

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

HYPOXISCH-ISCHÄMISCHE
HIRNSCHÄDIGUNG BEI OPFERN EINES
PLÖTZLICHEN KINDSTODES

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

FABIAN WÖTZEL
aus Detmold

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Oehmichen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klöppel

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23. Juli 2009

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi
(Ausschussvorsitzender)

Publikation

Wesentliche Inhalte dieser Dissertation werden unter folgendem Titel in der Zeitschrift *Acta Neuropathologica* veröffentlicht:

Oehmichen M, Wötzel F, Meissner C. Hypoxic-ischemic changes in SIDS brains as demonstrated by a reduction in MAP2-reactive neurons.

[im Druck, DOI 10.1007/s00401-008-0459-y]

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Geschichte des plötzlichen Kindstodes..... | 2 |
| 1.2 Definition des Begriffs SIDS und Diagnostik | 3 |
| 1.3 Epidemiologie und Risikofaktoren | 7 |
| 1.4 Pathophysiologie..... | 10 |
| 1.5 Pathologie | 11 |
| 1.6 Neuropathologie des plötzlichen Kindstodes | 11 |
| 1.6.1 Primär pathologische Veränderungen des ZNS | 12 |
| 1.6.2 Sekundär pathologische Veränderungen des ZNS..... | 14 |
| 1.7 Allgemeiner zytologischer Hypoxie-Nachweis am Gehirn | 16 |
| 1.7.1 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) und Mikrotubuli | 17 |
| 1.7.2 Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2)..... | 18 |
| 1.8 Zielsetzung..... | 20 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 21 |
| 2.1 Studienpopulation und Auswahlkriterien | 21 |
| 2.2 Aufarbeitung und Untersuchung | 24 |
| 2.2.1 Aufarbeitung der Gehirne und Herstellung von Schnittpräparaten | 24 |
| 2.2.2 Prinzip der immunhistochemischen Reaktion..... | 25 |
| 2.2.3 Reaktionsprotokoll | 26 |
| 2.3 Anatomische Strukturen der untersuchten Hirnregionen..... | 28 |
| 2.3.1 Ammonshornformation | 28 |
| 2.3.2 Frontale Großhirnrinde | 29 |
| 2.4 Auswertung | 30 |
| | |
| 3. Ergebnisse | 31 |
| 3.1 Qualitative Untersuchung..... | 32 |
| 3.1.1 Makroskopische Hirnuntersuchung | 32 |
| 3.1.2 Mikroskopische Hirnuntersuchung..... | 32 |
| 3.1.3 Spezifisches Färbeverhalten bei MAP2-Reaktion..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.4 Fotografische Wiedergabe..... | 34 |
| 3.2 Quantitative Untersuchung..... | 38 |
| 3.2.1 Vergleich des Kontrollkollektivs <i>Akutversterben</i> mit dem Kollektiv <i>cerebrale Hypoxie/Ischämie</i> | 38 |
| 3.2.2 Vergleich des Kontrollkollektivs <i>Akutversterben</i> mit dem Kollektiv <i>plötzlicher Kindstod</i> | 40 |
| 3.2.3 Vergleich des Kollektivs <i>plötzlicher Kindstod</i> mit dem Kollektiv <i>cerebrale Hypoxie/Ischämie</i> | 42 |
| 4. Diskussion | 44 |
| 4.1 Bewertung der eigenen Ergebnisse | 45 |
| 4.1.1 Ammonshornformation | 45 |
| 4.1.2. Frontale Hirnrinde..... | 48 |
| 4.2 Kritische Bewertung der eigenen Ergebnisse | 50 |
| 4.3 Einordnung der eigenen Ergebnisse | 52 |
| 5. Zusammenfassung | 56 |
| 6. Literatur | 58 |
| 7. Anhang | 74 |
| 7.1 Numerische und statistische Daten..... | 74 |
| 7.1.1 Numerische Darstellung der MAP2-Expression..... | 74 |
| 7.1.2 Darstellung der statistischen Signifikanz | 77 |
| 7.2 Chemikalien und Gerätenachweis | 79 |
| 7.2.1 Chemikaliennachweis..... | 79 |
| 7.2.2 Gerätenachweis..... | 81 |
| 8. Danksagung | 82 |
| 9. Lebenslauf | 83 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-------------------------------|---|-------|--|
| Abb. | Abbildung | max. | maximal |
| AEC | 3-Amino-9-Ethylcarbazol | min. | Minute |
| Aqua dest. | Aqua destillata | mm | Milimeter |
| ATP | Adenosintriphosphat | n | Anzahl |
| bzw. | Beziehungsweise | NICHD | National Institute of Child Health and Human De- velopment |
| °C | Grad Celsius | | |
| ca. | circa | | |
| CA | Cornu ammonis | NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| d.h. | dass heißt | Nr. | Nummer |
| Fc | Fragment constant | pH | pondus Hydrogenii |
| HE | Hämatoxylin-Eosin | PMI | postmortales Intervall |
| HMW | High Molecular Weight | sec. | Sekunde |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid | SIDS | Sudden Infant Death Syndrom |
| HRP | Horseradish Peroxidase | | |
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamin | Tab. | Tabelle |
| ICD | International Classification of Diseases | u.a. | unter anderem |
| Ig | Immunglobulin | v.a. | vor allem |
| k.A. | keine Angaben | VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| kDa | Kilodalton | W | Watt |
| LASB | Labelled Streptavidin Biotin | w | weiblich |
| lfd. | laufende | z.B. | zum Beispiel |
| LMW | Low Molecular Weight | ZNS | Zentralnervensystem |
| m | männlich | ZwSt. | Zweigstelle |
| MAP | Mikrotubuli-assoziiertes Protein | µl | Mikroliter |
| | | µm | Mikrometer |

1. Einleitung

Der plötzliche Kindstod, in der englischen und internationalen Terminologie als Sudden Infant Death Syndrom (SIDS) bezeichnet, wird in einer allgemeinen, aktualisierten Definition aus dem Jahr 2004 (San Diego Definition) als plötzlich unerwarteter Tod eines Kindes < 1 Jahr bezeichnet, mit Beginn des Todesereignisses während des Schlafs, welcher auch nach gründlicher Untersuchung, d.h. nach vollständiger Obduktion, Überprüfung der Todesumstände und Betrachtung der klinischen Anamnese ungeklärt bleibt (Krous et al., 2004). Die Bedeutung und Sonderstellung des plötzlichen Kindstodes lässt sich anhand einiger Faktoren aufzeigen. Trotz deutlicher Abnahme der Inzidenz des plötzlichen Kindstodes innerhalb der letzten 20 Jahre bleibt dieser die häufigste Todesursache bei Säuglingen zwischen dem 8. und 365. Lebenstag in Industrieländern (Dwyer, Ponsonby, 1995).

Bei hoher Säuglingssterblichkeit in der Vergangenheit mit erklärbaren Ursachen, wie v.a. Infektionskrankheiten, die bei weitem die häufigsten Todesursachen im ersten Lebensjahr darstellten, nahm der plötzliche Kindstod nur einen kleinen Anteil ein. Erst durch die signifikante Abnahme der Säuglingssterblichkeit im letzten Jahrhundert, v.a. durch den Fortschritt der Perinatalmedizin und der antibiotischen Behandlung, rückte der plötzliche Kindstod verstärkt in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Forschung. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich vornehmlich mit der Ätiologie und Pathogenese, die noch weitgehend ungeklärt ist und keine kausale pathogenetische Erklärung für den plötzlichen Kindstod liefern kann sowie mit epidemiologischen Fragen. Obgleich Risikofaktoren detektiert wurden und diesen durch erfolgreiche Präventionskampagnen so entgegengewirkt werden konnte, dass die Inzidenz des plötzlichen Kindstodes bedeutend abnahm, muss es weiterhin Auftrag der Forschung sein, die Ätiologie und Pathogenese vollständig zu klären, um weitere Erfolge im Kampf gegen den plötzlichen Kindstod und die damit verbundene Säuglingssterblichkeit zu erzielen. Die Differentialdiagnosen des plötzlichen Kindstodes lassen immer auch die forensische Bedeutsamkeit erkennen, da neben dem Ausschluss eines „natürlichen“ Todes auch immer der Ausschluss eines „nicht-natürlichen“ Todes zu berücksichtigen und zu überprüfen ist.

1.1 Geschichte des plötzlichen Kindstodes

Erste historische Verweise auf plötzlich und unerwartet verstorbene Kinder lassen sich schon im Alten Testament der Bibel finden. Im 2. Buch Mose 11,4 wird als zehnte Plage, zur Zeit des Auszugs der Israeliten aus Ägypten, der Tod sämtlicher Neugeborener genannt. Einen anderen Verweis findet man im 1. Buch Könige 3,19 in der Geschichte vom „salomonischen Urteil“.

Obwohl in dieser Geschichte dezidiert aufgeführt wird, dass die Mutter ihr Kind im Schlaf erdrückt hat und somit „Erdrücken“ – und dadurch Erstickten – die Todesursache war, diente diese Erklärung als Ursache eines „plötzlichen und unerwarteten Todes im Kindesalter“, bis sie in den Anfängen des 19. Jahrhunderts in Frage gestellt wurde. So entstanden zwischen dem Mittelalter und dem 18. Jahrhundert viele Verordnungen und Verbote, um präventiv dem akzidentellen Erstickten/Erdrücken entgegenzuwirken. In den Akten des deutschen Nationalkonzils, abgehalten am 3. Oktober 852 in Mainz, finden sich Beschlüsse und Hinweise zum plötzlichen Säuglingstod. In der 9. Verordnung wird ein Strafmaß, geregelt in der 9. Bußverordnung, für diejenigen festgelegt, die ihr Kind „unvorsichtig erdrücken oder ersticken“ (Molz, 2000). Im Jahr 1291 trat in Deutschland ein Gesetz in Kraft, in dem allen Müttern verboten wurde, Kinder unter drei Jahren in der Nacht mit ins elterliche Bett zu nehmen (Russell-Jones, 1985). Nach einem Bericht von J.P. Frank, Krankenhausdirektor in Pavia, aus dem Jahr 1786 drohten Mutter oder Amme eine Strafe durch Verbannung, sollten sie das Kind je an die Brust nehmen oder neben sich ins Bett legen, ohne den sogenannten Arcuccio zu gebrauchen (Molz, 2000). Das Arcuccio war ein Gehäuse aus hölzernen und eisernen Bögen, in dem das Kind sicher gebettet werden konnte, um so ein Erstickten durch „Überliegen“ präventiv zu verhindern (Guntheroth, 1995).

Erst im 19. Jahrhundert standen andere pathogenetische Erklärungen zum plötzlichen Säuglingstod in Vordergrund. Der Thymus spielte bei diesen Überlegungen eine bedeutende Rolle. Zum einen wurde eine Thymushyperplasie (Asthma thymicum) als Ursache eines Erstickungstodes durch Verlegung der Atemwege angenommen, zum anderen war das Asthma thymicum Teil eines von Paltauf 1890

beschriebenen komplexen Krankheitsbildes, welches als Status thymico-lymphaticus (Körperkonstitution „lymphatisch-chlorotischer Natur“) Eingang in die Literatur fand und zur Grundlage der Theorie des Thymustodes wurde und den plötzlichen Säuglingstod erklären sollte. Als Folge wurden Anfang des 20. Jahrhunderts präventive Röntgenbestrahlungen des Thymus bei Kindern durchgeführt (Schlaud, 1998). Die Theorie vom Thymustod konnte 1931 in England von einem eigens dafür gegründeten Komitee, aufgrund von über 600 Obduktionen, als Ursache für den plötzlichen Säuglingstod ausgeschlossen werden (Young, Turnbull, 1931).

1.2 Definition des Begriffs SIDS und Diagnostik

Vom plötzlichen Kindstod als „sudden and unexpected death of children“ wird zum ersten mal in einem Brief, datiert am 19. Oktober 1834, vom englischen Arzt S.W. Fearn an den Herausgeber der medizinischen Zeitschrift Lancet gesprochen (Molz, 2000). Bei der ersten internationalen Konferenz zum plötzlichen Kindstod, 1963 in Seattle, wurde der Begriff „sudden death in infants“ für den plötzlichen und unerwarteten Säuglingstod beschrieben (Wedgwood, 1965).

Der Begriff „Sudden Infant Death Syndrom“ (SIDS) wurde 1969 auf der zweiten internationalen Konferenz zum plötzlichen Kindstod in Seattle eingeführt und dort erstmals offiziell definiert (Seattle Definition): „Plötzlicher Tod eines Säuglings oder Kleinkindes, der unerwartet eintritt und bei dem sich durch eine sorgfältige post-mortale Untersuchung keine adäquate Todesursache nachweisen lässt“ (Beckwith, 1970). Diese Definition stellte fortan die Grundlage für alle wissenschaftlichen Arbeiten über den plötzlichen Kindstod dar. In den letzten Jahrzehnten wurde der Begriff jedoch kontrovers diskutiert. So wurde im Jahr 1989 durch ein Expertengremium des National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) die von Beckwith geprägte Definition modifiziert, d.h. der Begriff der postmortalen Untersuchung erweitert sowie eine obere Altersgrenze von einem Jahr festgesetzt. Danach wird jeder plötzliche und unerwartete Tod eines Säuglings < 1 Jahr, der nach einer gründlichen Untersuchung, einschließlich einer vollständigen Obduktion, der Untersuchung der Todesszene und der Überprüfung der Vorgeschichte unerklärt bleibt (NICHD Definition), als SIDS definiert (Valdes-Dapena, 1992; Willinger et al.,

1991). Es gab immer wieder neue Definitions- und Klassifikationsversuche des plötzlichen Kindstodes, jedoch selbst die internationale SIDS Konferenz (Global Strategy Meeting) in Stavanger (Norwegen) hielt im August 1994 als Ergebnis an der ursprünglichen Definition von Beckwith (Seattle Definition) fest und befürwortete deren Gebrauch (Byard et al., 1996; Rognum, Willinger, 1995).

Nach einem Aufruf von Beckwith kam im Januar 2004 in San Diego wiederum eine internationale Expertengruppe zusammen, um einen neuen Definitionsvorschlag zu entwerfen. Als Ergebnis wurden eine allgemeine Definition, wie oben beschrieben, und eine detailliert wissenschaftliche Definition, die vier verschiedene SIDS-Subgruppen kategorisiert und spezielle epidemiologische Merkmale, Kriterien der klinischen Anamnese, der Todesumstände sowie Qualität und Quantität der autopsische Untersuchung bei der Klassifizierung der SIDS-Fälle berücksichtigt, erarbeitet (San Diego Definition). Durch Bildung der Subgruppen stehen Richtlinien zur Verfügung, die dem aktuellen Wissenstand angepasst sind sowie Empfehlungen für die Klassifikation und Einordnung, Untersuchung und Befundbewertung der SIDS-Fälle. Somit wird versucht eine klar umschriebene Diagnostik zu etablieren und eine valide internationale Vergleichbarkeit zu gewährleisten (Krous et al., 2004).

Die Empfehlung, die neue Definition (San Diego Definition) universell zu akzeptieren und anzuwenden, ist Ergebnis einer Studie, die die Praktikabilität der San Diego Definition untersucht hat. Ein bedeutender Vorteil ist die Flexibilität, die es ermöglicht die Definition in Zukunft zu modifizieren, um sie neuen Wissensinhalten und Empfehlungen anzupassen, genauso wie die Einführung der USID (Unclassified Sudden Infant Death) Subgruppe, die unterstreicht, dass der plötzlich, unerwartete Säuglingstod ohne die Durchführung einer Obduktion nicht als SIDS klassifiziert werden kann (Bajanowski et al., 2006).

Bisher wird der Gebrauch der verschiedenen Definitionen sehr unterschiedlich und widersprüchlich gehandhabt. Eine Studie aus dem Jahr 2005 zeigte, dass 58% der ausgewerteten Veröffentlichungen keine spezifische Definition bzw. eine nicht-Standard Definition zu Grunde legten. Die NICHD Definition (1989) war mit 30% die am häufigsten angewendete Definition (San Diego Definition 10%, Seattle Definition 2%). Durch den Gebrauch verschiedener Definitionen und Klassifikationen des

plötzlichen Kindstodes entstehen Probleme, da keine einheitliche Diagnostik der Fälle gewährleistet wird und damit die Vergleichbarkeit und Bewertung verschiedener Studien einschränkt bzw. nahezu unmöglich macht. Das Ziel muss eine Standardisierung und Einigung auf die Anwendung einer einheitlichen Definition sein, um Forschungsergebnisse universell bewerten und weiterverarbeiten zu können (Byard, Marshall, 2007). Todesfälle von Säuglingen, die die Kriterien für die Diagnose eines plötzlichen Kindstodes nicht erfüllen und bei denen die alternative Diagnose eines „natürlichen/nicht-natürlichen“ Todes ausgeschlossen werden kann, werden als SUDI (Sudden Unexpected Death in Infancy) oder nach der San Diego Definition als USID (Unclassified Sudden Infant Death) bezeichnet (Bajanowski et al., 2007). Betrachtet man die Bedeutung des plötzlichen Kindstodes, ist es verwunderlich, dass über Jahrzehnte der universelle, internationale Gebrauch einer grundlegenden Definition nicht gegeben war. Bezüglich der Kriterien für die Diagnostik des plötzlichen Kindstodes herrscht Konsens, aber die universelle Standardisierung der Diagnosekriterien muss weiterhin fortgeführt werden, v.a. im Hinblick auf eine erfolgreiche Anwendung der San Diego Definition.

Die Diagnostik des plötzlichen Kindstodes umfasst neben der kompletten Obduktion, inklusive der obligatorischen histologischen Untersuchung von ZNS, respiratorischem System und Herz, zusätzlich mikrobiologische/virologische, toxikologische, radiologische und metabolisch/genetische Untersuchungen. Zur Durchführung der Obduktionen stehen einige standardisierte Autopsieprotokolle (SAP) sowie das international standardisierte Autopsieprotokoll (ISAP) der Global Strategy Task Force of SIDS international (GSTF) zur Verfügung (Bajanowski et al., 2007; Rognum, Kleemann, 2000).

Wie in den Definitionen schon aufgeführt, sind die ausführliche Erhebung der klinischen Anamnese (Schwangerschafts- und Geburtsverlauf, kindliche Entwicklung) und die umfassende Betrachtung der Todesumstände (Unterschied „natürlicher/nicht-natürlicher“ Tod) ebenfalls wichtige Diagnosekriterien. Die beiden genannten Kriterien sowie die Obduktion spielen nicht zuletzt auch eine wichtige Rolle zum Ausschluss wichtiger Differenzialdiagnosen eines „natürlichen“ bzw. eines „nicht-natürlichen“ Todes. Dabei müssen eine Reihe von Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden, wobei die wichtigsten in Tabelle 1 aufgeführt sind. Hierbei

sind die „nicht-natürlichen“ asphyktisch-bedingten Todesursachen, wie Ersticken und Thoraxkompression (Oehmichen et al., 2000), als auch Intoxikationen und Schütteltraumen wegen fehlender, deutlicher äußerer Merkmale bzw. Verletzungen von SIDS-Todesfällen zu unterscheiden.

Tabelle 1: Wesentliche Differentialdiagnosen des plötzlichen Kindstodes aufgeteilt nach „natürlichen“ und „nicht-natürlichen“ Todesursachen (Bajanowski, Poets Ch., 2004; Kleemann, 2000)

| <i>Natürlicher Tod</i> | <i>Nicht-natürlicher Tod</i> |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Infektionen (Verschiedene Formen der Pneumonie, Meningoenzephalitis, Gastroenteritis, Myokarditis, Sepsis) - Stoffwechselerkrankungen (Fettsäureoxidationsdefekte, Pyruvatdehydrogenase-Mangel, Biotinidase-Mangel, Hyperinsulinismus, Thiaminstoffwechselstörungen) - Fehlbildungen (Gefäßmissbildungen, Herzvitien, Kardiomyopathie, Endokardfibroelastose) - Pierre-Robin-Sequenz - Reye Syndrom - Hyperthermie aus innerer Ursache - Bronchopulmonale Dysplasie | <ul style="list-style-type: none"> - Ersticken (unter weicher Bedeckung, durch Verschluss der Atemöffnungen, durch Thoraxkompression, durch Aspiration von Mageninhalt) - Schütteltrauma - Intoxikation - Sonstige Formen der Gewalteinwirkung (z.B. stumpfes Bauchtrauma) - „Münchhausensyndrom by proxy“ mit tödlichem Ausgang - Vernachlässigung - Hyperthermie aus äußerer Ursache |

Trotz der Bedeutung der Obduktion zur Bestätigung der Diagnose SIDS (Loghmanee, Weese-Mayer, 2007) hat in den letzten Jahren die Obduktionsfrequenz bei Kindern und Säuglingen – wie auch bei Erwachsenen – abgenommen. In Deutschland werden durchschnittlich nur 55,2% aller plötzlich und unerwartet verstorbenen Säuglinge obduziert (Kleemann et al., 1997). Alles in allem war – und bleibt – der plötzliche Kindstod damit eine Ausschlussdiagnose.

1.3 Epidemiologie und Risikofaktoren

Unabhängig von der Definition wird der plötzliche Kindstod in Deutschland – und in der Welt – diagnostiziert und epidemiologisch erfasst, trotz aller damit verbundenen Unsicherheiten. Im Jahr 2006 starben in Deutschland insgesamt 259 Säuglinge durch den plötzlichen Kindstod (Abb. 1), wobei in Schleswig-Holstein die Anzahl der an SIDS verstorbenen Säuglinge acht betrug, davon sechs männliche und zwei weibliche Fälle.

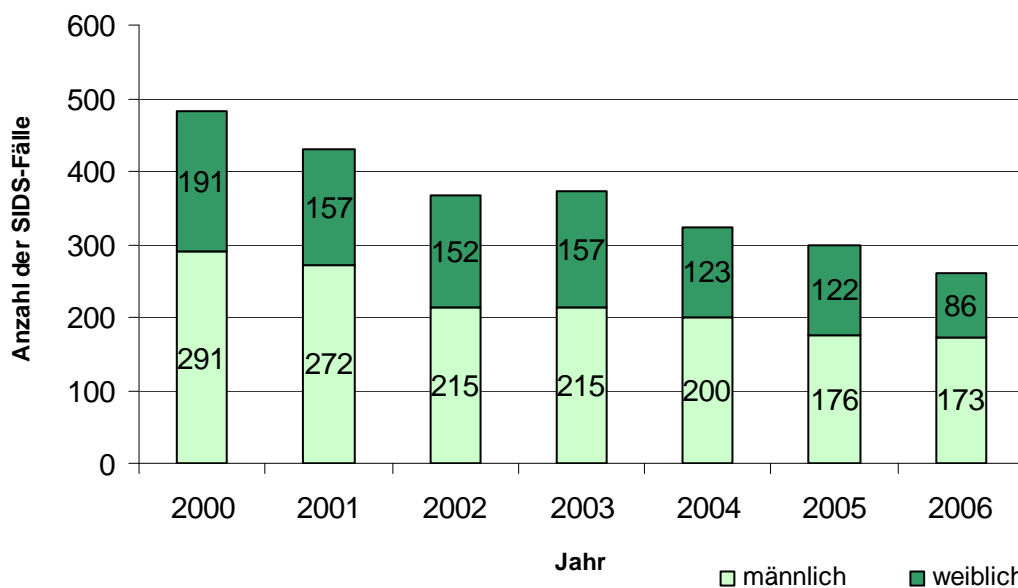


Abbildung 1: Anzahl der pro Jahr registrierten SIDS-Fälle (Positions Nr. R95 der ICD 10) in Deutschland in absoluten Zahlen mit Unterteilung in männliches/weibliches Geschlecht (Todesursachenstatistik des StBA, Statistisches Bundesamt, ZwSt. Bonn, 2008)

Die Inzidenz, d.h. der Anteil der durch plötzlichen Kindstod verstorbenen Säuglinge pro 1000 Lebendgeborene (Lebend- und Todgeborene in Deutschland, Statistisches Bundesamt (ZwSt. Bonn), 2008), betrug 2006 deutschlandweit 0,39/1000 Lebendgeborene. Für Schleswig-Holstein lag die Inzidenz für das Jahr 2006 bei 0,35/1000 Lebendgeborene. Betrachtet man die Inzidenzen des plötzlichen Kindstodes für Deutschland von 1990 bis 2006 (Abb. 2), so sieht man eine Abnahme, mit einem deutlichen Sprung zwischen den Jahren 1991 und 1992, so dass ein maximaler Rückgang im Jahr 1992 dokumentiert werden konnte.

