. *Cerebellum* 2007; 6: 242-53.

- Frick RB. The ego and the vestibulocerebellar system: some theoretical perspectives. *Psychoanal Q* 1982; 51: 93-112.
- Gao XP, Liu QS, Liu Q, Wong-Riley MT. Excitatory-inhibitory imbalance in hypoglossal neurons during the critical period of postnatal development in the rat. *J Physiol* 2011; 589: 1991-2006.
- Gasbarri A, Pompili A, Pacitti C, Cicirata F. Comparative effects of lesions to the ponto-cerebellar and olivo-cerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. *Neuroscience* 2003; 116: 1131-40.
- Gdovin MJ, Zamora DA, Ravindran CR, Leiter JC. Serotonergic modulation of respiratory rhythmogenesis and central chemoreception. *Ethn Dis* 2010; 20: S1-39-44.
- Gibson RA, McMurchie EJ. The role of pulmonary surfactant in SIDS. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 533: 296-300.
- Giunti P, Sabbadini G, Sweeney MG, Davis MB, Veneziano L, Mantuano E, Federico A, Plasmati R, Frontali M, Wood NW. The role of the SCA2 trinucleotide repeat expansion in 89 autosomal dominant cerebellar ataxia families. Frequency, clinical and genetic correlates. *Brain* 1998; 121: 459-67.
- Glaser J, Greene G, Hendricks S. *Stereology for Biological Research with a Focus on Neuroscience*. mbf Press, 2006.
- Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008; 371: 75-84.
- Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by hedgehog. *Genes Dev* 1996; 10: 301-12.
- Gorini C, Philbin K, Bateman R, Mendelowitz D. Endogenous inhibition of the trigeminally evoked neurotransmission to cardiac vagal neurons by muscarinic acetylcholine receptors. *J Neurophysiol* 2010; 104: 1841-8.

- Gramsbergen A. Clumsiness and disturbed cerebellar development: insights from animal experiments. *Neural Plast.* 2003; 10: 129-40.
- Guilleminault C, Peraita R, Souquet M, Dement WC. Apneas during sleep in infants: possible relationship with sudden infant death syndrome. *Science* 1975; 190: 677-9.
- Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 1986; 143: 3-45.
- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147: 229-63.
- Guntheroth WG, Spiers PS. Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 1999; 103: 813-4.
- Hajashi M, Jakob A. Einige wichtige Tatsachen aus der ontogenetischen Entwicklung des menschlichen Kleinhirns (mit Demonstrationen). *JNeurol* 1924; 81: 74-82.
- Haldipur P, Bharti U, Govindan S, Sarkar C, Iyengar S, Gressens P, Mani S. Expression of Sonic hedgehog during cell proliferation in the human cerebellum. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 1059-68.
- Haque AK, Mancuso MG, Hokanson J, Nguyen ND, Nichols MM. Bronchiolar wall changes in sudden infant death syndrome: morphometric study of a new observation. *Pediatr Pathol* 1991; 11: 551-68.
- Harper RM, Leake B, Hodgman JE, Hoppenbrouwers T. Developmental patterns of heart rate and heart rate variability during sleep and waking in normal infants and infants at risk for the sudden infant death syndrome. *Sleep* 1982; 5: 28-38.
- Harper RM, Woo MA, Alger JR. Visualization of sleep influences on cerebellar and brainstem cardiac and respiratory control mechanisms. *Brain Res Bull* 2000; 53: 125-31.