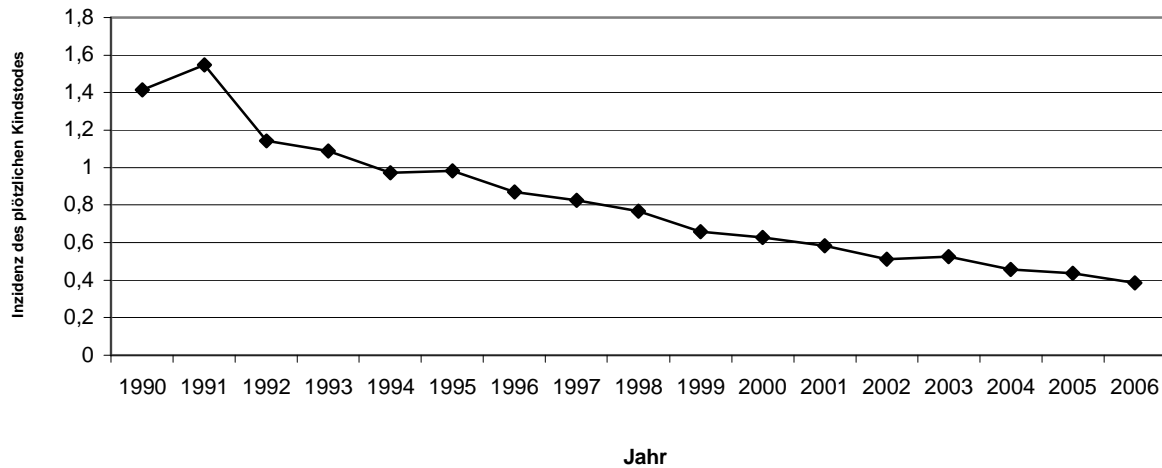


Abbildung 2: Anzahl der SIDS-Fälle pro 1000 Lebendgeborene in Deutschland zwischen den Jahren 1990 und 2006

Die aktuell niedrigsten SIDS-Inzidenzraten weltweit werden mit 0,09/1000 Lebendgeborene für die Niederlande und mit 0,1/1000 Lebendgeborene für Japan angegeben, im Gegensatz zu Neuseeland, wo die höchste SIDS-Inzidenzrate mit 0,8/1000 Lebendgeborene der Industriestaaten dokumentiert ist. Zu beachten ist aber auch, dass die Obduktionsraten in den Niederlanden und Japan, im Vergleich zu anderen Industriestaaten, extrem niedrig sind (Moon et al., 2007).

In Ländern mit hoher Säuglingssterblichkeit und niedrigem Gesundheitsstandard sind die SIDS-Inzidenzen nur schwer zu beurteilen, da der plötzliche Kindstod gegenüber anderen Ursachen der Säuglingssterblichkeit nur eine untergeordnete Rolle spielt und dementsprechend anders oder gar nicht wahrgenommen und bewertet wird.

Es gibt einige typische Charakteristika, die für den plötzlichen Kindstod zutreffen und in nahezu jeder Statistik nachweisbar sind. SIDS betrifft mehr männliche als weibliche Säuglinge, mit einem Verhältnis von ca. 60:40. Außerdem zeigt sich eine typische Altersverteilung mit einem Sterblichkeitsgipfel zwischen dem 2. und 4. Lebensmonat (Mitchell, 1997). Die überwiegende Anzahl der SIDS-Fälle ereignet sich in der kalten Jahreszeit und ist entsprechend häufiger in kalten Klimazonen anzutreffen (Mitchell et al., 1999a).

Es konnten aber auch ethnische Unterschiede bei Betrachtung des plötzlichen Kindstodes aufgezeigt werden: in den USA, wo Afroamerikaner, Indianer und Ureinwohner Alaskas ein höheres SIDS-Risiko aufweisen, ebenso wie Maoris in Neuseeland sowie Aborigines in Australien. Die Unterschiede werden zum einen auf biologische Faktoren, zum anderen auf ein differentes Sozialverhalten zurückgeführt (Freemantle et al., 2006; Moon et al., 2007; Tomashek et al., 2006).

Durch Forschung und epidemiologische Studien konnten in den letzten Jahrzehnten einige Risikofaktoren festgestellt werden. Als Hauptrisikofaktor gilt das Schlafen in Bauchlage („prone position“), besonders tagsüber (Mitchell et al., 2008). Der Einfluss der Bauchlage als wesentlicher Risikofaktor des plötzlichen Kindstodes wurde 1985 von Saturnus und Adam durch die experimentell fundierte Formulierung der Arteria vertebralis-Theorie erstmals diskutiert und durch zahlreiche empirische Nachuntersuchungen bestätigt (de Jonge et al., 1989; Saturnus, 1998). Durch landesweit durchgeführte Aufklärungs- und Präventionskampagnen („back to sleep“) wurde versucht, die Bauchlagenprävalenz zu senken, so dass in Deutschland die Prävalenz der Bauchlage inzwischen von 37,6% im Jahr 1991 auf 8,7% im Jahr 1995 sank (Schlaud et al., 1999). Eine Studie kam zu dem Schluss, dass der deutliche Rückgang der SIDS-Inzidenz in Deutschland, der maßgeblich im Jahr 1992 stattfand (Abb. 2), mit der Änderung der Schlafposition und Aufklärung über die Risiken der Bauchlage kausal in Verbindung gebracht werden konnte (Schellscheidt et al., 1997). In anderen Ländern zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der SIDS-Sterblichkeit durch Änderung der Schlafposition, auch wenn, wie z.B. in den USA, kein kausaler Zusammenhang belegt werden konnte (Einspieler, 2000).

Mit dem Rückgang der Bauchlagenprävalenz wurde das Schlafen in Seitenlage („side sleep position“) als neuer Risikofaktor bedeutsam. Ferner besteht die Möglichkeit, aus dieser unstabilen Schlafposition in Bauchlage zu rollen, was ebenfalls mit einem erhöhten Risiko verbunden ist (Li et al., 2003; Mitchell et al., 1999b; Oyen et al., 1997). Schlafen Säuglinge im Bett der Eltern („co-sleeping“), besteht ebenso ein – allerdings gering erhöhtes – Risiko. Das Risiko steigt zusätzlich deutlich für Säuglinge von rauchenden Müttern an (Carpenter et al., 2004). Teilen sich Säugling und Elternteil einen Schlafplatz auf einem Sofa, erhöht sich das Risiko wiederum deutlich. Risikomindernd und protektiv wirkt es sich hingegen aus, wenn Säuglinge in

ihrem eigenen Bett – aber im Schlafzimmer der Eltern – schlafen (Tappin et al., 2005) und wenn während der Schlafenszeit ein Schnuller verwendet wird (Campbell, 2006; Hauck et al., 2005).

Ein anderer isolierter Hauptrisikofaktor, der in nahezu allen epidemiologischen Studien dokumentiert werden konnte, ist das Rauchen während der Schwangerschaft, wobei das Risiko mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten steigt. Weitere Risikofaktoren sind Stillverzicht oder Stillen < 2 Wochen sowie junges Alter der Mutter und niedriger sozio-ökonomischer Status der Eltern mit einer umgekehrt proportionalen Risikosteigerung (Vennemann et al., 2005). Frühgeburtlichkeit, niedriges Geburtsgewicht und weiches betten der Säuglinge sowie hohe Raumtemperaturen erhöhen ebenfalls das SIDS-Risiko (Moon et al., 2007).

1.4 Pathophysiologie

Die pathophysiologischen Erklärungsmodelle zum plötzlichen Kindstod sind vielschichtig und umfassen viele Körperfunktionen und Organsysteme sowie auch genetische Prädispositionen. Die sogenannte „Triple-Risk-Hypothesis“ liefert einen guten Ansatz, die vielschichtigen Erklärungen zu integrieren, auch unter Beachtung neuerer Forschungsergebnisse. Dieses pathophysiologische Modell wurde schon im Jahr 1972 von Wedgewood eingeführt, durch Rognum und Saugstad 1993, und durch Filiano und Kinney 1994 modifiziert. Die am weitesten verbreitete Theorie von Filiano und Kinney besagt, dass SIDS auftritt, wenn folgende drei Faktoren gleichzeitig zutreffen (Guntheroth, Spiers, 2002):

- I. Grundsätzliche Vulnerabilität des Säuglings;
- II. Kritische Entwicklungsphase mit Vorhandensein altersabhängiger, endogener Risikofaktoren;
- III. Auslösende exogene Faktoren, z.B. Schlafen in Bauchlage.

In der gemeinsamen Endstrecke des plötzlichen Kindstods scheinen eine unreife autonome kardiorespiratorische Regulierung sowie besonders eine abnorme Weckreaktion („arousal“) eine bedeutende Rolle einzunehmen. Die Weckreaktion des

schlafenden Säuglings stellt eine überlebenswichtige Reaktion gegenüber ALTE (Apparant life threatening event) und hypoxisch-ischämisch induzierten Zuständen dar. In Langzeitstudien an Säuglingen, von denen einige zu einem späteren Zeitpunkt an SIDS verstarben, konnten reduzierte, spontan ablaufende Weckreaktionen dokumentiert werden sowie ein gestörter Verlauf des „arousals“ (Kato et al., 2003).

1.5 Pathologie

Pathologisch-anatomische Studien konnten zahlreiche Minimalbefunde erfassen, die aber nicht durchgängig in allen Fällen nachweisbar waren. Allerdings reichte keiner dieser Minimalbefunde aus, um den Tod in diesen Fällen zu erklären. Im Zentrum standen jedoch von Beginn an die neuropathologischen Veränderungen beim dem Versuch die Pathophysiologie des plötzlichen Kindstodes zu erklären.

1.6 Neuropathologie des plötzlichen Kindstodes

Einige Studien belegen, dass das zentrale Nervensystem einen wichtigen Stellenwert im Hinblick auf den plötzlichen Kindstod einnimmt. Dabei ist die Frage, ob primär oder sekundär pathologische Veränderungen des Gehirns den plötzlichen Kindstod erklären oder mit ihm assoziiert sind. Obwohl Richtlinien für die neuropathologische Untersuchung des ZNS vorliegen, gibt es keine signifikant nachgewiesenen cerebralen Veränderungen, die für SIDS charakteristisch sind (Stoltenburg-Didinger et al., 2003).

Basierend auf der Apnoe Hypothese von A. Steinschneider aus dem Jahr 1972, begann die Suche nach morphologischen Äquivalenten einer primären Atemregulationsstörung jeglicher Art sowie zusätzlich nach extracerebral bedingten hypoxisch-ischämisch Veränderungen des Gehirns. Die Hypothese, dass eine Hypoxie dem plötzlichen Kindstod vorausgeht, wurde weiterhin mit viel Interesse verfolgt. Der Einfluss und Nachweis einer Hypoxie in der Kaskade des plötzlichen Kindstodes konnte nach bisherigen Untersuchungen weder eindeutig bestätigt noch ausgeschlossen werden (Poulsen et al., 1990a; Poulsen et al., 1990b; Rognum et al., 1988; Rognum, Saugstad, 1991; Vege et al., 1998; Waters et al., 1999). Allerdings

unterstreicht eine aktuellere Studie durch den biochemischen Nachweis hoher VEGF-Konzentration im Liquor cerebrospinalis bei SIDS-Fällen, dass der pathophysiologische Mechanismus des plötzlichen Kindstodes höchstwahrscheinlich mit einer Hypoxie vergesellschaftet ist und diese dem Ereignis vorausgeht (Jones et al., 2003).

1.6.1 Primär pathologische Veränderungen des ZNS

Morphologisch-biochemische Nachweise neuronaler Entwicklungsstörungen und -verzögerungen im Hirnstamm bei SIDS Kindern wurden anhand der Dichte von Dendriten-Spines, reduzierter Aktivität katecholamin-synthetisierender Enzyme sowie einer Beeinträchtigung der Immunreaktivität von Endorphinen erbracht.

Retikuläres Dendriten-Spine-System

Das retikuläre Dendriten-Spine-System steht im Verdacht, den Regelmechanismus der Atmung zu beeinflussen. Zwischen dem 20. und 30. Tag nach der Geburt verlieren die Dendriten die Spines und sind so befähigt, komplexe funktionale Prozesse wie das Schlaf-Wach-Muster der Atmung zu regulieren (Takashima, Becker, 1986).

Quattrochi wies in seinen Studien eine signifikant höhere Spine-Dichte in Fällen eines plötzlichen Kindstodes nach und machte eine Entwicklungsstörung und -verzögerung des Hirnstammes als Ursache einer Beeinträchtigung der respiratorischen Regulation verantwortlich (Quattrochi et al., 1980; Quattrochi et al., 1985). Die Ergebnisse einer weiteren Studie ließen die Persistenz der Dendriten-Spines als Zeichen einer Unreife des Hirnstammes nicht zu und konnten so den Zusammenhang zwischen der Atemregulation und der Dichte der Dendriten-Spines nicht belegen. Desweiteren ist der Nachweis der Dichte der Dendriten-Spines von dem postmortalen Intervall und der Agoniedauer abhängig (Braak, Braak, 1985; Takashima et al., 1985), so dass ein methodischer Zweifel an den Ergebnissen besteht (Oehmichen, 1990; Oehmichen, 1995)

Katecholaminsynthetisierende Enzyme

Unter der Annahme, dass die meisten Hirnstammregionen, die mit respiratorischen Funktionen assoziiert sind, katecholaminhaltige Zellen aufweisen, wurde die Aktivität katecholamin-synthetisierender Enzyme in neun Hirnstammregionen untersucht. In einigen Hirnstammregionen von SIDS-Opfern wurde eine signifikant niedrigere Anzahl von adrenalinsynthetisierenden Enzymen gefunden, was zu einer abnormen zentralen respiratorischen Kontrolle und Weckreaktion führen kann (Denoroy et al., 1987). Auch hier ist kritisch anzumerken, dass durch eine zeitabhängige Reduktion der Enzymaktivität (Oehmichen, 1980) während des postmortalen Intervalls die Ergebnisse fragwürdig sind (Oehmichen, 1990; Oehmichen, 1995)

Immunreaktivität von Endorphinen

Endorphine führen im Fetus und bei Neugeborenen (Moss, 1986) sowie beim Erwachsenen über Opioidrezeptoren, die zahlreich in den respiratorischen Kerngebieten zu finden sind, zu Atemdepression. Diese Beobachtung führte zur Hypothese, dass SIDS durch eine Hyperaktivität des endogenen Opioidsystems hervorgerufen wird (Kuich, Zimmerman, 1981).

Untersuchungen von SIDS-Fällen zeigten allerdings keine auffällige Überproduktion von Met-Enkephalin, aber einen gegenüber Kontrollfällen signifikant erhöhten Substanz-P Wert in der Medulla oblongata (Bergström et al., 1984; Kuich, Franciosi, 1983). Die Ergebnisse wurden unterschiedlich interpretiert und u.a. als Ursache einer cerebralen Hypoxie gedeutet, wobei sie nahelegen, dass die Funktionen des Endorphinsystems im Zusammenhang mit dem plötzlichen Kindstod zu verstehen sein könnten.

Hypoplasie des Nucleus arcuatus (Medulla oblongata)

Die Zellen des Nucleus arcuatus in der ventrolateralen Medulla übernehmen eine wichtige Rolle für die Funktion zentraler Chemorezeptoren. Der Nachweis einer Hypoplasie des Nucleus arcuatus in Fällen eines plötzlichen Kindstodes geht somit mit einer inadäquaten kardiorespiratorischen Kontrolle einher (Kinney, Filiano, 1995; Maturri et al., 2002).

Hyperplasie des Hirnstamms

Eher gegenläufige Ergebnisse wurden in Studien gefunden, die eine erhöhte Anzahl von Dendriten-Spines und Synapsen in der retikulären Formation der Medulla mit einer generalisierten Hypertrophie des Hirnstamms aufwiesen (O'Kusky et al., 1995; O'Kusky, Norman, 1994; O'Kusky, Norman, 1995).

1.6.2 Sekundär pathologische Veränderungen des ZNS

Naeye versuchte in zahlreichen Studien (Naeye, 1974; Naeye, 1976; Naeye et al., 1976; Naeye, 1978), sowohl im ZNS als auch in anderen Organsystemen, histologisch morphologische Korrelate einer hypoxisch bedingten Veränderung nachzuweisen. Ein Großteil dieser Studienergebnisse konnte jedoch in nachfolgenden Untersuchungen nicht bestätigt werden (Valdes-Dapena, 1992).

Bei dem Nachweis hypoxisch-ischämisch bedingter sekundärer Schäden des ZNS stehen vorwiegend die Hirnstammgliose, d.h. die Vermehrung von Gliazellen im Hirnstamm infolge neuronalen Untergangs und die Immunreaktivität des Antikörpers Alz-50 im Vordergrund.

Hirnstammgliose

In einem Teil der Studien konnte Naeye (1976) als erster eine Hirnstammgliose bei Säuglingen eines plötzlichen Kindstodes gegenüber einem Kontrollkollektiv nachweisen, die als Folge rezidivierender chronischer Hypoxien aufgefasst wurde (Becker, 1983; Kinney et al., 1983; Ozawa, Takashima, 2002; Takashima et al.,

1978). In Studien anderer Autoren hingegen konnte keine Hirnstammgliose bei SIDS-Fällen beobachtet werden (Ambler et al., 1981; Oehmichen et al., 1989a; Pearson, Brandeis, 1983; Sawaguchi et al., 2002a; Sawaguchi et al., 2002b; Stoltenburg-Didinger, Kordes, 1990; Summers et al., 1978). Weder qualitative noch quantitative Untersuchungen können die Hirnstammgliose bei Opfern eines plötzlichen Kindstodes definitiv bestätigen und spezifisch nachweisen.

Alz-50 Immunreaktion

Bei plötzlichen Säuglingstodesfällen wurde in der Ammonshornformation und im Nucleus olivarius inferior eine signifikant höhere Anzahl Alz-50 positiver Nervenzellen nachgewiesen als in Kontrollgruppen. Diese positive Reaktion war allerdings auch in Todesfällen mit einer subakuten cerebralen Hypoxie/Ischämie – mit und ohne Reperfusion – nachweisbar. Der Unterschied könnte als ein Hinweis auf eine längere Agoniephase mit einer Hypoxie/Ischämie bei SIDS-Fällen verstanden werden (Oehmichen et al., 1998). Bestätigt wird diese Hypothese durch den Nachweis des erhöhten c-fos Protoonkogens im Nucleus dorsalis nervi vagi der Medulla oblongata in Fällen eines plötzlichen Kindstodes. Das c-fos Protoonkogen ist ein Marker von Hypoxie-aktivierten Neuronen und die genannten Nuclei der Medulla oblongata sind in die Regulation der postnatalen Atmung involviert (Lavezzi et al., 2003). Der Alz-50 Antikörper reagiert normalerweise mit Hirngewebe von Alzheimer Patienten, er wurde aber auch bereits an vibratom-präpariertem Hirngewebe in Fällen eines plötzlichen Kindstodes nachgewiesen (Sparks et al., 1996; Sparks, Hunsaker, III, 1991).

Obwohl der molekulare Mechanismus der erhöhten Alz-50 Antikörper Immunreaktion noch nicht aufgeklärt ist, scheint die Immunreaktion von Alz-50 eine Methode zur Diskriminierung – und damit zur Diagnostik – des plötzlichen Kindstodes zu sein.

Reduktion der Purkinje Zellen (Cerebellum)

Die Purkinje Zellen des Cerebellums reagieren sensibel auf hypoxisch-ischämische Schädigungen, was zu einer Abnahme der Zelldichte führt. Wenn das Gehirn einem länger anhaltenden oder rezidivierenden hypoxischen Ereignis ausgesetzt ist (Hypoperfusion), zeigt sich im Kleinhirn eine Reduktion der Anzahl der Purkinje Zellen. Bei Vergleich der Purkinje-Zelldichte von SIDS-Fällen gegenüber alters- und geschlechtsgleichen Kontrollfällen zeigte sich eine leicht erhöhte Purkinje-Zelldichte im Kleinhirn der SIDS-Fälle. Entsprechend dieser Studie lassen sich somit keine Folgeerscheinungen einer Hypoxie/Ischämie nachweisen, was die Ergebnisse der Autorengruppe bezüglich der Hirnstammgliose bei SIDS Opfern bestätigt (Oehmichen et al., 1989b).

1.7 Allgemeiner zytologischer Hypoxie-Nachweis am Gehirn

Eine komplette Unterbrechung des zuführenden Blutstroms zum Gehirn von nur fünf Minuten erzeugt irreversible Schäden an vulnerablen Nervenzellen und nach zehn Minuten Ischämiezeit kommt es zum Hirntod. Zum Teil reflektiert diese besondere Vulnerabilität des Gehirns gegenüber hypoxisch-ischämischer Schädigung den hohen metabolischen Umsatz, der für das Gehirn bei 25% des Basis-Umsatzes liegt (Lee et al., 2000).

Eine graduelle Empfindlichkeit gegenüber hypoxisch-ischämischer Schädigung gibt es auch innerhalb des Gehirns, was als selektive Vulnerabilität bezeichnet wird. Besonders die Großhirnrinde und Ammonshornformation (Hippokampus), aber auch das Striatum gehören zu den Hirnregionen mit selektiver Vulnerabilität und reagieren daher ausgesprochen empfindlich auf Sauerstoffmangel. Der zugrunde liegende Mechanismus der regionalen Empfindlichkeit verschiedener Hirnregionen wurde viel diskutiert und wird entweder auf unterschiedliche intrinsische Anfälligkeit der Hirnregionen gegenüber einer Hypoxie/Ischämie oder auf die regional unterschiedliche Blutversorgung durch Kollateralen zurückgeführt, ebenso wie auf die weitgehend anerkannte Theorie eines Glutamat induzierten Nervenzelltodes. Nach dieser Theorie weisen Nervenzellen der empfindlichen Hirnregionen eine besonders

hohe Dichte an NMDA-Glutamat Rezeptoren auf, die durch den hypoxisch-ischämisch bedingten Anstieg des exzitatorischen Transmitters Glutamat, auf neurotoxische Konzentrationen, stimuliert werden und durch komplexe und zahlreiche Ionenverschiebungen zum Absterben von Neuronen führen (Prinzip der Exzitotoxizität). Nur Neurone unterliegen diesem Mechanismus, da Gliazellen keine exzitatorischen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren (Auer, Siesjo, 1988; Bernaudin et al., 1998; Lee et al., 2000; Smith, 2000; Yamamoto et al., 1986).