- Hashimoto T, Tayama M, Murakawa K, Yoshimoto T, Miyazaki M, Harada M, Kuroda Y. Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients. *J Autism Dev Disord* 1995; 25: 1-18.
- Hatten ME. Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 511-39.
- Havens DH, Zink RL. The "back to sleep" campaign. *J Pediatr Health Care* 1994; 8: 240-2.
- Heine VM, Griveau A, Chapin C, Ballard PL, Chen JK, Rowitch DH. A small-molecule smoothed agonist prevents glucocorticoid-induced neonatal cerebellar injury. *Sci Transl Med* 2011; 3: 105ra104.
- Herrup K, Sunter K. Numerical matching during cerebellar development: quantitative analysis of granule cell death in staggerer mouse chimeras. *J Neurosci* 1987; 7: 829-36.
- Herrup K, Shojaeian-Zanjani H, Panzini L, Sunter K, Mariani J. The numerical matching of source and target populations in the CNS: the inferior olive to Purkinje cell projection. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; 96: 28-35.
- Hills BA, Masters IB, Vance JC. A novel role for surfactant in the lung with implications for the sudden infant death syndrome. *Med Hypotheses* 1995; 44: 431-4.
- Hisaoka M, Haratake J, Nakamura Y, Itoh Y. Pancreatic islet abnormalities in sudden infant death syndrome. Qualitative and quantitative analyses of 15 cases. *Acta Pathol Jpn* 1992; 42: 870-5.
- Holmes G. The cerebellum of man. *Brain* 1939; 62: 1-30.
- Howat WJ, Semper AE, Moore IE, Roche WR. Pulmonary production of cytokines in sudden infant death syndrome. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 298S.
- Hu D, Barajas-Martinez H, Medeiros-Domingo A, Crotti L, Veltmann C, Schimpf R, Urrutia J, Alday A, Casis O, Pfeiffer R, Burashnikov E, Caceres G, Tester DJ, Wolpert C, Borggreffe M, Schwartz P, Ackerman MJ, Antzelevitch C. A novel rare variant in SCN1Bb linked to

- Brugada syndrome and SIDS by combined modulation of Nav1.5 and Kv4.3 channel currents. *Heart Rhythm* 2012; 9: 760-9
- Hunt CE, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *CMAJ* 2006; 174: 1861-9.
- Ishiyama G, Geiger C, Lopez IA, Ishiyama A. Spiral and vestibular ganglion estimates in archival temporal bones obtained by design based stereology and Abercrombie methods. *J Neurosci Methods* 2011; 196: 76-80.
- Jo YS, Choi JY, Han SD, Kim YD, Na SJ. A case of cerebellar infarction presenting as thunderclap headache. *Neurol Sci* 2012; 33: 321-3.
- Joyal CC, Pennanen C, Tiihonen E, Laakso MP, Tiihonen J, Aronen HJ. MRI volumetry of the vermis and the cerebellar hemispheres in men with schizophrenia. *Psychiatry Res* 2004; 131: 115-24.
- Kadhim H, Deltenre P, De Prez C, Sebire G. Interleukin-2 as a neuromodulator possibly implicated in the physiopathology of sudden infant death syndrome. *Neurosci Lett* 2010; 480: 122-6.
- Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999; 99: 2757-64.
- Karunaratne S, Udayakumara Y, Fernando H. Epstein-Barr virus co-infection in a patient with dengue fever presenting with post-infectious cerebellitis: a case report. *J Med Case Reports* 2012; 6: 43.
- Kato Z, Sasai H, Funato M, Asano T, Kondo N. Acute cerebellitis associated with rotavirus infection. *World J Pediatr* 2011; epub DOI: 10.1007/s12519-011-0298-0.
- Katz MJ, Grenander U. Developmental matching and the numerical matching hypothesis for neuronal cell death. *J Theor Biol* 1982; 98: 501-17.