1.7.1 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) und Mikrotubuli

MAPs modulieren die Polymerisation, Stabilität und Anordnung von Mikrotubuli des neuronalen Zytoskeletts und regulieren so die Steuerung der Mikrotubuli. Damit spielen die MAPs eine wichtige Rolle für Wachstum, Differenzierung und Plastizität von Nervenzellen. Die Phosphorylierung der MAPs, die durch einige second-messenger regulierte Proteinkinasen und Phosphatasen gesteuert wird, ist die am meisten beobachtete Modifizierung, die die Fähigkeit und Affinität der MAPs an Mikrotubuli zu binden und sie zu stabilisieren steuert und beeinflusst (Maccioni, Cambiasso, 1995; Sanchez et al., 2000).

Mikrotubuli sind lange (25 nm), relativ steife, hohle Zylinder innerhalb des Zytoplasmas, die aus globalen Proteinmolekülen, α - und β -Tubulin, bestehen, die sich zu Dimeren zusammenlagern und die eigentlichen Bausteine der Mikrotubuli bilden. Die Mikrotubuli haben ein Ende mit raschem Wachstum/Zerfall (+ Ende) und ein Ende an dem diese Abläufe langsamer ablaufen (- Ende). Sie dienen als mechanische Stützen der Zellen, Transportschienen zur Verfrachtung von Zellorganellen und zur Bildung von Mitosespindeln (Lüllmann-Rauch, 2003).

Die MAPs lassen sich in verschiedenen Subtypen aufteilen. Die bekanntesten Subtypen sind: MAP1a,1b, MAP2a,2b,2c,2d, MAP4 und das Protein Tau. Die größtenteils auf Nervenzellen beschränkten MAPs, MAP2a und 2b, sind überwiegend in Nervenzellkörpern und Dendriten zu finden, Protein Tau überwiegend in Axonen von Nervenzellen, wohingegen MAP1a und 1b sich in allen Nervenzellkompartimenten finden lassen. MAP4 kommt v.a. in sich teilenden Zellen vor. MAP1a findet sich v.a. in adulten Gehirnen („spätes“ MAP) im Gegensatz zu MAP1b,

welches sich hauptsächlich in sich entwickelnden Gehirnen („frühes“ MAP) darstellen lässt (Hirokawa, 1994; Tucker, 1990).

1.7.2 Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2)

MAP2 ist das häufigste im Gehirn vorkommende Mikrotubuli-assoziierte Protein, das eine bedeutende Rolle für das neuronale Wachstum und die Plastizität der Nervenzellen spielt (Johnson, Jope, 1992).

Die vier verschiedenen MAP2 Isoformen, lokalisiert auf einem Gen auf Chromosom 2, welches 20 Exons besitzt, lassen sich in zwei Gruppen einteilen. In die Gruppe mit hohem Molekulargewicht (HMW-MAP2) sind die Isoformen MAP2a (280 kDa) und 2b (270 kDa) einzuordnen und in die Gruppe mit niedrigem Molekulargewicht (LMW-MAP2) die beiden Isoformen MAP2c (70 kDa) und 2d (75 kDa). Die Form HMW-MAP2 der MAPs wird v.a. in Nervenzellen exprimiert, wohingegen die Form LMW-MAP2 auch in Gliazellen exprimiert wird (Tucker et al., 1989; Tucker, 1990). MAP2b und MAP2d sind während der gesamten Entwicklung des ZNS nachweisbar, ebenso wie MAP2a, welches aber hauptsächlich in adulten Gehirnen exprimiert wird. MAP2c findet man vorwiegend in embryonalen Gehirnen (Doll et al., 1993; Przyborski, Cambray-Deakin, 1995; Sanchez et al., 2000).

Es zeigt sich, dass ein stark phosphoryliertes MAP2 vor einer Proteolyse durch die calciumaktivierte Protease Calpain geschützt ist, im Gegensatz zu gering phosphoryliertem MAP2, welches an Mikrotubuli gebunden vorliegt (Johnson et al., 1991). Der MAP2-Expressionsverlust der Nervenzellen wird nach einer führenden Hypothese auf die Calpain vermittelte Proteolyse der MAPs zurückgeführt sowie auf einen Zerfall der Mikrotubuli durch Einfluss von Calciumionen. Der intrazelluläre Calciumanstieg unter Sauerstoffmangel führt zu einer Aktivierung der Calpain-Protease, die eine proteolytische Degeneration von MAP2 induziert und eine Antwort auf eine hypoxisch-ischämische Schädigung darstellt (Blomgren et al., 1997; Kitagawa et al., 1989; Kwei et al., 1993; Malinak, Silverstein, 1996; Ota et al., 1997; Raley-Susman, Murata, 1995; Schmidt-Kastner et al., 1998; Tomimoto, Yanagihara, 1992; Yanagihara et al., 1990).

Die Störung der Calcium-Homöostase, d.h. eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration und Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern, ist ein Teil der allgemeinen, subzellulären Veränderungen, die infolge einer Hypoxie/Ischämie auftreten. Durch Abfall des zellulären ATP-Gehalts können die Funktionen der zellulären Ionenpumpen nicht aufrecht erhalten werden. Folglich kommt es zur Entwicklung eines Zellödems sowie einer gestörten Proteinsynthese. Durch den erhöhten zytosolischen Calciumspiegel kommt es zur Aktivierung von Proteasen, Phospholipasen, Transglutaminasen und Endonukleasen mit entsprechenden funktionellen Einschränkungen und morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts, der Membranen und des Chromatins. Bei irreversibel geschädigten Zellen kommt es zur Verstärkung des Zellmembranschadens und dem kompletten Ausfall der Protein/Lipidsynthese (Zatloukal et al., 2004).

MAP2 zeichnet sich durch Verlust seiner neuronalen Immunreaktivität (MAP2-Expressionsverlust) nach Hypoxie/Ischämie als ein sensibler, besonders früh (akut) auf Sauerstoffmangel reagierender Marker aus. Dies wurde in einigen Studien sowohl an Hirngewebe von Ratten, Rennmäusen und Ferkeln (Kitagawa et al., 1989; Kwei et al., 1993; Lingwood et al., 2008; Malinak, Silverstein, 1996; Ota et al., 1997; Raley-Susman, Murata, 1995; Schmidt-Kastner et al., 1998; Yanagihara et al., 1990) als auch an menschlichem Hirngewebe nachgewiesen (Kühn et al., 2005; Qi et al., 2004).

1.8 Zielsetzung

Die beschriebenen epidemiologischen Charakteristika sowie die nicht vollständig aufgeklärte Pathogenese, inklusive der Neuropathogenese, verdeutlichen die zahlreichen offenen Probleme des plötzlichen Kindstodes und machen die Forschung auf dem Feld des SIDS (Sudden Infant Death Syndrom) unabdingbar. Das Ziel der Forschung muss die vollständige Aufklärung der Pathogenese, die weitere Abnahme der Inzidenz und – letztendlich – die Verhinderung bzw. Eliminierung des Phänomens plötzlicher Kindstod sein.

Eine Haupthypothese zur Pathophysiologie des SIDS geht davon aus, dass eine Hypoxie/Ischämie in den pathophysiologischen Abläufen des plötzlichen Kindstodes eine wichtige Rolle spielt und ein solcher Prozess dem Todesereignis vorausgeht. Wie oben beschrieben, lassen viele Studienergebnisse eine Hypoxie/Ischämie in der Kaskade des plötzlichen Kindstodes vermuten, aber nicht eindeutig beweisen, selbst nicht am Gehirn, welches bekanntermaßen besonders sensibel auf Sauerstoffmangel reagiert. Demzufolge muss bis heute als aktuelles Fazit der neuropathologischen Forschung festgehalten werden, dass im ZNS bisher keine signifikanten, pathophysiologisch eindeutig erklärbaren, durch eine Hypoxie/Ischämie induzierten Veränderungen nachweisbar sind.

Daraus ergab sich folgende Fragestellung: lassen sich an den Nervenzellen im Gehirn von SIDS Kindern hypoxische-ischämische Veränderungen nachweisen? Anwendung fand der Marker einer akuten Hypoxie/Ischämie MAP2 (Mikrotubulin-assoziiertes Protein 2), der besonders früh auf Sauerstoffmangel reagiert und dessen Immunreaktivität und Sensitivität gegenüber hypoxisch-ischämischen induzierten Schädigungen in mehreren Studien – u.a. auch an menschlichem Hirngewebe – belegt wurde.

2. Material und Methoden

2.1 Studienpopulation und Auswahlkriterien

Alle untersuchten Gehirne stammen aus den Instituten für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel und Campus Lübeck sowie des Universitätsklinikums Göttingen, aus den Jahren 1994 - 2005. Aus insgesamt 41 gesicherten Fällen wurden die folgenden drei Kollektive gebildet:

Kollektiv 1: *plötzlicher Kindstod/SIDS*

Kollektiv 2: *cerebrale Hypoxie/Ischämie* (Vergleichskollektiv)

Kollektiv 3: *Akutversterben* (Kontrollkollektiv)

Als Opfer eines plötzlichen Kindstodes wurden entsprechend der Definition nur Kinder berücksichtigt, die der unten aufgeführten Definition entsprachen. Diese Gruppe bestand aus 17 Säuglingen (Tabelle 2), davon neun männliche und acht weibliche Fälle, in einem Alter von 1 bis 8 Monaten, bei einem mittleren Lebensalter von 102 Tagen (3,2 Monaten). Die Hirngewichte lagen zwischen 500 g und 900 g. Teilweise lagen die Hirngewichte gering über den altersentsprechenden Erwartungen (Oehmichen et al., 2006).

Voraussetzung für die Aufnahme in dieses Kollektiv war die Diagnosestellung eines SIDS gemäß den internationalen Standards, d.h. nach Untersuchung des Falles durch eine vollständige Obduktion und histologische Organuntersuchung, inklusive Untersuchung des ZNS sowie einer toxikologischen Untersuchung, der Suche nach pathogenen Keimen und der Untersuchung der Todesumstände unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese (Froede, 2003; Kirschner, Wilson, 2001; Krous et al., 2004). Wurden aufgrund dieser Untersuchungen keine pathologischen Befunde erhoben, konnte die Diagnose SIDS gestellt werden.

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Fälle des Kollektivs *plötzlicher Kindstod /SIDS*; m = männlich, w = weiblich

| <i>Lfd. Nr.</i> | <i>Sektions Nr.</i> | <i>Geschlecht</i> | <i>Alter in Tagen</i> | <i>Hirngewicht in Gramm</i> |
|-----------------|---------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 1 | 126/01 | m | 30 | 630 |
| 2 | 325/01 | m | 45 | 570 |
| 3 | 591/04 | m | 58 | 520 |
| 4 | 178/04 | w | 60 | 560 |
| 5 | 124/03 | w | 61 | 500 |
| 6 | 28/02 | w | 70 | 600 |
| 7 | 137/01 | m | 73 | 590 |
| 8 | 105/01 | m | 75 | 650 |
| 9 | 363/01 | w | 78 | 620 |
| 10 | 38/04 | w | 91 | 620 |
| 11 | 199/02 | m | 95 | 590 |
| 12 | 169/01 | m | 101 | 670 |
| 13 | 57/01 | w | 105 | 670 |
| 14 | 83/04 | m | 120 | 600 |
| 15 | 353/02 | w | 211 | 760 |
| 16 | 361/01 | m | 220 | 900 |
| 17 | 65/01 | w | 240 | 760 |

In dem 2. Kollektiv wurden Kinder mit einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung zusammengefasst, insgesamt 14 Fälle (Tabelle 3), davon acht männliche und sechs weibliche. Das Lebensalter lag zwischen 1 bis 12 Monaten, mit einem mittleren Alter von 180 Tagen (6 Monaten). Die Hirngewichte lagen in einem Bereich von 430 g bis 1100 g, und erwiesen sich überwiegend als erhöht bzw. deutlich erhöht. Einschlusskriterien für dieses Kollektiv waren die Todesursachen: cerebrale Hypoxie/Ischämie, der in allen Fällen eine lang anhaltende (> 5 min) hypoxisch-ischämische Schädigung zugrunde gelegt werden konnte, die durch Zeugen und die rechtsmedizinische Untersuchung bestätigt werden konnte. Nicht berücksichtigt wurden Fälle mit Krankheiten, die zu neuronalem Untergang hätten führen können, wie Epilepsie, Diabetes mellitus oder chronische Intoxikation (Auer, Siesjo, 1988). Dieses Kollektiv wurde als Vergleichsgruppe angesehen.

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Fälle des Kollektivs *cerebrale Hypoxie/Ischämie*; m = männlich, w = weiblich

| <i>Lfd. Nr.</i> | <i>Sektions Nr.</i> | <i>Geschlecht</i> | <i>Alter in Tagen</i> | <i>Hirngewicht in Gramm</i> | <i>Diagnose</i> |
|-----------------|---------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------|--|
| 1 | 652/04 | m | 28 | 460 | Apnoe-Zustände |
| 2 | 3/01 | m | 35 | 550 | Akutes Ersticken: Kissen auf Gesicht |
| 3 | 111/00 | w | 45 | 430 | Aortenisthmusstenose |
| 4 | 140/99 | w | 63 | 807 | Virus-Pneumonie |
| 5 | 52/03 | m | 95 | 670 | Aortenisthmusstenose |
| 6 | 123/03 | m | 122 | k.A. | Frühgeburt, Apnoe |
| 7 | 222/03 | w | 135 | 570 | beim Essen akut erstickt |
| 8 | 81/05 | m | 155 | k.A. | Fehlbildung-Herz |
| 9 | 13/96 | m | 178 | 670 | Ventrikel-Septum-Defekt |
| 10 | 414/04 | m | 285 | 1100 | Ertrinken, kurzfristig überlebt |
| 11 | 965/02 | m | 329 | 820 | Strangulation |
| 12 | 660/00 | w | 333 | 830 | rezidivierende Apnoe |
| 13 | 807/01 | w | 355 | 800 | Herzfehler, Beatmungskanüle verstopft |
| 14 | 741/03 | w | 361 | 950 | Tubus herausgerutscht |

Die 3. Gruppe *Akutversterben* bestand aus zehn Fällen (Tabelle 4), davon sieben männlichen und drei weiblichen Geschlechts, im Alter von 1 bis 12 Monaten, mit einem mittleren Alter von 211 Tagen (7 Monaten). Die Hirngewichte lagen zwischen 530 g und 1000 g. Voraussetzung für die Aufnahme in das 3. Kollektiv waren Todesursachen, bei denen aufgrund von Zeugenaussagen, Polizeiprotokollen, ärztlichen Unterlagen sowie der makroskopischen und mikroskopischen Obduktionsbefunde eine Hypoxie/Ischämie sowie eine längere Agoniephase ausgeschlossen werden konnten.

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Fälle des Kollektivs *Akutversterben*; m = männlich, w = weiblich

| <i>Lfd. Nr.</i> | <i>Sektions Nr.</i> | <i>Geschlecht</i> | <i>Alter in Tagen</i> | <i>Hirngewicht in Gramm</i> | <i>Diagnose</i> |
|-----------------|---------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 121/94 | m | 29 | 530 | interstitielle Pankreatitis |
| 2 | 794/00 | m | 75 | 560 | Herzfehler |
| 3 | 1170/03 | m | 150 | 940 | Schädel-Hirn-Trauma |
| 4 | 50/02 | w | 153 | k.A. | Meningokokken-Sepsis ohne Meningitis |
| 5 | 168/02 | w | 181 | k.A. | Myofibrom des Herzens |
| 6 | 139/98 | w | 212 | 820 | Herztumor |
| 7 | 545/03 | m | 305 | k.A. | Polytrauma nach Sturz |
| 8 | 722/04 | m | 312 | 1000 | Balken-Agenesie |
| 9 | 351/04 | m | 335 | 930 | Verhungern/Verdursten |
| 10 | 32/04 | m | 358 | 900 | Hirnmissbildung |

2.2 Aufarbeitung und Untersuchung

2.2.1 Aufarbeitung der Gehirne und Herstellung von Schnittpräparaten

Die Obduktionen erfolgten innerhalb von 24 – 48 Std. nach Eintritt des Todes. Die bei der Obduktion entnommenen kompletten Gehirne wurden im Ganzen in 4,5%igem, gepuffertem Formalin fixiert und nach einer Fixierungszeit von mindestens 14 Tagen und maximal 28 Tagen makroskopisch untersucht, befundet und fotografiert. Für die sich anschließende umfangreiche mikroskopische Untersuchung und Befundung wurden regelmäßig Gewebe-Blöcke aus folgende Hirnabschnitten entnommen: frontale Großhirnrinde (1./2. Frontalhirnwindung), Stammganglien, Thalamus,

Hippokampus, Kleinhirn, Pons und Medulla oblongata. Die Gewebeblöcke wurden mittels Standardverfahren in Paraffin eingebettet. Es erfolgte in allen Fällen eine histologische Aufarbeitung, Befundung und Begutachtung mittels folgender Routinefärbungen: HE (Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich; Eosin, 1% wässrige Lösung), van Gieson und Nissl.

Es wurden ca. 4-5 µm dünne Paraffinschnitte der Ammonshornformation und der 1./2. Frontalhirnwindung am Schlittenmikrotom angefertigt. Die entstandenen Schnitte wurden in einem 40°C warmen Wasserbad geglättet und anschließend auf SuperfrostPlus®-Objektträger aufgezogen und über Nacht in einem 37°C warmen Brutschrank getrocknet.

Auf Grund der HE Färbungen ließen sich die wichtigsten anatomischen Strukturen voneinander unterscheiden. Leider konnte nicht in allen Fällen sowohl Frontalhirnrinde als auch Ammonshorn untersucht werden, da es sich um eine retrospektive Untersuchung handelt und vereinzelt nicht alle Gehirnböcke auffindbar waren.

2.2.2 Prinzip der immunhistochemischen Reaktion

Ziel der immunhistochemischen Reaktion ist die spezifische Darstellung eines Antigens mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch Farbniederschlag dargestellt wird. Die meisten der heute verwendeten immunchemischen Färbemethoden basieren auf der hohen Affinität von (Strept)Avidin für Biotin. Die sensitivste Variante der (Strept)Avidin-Biotin-Methode, die markierte-(Strept)Avidin-Biotin-Methode (LASB = Labelled-StreptAvidin-Biotin-Methode) kam in dieser Studie zur Anwendung (Boenisch, 2003). Im Folgenden soll einerseits der grundsätzliche Ablauf der LASB-Methode, der sich in drei Hauptschritte gliedert, andererseits aber auch die spezielle Applikation bei Darstellung des MAP2-Antigens an Nervenzellen kurz skizziert werden.

1. Schritt

Der Primärantikörper bindet an das gesuchte Antigen im Gewebe. Als Primärantikörper diente in dieser Studie MAP2a,b Ab-2 (Klon AP20, hergestellt von Neomarkers, Inc./Lab Vision, Fremont/USA; Code: MS-249-P). Der Antikörper Ab-2 ist ein monoklonaler Antikörper des Isotyps IgG₁ und weist hochspezifisch das hochmolekulare MAP2a,b Antigen im Zytoplasma von Nervenzellen und Dendriten nach. Der Klon AP20 wurde 1994 klassifiziert (Kalcheva et al., 1994). Als Immunogen diente MAP2 aus Rinderhirn. Die Gewinnung der Antikörper erfolgte aus Protein G chromatographisch gereinigtem Mäuseaszites. Ab-2 zeigt keine Kreuzreaktion mit MAP1, MAP5, Tubulin oder Tau, ebenso wenig mit der niedermolekularen Form von MAP2c.

2. Schritt

Als Sekundärreagenz wird ein biotinylierter Antikörper aufgetragen, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist. Der Sekundärantikörper stellt eine Verbindung zwischen dem Primärantikörper und dem Tertiärreagenz dar und wird dementsprechend auch als „Brückenantikörper“ bezeichnet.

3. Schritt

Peroxidase-konjugiertes (Strept)Avidin dient als Tertiärreagenz und stellt die Verbindung zum biotinylierten Brückenantikörper dar. Die Farbreaktion, also die Markierung des Antigens, wird nach Zugabe von Chromogen durch die Peroxidase katalysiert und führt zu einem unlöslichen, farbigen Niederschlag.

2.2.3 Reaktionsprotokoll

1. Vorbehandlung der Schnitte:

Entparaffinieren in Xylol für 2 x 15 min.

Rehydrieren in absteigender Ethanolreihe

(10 min. 100% Ethanol, dann jeweils 5 min. 96% und 70% Ethanol bis zum Aqua dest., 5 min.)

2. Antigen-Demaskierung:

Andauung der Schnitte in der Mikrowelle mit Zitronensäure (pH=6) für 1 min. bei maximaler Temperatur (800 W), dann 9 min. bei 90 W

3. Auskühlen: bei Raumtemperatur für 10 min. in Zitronensäure
4. Schnitte kurz mit Aqua dest. spülen
5. 3x3 min. spülen in Tris-Puffer
6. Blocken der endogenen Peroxidase durch Spülen in 3% H₂O₂ für 15 min.
7. 3x3 min. spülen in Tris-Puffer
8. Inkubation mit Primärantikörper:
MAP2a,b Ab-2 (Klon AP 20) 1:100 verdünnt mit Antikörperverdünnungsmedium in feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 60 min.
9. 3x3 min. spülen in Tris-Puffer
10. Inkubation mit Sekundärantikörper:
Biotinkonjugierter Ziege-Anti-Maus IgG-Antikörper (Vertrieb: Dianova GmbH, Hamburg, Code: 115-065-166, Herstellung: JacksonImmunoResearch Laboratories, Inc., West Baltimore, USA) 1:1000 verdünnt mit Antikörper-Verdünnungsmedium in feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 30 min.
11. 3x3 min. spülen in Tris-Puffer
12. Inkubation mit Streptavidin/HRP (Meerrettichperoxidase)
Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Vertrieb: Dianova GmbH, Hamburg, Code: 016-030-084, Herstellung: JacksonImmunoResearch Laboratories, Inc., West Baltimore, USA) 1:500 verdünnt mit Tris-Puffer in feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 30 min.
13. 3x3 min. spülen in Tris-Puffer
14. Farbentwicklung mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol):
Sichtbarmachen der Peroxidase durch eine Farbreaktion mit AEC-Farblösung (50 µl Substratpuffer + 50 µl Chromogenlösung + 50 µl Hydrogenperoxidlösung auf 1 ml Aqua dest.) bei Raumtemperatur für max. 30 min. unter mikroskopischer Kontrolle
15. Abstoppen der Farbreaktion in Aqua dest.
16. Kerngegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für 15-30 sec.
17. Bläuen der Kerne unter fließendem Leitungswasser für 10 min.
18. Überführen der Schnitte in Aqua dest.
19. Eindecken der gefärbten Schnitte aus Aqua dest. mit Aquatex®

Das Ergebnis einer positiven Reaktion stellt sich, aufgrund der Verwendung des Chromogens AEC, in Form eines rosenroten Farbniederschlags dar. Lichtmikroskopisch wird das farbige Endprodukt an den Stellen einer stattgefundenen Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar, also im Zytoplasma und den Dendriten der Nerven-

zellen. Bei jedem Färbevorgang wurde eine Positiv-Kontrolle (Frontale Großhirnrinde) mitgeführt, die das gesuchte Antigen sicher exprimiert.

Bei einigen wenigen Schnittpräparaten kam es während der Behandlungsprozedur, besonders bei der in Punkt zwei im Färbeprotokoll aufgeführten Mikrowellenbehandlung, zu einer Schnittablösung vom Objektträger. Die Färbung dieser Schnittpräparate wurde wiederholt, bis ein für die Auswertung verwertbares Präparat vorlag, Schnittpräparate hingegen, die trotz mehrmaligem Färben nicht auswertbar waren, wurden aus dem Untersuchungskollektiv ausgeschlossen. Ansätze und Lösungen der Chemikalien sowie deren Hersteller, ebenso wie die Hersteller der verwendeten Geräte sind im Anhang aufgelistet.

2.3 Anatomische Strukturen der untersuchten Hirnregionen

2.3.1 Ammonshornformation

Der Hippokampus liegt im Temporallappen an der Medialseite des Unterhorns des Seitenventrikels. Mit seinem Endstück bildet er dort eine tatzenähnliche Struktur, den Pes hippocampi. Im Querschnitt bildet der Hippocampus die Struktur des Ammonshorns, Cornu ammonis (CA), ab, das durch die eingerollte Archikortexstruktur zustande kommt. Die histologische Struktur des Cornu ammonis steht mit seiner Archikortex, und zum Teil auch Paleokortex-Struktur, dem Neo/Isokortex, mit seiner sechsschichtigen Gliederung, als so genannter Allokokortex, gegenüber. Das Zellband des Ammonshorns wird aufgrund seiner Zellgröße, Zelldichte und Breite sowie der unterschiedlichen Funktionen in vier Regionen eingeteilt:

CA4-Region: aufgelockerte Zellregion von Nervenzellen, umgeben vom hufeisenförmigen Gyrus dentatus;

CA3-Region: breites, lockeres Band großer Pyramidenzellen;

CA2-Region: große Nervenzellen in dichter Anordnung, so dass das Rindenband schmal erscheint;

CA1-Region: viele, kleine Pyramidenzellen bilden den Abschluss und gehen in das Subiculum über.

2.3.2 Frontale Großhirnrinde

Der histologisch sechsschichtige Neokortex ist der phylogenetisch jüngste und damit der am höchsten organisierte Teil der Großhirnrinde. Die Großhirnrinde nimmt fast die gesamte Hemisphärenoberfläche ein und ist durchschnittlich etwa 3-4 mm dick. Man unterscheidet im Neokortex mikroskopisch sechs, manchmal fließend ineinander übergehende Schichten, die von außen nach innen nummeriert werden. Diese sechs Rindenschichten sind in einzelnen Großhirn-Regionen unterschiedlich stark ausgeprägt.

I. Die Molekularschicht (Lamina molecularis):

Diese Schicht liegt an der Hirnoberfläche und besitzt keine Pyramidenzellen, aber locker verteilte kleine Zellen (Cajalsche Zellen), so wie – überwiegend – Nervenzellausläufer von tiefer gelegenen Neuronen und Astrozyten;

II. Die äußere Körnerschicht (Lamina granularis externa):

Sie besteht überwiegend aus kleinen Pyramidenzellen und Körnerzellen, die sehr dicht gepackt sind;

III. Die äußere Pyramidenschicht (Lamina pyramidalis externa):

Es handelt sich um die breiteste der Rindenschichten; die Pyramidenzellen dieser Schicht werden von außen nach innen größer;

IV. Die innere Körnerschicht (Lamina granularis interna):

Sie enthält vorwiegend kleine, dicht gepackte Pyramidenzellen, auch nicht-Pyramidenzellen sind hier zu finden;

V. Die innere Pyramidenschicht (Lamina pyramidalis interna):

Sie besteht aus mittelgroßen und großen Pyramidenzellen, wobei diese Schicht in fast allen Hirnarealen die größten Zellen der Großhirnrinde enthält;

VI. Die multiforme Schicht (Lamina multiformis):

Es finden sich viele Neurone unterschiedlicher Morphologie; diese Schicht enthält innen eine lockere kleinzellige und außen eine mehr großzellige Schicht; diese Schicht geht ohne scharfe Grenze ins Marklager über.

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurden nur die Schichten II-VI herangezogen, da die Molekularschicht keine Pyramidenzellen/Neurone enthält, die das Antigen

exprimieren. Die untersuchten Großhirnareale dieser Studie entstammen einheitlich der 1. bzw. 2. Frontalhirnwindung.

2.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte unter einem Zeiss Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung unter der Annahme, dass hypoxisch-ischämisch geschädigte Nervenzellen kein MAP2 exprimieren, mit dem Ziel, das Verhältnis MAP2-exprimierender Neurone (Farbniederschlag) zu nicht-MAP2-exprimierenden Neuronen (kein Farbniederschlag) zu ermitteln. Ausgezählt wurden die Segmente CA4 bis CA1 der Ammonshornregion sowie die Schichten II bis VI der Großhirnrinde. Jeweils 100 Nervenzellen wurden ausgezählt. Die Ergebnisse der Auszählung, d.h. der Anteil der MAP2-positiven Nervenzellen an jeweils 100 ausgezählten Nervenzellen pro Schicht /Segment, sind im Anhang tabellarisch aufgelistet. Die Auszählung erfolgte blind, ohne Kenntnis davon, welchem der drei Kollektive das untersuchte Präparat zuzuordnen war. Grundlage für die statistische Auswertung war der Anteil MAP2-positiver Nervenzellen in den jeweils ausgezählten Hirn-Arealen.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Auszählung wurden für die statistische Berechnung in ≤ 5 und > 5 dichotomisiert. Die statistische Auswertung folgte einem explorativen Ansatz und wurde mit Hilfe des Fisher-Tests durchgeführt, der aufgrund der niedrigen Besetzungszahlen Anwendung fand. In einem ersten Schritt wurden die drei Kollektive, mit Hilfe des Fisher-Tests für 2 x 3-Felder-Kontingenztafeln, auf Unterschiede untersucht, wobei ein Testergebnis als signifikant betrachtet wurde, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Bei signifikanten Ergebnissen schloss sich der Fisher-Test für 2 x 2-Felder-Kontingenztafeln an, bei dem die Kollektive paarweise verglichen wurden. Wegen des multiplen Testproblems ($n=3$ Vergleiche) ergab sich, nach Bonferroni-Korrektur, ein adjustiertes Niveau von $p \leq 0,01666667$ für diese Tests. Sämtliche statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm R (A language and environment for statistical computing, R Development Core Team, Wien 2007). Die graphischen Darstellungen der Daten, mittels Boxplots, wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 4.03, 2005) angefertigt. Die Boxplots geben Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum der Werte wieder.

3. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war, das Verhältnis von MAP2-positiven zu MAP2-negativen Nervenzellen in jeweils allen ausgezählten Nervenzellschichten der Frontalhirnrinde und den Segmenten der Ammonshornformation zu erfassen und deren Anzahl bei Opfern eines plötzlichen Kindstodes, eines Todes nach cerebraler Hypoxie/Ischämie und eines akuten Todes ohne Hypoxie/Ischämie miteinander zu vergleichen. Im Folgenden werden zunächst die makroskopischen und mikroskopischen Befunde sowie das Färbeverhalten der Schnittpräparate beschrieben und durch Fotos ausgewählter Präparate verdeutlicht und ergänzt. Sodann werden anhand der zwei untersuchten Hirnregionen, Frontalhirnrinde und Ammonshornformation, die drei Kollektive paarweise verglichen, so dass jeweils Vergleiche aller Kollektive miteinander vorliegen. Dementsprechend gliedert sich die Darstellung der Ergebnisse in drei Hauptteile. Verdeutlicht und vervollständigt wird die Gegenüberstellung der Kollektive durch graphische Darstellungen mit Hilfe von Boxplots, deren numerische Werte im Anhang tabellarisch aufgeführt sind. Alle dargestellten Ergebnisse für den paarweisen Vergleich der Kollektive beruhen auf den Daten des Bonferroni-korrigierten Fisher-Tests für 2 x 2-Felder-Kontingenztafeln, wobei die Ergebnisse des Vergleiches bei einem p-Wert $\leq 0,01666667$ als signifikant gewertet wurden. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind im Anhang aufgeführt.

3.1 Qualitative Untersuchung

3.1.1 Makroskopische Hirnuntersuchung

Alle Gehirne wurden zunächst makroskopisch untersucht, befundet und fotografisch dokumentiert. Es konnten folgende globale Feststellungen getroffen werden:

Im Kollektiv *plötzlicher Kindstod* waren makroskopisch keinerlei Auffälligkeiten zu beobachten. Wie bereits erwähnt, lag das Hirngewicht teilweise leicht über der Norm, wobei sich jedoch eindeutige Hirndruckzeichen nicht nachweisen ließen. Missbildungen lagen ebenso wenig vor wie Blutungen.

Im Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie* lag das Hirngewicht in Einzelfällen deutlich über der altersentsprechenden Norm, wobei in diesen Fällen auch makroskopisch teilweise eindeutig ausgeprägte Hirndruckzeichen zu erfassen waren. Allerdings konnten in keinem der Fälle laminäre Rindennekrosen, Nekrosen des Hirnstamms, oder der zentralen Kerne (insbesondere im Pallidum) beobachtet werden.

Im Kollektiv *Akutversterben* fand sich ausschließlich im Fall eines Schädel-Hirntraumas eine frische, reaktionslose Subarachnoidalblutung, im Übrigen waren jedoch makroskopisch keine Blutungen und keinerlei Entzündungen erkennbar. Es fanden sich Zeichen einer Hirnmissbildung sowohl im Fall der Balkenagenesie, als auch im Fall der Hirnmissbildung mit Turmschädel und Brachycephalie.

3.1.2 Mikroskopische Hirnuntersuchung

Bei der mikroskopischen Untersuchung des gesamten Gehirns – Groß- und Kleinhirn, einschließlich Mittel- und Stammhirn – konnten weder im Kollektiv *plötzlicher Kindstod* noch im Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie* oder im Kollektiv *Akutversterben* eindeutige pathologische Veränderungen beobachtet werden. Insbesondere konnten allenfalls diskrete Anzeichen einer hypoxisch-ischämischen neuronalen Schädigung festgestellt werden, nicht jedoch im Sinne eines Nervenzellverlustes, als Hinweis auf eine länger zurückliegende Hypoxie/Ischämie, sondern im Sinne einer sogenannten eosinophilen Veränderung einzelner Neurone. Dies galt

u.a. gleichermaßen für die Frontalhirnrinde und das Ammonshorn. In der Gruppe der akut verstorbenen Säuglinge wurden die zu erwartenden histologischen Veränderungen bei Hirnmissbildung beobachtet, aber keine zusätzlichen Auffälligkeiten. Im Fall des Schädel-Hirn-Traumas konnte auch histologisch die Subarachnoidalblutung bestätigt werden.

3.1.3 Spezifisches Färbeverhalten bei MAP2-Reaktion

Jedes Schnittpräparat wurde makroskopisch sowie mikroskopisch in aufsteigender Vergrößerung eingehend betrachtet und befundet. Schon bei makroskopischer Betrachtung der Schnittpräparate konnten bei einem Großteil der Präparate Unterschiede in der Intensität des Farbniederschlags im Zytoplasma der Nervenzellen ausgemacht werden. Dabei zeigte sich bei Präparaten des Kontrollkollektivs *Akut-versterben* makroskopisch durchweg eine stärkere Intensität des rosenroten Farbniederschlags, als Ausdruck einer Antigen-Antikörperreaktion, als bei Nervenzellen der Kollektive *cerebrale Hypoxie/Ischämie* und *plötzlicher Kindstod*.

Bei der mikroskopischen Betrachtung waren selektiv MAP2-positive Nervenzellen mit Farbniederschlag im Zytoplasma und den Dendriten dargestellt. Die positiv reagierenden Nervenzellen, die im Vergleich mit der mitgeführten Positivkontrolle gleich stark angefärbt waren, ließen sich jedoch bis auf wenige Ausnahmen deutlich gegenüber MAP2-negativen Nervenzellen (kein Farbniederschlag) abgrenzen. Zusätzlich waren in einigen wenigen Präparaten der Kollektive *cerebrale Hypoxie/Ischämie* und *plötzlicher Kindstod* in der frontalen Großhirnrinde, v.a. in Schicht III, hydroptisch geschwollene Nervenzellen zu beobachten sowie in der Ammonshornformation, v.a. im Segment CA4, durch den Antikörper gefärbte Mikrogliazellen. Nach makroskopischer und mikroskopischer Betrachtung und Befundung der Schnittpräparate der beiden untersuchten Hirnregionen, frontale Großhirnrinde und Ammonshornformation, konnten keine zusätzlichen Anzeichen für Hirnmissbildung, Entwicklungsstörungen oder akute herdförmige Veränderung durch Blutungen oder Entzündungen festgestellt werden.

3.1.4 Fotografische Wiedergabe

Nachfolgend werden anhand ausgewählter mikroskopischer Fotos die unterschiedlichen Reaktionsmuster der Nervenzellen der drei Kollektive dargestellt. Ersichtlich wird in zwei Kontrollfällen (*Akutversterben*) (Abbildungen 3, frontale Großhirnrinde und 6a, Ammonshornformation), dass sich nahezu alle Nervenzellen als MAP2-positiv erweisen und nur vereinzelt MAP2-negative Neurone auftreten. Bei Fällen einer *cerebralen Hypoxie/Ischämie* (Abb. 4a) sowie eines *plötzlichen Kindstodes* (Abb. 4b) aber wiesen nahezu alle Präparate eine deutliche Reduktion der Anzahl MAP2-positiver Neurone auf. In einigen Fällen fanden sich ganze Nervenzell-Schichten bzw. -Segmente mit komplettem Verlust einer MAP2-Reaktion in den Nervenzellen (keine Farbreaktion) (Abbildung 4, 5, 6b).

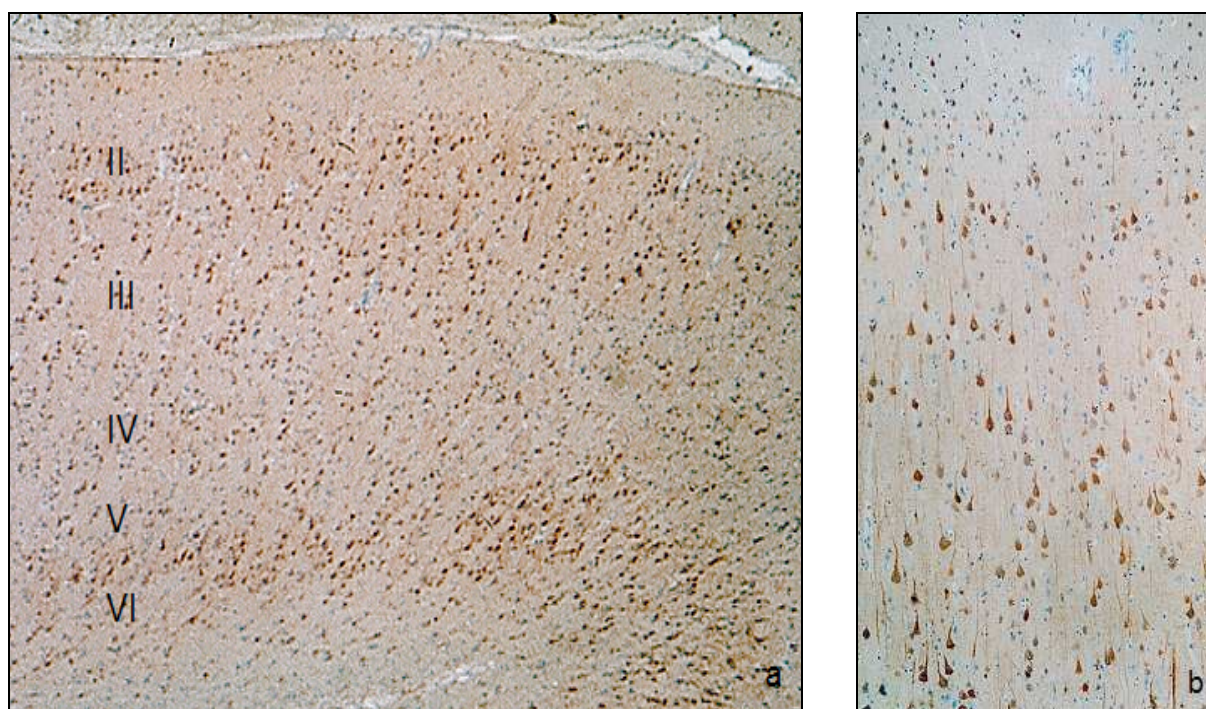


Abbildung 3: Darstellung von Nervenzellen der frontalen Großhirnrinde eines Kontrollfalles *Akutversterben* (Sektionsnummer 50/02) nach immunhistochemischer MAP2-Reaktion:

a) Übersicht der sechsgliedrigen Großhirnrindenstruktur, mit Darstellung von MAP2-positiven Nervenzellen in allen Schichten (25-fache Vergrößerung), b) deutliche Darstellung von MAP2-positiven Nervenzellen in den Schichten II und III der Großhirnrinde (200-fache Vergrößerung)

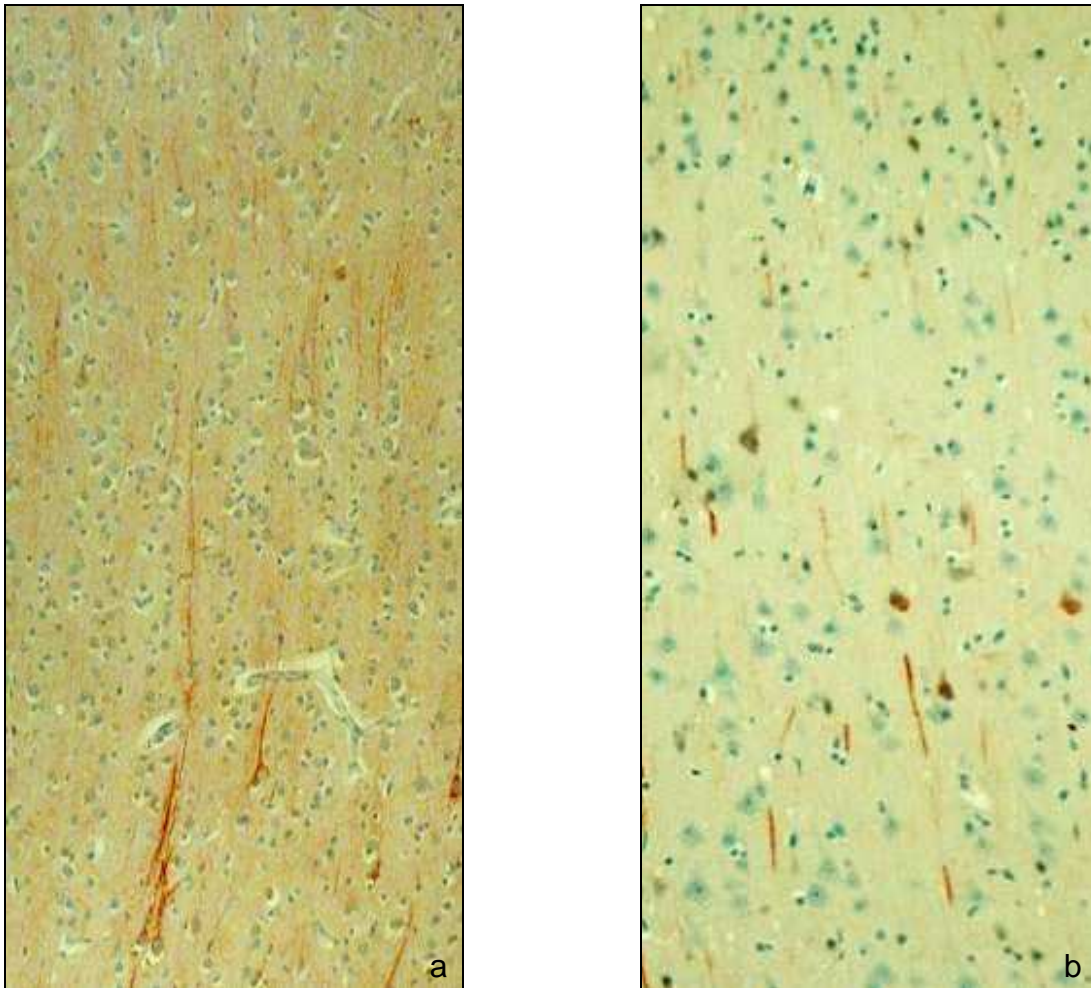


Abbildung 4: Darstellung von Nervenzellen der frontalen Großhirnrinde eines *Hypoxie/Ischämie*-Falles (Sektionsnummer 332/00) und eines *SIDS*-Falles (Sektionsnummer 38/04) nach immunhistochemischer MAP2-Reaktion:

a) Detailansicht der Großhirnrindenschichten II und III eines *Hypoxie/Ischämie*-Falles mit deutlicher Reduktion der Anzahl MAP2-positiver Nervenzellen (200-fache Vergrößerung), b) Detailansicht der Großhirnrindenschichten II und III eines *SIDS*-Falles mit deutlicher Reduktion der Anzahl MAP2-positiver Nervenzellen (200-fache Vergrößerung)