- Kelly DH, Shannon DC, Liberthson RR. The role of the QT interval in the sudden infant death syndrome. *Circulation* 1977; 55: 633-5.
- Kim MS, Kim SW, Chang CH, Kim OL. Cerebellar pilocytic astrocytomas with spontaneous intratumoral hemorrhage in adult. *J Korean Neurosurg Soc* 2011; 49: 363-6.
- Kinney HC, Filiano JJ. Brainstem research in sudden infant death syndrome. *Pediatrician* 1988; 15: 240-50.
- Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall RA, Nattie EE. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 517-50.
- Klaver EC, Versluijs GM, Wilders R. Cardiac ion channel mutations in the sudden infant death syndrome. *Int J Cardiol* 2011; 152: 162-70.
- Klunder AD, Chiang MC, Dutton RA, Lee SE, Toga AW, Lopez OL, Aizenstein HJ, Becker JT, Thompson PM. Mapping cerebellar degeneration in HIV/AIDS. *Neuroreport* 2008; 19: 1655-9.
- 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* 1992; 7: 44-9.
- Korbo L, Andersen BB. The distributions of Purkinje cell perikaryon and nuclear volume in human and rat cerebellum with the nucleator method. *Neuroscience* 1995; 69: 151-8.
- Kovacevic MS, Bumbasirevic L, Prokopljevic C, Kovacevic D, Jovanovic D, Zidverc J. [Cerebellar ataxia and acute cerebellar insult]. *Srp Arh Celok Lek* 1992; 120: 345-7.
- Lagarde J, Hantkie O, Hajjioui A, Yelnik A. Neuropsychological disorders induced by cerebellar damage. *Ann Phys Rehabil Med* 2009; 52: 360-70.
- Lamont P, Chow C, Hilton J, Pamphlett R. Differences in diaphragm fiber types in SIDS infants. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995a; 54: 32-7.

- Lamont P, Murray N, Halliday G, Hilton J, Pamphlett R. Brain stem nuclei in sudden infant death syndrome (SIDS): volumes, neuronal numbers and positions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995b; 21: 262-8.
- Lange W. Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tissue Res* 1975; 157: 115-24.
- Lavezzi AM, Ottaviani G, Terni L, Maturri L. Histological and biological developmental characterization of the human cerebellar cortex. *Int J Dev Neurosci* 2006; 24: 365-71.
- Lavezzi AM, Ottaviani G, Maturri L. Ontogenesis of human cerebellar cortex and biopathological characterization in sudden unexplained fetal and infant death. *Virchows Arch* 2007; 450: 31-40.
- Lavezzi AM, Corna M, Maturri L, Santoro F. Neuropathology of the Guillain-Mollaret Triangle (dentato-rubro-olivary network) in sudden unexplained perinatal death and SIDS. *Open Neurol J* 2009; 3: 48-53.
- Lavezzi AM, Corna MF, Maturri L. Ependymal alterations in sudden intrauterine unexplained death and sudden infant death syndrome: possible primary consequence of prenatal exposure to cigarette smoking. *Neural Dev* 2010a; 5: 17.
- Lavezzi AM, Corna M, Mingrone R, Maturri L. Study of the human hypoglossal nucleus: normal development and morpho-functional alterations in sudden unexplained late fetal and infant death. *Brain Dev* 2010b; 32: 275-84.
- Lavezzi AM, Mohorovic L, Alfonsi G, Corna MF, Maturri L. Brain iron accumulation in unexplained fetal and infant death victims with smoker mothers--the possible involvement of maternal methemoglobinemia. *BMC Pediatr* 2011; 11: 62.
- Lavezzi AM, Mecchia D, Maturri L. Neuropathology of the area postrema in sudden intrauterine and infant death syndromes related to tobacco smoke exposure. *Auton Neurosci* 2012; 166: 29-34.