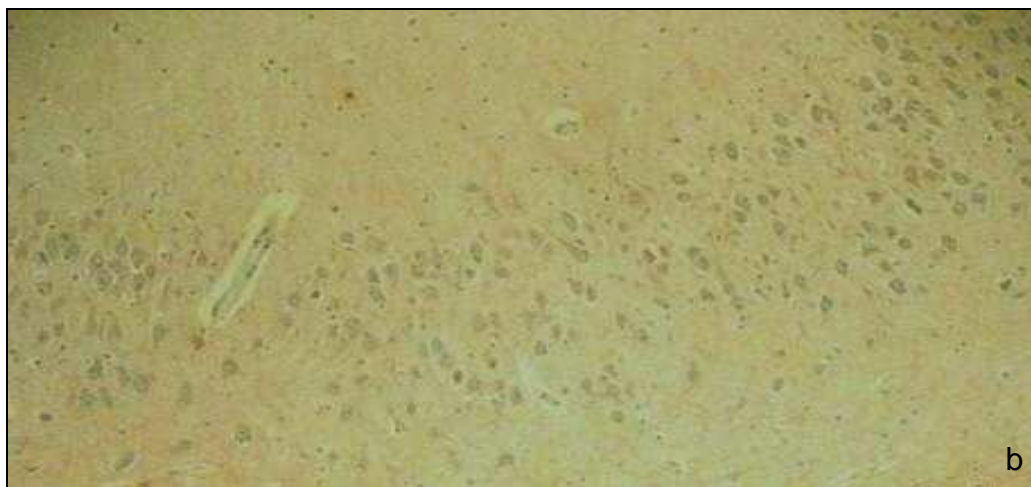
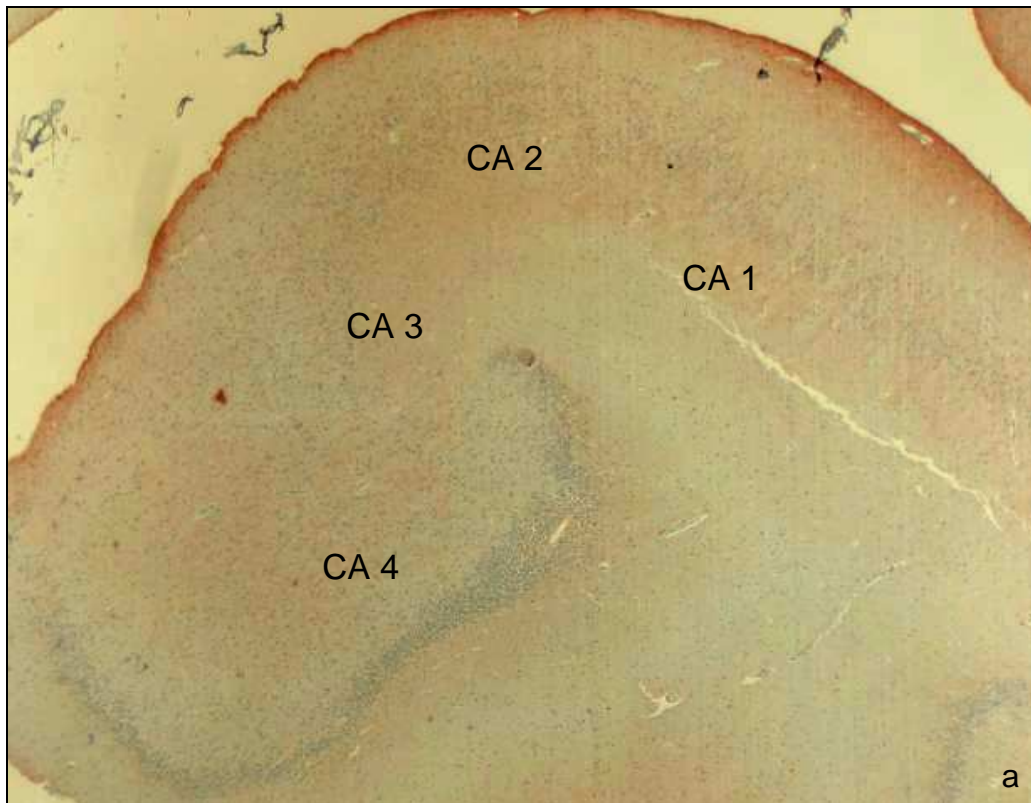


Abbildung 5: Darstellung von Nervenzellen der Ammonshornformation zweier *Hypoxie/Ischämie*-Fälle nach immunhistochemischer MAP2-Reaktion: a) Übersicht der Ammonshornsegmente CA4-CA1, mit fehlender immunhistochemischer MAP2 Antigen-Antikörperreaktion der Nervenzellen in allen Segmenten (Sektionsnummer 111/00; 25-fache Vergrößerung), b) Detaillierte Darstellung der Nervenzellen im Bereich des Übergangs der Segmente CA3-CA2, mit durchgehend fehlender MAP2-Expression der Nervenzellen (Sektionsnummer 660/00; 200-fache Vergrößerung)

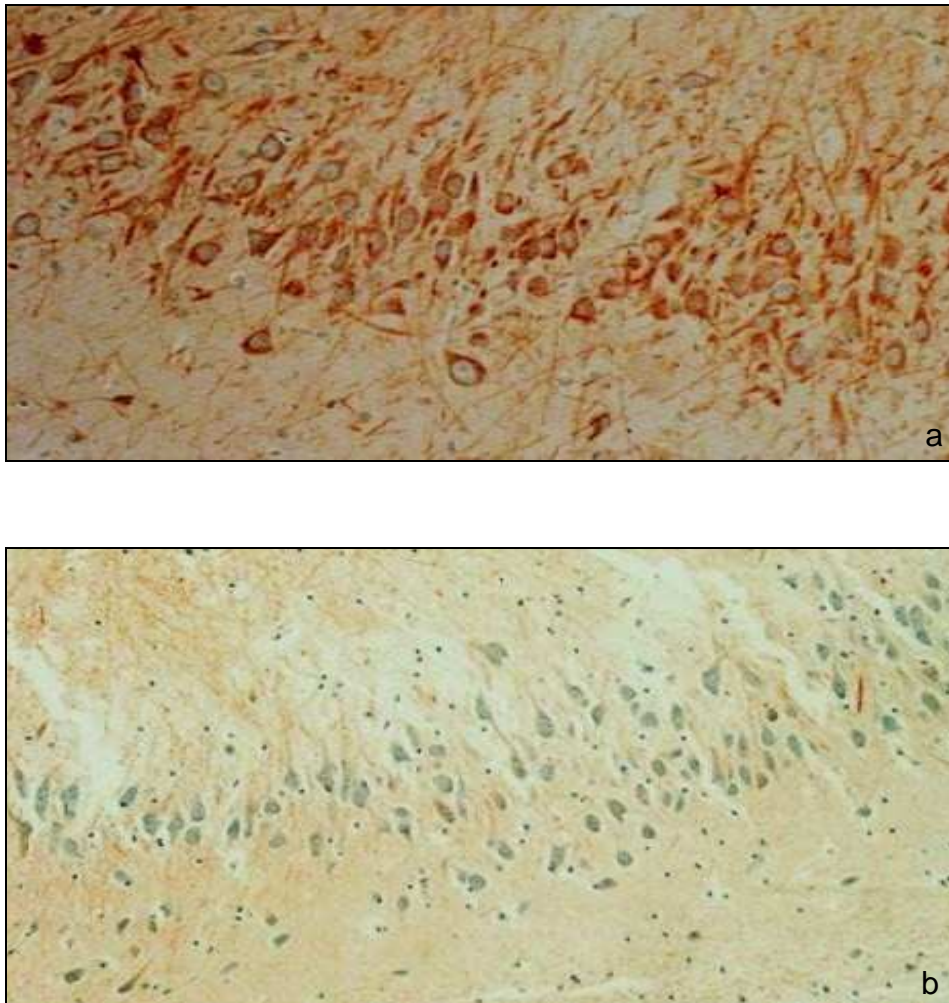


Abbildung 6: Darstellung von Nervenzellen der Ammonshornformation eines Kontrollfalles *Akutversterben* (Sektionsnummer 168/02) und eines *SIDS*-Falles (Sektionsnummer 65/01) nach immunohistochemischer MAP2-Reaktion: a) Detaildarstellung der Segmente CA3-CA2 des Kontrollfalles mit dichtem Besatz MAP2-positiver Nervenzellen (200-fache Vergrößerung), b) Detaildarstellung der Segmente CA3-CA2 des *SIDS*-Falles mit fehlender MAP2-Expression der Nervenzellen (200-fache Vergrößerung)

3.2 Quantitative Untersuchung

3.2.1 Vergleich des Kontrollkollektivs *Akutversterben* mit dem Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie*

Frontale Großhirnrinde

Die Gegenüberstellung der Hirnrindenschichten II bis VI der beiden Kollektive zeigte nur in Hirnrindenschicht III signifikante Unterschiede (Abb. 7), d.h. eine signifikante Reduktion der MAP2 exprimierenden Neurone im Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie*. In den vier anderen Schichten II und IV bis VI der Hirnrinde war die Reduktion der MAP2-positiven Nervenzellen im Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie* unter Beachtung des adjustierten Signifikanzniveaus zwar statistisch nicht signifikant, aber auch diese Hirnrindenschichten wiesen bei Vergleich der beiden Kollektive durchweg eine deutlich gleichgerichtete Diskrepanz der Mediane auf, anschaulich in Abbildung 7 dargestellt, wobei die Mediane des Kontrollkollektivs den jeweils höheren Wert MAP2-reagierender Neurone aufwiesen.

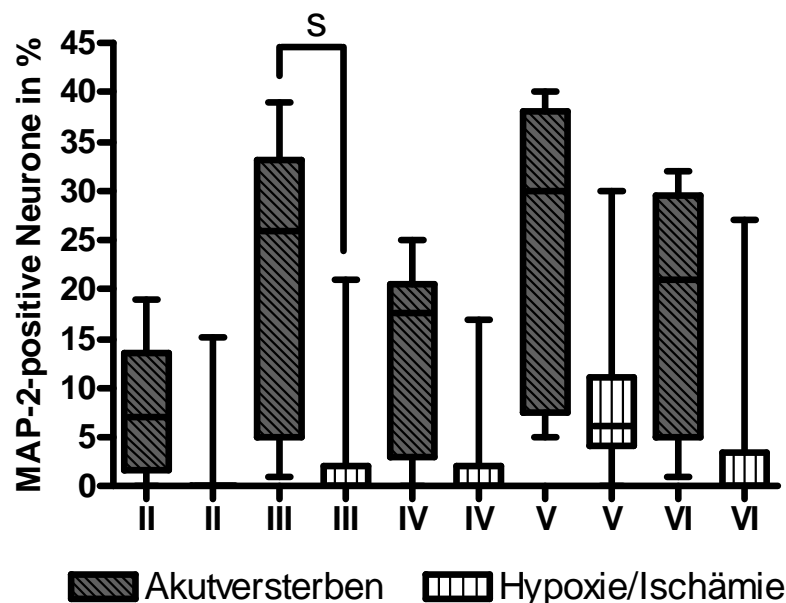


Abbildung 7: Frontale Großhirnrinde – Anzahl der MAP2-positiven Nervenzellen des Kollektivs *cerebrale Hypoxie/Ischämie* im Vergleich zum Kontrollkollektiv *Akutversterben*; s = signifikant

Ammonshornformation

Bei Vergleich der vier Ammonshornsegmente CA4-CA1 beider oben genannter Kollektive zeigten sich in fast allen Segmenten signifikante Unterschiede. In den Regionen CA4 bis CA2 exprimierten im Kontrollkollektiv *Akutversterben* signifikant mehr Nervenzellen MAP2 als im Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie*. Der größte Verlust MAP2-positiver Nervenzellen war jeweils in den Regionen CA3 und CA2 des Hypoxie/Ischämie Kollektivs zu beobachten. In der Region CA1 zeigte sich bei Vergleich der Kollektive trotz nicht signifikanter Unterschiede nach dem Bonferroni-korrigierten Fisher-Test eine manifeste Differenz der Mediane bezüglich der MAP2-Expression, dargestellt im Boxplotdiagramm (Abb. 8), mit einem höheren Median durchgehend in dem Kontrollkollektiv.

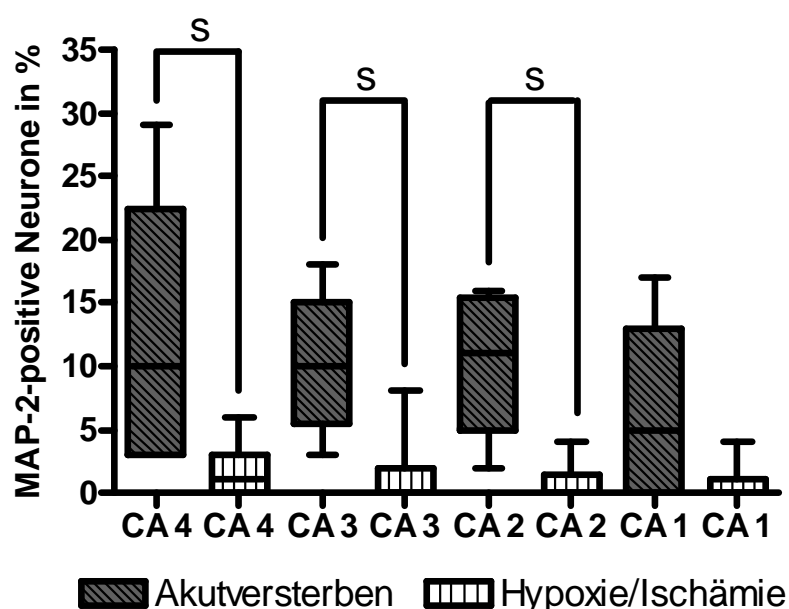


Abbildung 8: Ammonshorn – Anzahl der MAP2-positiven Nervenzellen des Kollektivs *cerebrale Hypoxie/Ischämie* im Vergleich zum Kontrollkollektiv *Akutversterben*; s = signifikant

3.2.2 Vergleich des Kontrollkollektivs *Akutversterben* mit dem Kollektiv *plötzlicher Kindstod*

Frontale Großhirnrinde

Der Vergleich beider Kollektive, in den fünf Hirnrindenschichten, ergab keine signifikanten Unterschiede. Es konnte keine signifikante Reduktion von MAP2-positiven Neuronen nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich – u.a. bei Betrachtung des zugehörigen Diagramms (Abb. 9) –, dass die Mediane in allen Schichten des Kontrollkollektivs *Akutversterben* deutlich über den Medianen des Kollektivs *plötzlicher Kindstod* lagen. Allerdings ist in der Kontrollgruppe eine erhebliche Streuung erkennbar.

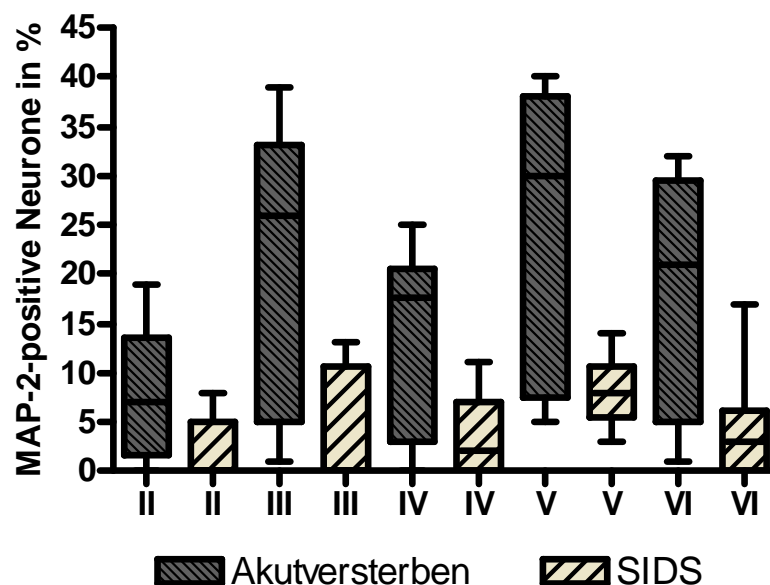


Abbildung 9: Frontale Großhirnrinde – Anzahl der MAP2-positiven Nervenzellen des Kollektivs *plötzlicher Kindstod* im Vergleich zum Kontrollkollektiv *Akutversterben*

Ammonshornformation

In den Regionen CA3 und CA2 der Ammonshornformation des Kollektivs *plötzlicher Kindstod* stellten sich signifikant weniger MAP2 gefärbte Nervenzellen dar, als in den korrespondierenden Regionen des Kontrollkollektivs *Akutversterben*. Am deutlichsten war die Reduktion der MAP2-positiven Nervenzellen in dem Segment CA2. Im Boxplotdiagramm (Abb. 10) fanden sich bei diesem Vergleich generell deutlich niedrigere Mediane im Kollektiv *plötzlicher Kindstod* als im Kollektiv *Akutversterben* auch in den nicht-signifikanten Segmenten CA4 und CA1, wobei in diesen beiden Segmenten der Unterschied der Mediane weniger ausgeprägt war.

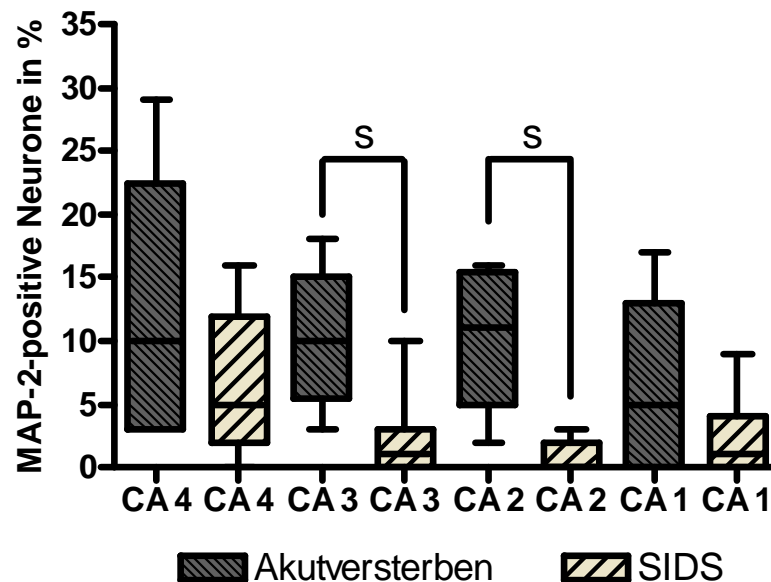


Abbildung 10: Ammonshorn – Anzahl der MAP2-positiven Nervenzellen des Kollektivs *plötzlicher Kindstod* im Vergleich zum Kontrollkollektiv *Akutversterben*; s = signifikant

3.2.3 Vergleich des Kollektivs *plötzlicher Kindstod* mit dem Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie*

Frontale Großhirnrinde

Alle untersuchten Hirnrindenschichten zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl MAP2-positiver Nervenzellen nach immunhistochemischer Reaktion. Dieser Trend ließ sich auch beim Vergleich der Boxplots (Abb. 11) graphisch aufzeigen. Die Boxplots erschienen annähernd gleich konfiguriert und auch bei Betrachtung des Medians stellten sich keine nennenswerten Differenzen dar.

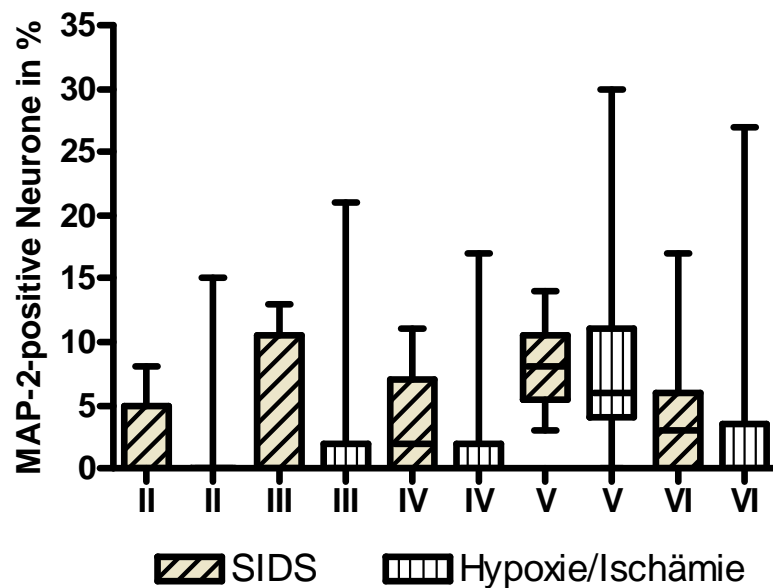


Abbildung 11: Frontale Großhirnrinde – Anzahl der MAP2-positiven Nervenzellen des Kollektivs *plötzlicher Kindstod* im Vergleich zum Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie*

Ammonshornformation

Nach Auswertung der Ergebnisse des Bonferroni-korrigierten Fisher-Tests konnten bei Gegenüberstellung der beiden Kollektive in keinem der vier Segmente der Ammonshornregion signifikante Unterschiede festgestellt werden. Auch hier erschienen die Boxplots (Abb. 12) nahezu gleich konfiguriert, v.a. in Bezug auf den Median, mit Ausnahme der Region CA4 des Kollektivs *plötzlicher Kindstod*, in dem der Median sich leicht von dem des Hypoxie/Ischämie-Kollektivs unterscheiden ließ.

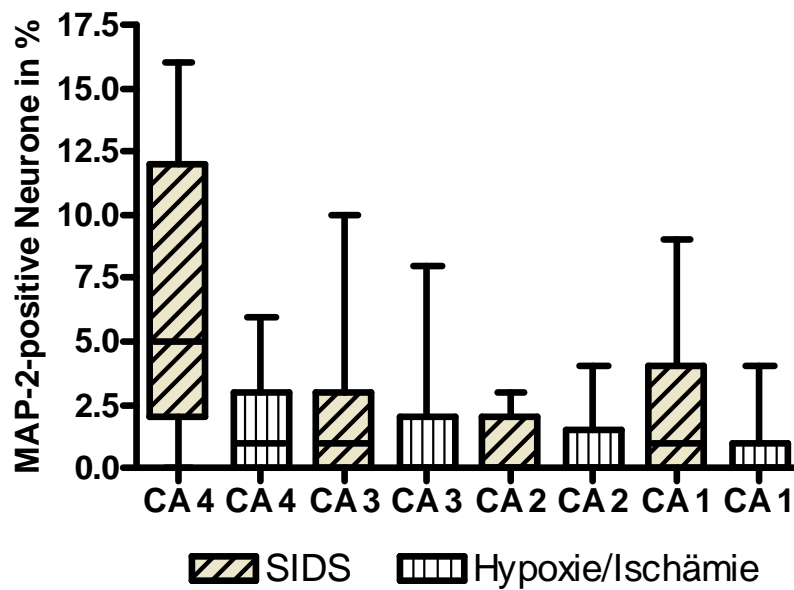


Abbildung 12: Ammonshorn – Anzahl der MAP2-positiven Nervenzellen des Kollektivs *plötzlicher Kindstod* im Vergleich zum Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie*

4. Diskussion

Morphologische Äquivalente einer hypoxisch-ischämischen Zellschädigung am Gehirn lassen sich anhand zweier, unterschiedlicher Arten der Nervenzellschädigung lichtmikroskopisch nachweisen, wobei die Art der Nervenzellschädigung vom Vorhandensein bzw. dem Ausmaß einer Reperfusion abhängig ist und die strukturellen, zytologischen Veränderungen in diesen Fällen meist nur diskret darzustellen sind.

In Fällen einer hypoxisch-ischämischen Nervenzellschädigung mit globaler oder partieller Reperfusion zeigt sich lichtmikroskopisch in HE-gefärbten Schnittpräparaten eine Eosinophilie im Zytoplasma von „geschrumpften“ Nervenzellen, welche auch als dunkle Nervenzellschädigung („dark nerve cell injury“) bezeichnet wird. In Nissl-gefärbten Präparaten sind die geschädigten Nervenzellen durch ein verdichtetes Zyto- und Karyoplasma, stark geblähte Mitochondrien sowie eine Schwellung perineuraler und perivaskulärer Astrozytenfortsätze charakterisiert. Diese Veränderungen können nach 40 bis 60 Minuten oder innerhalb einiger Stunden beobachtet werden, wobei jedoch Nervenzellveränderungen, die als sogenannte „dark neurons“ imponieren, differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden müssen (Kalimo et al., 1982; Oehmichen, Meissner, 2006).