- Lax NZ, Hepplewhite PD, Reeve AK, Nesbitt V, McFarland R, Jaros E, Taylor RW, Turnbull DM. Cerebellar Ataxia in Patients With Mitochondrial DNA Disease: A Molecular Clinicopathological Study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71: 148-61.
- Levisohn L, Cronin-Golomb A, Schmahmann JD. Neuropsychological consequences of cerebellar tumour resection in children: cerebellar cognitive affective syndrome in a paediatric population. *Brain* 2000; 123: 1041-50.
- Lewis PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottmann A, McMahon AP. Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol* 2004; 270: 393-410.
- Loeliger M, Tolcos M, Leditschke J, Campbell P, Rees S. Tracing cranial nerve pathways (glossopharyngeal, vagus, and hypoglossal) in SIDS and control infants: a Dil study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59: 822-9.
- Luan Y, Wang H, Zhong Y, Bian X, Luo Y, Ge P. Traumatic hemorrhage within a cerebellar dermoid cyst. *Int J Med Sci* 2012; 9: 11-3.
- Mage DT, Kollander M. Brainstem serotonin in sudden infant death syndrome. *J Am Med Assoc* 2010; 303: 1810
- Maron BJ, Clark CE, Goldstein RE, Epstein SE. Potential role of QT interval prolongation in sudden infant death syndrome. *Circulation* 1976; 54: 423-30.
- Marti E, Bovolenta P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci* 2002; 25: 89-96.
- Martin P, Albers M. Cerebellum and schizophrenia: a selective review. *Schizophr Bull* 1995; 21: 241-50.
- Matturri L, Ottaviani G, Ramos SG, Rossi L. Sudden infant death syndrome (SIDS): a study of cardiac conduction system. *Cardiovascular Pathology* 2000; 9: 137-45.
- Matturri L, Mauri M, Ferrero ME, Lavezzi AM. Unexpected perinatal loss versus Sids-a common neuropathologic entity. *Open Neurol J* 2008; 2: 45-50.

- Miller LC, Johnson A, Duggan L, Behm M. Consequences of the "back to sleep" program in infants. *J Pediatr Nurs* 2011; 26: 364-8.
- Misciagna S. Cerebellar contribution to cognitive, emotional, and behavioural functions in children with cerebellar abnormalities. *Dev Med Child Neurol* 2011; 53: 1075-6.
- Mitterauer BJ. The gliocentric hypothesis of the pathophysiology of the sudden infant death syndrome (SIDS). *Med Hypotheses* 2011; 76: 482-5.
- Mostofsky SH, Reiss AL, Lockhart P, Denckla MB. Evaluation of cerebellar size in attention-deficit hyperactivity disorder. *J Child Neurol* 1998; 13: 434-9.
- Naeye RL. Brain-stem and adrenal abnormalities in the sudden-infant-death syndrome. *Am J Clin Pathol* 1976; 66: 526-30.
- Naeye RL, Whalen P, Ryser M, Fisher R. Cardiac and other abnormalities in the sudden infant death syndrome. *Am J Pathol* 1976; 82: 1-8.
- Noguchi KK, Walls KC, Wozniak DF, Olney JW, Roth KA, Farber NB. Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1582-92.
- Oehmichen M, Wullen B, Zilles K, Saternus KS. Cytological investigations on the cerebellar cortex of sudden infant death victims. *Acta Neuropathol* 1989; 78: 404-9.
- Ogbuihi S, Zink P. [Changes in the lung connective tissue framework in sudden infant death (SIDS)]. *Z Rechtsmed* 1987; 98: 191-205.
- Ogiwara H, Dubner S, Bigio E, Chandler J. Neurocytoma of the cerebellum. *Surg Neurol Int* 2011; 2: 36.
- 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 Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51: 577-84.

- Opdal SH, Rognum TO. The sudden infant death syndrome gene: does it exist? *Pediatrics* 2004; 114: e506-12.
- Opdal SH, Vege A, Stray-Pedersen A, Rognum TO. Aquaporin-4 gene variation and sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 2010; 68: 48-51.
- Opdal SH, Melien O, Hynnekleiv T, Rognum TO. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and sudden unexpected infant death. *Acta Paediatr* 2011; 100: 86-9.
- Oshinowo AG, Blount BW, Golusinski LL. Tuberculous cerebellar abscess. *J Am Board Fam Pract* 1998; 11: 459-64.
- Palmen SJ, van Engeland H, Hof PR, Schmitz C. Neuropathological findings in autism. *Brain* 2004; 127: 2572-83.
- Pamphlett R, Treloar L. Astrocytes in the hypoglossal nuclei of sudden infant death syndrome (SIDS) infants: a quantitative study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22: 136-43.
- Parikh NA, Lasky RE, Kennedy KA, Moya FR, Hochhauser L, Romo S, Tyson JE. Postnatal dexamethasone therapy and cerebral tissue volumes in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 2007; 119: 265-72.
- Paterson DS, Hilaire G, Weese-Mayer DE. Medullary serotonin defects and respiratory dysfunction in sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 2009; 168: 133-43.
- Pavlik A, Buresova M. The neonatal cerebellum: the highest level of glucocorticoid receptors in the brain. *Brain Res* 1984; 314: 13-20.
- Penatti EM, Barina AE, Raju S, Li A, Kinney HC, Commons KG, Nattie EE. Maternal dietary tryptophan deficiency alters cardiorespiratory control in rat pups. *J Appl Physiol* 2011; 110: 318-28.

- Pérez-Platz U, Saeger W, Dhom G, Bajanowski T. The pathology of the adrenal glands in sudden infant death syndrome (SIDS). *Int J Legal Med* 1994; 106: 244-8.
- Perlman SL. Cerebellar Ataxia. *Curr Treat Options Neurol* 2000; 2: 215-24.
- Perticone F, Ceravolo R, Mattioli PL. Prolonged QT interval: a marker of sudden infant death syndrome? *Clin Cardiol* 1991; 14: 417-21.
- Phillips SC, Harper CG, Kril J. A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. *Brain* 1987; 110: 301-14.
- Picard H, Amado I, Mouchet-Mages S, Olie JP, Krebs MO. The role of the cerebellum in schizophrenia: an update of clinical, cognitive, and functional evidences. *Schizophr Bull* 2008; 34: 155-72.
- Poetsch M, Nottebaum BJ, Wingenfeld L, Frede S, Vennemann M, Bajanowski T. Impact of sodium/proton exchanger 3 gene variants on sudden infant death syndrome. *J Pediatr* 2010; 156: 44-48 e1.
- Rakic P, Sidman RL. Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. *J Comp Neurol* 1970; 139: 473-500.
- Reiman EM, Lane RD, Ahern GL, Schwartz GE, Davidson RJ, Friston KJ, Yun LS, Chen K. Neuroanatomical correlates of externally and internally generated human emotion. *Am J Psychiatry* 1997; 154: 918-25.
- Richardson HL, Walker AM, Horne RS. Influence of swaddling experience on spontaneous arousal patterns and autonomic control in sleeping infants. *J Pediatr* 2010a; 157: 85-91.
- Richardson HL, Walker AM, Horne RS. Sleeping like a baby--does gender influence infant arousability? *Sleep* 2010b; 33: 1055-60.
- Rickert CH, Gros O, Nolte KW, Vennemann M, Bajanowski T, Brinkmann B. Leptomeningeal neurons are a common finding in infants and are increased in sudden infant death syndrome. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 275-82.

- Riedel A, Klekamp J, Harper C, Kretschmann HJ. Morphometric study on the postnatal growth of the cerebellum of Australian aborigines and Caucasians. *Brain Res* 1989; 499: 333-43.
- Risse M, Weiler G. [Histologic thyroid gland findings in the newborn infant and infant, with special reference to sudden infant death]. *Z Rechtsmed* 1984; 92: 205-13.
- Rogers BP, Parks MH, Nickel MK, Katwal SB, Martin PR. Reduced fronto-cerebellar functional connectivity in chronic alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 2012; 36: 294-301.
- Rossato N. [Breast feeding and sudden infant death syndrome prevention]. *Arch Argent Pediatr* 2011; 109: 388-9.
- Savic D, Savic L. [Cerebellar infarction in vascular territory of arteria cerebelli superior]. *Med Pregl* 2010; 63: 27-32.
- Schmahmann JD. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2004; 16: 367-78.
- Schmitz C. Variation of fractionator estimates and its prediction. *Anat Embryol (Berl)* 1998; 198: 371-97.
- Schmitz C, Hof PR. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. *J Chem Neuroanat* 2000; 20: 93-114.
- Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 2005; 130: 813-31.
- Schmitz C, Dafotakis M, Heinsen H, Mugrauer K, Niesel A, Popken GJ, Stephan M, Van de Berg WD, von Hörsten S, Korr H. Use of cryostat sections from snap-frozen nervous tissue for combining stereological estimates with histological, cellular, or molecular analyses on adjacent sections. *J Chem Neuroanat* 2000; 20: 21-9.