Eine lokale oder generalisierte Hypoxie/Ischämie ohne Reperfusion, die als Modell und Grundlage der vorliegenden Studie diente, zeigt lichtmikroskopisch nach Nissl-Färbung ein Ödem von Nervenzellen und Astrozyten, eine leichte Schwellung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums sowie eine Dilatation des Kernchromatins. Diese Veränderungen der Nervenzellen sind sehr diskret und werden auch als „blasse“ Nervenzellschädigung bezeichnet („pale nerve cell injury“). Der zytologische Nachweis dieser Nervenzellschädigung lässt sich frühestens nach 10-30 min., generell aber erst nach mehreren Stunden des Überlebens eines hypoxisch-ischämischen Geschehens erbringen (Kalimo et al., 1982; Oehmichen, Meissner, 2006). Neben diesen eher diskreten, lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen lässt sich als deutliches Zeichen einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung ohne Reperfusion (oder eines perakuten Todes als Folge einer Hypoxie/Ischämie) auf quantitativer Ebene der Verlust der Immunreaktivität des MAP2 nachweisen. Dies wurde in einigen Tiermodellen (Tomimoto, Yanagihara,

2000; Yanagihara et al., 1990) sowie auch am menschlichen Gehirn nachgewiesen (Kühn et al., 2005; Qi et al., 2004).

4.1 Bewertung der eigenen Ergebnisse

4.1.1 Ammonshornformation

Die Ammonshornformation gilt als ein sehr sensibles und frühzeitig auf Sauerstoffmangel reagierendes Hirnareal (Ota et al., 1997). Beim Vergleich der Ammonshornformation der drei Kollektive *Akutversterben*, *plötzlicher Kindstod* und *cerebrale Hypoxie/Ischämie* ließen sich signifikante Unterschiede in der Expression des MAP2 der Nervenzellen in den einzelnen Ammonshornsegmenten aufzeigen. Durchgehend fand sich eine Reduktion der MAP2-reaktiven Neurone in den Kollektiven *Plötzlicher Kindstod* und *cerebrale Hypoxie/Ischämie* – im Vergleich zum Kollektiv *Akutversterben*.

Bei der Gegenüberstellung der Segmente CA4 bis CA1 der beiden Kollektive *Akutversterben* und *cerebrale Hypoxie/Ischämie* zeigten sich signifikante Unterschiede der MAP2-Expression in den Segmenten CA4 bis CA2. Die dargestellten Ergebnisse bestätigen und ergänzen damit die Resultate anderer Forschergruppen, in denen sich MAP2 als Marker einer akuten hypoxisch-ischämisch bedingten Hirnläsion erwiesen hat (Kitagawa et al., 1989; Kühn et al., 2005; Kwei et al., 1993; Lingwood et al., 2008; Malinak, Silverstein, 1996; Ota et al., 1997; Qi et al., 2004; Raley-Susman, Murata, 1995; Schmidt-Kastner et al., 1998; Yanagihara et al., 1990). Der signifikante Rückgang der MAP2-Expression als Folge einer hypoxisch-ischämischen Hirnläsion im Ammonshornsegment CA4 des Kollektivs *cerebrale Hypoxie/Ischämie* wird durch die Literatur gestützt. Es konnte gezeigt werden, dass die Nervenzellen der Region CA4 früh, d.h. bereits kurz nach überlebter Hypoxie/Ischämie, Schädigungen aufweisen (Auer, Siesjo, 1988; Kirino, Sano, 1984; Tomimoto, Yanagihara, 2000). Dabei reagieren die Nervenzellen dieser Region im Gegensatz zu den Nervenzellen des Segments CA1 vornehmlich auf schwere Hypoxien/Ischämien, die eine frühe, akute Nervenzellschädigung bewirken, welches sich u.a. in einem Verlust der MAP2-Immunreaktivität widerspiegelt (Kühn et al., 2005; Ota et al., 1997).

Die Nervenzellen des Ammonshornsegments CA3 sind ebenfalls sauerstoffsensibel, was in der vorliegenden Studie durch eine signifikante MAP2-Reduktion im *Hypoxie/Ischämie* Kollektiv bestätigt werden konnte. Allerdings konnte in diesem Segment – im Vergleich zu den drei anderen Ammonshornsegmenten – auch eine relative Stabilität gegenüber Sauerstoffmangel beschrieben werden (Bernaudin et al., 1998; Kirino, Sano, 1984; Kitagawa et al., 1989; Kühn et al., 2005; Ota et al., 1997; Tomimoto, Yanagihara, 2000). Insbesondere beim Vergleich mit dem Ammonshornsegment CA1 zeigt sich eine unterschiedliche Vulnerabilität des Segments CA3, welche durch eine erhöhte Glutamat (NMDA) Rezeptor Antwort der CA1 Neurone bedingt ist. Diese wird ihrerseits durch Tyrosinkinasen und Phosphatasen sowie den protektiven Effekt der Azidose gesteuert, die die Glutamat (NMDA) Rezeptor Antwort der CA3-Neurone herunterreguliert (Cronberg et al., 2005; Gee et al., 2006). Die Theorie einer relativen Stabilität der Nervenzellen des Segments CA3 beruht auf den Ergebnissen von Studien an adulten Ratten, wohingegen in Studien an 7 Tage alten Ratten eine selektive Vulnerabilität des Ammonshornsegments CA3 gezeigt werden konnte (Ota et al., 1997).

Die signifikante Reduktion der MAP2-positiven Nervenzellen des Ammonshornsegments CA2 im Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie* bestätigt vorliegende Forschungsergebnisse, die eine frühe Schädigung der Nervenzellen des Segments CA2 nach einer Hypoxie/Ischämie beschrieben haben (Kirino, Sano, 1984; Kitagawa et al., 1989; Tomimoto, Yanagihara, 2000; Yanagihara et al., 1990).

Im Ammonshornsegment CA1 fand sich kein signifikanter Unterschied in der MAP2-Expression der Nervenzellen bei Vergleich der beiden Kollektive. Im Allgemeinen reagieren die Nervenzellen des Ammonshornsegments CA1 sehr sensitiv gegenüber Sauerstoffmangel, was durch eine erhöhte Anzahl von Glutamat (NMDA) Rezeptoren und deren verstärkte Aktivierung während einer Hypoxie/Ischämie in diesem Segment erklärt wird (Auer, Siesjo, 1988; Bernaudin et al., 1998; Cronberg et al., 2005; Gee et al., 2006; Kitagawa et al., 1989; Smith, 2000; Tomimoto, Yanagihara, 2000; Yamamoto et al., 1986; Yanagihara et al., 1990). Diese Nervenzellläsionen treten allerdings erst 2-3 Tage nach dem Ereignis und einer Reperfusion auf und werden als sogenannter „verzögerter Zelltod“ („delayed neuronal death“) bezeichnet, was durch die temporäre Reifung („Maturation“) des Prozesses der Nervenzellschädigung

erklärt wird (Ito et al., 1975; Kalimo et al., 1982; Kirino, 1982; Kühn et al., 2005). Demzufolge sind in dieser Studie, aufgrund der nicht vorhandenen Reperfusion und der zu kurzen Überlebenszeit, die Mechanismen („Maturation“), die der beschriebenen Art der Nervenzellschädigung („delayed neuronal death“) zu Grunde liegen, nicht gegeben, so dass im Vergleich der beiden Kollektive kein MAP2-Expressionsverlust zu erwarten war.

Bei der Gegenüberstellung der vier Ammonshornsegmente CA4 bis CA1 der Kollektive *Akutversterben* und *plötzlicher Kindstod* zeigte sich eine signifikante Reduktion der MAP2-positiven Nervenzellen in den Ammonshornsegmenten CA3 und CA2 des Kollektivs *plötzlicher Kindstod*. Wie bereits erwähnt sind diese beiden Ammonshornsegmente, v.a. das Segment CA2, sehr sauerstoffsensibel und reagieren früh auf eine hypoxisch-ischämische Schädigung (Bernaudin et al., 1998; Kirino, Sano, 1984; Kitagawa et al., 1989; Ota et al., 1997; Tomimoto, Yanagihara, 2000; Yanagihara et al., 1990). Das Segment CA4, das neben dem Segment CA2 ebenfalls akut auf einen Sauerstoffmangel reagieren soll, zeigte in der vorliegenden Studie jedoch keinen signifikanten MAP2-Expressionsverlust der Nervenzellen im Kollektiv *plötzlicher Kindstod*. Im Ammonshornsegment CA1 war kein Verlust der MAP2-Immunreaktivität zu erwarten, da die Voraussetzungen, die den verzögerten Zelltod („delayed neuronal death“) dieses Ammonshornsegmentes bedingen, in dem Kollektiv *plötzlicher Kindstod* nicht gegeben waren. Die Ergebnisse weisen auf eine hypoxisch-ischämische Schädigung der Nervenzellen bei Opfern eines plötzlichen Kindstodes hin, welches sich in einem signifikanten Verlust der MAP2-Immunreaktivität, v.a. der CA2 und CA3 Segmente, widerspiegelt.

In den untersuchten Ammonshornsegmenten der Kollektive *plötzlicher Kindstod* und *cerebrale Hypoxie/Ischämie* konnten beim Vergleich der unterschiedlichen Ammonshornsegmente keine signifikanten Unterschiede in der Expression des MAP2 in den Nervenzellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse ergänzen somit die vorher genannten Resultate und bestätigen Ergebnisse anderer Forschergruppen, die MAP2 als einen sensitiven, früh und akut auf eine Hypoxie/Ischämie reagierenden Marker beschrieben haben (Kühn et al., 2005; Qi et al., 2004; Tomimoto, Yanagihara, 2000; Yanagihara et al., 1990).

4.1.2. Frontale Hirnrinde

Die frontale Großhirnrinde zählt neben der Ammonshornformation ebenfalls zu einem sehr sauerstoffsensiblen Hirnareal (Ota et al., 1997), insbesondere der Übergang der 1. zur 2. Frontalwindung, v.a. in dem zugehörigen Windungstal. Das Windungstal stellt das Versorgungsgebiet einer Endarterie dar, in dem die Durchblutung, u.a. bei Blutdruckabfall und Abfall des Sauerstoffdruckes im Blut, vermindert ist (Areal der sogenannten „letzten Wiese“). Bei der Gegenüberstellung der fünf untersuchten Hirnrindenschichten der drei Kollektive konnten signifikante Unterschiede in der MAP2-Immunreaktion der Nervenzellen ausgemacht werden. Beim Vergleich der Kollektive *Akutversterben* und *cerebrale Hypoxie/Ischämie* fanden sich signifikant weniger MAP2-positive Neurone in der Hirnrindenschicht III des Hypoxie/Ischämie Kollektivs. Der Befund deckt sich mit Resultaten anderer Forschergruppen, die die Hirnrindenschichten III, IV und V als besonders sauerstoffsensibel beschrieben haben, im Vergleich zu einer relativen Stabilität der Rindenschichten II und VI (Auer, Siesjo, 1988; Kitagawa et al., 1989; Kühn et al., 2005; Smith, 2000; Yanagihara et al., 1990). Diese selektive Vulnerabilität könnte ebenfalls durch eine unterschiedliche Verteilung der Glutamat (NMDA) Rezeptoren erklärt werden. In den anderen Rindenschichten konnten demgegenüber keine signifikanten Unterschiede der MAP2-Expression aufgezeigt werden. Wesentliche Ursache für die fehlende Signifikanz einzelner Rindenschichten dürfte die erhebliche Streuung der positiv reagierenden Neurone sein, sowohl in der Gruppe *Akutversterben* als auch etwas geringer in der Gruppe *cerebrale Hypoxie/Ischämie*.

Die untersuchten Hirnrindenschichten zeigten beim Vergleich der Kollektive *Akutversterben* und *plötzlicher Kindstod* zwar keine signifikanten Unterschiede, aber im übrigen doch deutliche Differenzen: Die Anzahl positiv reagierender Neurone war in Fällen des *plötzlichen Kindstodes* deutlich niedriger als in den Fällen des Kontrollkollektivs. Auch hier dürfte eine erhebliche Streuung im Kollektiv *Akutversterben* die fehlende Signifikanz erklären. Zwischen den Kollektiven *cerebrale Hypoxie/Ischämie* und *plötzlicher Kindstod* ließen sich keinerlei Unterschiede in der Anzahl der MAP2-positiven Neurone der Großhirnrinde aufweisen. Somit stellt sich MAP2 in der vorliegenden Studie auch im Bereich der frontalen Großhirnrinde – wenn auch nur eingeschränkt – als Marker einer akuten Hypoxie/Ischämie dar.

Vergleicht man das Ammonshorn mit der frontalen Hirnrinde in Bezug auf die MAP2-Expression der Nervenzellen, so zeigt sich die Ammonshornformation als sensibler gegenüber Sauerstoffmangel, was sich u.a. in einem stärkeren MAP2 Verlust der Neurone der Ammonshornsegmente niederschlägt. Eine höhere Vulnerabilität der Ammonshornformation gegenüber der frontalen Hirnrinde wurde auch in anderen Studien bestätigt und ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Verteilung von Glutamat (NMDA) Rezeptoren zurückzuführen (Bernaudin et al., 1998; Kühn et al., 2005; Yanagihara et al., 1990).

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie gefolgert werden, dass eine Assoziation zwischen einer hypoxisch-ischämisch bedingten Nervenzellschädigung und dem plötzlichen Kindstod besteht. Die Ergebnisse liefern damit einen morphologischen Beweis einer hypoxisch-ischämischen Nervenzellschädigung – auch bei SIDS-Fällen – und bekräftigen damit die Hypothese, dass ein hypoxisch-ischämischer Prozess in der Pathogenese des plötzlichen Kindstodes zu suchen ist. Die Nachweisbarkeit einer Signifikanz ist u.a. auch abhängig von der Fallzahl. Sie ist in der vorliegenden Studie insbesondere im Kollektiv *Akutversterben* bestimmend, wobei auf die Schwierigkeit hingewiesen werden muss, eine ausreichend große Fallzahl im Obduktionsgut eines Institutes zu erhalten, die auch die definierten Voraussetzungen für die Aufnahme in dieses Kollektiv erfüllen. Denn wann stirbt ein Kind ohne länger dauernde Agonie, d.h. ohne hypoxisch-ischämische Schädigung des Gehirns? Aufgrund der niedrigen Fallzahlen der drei Kollektive ist die Power, d.h. die Test- und Trennschärfe des hier zur Anwendung gekommenen Fischer-Tests, gering. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit, einen wahren Effekt zu entdecken und ihn als solchen zu erkennen herabgesetzt (Sachs, 2004). Eine Bestätigung oder Widerlegung der vorliegenden Ergebnisse in Folgestudien wäre daher bei Kollektiven mit ausreichend großen Fallzahlen zu empfehlen.

Weiterhin ist festzustellen, dass in den Fällen des *Akutversterbens* – trotz der vorgenommenen Selektion – die Kinder unterschiedlich schnell verstarben und damit auch eine unterschiedlich lange Agoniedauer, d.h. eine unterschiedlich lange Hypoxie/Ischämie-Phase die Folge war, mit dem Ergebnis einer großen Streubreite der MAP2-positiven Nervenzellen (siehe auch unten).

4.2 Kritische Bewertung der eigenen Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse stellen das relative Verhältnis MAP2-positiver zu MAP2-negativen Nervenzellen dar und geben folglich nicht die absolute Zahl der hypoxisch-ischämisch geschädigten Nervenzellen wieder. Die Auszählung der Nervenzellen erfolgte zwar blind, d.h. ohne Kenntnis davon, welchem der drei Kollektive das untersuchte Präparat zuzuordnen war, dennoch lassen sich bei dieser subjektiven Zählweise Fehler in der Auszählung nicht vollkommen ausschließen.

Betrachtet man die untersuchten Hirnregionen des Kontrollkollektivs *Akutversterben*, so zeigt sich hier ebenfalls ein manifester MAP2-Expressionsverlust der Neurone, was auf eine längere Agoniephase hindeuten könnte, die aber in diesem Kollektiv durch gezielte Auswahl der Fälle auszuschließen versucht wurde. Eine weitere Erklärung könnte die Abhängigkeit der Intensität der MAP2-Reaktivität vom postnatalen Alter sein, was für verschiedene Nervenzellen der Ammonshornformation an Ratten, in einem Alter von 0 bis 90 Tage gezeigt werden konnte (Biranowska et al., 2000). Zu Beachten ist allerdings auch bei den Opfern eines plötzlichen Kindstodes, dass die nachgewiesene Reduktion der MAP2-positiven Nervenzellen infolge einer längeren Agonie aufgetreten sein kann, was bei den meisten SIDS-Fällen – bei fehlender Möglichkeit einer Beobachtung – weder bestätigt noch ausgeschlossen werden kann.

Für das Kollektiv *cerebrale Hypoxie/Ischämie* wurden, wie bereits erwähnt Faktoren wie Epilepsie, Diabetes mellitus oder chronische Intoxikation bei der Auswahl der Fälle ausgeschlossen, da diese zu gleichartigen Nervenzellschädigung führen (Auer, Siesjo, 1988). Weitere, bisher nicht bekannte Faktoren könnten aber gleichfalls zu Veränderungen/Schädigungen von Nervenzellen führen und so eine zusätzliche, potentielle Fehlerquelle darstellen. Veränderungen der MAP2-Expression der Nervenzellen des Ammonshorns, beobachtet bei Schizophrenie und der Alzheimer-Krankheit (Kitamura et al., 2005), können aufgrund des Alters der in diese Studie untersuchten Fälle für alle Kollektive ausgeschlossen werden. Zudem konnte bei keinem der untersuchten Fälle eine letale Hypothermie nachgewiesen werden, die sowohl einen protektiven Einfluss auf die Verteilung und Intensität der MAP2-

Immunreaktion bei cerebraler Hypoxie/Ischämie hat, als auch auf den postmortalen Zerfall von MAP2 Einfluss nehmen könnte (Kitamura et al., 2005).

Darüber hinaus müssen Veränderungen der MAP2-Expression an postmortalem, humanem Gewebe mit Vorsicht interpretiert werden. In Studien, in denen die postmortale Stabilität von MAP2 in Tiermodellen untersucht wurde, zeigten sich unterschiedliche, widersprüchliche Ergebnisse. Auf der einen Seite wurde an Rattenhirnen post mortem ein Zerfall der MAPs mit fortschreitendem postmortalem Intervall (PMI) beschrieben, auf der anderen Seite zeigten Untersuchungen an Rinderhirnen, dass die Intensität und Verteilung der MAP2-Immunreaktivität in einem PMI von 0,5 bis 24 Stunden konstant blieb (Irving et al., 1997; Schwab et al., 1994; Trojanowski et al., 1989). Eine Studie an humanem Ammonshorn Gewebe zeigte postmortale Veränderungen der MAP2-Verteilung – in Abhängigkeit vom PMI – vornehmlich in dem Segment CA1, bei relativ konstanter Verteilung von MAP2-reaktiven Neuronen in den übrigen Segmenten CA4 bis CA2. Die dargelegten Ergebnisse entsprechen größtenteils der Verteilung und Anfärbbarkeit von MAP2 nach cerebraler Hypoxie-/Ischämie in Tiermodellen, so dass gefolgert wird, dass der Progress der postmortalen Veränderungen von MAP2 durch hypoxisch-ischämische Bedingungen beeinflusst wird (Kitamura et al., 2005).

Eine weitere Möglichkeit eines partiellen oder vollständigen Verlustes der MAP2-Immunreaktivität durch Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin, kann durch die Anwendung der erstmals 1991 beschriebenen Antigendemaskierung durch Erhitzung in der Mikrowelle („Antigen Retrieval“, AR) praktisch ausgeschlossen werden (Shi et al., 1991). Durch die formalininduzierte Bildung chemischer Quervernetzungen der Epitope kommt es zu einer „Maskierung“ des Antigens während der Fixation. Die MAP2-Immunreaktivität wird selbst bei Formalinfixation über mehrere Jahre bei Anwendung der AR-Methode und speziellen Färbeprotokollen nicht beeinträchtigt (Evers, Uylings, 1997; Kan et al., 2005).

Bei eingeschränkter oder verlorener Immunreaktivität der Nervenzellen für MAP2 kann anhand der immunhistochemischen Reaktion die Ursache für das Ausbleiben einer Antigen-Antikörperreaktion und den Verlust der Antigenität nicht sicher bestimmt werden. Es kann sich zum einen um einen transienten Verlust der Antigenität

handeln – möglicherweise durch Phosphorylierung der MAPs oder eine Verschiebung des pH-Wertes im Gewebe verursacht – zum anderen kann ein irreversibler Schaden der immunnegativen Zelle vorliegen oder andere subtile Veränderungen, auf zellulärer Ebene, die den (transienten) Anfärbbarkeitsverlust der Nervenzellen bedingen (Kühn et al., 2005; Ota et al., 1997). In der vorliegenden Studie wird auf Grund der relativ kurzen Agoniephase/Überlebenszeit der untersuchten Fälle eine reversible Schädigung der Nervenzellen angenommen.

4.3 Einordnung der eigenen Ergebnisse

Die Diagnose des plötzlichen Kindstodes basiert bis auf den heutigen Tag auf dem fehlenden Nachweis charakteristischer Befunde, d.h. morphologischer oder funktioneller Organveränderungen, die den plötzlichen Kindstod erklären. Zahlreiche Hypothesen, die eine funktionelle Veränderung des Gehirns als Ursache und Erklärung der Pathogenese des SIDS annehmen, sind in der Literatur beschrieben. Dabei herrscht eine breite Übereinstimmung darüber, dass die pathogenetischen Abläufe des plötzlichen Kindstods mit einer Hypoxie/Ischämie des Gehirns assoziiert sind. In aller Regel zeigten die vorliegenden neuropathologischen Studien allerdings nur diskrete Symptome einer hypoxisch-ischämischen Nervenzellschädigung, die teilweise auch unspezifisch waren, d.h. durch andere pathogenetische Prozesse erklärbar wären.

Einige Autoren sehen eine primäre neuronale Entwicklungsstörung und -verzögerung als Ursache der cerebralen Hypoxien/Ischämien bei Opfern des plötzlichen Kindstodes an. Erklärungsmodelle dafür sind die von Quattrochi beschriebene Dichte von Dendriten-Spines („high dendritic spine density“), die möglicherweise den Regelmechanismus der Atmung beeinträchtigt (Quattrochi et al., 1980; Quattrochi et al., 1985) sowie die von Kinney und Filiano aufgezeigte Hypoplasie des Nucleus arcuatus („acute nucleus hypoplasia“), die für die Funktion der Chemorezeptoren von Bedeutung ist (Kinney, Filiano, 1995; Maturri et al., 2002). Weitere Hinweise für neuronale Entwicklungsstörungen und -verzögerungen als Ursache ablaufender Hypoxien/Ischämien geben die reduzierte Aktivität Katecholamin-synthetisierender Enzyme sowie die Beeinträchtigung der Immunreaktivität von Endorphinen (Bergström et al., 1984; Denoroy et al., 1987; Kuich, Franciosi, 1983).