- Schmitz C, Born M, Dolezel P, Rutten BP, de Saint-Georges L, Hof PR, Korr H. Prenatal protracted irradiation at very low dose rate induces severe neuronal loss in rat hippocampus and cerebellum. *Neuroscience* 2005; 130: 935-48.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182: 311-22.
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A, Austoni P, Bosi G, Giorgetti R, Grancini F, Marni ED, Perticone F, Rosti D, Salice P. Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338: 1709-14.
- Sekizawa S, Joad JP, Pinkerton KE, Bonham AC. Distinct tachykinin NK(1) receptor function in primate nucleus tractus solitarius neurons is dysregulated after second-hand tobacco smoke exposure. *Br J Pharmacol* 2011; 163: 782-91.
- Seo TB, Kim BK, Ko IG, Kim DH, Shin MS, Kim CJ, Yoon JH, Kim H. Effect of treadmill exercise on Purkinje cell loss and astrocytic reaction in the cerebellum after traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2010; 481: 178-82.
- Shields SD, Cheng X, Gasser A, Saab CY, Tyrrell L, Eastman EM, Iwata M, Zwinger PJ, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG. A channelopathy contributes to cerebellar dysfunction in a model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2012; 71: 186-94.
- Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 1973; 62: 1-35.
- Silveri MC, Misciagna S, Terrezza G. Right side neglect in right cerebellar lesion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71: 114-7.
- Siren PM, Siren MJ. Critical diaphragm failure in sudden infant death syndrome. *Ups J Med Sci* 2011; 116: 115-23.
- Skinner JR. Is there a relation between SIDS and long QT syndrome? *Arch Dis Child* 2005; 90: 445-9.

- Slotkin TA, Seidler FJ, Spindel ER. Prenatal nicotine exposure in rhesus monkeys compromises development of brainstem and cardiac monoamine pathways involved in perinatal adaptation and sudden infant death syndrome: amelioration by vitamin C. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33: 431-4.
- Squire L, Berg D, Bloom F, du Lac S, Ghosh A, Spitzer N. *Fundamental neuroscience*. 3rd ed. Academic Press/Elsevier, Amsterdam, Boston, 2008.
- Statistisches Bundesamt. *Statistisches Jahrbuch 2006*. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2006; Kapitel 2.22: 50, Kapitel 9.3.1: 239
- Statistisches Bundesamt. *Statistisches Jahrbuch 2012*. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2012; Kapitel 2.2.1: 33, Kapitel 4.1.14: 128
- Steinlin M. Cerebellar disorders in childhood: cognitive problems. *Cerebellum* 2008; 7: 607-10.
- Steinschneider A. Prolonged apnea and the sudden infant death syndrome: clinical and laboratory observations. *Pediatrics* 1972; 50: 646-54.
- Stoodley CJ, Schmahmann JD. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex* 2010; 46: 831-44.
- Stoodley CJ, Valera EM, Schmahmann JD. Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fMRI study. *Neuroimage* 2012; 59: 1560-70.
- Strakowski SM, Delbello MP, Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 105-16.
- Subhedar NV, Ryan SW, Shaw NJ. Open randomised controlled trial of inhaled nitric oxide and early dexamethasone in high risk preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 77: F185-90.
- Svetel M, Culjkovic B, Sternic N, Dragasevic B, Stojkovic I, Romac S, Kostić VS. [Clinico-genetic study of type I spinocerebellar ataxia]. *Srp Arh Celok Lek* 1999; 127: 157-62.