Andere Autoren interpretieren eine Hypoxie/Ischämie als Folge sekundärer Schäden des ZNS, infolge einer beeinträchtigten Perfusion mit konsekutiver Hypotonie und bzw. oder Apnoe. Der Nachweis einer Hirnstammgliose in Fällen des plötzlichen Säuglingstodes als Folge abgelaufener Hypoxien/Ischämien (Becker, 1983; Kinney et al., 1983; Ozawa, Takashima, 2002; Takashima et al., 1978) widerspricht allerdings den Ergebnissen anderer Autoren (Ambler et al., 1981; Oehmichen et al., 1989; Pearson, Brandeis, 1983; Sawaguchi et al., 2002b; Sawaguchi et al., 2002a; Stoltenburg-Didinger, Kordes, 1990; Summers et al., 1978), die keinen Hinweis auf eine Gliose bei Vergleich mit einem Kontrollkollektiv fanden. Auch die Alz-50 Immunreaktion bei SIDS-Fällen kann sich nur im Zusammenhang mit hypoxisch-ischämischen sekundären Schäden des Gehirns erklären (Oehmichen et al., 1998; Sparks et al., 1996).

Im Gegensatz zu den genannten Ergebnissen liefern die Resultate der vorliegenden Studie einen morphologischen – allerdings nur quantitativ erfassbaren – Nachweis einer hypoxisch-ischämisch bedingten Nervenzellschädigung in Gehirnen von Opfern eines plötzlichen Kindstodes und bekräftigt damit die Hypoxie/Ischämie Hypothese. Wie schon erwähnt, begrenzen die kleinen Fallzahlen und die nicht durchgehend signifikanten Resultate der drei Kollektive eine generelle Schlussfolgerung. Dennoch stützen diese Ergebnisse die These, dass die Ursache des plötzlichen Kindstodes, besonders bei Abwesenheit anderer pathologischer Organveränderungen, auf eine unreife, autonom kardiorespiratorische Regulierung und Dysfunktion sowie eine abnorme Weckreaktion („arousal“) und Defizienzen der Fähigkeit zur Selbstreanimation („auto-resuscitation“) zurückzuführen ist (Leiter, Böhm, 2007; Moon et al., 2007).

Die erhöhte Anzahl MAP2-negativer („hypoxisch-ischämischer“) Nervenzellen, die in Fällen eines plötzlichen Kindstodes detektiert werden konnten, können durch den morphologischen Nachweis einer Hypoxie/Ischämie im Gehirn neue Anhaltspunkte für die Pathogenese des plötzlichen Kindstodes liefern. Generell führt eine Hypoxie/Ischämie dazu, dass die Mechanismen der „normalen“ Atmung („Eupnea“) durch die sogenannte Schnappatmung („Gaspung“) ersetzt werden (Paton et al., 2006; Pena, 2008; St John, Leiter, 2008). Spezielle Neurone („intrinsic bursting neurons“), die im sogenannten Prä-Bötzinger Komplex (PBC) der ventralen

respiratorischen Gruppe der *Formatio reticularis* lokalisiert sind, spielen bei der Neurogenese der „normalen“ Atmung sowie besonders bei der Schnappatmung eine entscheidende Rolle. Eine Gruppe dieser Neurone wird durch einen Calcium-aktivierten unspezifischen Kationen-Kanal (Cadmium sensitive, „CS“), der mit Flufenaminsäure geblockt werden kann, charakterisiert. Die andere Gruppe der Neurone ist durch persistente Natrium-Kanäle (Cadmium insensitiv, „CI“) gekennzeichnet, die durch Riluzol blockierbar sind (Pena, 2008; St John, 2008; Tryba et al., 2006).

Zudem stellte sich heraus, dass die Schnappatmung durch Blockierung der Natrium-Kanäle der CI-Neurone mit Riluzol sowohl *in vitro*, *in situ* als auch *in vivo* inhibiert werden kann und so eine Abhängigkeit der Schnappatmung von der Leitfähigkeit und Durchgängigkeit der Natriumkanäle besteht (vgl. Übersicht: St John, 2008). Damit wird die Schnappatmung unter hypoxisch-ischämischen Umständen durch eine spezielle Gruppe der „intrinsic bursting neurons“ (CI) generiert, die nur in Abhängigkeit von persistenten Natrium-Kanälen ihre Funktion erfüllen können (Paton et al., 2006; St John, 2008; Toppin et al., 2007). „Gaspung“ stellt somit einen essentiellen Mechanismus der Selbstreanimation („auto-resuscitation“) dar. In einer Untersuchung wurde als ein Grund für die defizitäre Selbstreanimation bei Opfern eines plötzlichen Kindtodes die Beeinträchtigung der Schnappatmung („gaspung“) angeführt (Sridhar et al., 2003). Ergänzend zeigte eine andere Studie eine insuffiziente Schnappatmung, die eine ineffiziente, nicht erfolgreiche Selbstreanimation bei SIDS-Opfern bedingte (Poets et al., 1999).

Es wird angenommen, dass eine Vielzahl verschiedener Neurotransmitter die Funktion der Natrium-Kanäle sowie den Mechanismus, der der Neurogenese der Schnappatmung unterliegt, beeinflussen (Toppin et al., 2007). Eine *in vitro* Studie an Mäusen in der durch eine alleinige 5-HT_{2A} Rezeptoren Blockade die Suppression der Schnappatmung induziert wurde (Tryba et al., 2006), konnte an jungen Ratten nach Blockade von 5-HT₁ und 5-HT₂ Rezeptoren nicht bestätigt werden (Toppin et al., 2007). In einer weiteren Studie zeigte sich aber, dass die Aktivierung von alpha1-adrenergen und 5-HT₂ Rezeptoren durch Noradrenalin und Serotonin die Mechanismen der Schnappatmung unterstützt und einen Effekt bei der Wiederherstellung der „normalen“ Atmung nach Beendigung der hypoxisch-ischämischen Konditionen

aufweist (St John, Leiter, 2008). Dysfunktionen und morphologische Defekte der beschriebenen Natrium-Kanäle können als Ursache einer ineffizienten und insuffizienten Schnappatmung – und der damit verbundenen defizienten Selbst-reanimation – angesehen werden und so eine mögliche Ursache des plötzlichen Kindstodes darstellen.

5. Zusammenfassung

Der plötzliche Kindstod (Sudden Infant Death Syndrom (SIDS)) wird als plötzlich, unerwarteter Tod während des Schlafens eines Kindes < 1 Jahr bezeichnet, der auch nach gründlicher Untersuchung, das heißt nach vollständiger Obduktion, Überprüfung der Todesumstände und Betrachtung der klinischen Anamnese ungeklärt bleibt.

In der vorliegenden Studie wurde der Hypothese nachgegangen, ob eine Assoziation zwischen einer hypoxisch-ischämisch bedingten Schädigung des ZNS und Opfern eines SIDS besteht. In einer vorangehenden Studie konnte durch quantitative Immunhistochemie demonstriert werden, dass der deutliche Verlust der Immunreaktivität für das Mikrotubulin-assoziierte Protein (MAP2) in erwachsenen, humanen Gehirnen auf eine akute hypoxisch-ischämische Schädigung zurückzuführen ist. In der vorliegenden Studie verwendeten wir dieselbe immunhistochemische Methode durch Nachweis des Antigens MAP2 an Gewebeproben der frontalen Hirnrinde und des Ammonshorns von 41 Gehirnen, von Kindern mit einem Alter < 1 Jahr. Der prozentuale Anteil MAP2-positiver, immunreaktiver Nervenzellen wurde nach Auszählung von je 100 Nervenzellen in jedem der Ammonshornsegmente (CA4-CA1) und in jeder der Schichten II–VI der frontalen Großhirnrinde ermittelt. Drei verschiedene Kollektive wurden daraufhin verglichen. 1) Opfer eines *plötzlichen Kindstodes* (n=17); 2) Kinder mit einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung (*cerebrale Hypoxie/Ischämie*, n=14); 3) Kinder ohne eine hypoxisch-ischämische Hirnschädigung (*Akutversterben*, n=10). In den Kollektiven *plötzlicher Kindstod* und *cerebrale Hypoxie/Ischämie* zeigte sich generell eine Reduktion der MAP2-positiven Nervenzellen im Vergleich zum Kollektiv *Akutversterben*. In dem *SIDS* Kollektiv konnte ein signifikanter ($p \leq 0,01666667$) Verlust der MAP2-Immunreaktivität der Nervenzellen der Ammonshornsegmente CA3 und CA2, im Vergleich zum Kollektiv *Akutversterben* nachgewiesen werden. Unterschiede der MAP2-Expression ließen sich beim Vergleich der Kollektive *plötzlicher Kindstod* und *cerebrale Hypoxie/Ischämie* nicht aufzeigen. Folglich konnten hypoxisch-ischämische Veränderungen an Gehirnen von SIDS-Opfern dargestellt werden, ohne jedoch einen Hinweis auf die Ursache des Sauerstoffmangels zu erbringen. Die Ergebnisse werden kritisch gewürdigt und erlauben Schlussfolgerungen, welche mit den

aktuellen Hypothesen kompatibel sind, die zur Erklärung des Phänomens des plötzlichen Kindstodes zurzeit diskutiert werden.

6. Literatur

1. Ambler MW, Neave C, Sturmer WQ. Sudden and unexpected death in infancy and childhood: neuropathological findings. *Am J Forensic Med Pathol* 1981;2:23-30.
2. Auer RN, Siesjo BK. Biological differences between ischemia, hypoglycemia, and epilepsy. *Ann Neurol* 1988;24:699-707.
3. Bajanowski T, Poets Ch. Der plötzliche Säuglingstod, Epidemiologie, Ätiologie, Pathophysiologie und Differenzialdiagnostik. *Dtsch Arztebl* 2004;101(Heft 47):A3185-A3190.
4. Bajanowski T, Brinkmann B, Vennemann M. The San Diego definition of SIDS: practical application and comparison with the GeSID classification. *Int J Legal Med* 2006;120:331-6.
5. Bajanowski T, Vege A, Byard RW et al. Sudden infant death syndrome (SIDS)--standardised investigations and classification: recommendations. *Forensic Sci Int* 2007;165:129-43.
6. Becker LE. Neuropathological basis for respiratory dysfunction in sudden infant death syndrome. In: Tildon JT, Roeder LM, Steinschneider A, eds. *Sudden infant death syndrome*. New York: Academic Press, 1983:99-114.
7. Beckwith JB. Discussion of the terminology and definition of the sudden infant death syndrome. In: Bergmann AB, Beckwith JB, Ray CC, eds. *Sudden infant death syndrome. Proceedings of the Second International Conference on the causes of the sudden death in infants*. Seattle, London: University of Washington Press, 1970:83-139.
8. Bergström L, Lagercrantz H, Terenius L. Post-mortem analyses of neuropeptides in brains from sudden infant death victims. *Brain Res* 1984;323:279-85.

9. Bernaudin M, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia. *Exp Neurol* 1998;150:30-9.
10. Biranowska J, Berdel B, Ludkiewicz B, Dziwiatkowski J, Jagalska-Majewska H, Morys J. Developmental changes of MAP2 immunoreactivity in the hippocampus proper and dentate gyrus of the rat. *Folia Neuropathol* 2000;38:1-6.
11. Blomgren K, McRae A, Elmered A et al. The calpain proteolytic system in neonatal hypoxic-ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1997;825:104-19.
12. Boenisch T. *Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage.* Carpinteria, New York: DakoCytomation Corp., 2003.
13. Braak H, Braak E. Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex. *Prog Neurobiol* 1985;25:93-139.
14. Byard RW, Marshall D. An audit of the use of definitions of sudden infant death syndrome (SIDS). *J Forensic Leg Med* 2007;14:453-5.
15. Byard RW, Becker LE, Berry PJ et al. The pathological approach to sudden infant death--consensus or confusion? Recommendations from the Second SIDS Global Strategy Meeting, Stavangar, Norway, August 1994, and the Third Australasian SIDS Global Strategy Meeting, Gold Coast, Australia, May 1995. *Am J Forensic Med Pathol* 1996;17:103-5.
16. Campbell J. Pacifier use is associated with a reduced risk for sudden infant death. *J Pediatr* 2006;148:416.
17. Carpenter RG, Irgens LM, Blair PS et al. Sudden unexplained infant death in 20 regions in Europe: case control study. *Lancet* 2004;363:185-91.
18. Cronberg T, Jensen K, Rytter A, Wieloch T. Selective sparing of hippocampal CA3 cells following in vitro ischemia is due to selective inhibition by acidosis. *Eur J Neurosci* 2005;22:310-6.

19. de Jonge GA, Engelberts AC, Koomen-Liefting AJ, Kostense PJ. Cot death and prone sleeping position in The Netherlands. *BMJ* 1989;298:722.
20. Denoroy L, Gay N, Gilly R, Tayot J, Pasquier B, Kopp N. Catecholamine synthesizing enzyme activity in brainstem areas from victims of sudden infant death syndrome. *Neuropediatrics* 1987;18:187-90.
21. Doll T, Meichsner M, Riederer BM, Honegger P, Matus A. An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J Cell Sci* 1993;106 (Pt 2):633-9.
22. Dwyer T, Ponsonby AL. SIDS epidemiology and incidence. *Pediatr Ann* 1995;24:350-6.
23. Einspieler C. Potentielle Risikofaktoren aus der Umgebung des Säuglings. In: Kurz R, Kenner Th, Poets Ch, eds. *Der plötzliche Säuglingstod. Ein Ratgeber für Ärzte und Betroffene*. Wien, New York: Springer, 2000:161-75.
24. Evers P, Uylings HB. An optimal antigen retrieval method suitable for different antibodies on human brain tissue stored for several years in formaldehyde fixative. *J Neurosci Methods* 1997;72:197-207.
25. Filiano JJ, Kinney HC. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonate* 1994;65:194-7.
26. Freemantle CJ, Read AW, de Klerk NH, McAullay D, Anderson IP, Stanley FJ. Sudden infant death syndrome and unascertainable deaths: trends and disparities among Aboriginal and non-Aboriginal infants born in Western Australia from 1980 to 2001 inclusive. *J Paediatr Child Health* 2006;42:445-51.
27. Froede RC. *Handbook of forensic pathology, 2nd edition*. Northfield, Illinois: College of American Pathologists, 2003.
28. Gee CE, Benquet P, Raineteau O, Rietschin L, Kirbach SW, Gerber U. NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 2006;23:2595-603.

29. Guntheroth WG. *Crib death: The sudden infant death syndrome, 3rd edition*. Armonk, New York: Futura Publishing Company, Inc., 1995.
30. Guntheroth WG, Spiers PS. The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 2002;110:e64.
31. Hauck FR, Omojokun OO, Siadaty MS. Do pacifiers reduce the risk of sudden infant death syndrome? A meta-analysis. *Pediatrics* 2005;116:e716-e723.
32. Hirokawa N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:74-81.
33. Irving EA, McCulloch J, Dewar D. The effect of postmortem delay on the distribution of microtubule-associated proteins tau, MAP2, and MAP5 in the rat. *Mol Chem Neuropathol* 1997;30:253-71.
34. Ito U, Spatz M, Walker JT, Jr., Klatzo I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol* 1975;32:209-23.
35. Johnson GV, Jope RS. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res* 1992;33:505-12.
36. Johnson GV, Littersky JM, Jope RS. Degradation of microtubule-associated protein 2 and brain spectrin by calpain: a comparative study. *J Neurochem* 1991;56:1630-8.
37. Jones KL, Krous HF, Nadeau J, Blackbourne B, Zielke HR, Gozal D. Vascular endothelial growth factor in the cerebrospinal fluid of infants who died of sudden infant death syndrome: evidence for antecedent hypoxia. *Pediatrics* 2003;111:358-63.
38. Kalcheva N, Albala JS, Binder LI, Shafit-Zagardo B. Localization of specific epitopes on human microtubule-associated protein 2. *J Neurochem* 1994;63:2336-41.

39. Kalimo H, Olsson Y, Paljarvi L, Soderfeldt B. Structural changes in brain tissue under hypoxic-ischemic conditions. *J Cereb Blood Flow Metab* 1982;2 Suppl 1:S19-S22.
40. Kan RK, Pleva CM, Hamilton TA, Petrali JP. Immunolocalization of MAP-2 in routinely formalin-fixed, paraffin-embedded guinea pig brain sections using microwave irradiation: a comparison of different combinations of antibody clones and antigen retrieval buffer solutions. *Microsc Microanal* 2005;11:175-80.
41. Kato I, Franco P, Groswasser J et al. Incomplete arousal processes in infants who were victims of sudden death. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:1298-303.
42. Kinney HC, Filiano JJ. The ventral medullary surface in SIDS. A review. In: Rognum TO, ed. *Sudden Infant Death Syndrome: New trends in the nineties*. Oslo: Scandinavian University Press, 1995:164-8.
43. Kinney HC, Burger PC, Harrell FE, Jr., Hudson RP, Jr. 'Reactive gliosis' in the medulla oblongata of victims of the sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 1983;72:181-7.
44. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982;239:57-69.
45. Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol* 1984;62:201-8.
46. Kirschner RH, Wilson HL. Pathology of fatal abuse. In: Reece RM, Ludwig S, eds. *Child abuse. Medical diagnosis and management, 2nd edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:467-516.
47. Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M et al. Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage--immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience* 1989;31:401-11.

48. Kitamura O, Gotohda T, Ishigami A, Tokunaga I, Kubo S, Nakasono I. Effect of hypothermia on postmortem alterations in MAP2 immunostaining in the human hippocampus. *Leg Med (Tokyo)* 2005;7:340-4.
49. Kleemann WJ. Differentialdiagnosen. In: Kurz R, Kenner Th, Poets Ch, eds. *Der plötzliche Säuglingstod. Ein Ratgeber für Ärzte und Betroffene*. Wien, New York: Springer, 2000:96-7.
50. Kleemann WJ, Vock R, Bajanowski T. Obduktionsfrequenz bei plötzlichen Säuglingstodesfällen in der Bundesrepublik Deutschland in den Jahren 1985 bis 1989. *Rechtsmed* 1997;7:72-5.
51. Krous HF, Beckwith JB, Byard RW et al. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 2004;114:234-8.
52. Kuich TE, Franciosi RA. A study of the endogenous opioid system in the sudden infant death syndrome. *Med Hypotheses* 1983;10:365-84.
53. Kuich TE, Zimmerman D. Endorphins, ventilatory control and sudden infant death syndrome--a review and synthesis. *Med Hypotheses* 1981;7:1231-40.
54. Kühn J, Meissner C, Oehmichen M. Microtubule-associated protein 2 (MAP2)--a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia. *Acta Neuropathol* 2005;110:579-86.
55. Kwei S, Jiang C, Haddad GG. Acute anoxia-induced alterations in MAP2 immunoreactivity and neuronal morphology in rat hippocampus. *Brain Res* 1993;620:203-10.
56. Lavezzi AM, Ottaviani G, Matturri L. Identification of neurons responding to hypoxia in sudden infant death syndrome. *Pathol Int* 2003;53:769-74.
57. Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 2000;106:723-31.
58. Leiter JC, Bohm I. Mechanisms of pathogenesis in the Sudden Infant Death Syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;159:127-38.

59. Li DK, Petitti DB, Willinger M et al. Infant sleeping position and the risk of sudden infant death syndrome in California, 1997-2000. *Am J Epidemiol* 2003;157:446-55.
60. Lingwood BE, Healy GN, Sullivan SM, Pow DV, Colditz PB. MAP2 provides reliable early assessment of neural injury in the newborn piglet model of birth asphyxia. *J Neurosci Methods* 2008;171:140-6.
61. Loghmanee DA, Weese-Mayer DE. Sudden infant death syndrome: another year of new hope but no cure. *Curr Opin Pulm Med* 2007;13:497-504.
62. Lüllmann-Rauch R. Mikrotubuli und ihre Motorproteine. In: *Histologie. Verstehen - Lernen - Nachschlagen*. Stuttgart: Thieme, 2003:22-6.
63. Maccioni RB, Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* 1995;75:835-64.
64. Malinak C, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury acutely disrupts microtubule-associated protein 2 immunostaining in neonatal rat brain. *Biol Neonate* 1996;69:257-67.
65. Matturri L, Biondo B, Suarez-Mier MP, Rossi L. Brain stem lesions in the sudden infant death syndrome: variability in the hypoplasia of the arcuate nucleus. *Acta Neuropathol* 2002;104:12-20.
66. Mitchell EA. The changing epidemiology of SIDS following the national risk reduction campaigns. *Pediatr Pulmonol Suppl* 1997;16:117-9.
67. Mitchell EA, Bajanowski T, Brinkmann B, Jorch G, Stewart AW, Vennemann MM. Prone sleeping position increases the risk of SIDS in the day more than at night. *Acta Paediatr* 2008;97:584-9.
68. Mitchell EA, Clements M, Williams SM, Stewart AW, Cheng A, Ford RP. Seasonal differences in risk factors for sudden infant death syndrome. The New Zealand Cot Death Study Group. *Acta Paediatr* 1999a;88:253-8.

-
69. Mitchell EA, Thach BT, Thompson JM, Williams S. Changing infants' sleep position increases risk of sudden infant death syndrome. New Zealand Cot Death Study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999b;153:1136-41.
 70. Molz G. Der plötzliche Säuglingstod in historischen Dokumenten, 2.Teil. In: Kurz R, Kenner Th., Poets Ch., eds. *Der plötzliche Säuglingstod. Ein Ratgeber für Ärzte und Betroffene*. Wien, New York: Springer, 2000:9-16.
 71. Moon RY, Horne RS, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *Lancet* 2007;370:1578-87.
 72. Moss IR. Endorphins in fetal and neonatal breathing. In: von Euler C, Lagercrantz H, eds. *Neurobiology of the control of breathing*. New York: Raven, 1986:119-32.
 73. Naeye RL. Hypoxemia and the sudden infant death syndrome. *Science* 1974;186:837-8.
 74. Naeye RL. Brain-stem and adrenal abnormalities in the sudden-infant-death syndrome. *Am J Clin Pathol* 1976;66:526-30.
 75. Naeye RL. The sudden infant death syndrome. *Monogr Pathol* 1978;19:262-70.
 76. Naeye RL, Fisher R, Ryser M, Whalen P. Carotid body in the sudden infant death syndrome. *Science* 1976;191:567-9.
 77. O'Kusky JR, Norman MG. Sudden infant death syndrome: increased synaptic density in the central reticular nucleus of the medulla. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:263-71.
 78. O'Kusky JR, Norman MG. Sudden infant death syndrome: increased number of synapses in the hypoglossal nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:627-34.
 79. O'Kusky JR, Kozuki DE, Norman MG. Sudden infant death syndrome: postnatal changes in the volumes of the pons, medulla and cervical spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:570-80.

80. Oehmichen M. Enzyme alterations in brain tissue during the early postmortal interval with reference to the histomorphology: review of the literature. *Z Rechtsmed* 1980;85:81-95.
81. Oehmichen M. Recent neuropathologic research in sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Prog* 1990;4:128-39.
82. Oehmichen M. Do SIDS babies have scars in the brain? In: Rognum TO, ed. *Sudden Infant Death Syndrome: New trends in the nineties*. Oslo: Scandinavian University Press, 1995:169-73.
83. Oehmichen M, Meissner C. Cerebral hypoxia and ischemia: the forensic point of view: a review. *J Forensic Sci* 2006;51:880-7.
84. Oehmichen M, Auer RN, König HG. *Forensic neuropathology and associated neuropathology*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2006.
85. Oehmichen M, Gerling I, Meissner C. Petechiae of the baby's skin as differentiation symptom of infanticide versus SIDS. *J Forensic Sci* 2000;45:602-7.
86. Oehmichen M, Linke P, Zilles K, Saternus KS. Reactive astrocytes and macrophages in the brain stem of SIDS victims? Eleven age- and sex-matched SIDS and control cases. *Clin Neuropathol* 1989a;8:276-83.
87. Oehmichen M, Theuerkauf I, Bajanowski T, Merz H, Meissner C. Enhanced reactivity of Alz-50 antibody in brains of sudden infant death syndrome victims versus brains with lethal hypoxic/ischemic injury. Diagnostic significance after application of the ImmunoMax technique on routine paraffin material. *Acta Neuropathol* 1998;95:280-6.
88. Oehmichen M, Wullen B, Zilles K, Saternus KS. Cytological investigations on the cerebellar cortex of sudden infant death victims. *Acta Neuropathol* 1989b;78:404-9.

89. Ota A, Ikeda T, Ikenoue T, Toshimori K. Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:519-26.
90. Oyen N, Markestad T, Skaerven R et al. Combined effects of sleeping position and prenatal risk factors in sudden infant death syndrome: the Nordic Epidemiological SIDS Study. *Pediatrics* 1997;100:613-21.
91. Ozawa Y, Takashima S. Developmental neurotransmitter pathology in the brainstem of sudden infant death syndrome: a review and sleep position. *Forensic Sci Int* 2002;130 Suppl:S53-S59.
92. Paton JF, Abdala AP, Koizumi H, Smith JC, St John WM. Respiratory rhythm generation during gasping depends on persistent sodium current. *Nat Neurosci* 2006;9:311-3.
93. Pearson J, Brandeis L. Normal aspects of morphometry of brain stem astrocytes, carotid bodies and ganglia in SIDS. In: Tildon JT, Roeder LM, Steinschneider A, eds. *Sudden infant death syndrome*. New York: Academic Press, 1983:115-21.
94. Pena F. Contribution of pacemaker neurons to respiratory rhythms generation in vitro. *Adv Exp Med Biol* 2008;605:114-8.
95. Poets CF, Meny RG, Chobanian MR, Bonofiglio RE. Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. *Pediatr Res* 1999;45:350-4.
96. Poulsen JP, Oyasaeter S, Sanderud J, Rognum TO, Saugstad OD. Hypoxanthine, xanthine, and uric acid concentrations in the cerebrospinal fluid, plasma, and urine of hypoxemic pigs. *Pediatr Res* 1990a;28:477-81.
97. Poulsen JP, Rognum TO, Oyasaeter S, Saugstad OD. Changes in oxypurine concentrations in vitreous humor of pigs during hypoxemia and post-mortem. *Pediatr Res* 1990b;28:482-4.

-
98. Przyborski SA, Cambray-Deakin MA. Developmental regulation of MAP2 variants during neuronal differentiation in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 1995;89:187-201.
 99. Qi JP, Wu AP, Wang DS, Wang LF, Li SX, Xu FL. Correlation between neuronal injury and Caspase-3 after focal ischemia in human hippocampus. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1507-12.
 100. Quattrochi JJ, Baba N, Liss L, Adrion W. Sudden infant death syndrome (SIDS): a preliminary study of reticular dendritic spines in infants with SIDS. *Brain Res* 1980;181:245-9.
 101. Quattrochi JJ, McBride PT, Yates AJ. Brainstem immaturity in sudden infant death syndrome: a quantitative rapid Golgi study of dendritic spines in 95 infants. *Brain Res* 1985;325:39-48.
 102. Raley-Susman KM, Murata J. Time course of protein changes following in vitro ischemia in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 1995;694:94-102.
 103. Rognum TO, Kleemann WJ. Obduktionsprotokolle. In: Kurz R, Kenner Th, Poets Ch, eds. *Der plötzliche Säuglingstod. Ein Ratgeber für Ärzte und Betroffene*. Wien, New York: Springer, 2000:54-9.
 104. Rognum TO, Saugstad OD. Hypoxanthine levels in vitreous humor: evidence of hypoxia in most infants who died of sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 1991;87:306-10.
 105. Rognum TO, Saugstad OD. Biochemical and immunological studies in SIDS victims. Clues to understanding the death mechanism. *Acta Paediatr Suppl* 1993;82 Suppl 389:82-5.
 106. Rognum TO, Willinger M. The story of the "stavanger definition". In: Rognum TO, ed. *Sudden Infant Death Syndrome: New trends in the nineties*. Oslo: Scandinavian University Press, 1995:21-35.

-
107. Rognum TO, Saugstad OD, Oyasaeter S, Olaisen B. Elevated levels of hypoxanthine in vitreous humor indicate prolonged cerebral hypoxia in victims of sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 1988;82:615-8.
 108. Russell-Jones DL. Sudden infant death in history and literature. *Arch Dis Child* 1985;60:278-81.
 109. Sachs L. *Angewandte Statistik - Anwendung statistischer Methoden*, 11. Auflage. Berlin: Springer, 2004.
 110. Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 2000;61:133-68.
 111. Saternus KS. A. vertebralis - Theorie und Plötzlicher Kindstod (SID). In: Saternus KS, Karimow S, eds. *Säuglingssterblichkeit - Plötzlicher Kindstod (SID)*. Lübeck: Schmidt-Römhild, 1998:105-17.
 112. Sawaguchi T, Franco P, Kato I et al. Interaction between apnea, prone sleep position and gliosis in the brainstems of victims of SIDS. *Forensic Sci Int* 2002a;130 Suppl:S44-S52.
 113. Sawaguchi T, Franco P, Kato I et al. Association between sleep apnea and reactive astrocytes in brainstems of victims of SIDS and in control infants. *Forensic Sci Int* 2002b;130 Suppl:S30-S36.
 114. Schellscheidt J, Ott A, Jorch G. Epidemiological features of sudden infant death after a German intervention campaign in 1992. *Eur J Pediatr* 1997;156:655-60.
 115. Schlaud M. Epidemiologie des plötzlichen Kindstods (SID). In: Saternus KS, Karimow S, eds. *Säuglingssterblichkeit - Plötzlicher Kindstod (SID)*. Lübeck: Schmidt-Römhild, 1998:41-50.
 116. Schlaud M, Eberhard C, Trumann B et al. Prevalence and determinants of prone sleeping position in infants: results from two cross-sectional studies on risk factors for SIDS in Germany. *Am J Epidemiol* 1999;150:51-7.

117. Schmidt-Kastner R, Zhao W, Truettner J, Belayev L, Busto R, Ginsberg MD. Pixel-based image analysis of HSP70, GADD45 and MAP2 mRNA expression after focal cerebral ischemia: hemodynamic and histological correlates. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;63:79-97.
118. Schwab C, Bondada V, Sparks DL, Cahan LD, Geddes JW. Postmortem changes in the levels and localization of microtubule-associated proteins (tau, MAP2 and MAP1B) in the rat and human hippocampus. *Hippocampus* 1994;4:210-25.
119. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-8.
120. Smith ML. Injury-determining factors and cellular mechanism for ischemic damage in the brain. In: Oehmichen M, ed. *Brain hypoxia and ischemia*. Lübeck: Schmidt-Römhild, 2000:59-64.
121. Sparks DL, Hunsaker JC, III. Increased ALZ-50-reactive neurons in the brains of SIDS infants: an indicator of greater neuronal death? *J Child Neurol* 1991;6:123-7.
122. Sparks DL, Davis DG, Bigelow TM et al. Increased ALZ-50 immunoreactivity in sudden infant death syndrome. *J Child Neurol* 1996;11:101-7.
123. Sridhar R, Thach BT, Kelly DH, Henslee JA. Characterization of successful and failed autoresuscitation in human infants, including those dying of SIDS. *Pediatr Pulmonol* 2003;36:113-22.
124. St John WM. Eupnea of in situ rats persists following blockers of in vitro pacemaker burster activities. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;160:353-6.
125. St John WM, Leiter JC. Maintenance of gasping and restoration of eupnea after hypoxia is impaired following blockers of alpha1-adrenergic receptors and serotonin 5-HT2 receptors. *J Appl Physiol* 2008;104:665-73.

-
126. Steinschneider A. Prolonged apnea and the sudden infant death syndrome: clinical and laboratory observations. *Pediatrics* 1972;50:646-54.
 127. Stoltenburg-Didinger G, Kordes U. GFAP-Expression im Hirngewebe bei SIDS. *Bull Bundesamt Gesundheitsw* 1990;11:131.
 128. Stoltenburg-Didinger G, Skullerud K, Krous HF. Cerebral changes. *Nordisk Rettsmedisin* 2003;9:66-7.
 129. Summers CG, Parker JC, Valdes-Dapena M. Brainstem morphology in sudden infant death syndrome. *Clin Res* 1978;26:641.
 130. Takashima S, Becker LE. Prenatal and postnatal maturation of medullary 'respiratory centers'. *Brain Res* 1986;391:173-7.
 131. Takashima S, Armstrong D, Becker L, Bryan C. Cerebral hypoperfusion in the sudden infant death syndrome? Brainstem gliosis and vasculature. *Ann Neurol* 1978;4:257-62.
 132. Takashima S, Mito T, Becker LE. Neuronal development in the medullary reticular formation in sudden infant death syndrome and premature infants. *Neuropediatrics* 1985;16:76-9.
 133. Tappin D, Ecob R, Brooke H. Bedsharing, roomsharing, and sudden infant death syndrome in Scotland: a case-control study. *J Pediatr* 2005;147:32-7.
 134. Tomashek KM, Qin C, Hsia J, Iyasu S, Barfield WD, Flowers LM. Infant mortality trends and differences between American Indian/Alaska Native infants and white infants in the United States, 1989-1991 and 1998-2000. *Am J Public Health* 2006;96:2222-7.
 135. Tomimoto H, Yanagihara T. Immunoelectron microscopic study of tubulin and microtubule-associated proteins after transient cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol* 1992;84:394-9.
 136. Tomimoto H, Yanagihara T. Vulnerability of dendrites and nerve cell bodies. In: Oehmichen M, ed. *Brain hypoxia and ischemia*. Lübeck: Schmidt-Römheld, 2000:65-84.

137. Toppin VA, Harris MB, Kober AM, Leiter JC, St John WM. Persistence of eupnea and gasping following blockade of both serotonin type 1 and 2 receptors in the in situ juvenile rat preparation. *J Appl Physiol* 2007;103:220-7.
138. Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VM. Distribution of phosphate-independent MAP2 epitopes revealed with monoclonal antibodies in microwave-denatured human nervous system tissues. *J Neurosci Methods* 1989;29:171-80.
139. Tryba AK, Pena F, Ramirez JM. Gasping activity in vitro: a rhythm dependent on 5-HT_{2A} receptors. *J Neurosci* 2006;26:2623-34.
140. Tucker RP. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Rev* 1990;15:101-20.
141. Tucker RP, Garner CC, Matus A. In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron* 1989;2:1245-56.
142. Valdes-Dapena M. The sudden infant death syndrome: pathologic findings. *Clin Perinatol* 1992;19:701-16.
143. Vege A, Rognum TO, Aasen AO, Saugstad OD. Are elevated cerebrospinal fluid levels of IL-6 in sudden unexplained deaths, infectious deaths and deaths due to heart/lung disease in infants and children due to hypoxia? *Acta Paediatr* 1998;87:819-24.
144. Vennemann MM, Findeisen M, Butterfass-Bahloul T et al. Modifiable risk factors for SIDS in Germany: results of GeSID. *Acta Paediatr* 2005;94:655-60.
145. Waters KA, Meehan B, Huang JQ, Gravel RA, Michaud J, Cote A. Neuronal apoptosis in sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 1999;45:166-72.
146. Wedgwood RJ. *Sudden death in infants: Proceedings of the Conference on Causes of Sudden Death in Infants, September 1963*. Seattle, Washington: U.S. Department of Health, Education, and Welfare Public Health Service, 1965.
147. Wedgwood RJ. Review of USA experience. In: Camps FE, Carpenter RG, eds. *Sudden and Unexpected Death in Infancy (Cot Deaths)*. Bristol: Wright, 1972:28.

-
148. Willinger M, James LS, Catz C. Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatr Pathol* 1991;11:677-84.
 149. Yamamoto K, Morimoto K, Yanagihara T. Cerebral ischemia in the gerbil: transmission electron microscopic and immunoelectron microscopic investigation. *Brain Res* 1986;384:1-10.
 150. Yanagihara T, Brengman JM, Mushynski WE. Differential vulnerability of microtubule components in cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 1990;80:499-505.
 151. Young M, Turnbull HM. An analysis of the data collected by the status lymphaticus investigation committee. *J Path Bact* 1931;34:213-57.
 152. Zatloukal K, Denk H, Roth J. Adaptation, Zellschädigung, Zelltod. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, eds. *Pathologie*. München: Urban&Fischer, 2004:54-71.

Tabelle 7: Prozentuale Darstellung MAP2-positiver Nervenzellen des Kollektivs *Akut-versterben*

| Lfd. Nr. | Ammonshornsegment | | | | Frontale Großhirnrindenschicht | | | | |
|------------|-------------------|-----|------|-----|--------------------------------|-----|------|-----|------|
| | CA4 | CA3 | CA2 | CA1 | II | III | IV | V | VI |
| 1 | 11 | 8 | 9 | 0 | | | | | |
| 2 | 9 | 9 | 13 | 2 | 6 | 9 | 5 | 9 | 7 |
| 3 | | | | | 8 | 30 | 21 | 37 | 22 |
| 4 | 16 | 11 | 16 | 8 | 19 | 32 | 25 | 34 | 29 |
| 5 | 3 | 18 | 15 | 17 | 0 | 1 | 1 | 6 | 1 |
| 6 | 29 | 12 | 8 | 9 | | | | | |
| 7 | | | | | 3 | 34 | 20 | 39 | 30 |
| 8 | | | | | 0 | 1 | 0 | 5 | 3 |
| 9 | | | | | 18 | 39 | 17 | 40 | 32 |
| 10 | 3 | 3 | 2 | 0 | 9 | 22 | 18 | 26 | 20 |
| Median | 10 | 10 | 11 | 5 | 7 | 26 | 17,5 | 30 | 21 |
| 1. Quartil | 3 | 5,5 | 5 | 0 | 1,5 | 5 | 3 | 7,5 | 5 |
| 3. Quartil | 22,5 | 15 | 15,5 | 13 | 13,5 | 33 | 20,5 | 38 | 29,5 |
| Maximum | 29 | 18 | 16 | 17 | 19 | 39 | 25 | 40 | 32 |
| Minimum | 3 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 1 |

7.1.2 Darstellung der statistischen Signifikanz

Tabelle 8: Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeit p beim Vergleich der MAP2-Expression in den Kollektiven *Akutversterben* und *cerebrale Hypoxie/Ischämie*, *signifikant ($p \leq 0,01666667$)

Akutversterben / cerebrale Hypoxie/Ischämie

| Region | Signifikanz | Region | Signifikanz |
|-------------|------------------|--------|------------------|
| Schicht II | $p = 0,01806$ | CA4 | $p = 0,01393^*$ |
| Schicht III | $p = 0,004438^*$ | CA3 | $p = 0,002193^*$ |
| Schicht IV | $p = 0,06233$ | CA2 | $p = 0,000387^*$ |
| Schicht V | $p = 0,6027$ | CA1 | $p = 0,01754$ |
| Schicht VI | $p = 0,01937$ | | |

Tabelle 9: Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeit p beim Vergleich der MAP2-Expression in den Kollektiven *Akutversterben* und *plötzlicher Kindstod*, *signifikant ($p \leq 0,01666667$)

Akutversterben / plötzlicher Kindstod

| Region | Signifikanz | Region | Signifikanz |
|-------------|---------------|--------|-------------------|
| Schicht II | $p = 0,05552$ | CA4 | $p = 0,6351$ |
| Schicht III | $p = 0,1827$ | CA3 | $p = 0,005547^*$ |
| Schicht IV | $p = 0,2031$ | CA2 | $p = 0,0002949^*$ |
| Schicht V | $p = 1$ | CA1 | $p = 0,1146$ |
| Schicht VI | $p = 0,1827$ | | |

Tabelle 10: Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeit p beim Vergleich der MAP2-Expression in den Kollektiven *plötzlicher Kindstod* und *cerebrale Hypoxie/Ischämie*

plötzlicher Kindstod / cerebrale Hypoxie/Ischämie

| Region | Signifikanz | Region | Signifikanz |
|-------------|--------------|--------|---------------|
| Schicht II | $p = 1$ | CA4 | $p = 0,03518$ |
| Schicht III | $p = 0,1602$ | CA3 | $p = 1$ |
| Schicht IV | $p = 0,6447$ | CA2 | $p = 1$ |
| Schicht V | $p = 0,6728$ | CA1 | $p = 0,4828$ |
| Schicht VI | $p = 0,3783$ | | |

7.2 Chemikalien und Gerätenachweis

7.2.1 Chemikaliennachweis

AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) Substrat-Kit

Reagenz A: Substratpuffer

Reagenz B: AEC-Chromogen-Lösung

Reagenz C: 0, 6% Hydrogenperoxid-Lösung

Nr.: 00-2007; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, California, USA

Antikörper-Verdünnungsmedium/puffer

Nr.: 00-3218, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, California, USA

Aqua destillata

Institut für Rechtsmedizin UKSH, Campus Kiel

Aquatex®, wässriges Eindeckmittel

Nr. 1.08562; Merck KGaA, Darmstadt

Biotinkonjugierter Ziege-Anti-Maus IgG-Antikörper

Vertrieb: Dianova GmbH, Hamburg, Code: 115-065-166, Herstellung:

JacksonImmunoResearch Laboratories, Inc., West Baltimore, USA

Citronensäure-Monohydrat

Nr.: 1.00244 Merck KGaA, Darmstadt

Ethanol 100%

Büfa Chemikalien GmbH & Co KG, Hude

Formalin 4,5 %, gepuffert

Büfa Chemikalien GmbH & Co KG, Hude

Hämalaun nach Mayer, sauer

Nr.: 1.09249; Merck KGaA, Darmstadt

Natriumchlorid

Nr.: 1.06404; Merck KGaA, Darmstadt

Peroxidase-konjugiertes Streptavidin

Vertrieb: Dianova GmbH, Hamburg, Code: 016-030-084, Herstellung:
JacksonImmunoResearch Laboratories, Inc., West Baltimore, USA

Primärantikörper MAP2a,b Ab-2 (Klon AP20)

Code: MS-249-P; Neomarkers, Inc./Lab Vision, Fremont/USA

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

Nr.: 38642; Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

Tris-{Hydroxymethyl}-Aminomethan (Tris-Base)

Nr.: T1503; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL)

Nr.: T3253; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tris-Puffer

4,0 g Tris-Aminomethan + 34,25 g Tris-Hydrochlorid
+ 47 g Natriumchlorid mit Aqua dest. auf 5 Liter auffüllen, pH = 7,4 – 7,6

Wasserstoffperoxid 3%

Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken

Xylol

Nr.: 1307; Th. Geyer GmbH & Co. KG, Hamburg

Zitratpuffer

Stammlösung A: Citronensäure-Monohydrat: 2,101 g auf 100 ml Aqua dest.
Stammlösung B: Tri-Natriumcitrat-Dihydrat: 5,882 g auf 200 ml Aqua dest.
Gebrauchslösung: 4,5 ml Lösung A + 20,5 ml Lösung B auf 250 ml Aqua dest.
auffüllen, pH = 6,0

7.2.2 Gerätenachweis

Deckgläser

Menzel-Gläser, Braunschweig

Mikroskop Axiolab,

Serien-Nr.: 982883; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Mikrowelle

2450 Megahertz, maximale Leistung 800W

Siemens-Elektrogeräte GmbH, München

Oberschalige Präzisionswaage Kilomat

Typ 2116; Sartorius AG, Göttingen

Objektträger, SuperFrostPlus®

Nr. : 041300; Menzel-Gläser, Braunschweig

Schlittenmikrotom

Jung AG, Heidelberg

Waage analytic

Typ A2005; Sartorius AG, Göttingen

Wärmeschrank

Typ B10, 70°C; Memmert, Schwabach

Wasserbad

Typ WB 24; Medax Nagel KG, Kiel

8. Danksagung

Herrn **Professor Dr. med. Manfred Oehmichen** danke ich für die Bereitstellung des spannenden und herausfordernden Dissertationsthemas plötzlicher Kindstod. Sein großes Vertrauen ermöglichte mir viele Freiräume und ein sehr angenehmes Arbeiten. Sein Interesse und Enthusiasmus an dem Thema und den Ergebnissen der Untersuchung ermunterten stets zu engagierter Arbeit. Seine Unterstützung und Begleitung während der Dissertation waren mir immer eine sehr große Hilfe.

Herrn **Professor. Dr. med. Dr. jur. Hans-Jürgen Kaatsch** und allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel, danke ich für die Unterstützung und die Möglichkeit, die hier vorgelegte Untersuchung durchführen zu können.

Frau **Sabine Preiß** danke ich für die sehr engagierte Einarbeitung in die Welt der Histologie und Immunhistochemie sowie für ihre stets freundliche Art und Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen.

Frau **Dipl. Math. Dipl. Phys. Dr. Amke Caliebe** danke ich für die statistische Beratung und die kritische Durchsicht der vorliegenden Ergebnisse.

Herrn **Dipl.-Biol. Jan Sperveslage**, Herrn **Timo Schulze** und Frau **Dorina Kuhlmann** danke ich für das Korrekturlesen und die konstruktive Kritik sowie für die Hilfe bei computerbezogenen Problemen.

Meiner Freundin **Anne Liesenkötter** danke ich für Motivation, Inspiration, großzügige Unterstützung und regen, fachlichen Gedankenaustausch.

Meinen Eltern danke ich für ihr großes Vertrauen in mich und meine Vorstellungen und die damit verbundene volle Unterstützung seit ich denken kann.

9. Lebenslauf

Persönliches

| | |
|---------------------|---------------|
| Name | Fabian Wötzel |
| Geburtstag | 28.12.1981 |
| Geburtsort | Detmold |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Schulbildung

| | |
|-------------|--|
| 1988 – 1992 | Ostschule, Grundschule der Alten Hansestadt Lemgo |
| 1992 – 2001 | Marianne-Weber-Gymnasium Lemgo, Abitur, Juni 2001 |

Zivildienst

| | |
|-------------------|---|
| 08/2001 – 05/2002 | Soziale Altendienste Lippe, Wohn- und Pflegehaus Eichenhof, Kalletal |
|-------------------|---|

Hochschulbildung

| | |
|-------------------|--|
| 2002 – 2008 | Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel |
| 08/2004 | Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung |
| 08/2007 – 07/2008 | Praktisches Jahr |
| 12/2008 | Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung |

Promotion

| | |
|-------------------|--|
| 03/2005 – 06/2008 | Experimentelle Doktorarbeit zum Thema: „Hypoxisch-Ischämische Hirnschädigung bei Opfern eines plötzlichen Kindstodes“ unter Leitung von Prof. Dr. med. M. Oehmichen, ehem. Direktor des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel |
|-------------------|--|