- Tagliati M, Simpson D, Morgello S, Clifford D, Schwartz RL, Berger JR. Cerebellar degeneration associated with human immunodeficiency virus infection. *Neurology* 1998; 50: 244-51.
- Takashima S, Armstrong D, Becker LE, Huber J. Cerebral white matter lesions in sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 1978; 62: 155-9.
- Tam EW, Chau V, Ferriero DM, Barkovich AJ, Poskitt KJ, Studholme C, Fok ED, Grunau RE, Glidden DV, Miller SP. Preterm cerebellar growth impairment after postnatal exposure to glucocorticoids. *Sci Transl Med* 2011; 3: 105ra105.
- Tang S, Machaalani R, Waters KA. Expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptor in the sudden infant death syndrome brainstem. *Respir Physiol Neurobiol* 2012; 180: 25-33
- Teive HA, Zavala JA, Iwamoto FM, Bertucci-Filho D, Werneck LC. [Acute cerebellitis caused by Epstein-Barr virus: case report]. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59: 616-8.
- Ten Donkelaar HJ, Lammens M, Wesseling P, Thijssen HO, Renier WO. Development and developmental disorders of the human cerebellum. *J Neurol* 2003; 250: 1025-36.
- Tester DJ, Dura M, Carturan E, Reiken S, Wronska A, Marks AR, Ackerman MJ. A mechanism for sudden infant death syndrome (SIDS): stress-induced leak via ryanodine receptors. *Heart Rhythm* 2007; 4: 733-9.
- Tfelt-Hansen J, Winkel BG, Grunnet M, Jespersen T. Cardiac channelopathies and sudden infant death syndrome. *Cardiology* 2011; 119: 21-33.
- The Vermont Oxford Network Steroid Study Group. Early postnatal dexamethasone therapy for the prevention of chronic lung disease. *Pediatrics* 2001; 108: 741-8.
- Timmann D. [Contribution of the cerebellum to cognition]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2012; 80: 44-52.

- Toru S, Murakoshi T, Ishikawa K, Saegusa H, Fujigasaki H, Uchihara T, Nagayama S, Osanai M, Mizusawa H, Tanabe T. Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function. *J Biol Chem* 2000; 275: 10893-8.
- Traiffort E, Charytoniuk DA, Faure H, Ruat M. Regional distribution of Sonic hedgehog, patched, and smoothed mRNA in the adult rat brain. *J Neurochem* 1998; 70: 1327-30.
- Van Norstrand DW, Ackerman MJ. Genomic risk factors in sudden infant death syndrome. *Genome Med* 2010; 2: 86.
- Varnas K, Okugawa G, Hammarberg A, Nesvag R, Rimol LM, Franck J, Agartz I. Cerebellar volumes in men with schizophrenia and alcohol dependence. *Psychiatry Clin Neurosci* 2007; 61: 326-9.
- Vennemann MM, Loddenkotter B, Fracasso T, Mitchell EA, Debertin AS, Larsch KP, Sperhake JP, Brinkmann B, Sauerland C, Lindemann M, Bajanowski T. Cytokines and sudden infant death. *Int J Legal Med* 2012; 126: 279-84.
- Villanueva R. The cerebellum and neuropsychiatric disorders. *Psychiatry Res*. 2012; epub  
DOI: 10.1016/j.psychres.2012.02.023
- Vogel MW, Herrup K. Numerical matching in the mammalian CNS: lack of a competitive advantage of early over late-generated cerebellar granule cells. *J Comp Neurol* 1989; 283: 118-28.
- Vogel MW, Sunter K, Herrup K. Numerical matching between granule and Purkinje cells in lurcher chimeric mice: a hypothesis for the trophic rescue of granule cells from target-related cell death. *J Neurosci* 1989; 9: 3454-62.
- Wadie M, Li J, Sasaki CT. Effect of altered core body temperature on glottal closing force. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2011; 120: 669-73.
- Wallace VA. Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 1999; 9: 445-8.

- Wang J, Lu J, Bond MC, Chen M, Ren XR, Lyerly HK, Barak LS, Chen W. Identification of select glucocorticoids as smoothened agonists: potential utility for regenerative medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 9323-8.
- Waxman SG. Cerebellar dysfunction in multiple sclerosis: evidence for an acquired channelopathy. *Prog Brain Res* 2005; 148: 353-65.
- Wedekind H, Bajanowski T, Friederich P, Breithardt G, Wulfing T, Siebrands C, Engeland B, Mönning G, Haverkamp W, Brinkmann B, Schulze-Bahr E. Sudden infant death syndrome and long QT syndrome: an epidemiological and genetic study. *Int J Legal Med* 2006; 120: 129-37.
- Wegiel J, Wisniewski HM, Dziewiatkowski J, Badmajew E, Tarnawski M, Reisberg B, Mlodzik B, De Leon MJ, Miller DC. Cerebellar atrophy in Alzheimer's disease-clinicopathological correlations. *Brain Res* 1999; 818: 41-50.
- Weis J, Weber U, Schroder JM, Lemke R, Althoff H. Phrenic nerves and diaphragms in sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* 1998; 91: 133-46.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231: 482-97.
- West MJ, Ostergaard K, Andreassen OA, Finsen B. Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: an in situ hybridization study using the optical fractionator method. *J Comp Neurol* 1996; 370: 11-22.
- Wetts R, Herrup K. Direct correlation between Purkinje and granule cell number in the cerebella of lurcher chimeras and wild-type mice. *Brain Res* 1983; 312: 41-7.
- Williams RW, Herrup K. The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci* 1988; 11: 423-53.
- Willinger M, Hoffman HJ, Hartford RB. Infant sleep position and risk for sudden infant death syndrome: report of meeting held January 13 and 14, 1994, National Institutes of Health, Bethesda, MD. *Pediatrics* 1994; 93: 814-9.

Witcombe NB, Yiallourou SR, Sands SA, Walker AM, Horne RS. Preterm birth alters the maturation of baroreflex sensitivity in sleeping infants. *Pediatrics* 2012; 129: e89-96.

Wong FY, Witcombe NB, Yiallourou SR, Yorkston S, Dymowski AR, Krishnan L, Walker AM, Horne RS. Cerebral oxygenation is depressed during sleep in healthy term infants when they sleep prone. *Pediatrics* 2011; 127: e558-65.

Wunscher W, Wiedersberg H, Mobius G. [Significance of brain edema in sudden natural death of infants and small children]. *Padiatr Grenzgeb* 1971; 10: 213-26.

Yeh TF, Lin YJ, Lin HC, Huang CC, Hsieh WS, Lin CH, Tsai CH. Outcomes at school age after postnatal dexamethasone therapy for lung disease of prematurity. *N Engl J Med* 2004; 350: 1304-13.

Yevenes LF, Klein A, Castro JF, Marin T, Leal N, Leighton F, Alvarez AR, Zanlungo S. Lysosomal vitamin E accumulation in Niemann-Pick type C disease. *Biochim Biophys Acta* 2012 ; 1822: 150-60.

Zar J. *Biostatistical Analysis*, 2nd edition. Prentice-Hall, Upper Saddle River, 1984.

## **DANKSAGUNG**

Herrn Univ.Prof. Dr.med. Christoph Schmitz (Anatomische Anstalt der LMU München) für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit, die damit verbundenen Anregungen und die unglaubliche Geduld, die dieses Unternehmen gefordert hat.

Herrn Univ.Prof. Dr.med. Andreas Büttner (Institut für Rechtsmedizin der Universität Rostock) für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials, das diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Herrn Dr. Patrick R. Hof (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA) für die freundliche Aufnahme in seinem Labor und Frau Camilla Butti (ebenda) für einen Monat einleuchtende Erklärungen zur Stereologie.

Herrn Prof. Dr.med. Hans-Georg Frank (Anatomische Anstalt der LMU München) für die Organisation des Labors und die Bereitstellung der Kapazitäten.

Meiner Familie und meinen Freunden, die dieses Projekt all die Monate unterstützt und begleitet haben.

Meinen „Mäusen“ für die unglaubliche Arbeit und die Energie, die in dieses Projekt eingeflossen sind. Mein besonderer Dank gilt dabei Beate Aschauer, Astrid Baltruschat, Ursel Fazekas und Claudia Stanglmair.

Alle meine lieben „Mäuse“ - Ihr seid einfach toll.