

**Myokardiale Apoptose und zelluläre Infiltration  
beim Plötzlichen Kindstod**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Sarah Grasmeyer geb. Marmagen  
aus Mechernich

2014

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Burkhard Madea
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Vogel

Tag der Mündlichen Prüfung: 09. Mai 2014

Aus dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Madea

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1 Der Plötzliche Kindstod .....	9
1.1.1 Begriffsbestimmung .....	9
1.1.2 Inzidenz, Risikofaktoren und Prävention .....	11
1.1.3 Infektionen als Todesursache? .....	14
1.2 Myokarditis .....	17
1.2.1 Histopathologische Definition nach Aretz (= DALLAS-Kriterien).....	17
1.2.2 Ätiologie und Symptomatik .....	18
1.2.3 Pathogenese und Verlauf.....	19
1.2.4 Diagnoseverfahren und -kriterien.....	21
1.2.5 Myokarditis und Plötzlicher Kindstod.....	25
1.3 Apoptose.....	27
1.3.1 Definition und Vorkommen .....	27
1.3.2 Merkmale einer apoptotischen Zelle .....	28
1.3.3 Apoptose und Myokarditis .....	29
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	30
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
2.1 Das SIDS-Kollektiv.....	31
2.2 Das Kontroll-Kollektiv.....	34
2.3 Entnahme des Myokardgewebes: Probeentnahmestellen & Asservierung.....	35
2.4 Konventionelle und immunhistochemische Färbemethoden .....	36
2.5 Die TUNEL-Methode .....	38
2.5.1 Prinzip.....	38
2.5.2 Durchführung und Färbeprotokoll.....	38
<b>3. Auswertung .....</b>	<b>41</b>
3.1 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE).....	41
3.2 Auswertung der Immunhistochemie und der TUNEL-Methode.....	42
3.2.1 Zählmethode in Quadratmillimeter .....	42
3.2.1.1 Motivation.....	42

3.2.1.2	Durchführung der Auszählung .....	43
3.2.1.3	Statistische Auswertung der Zählergebnisse .....	44
3.2.1.4	Berechnung eines Umrechnungsfaktors .....	44
3.2.1.5	Größenvergleich neue Zählmethode mit bisherigen Zählmethoden.....	45
3.3	Mikroskopische Darstellung der Immunhistochemie .....	46
3.4	Mikroskopische Darstellung der TUNEL-Methode.....	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
4.1	Ergebnisse der Obduktionsprotokolle .....	50
4.1.1	SIDS-Inzidenz .....	50
4.1.2	SIDS-Fälle und ihre monatliche Verteilung .....	51
4.1.3	Körperlage zum Todeszeitpunkt im SIDS-Kollektiv .....	52
4.1.4	Geschlechterverteilung .....	53
4.1.5	Nationalität .....	53
4.1.6	Säuglingsalter zum Todeszeitpunkt im SIDS-Kollektiv .....	54
4.1.7	Weitere Besonderheiten des Studienkollektivs .....	55
4.2	Ergebnisse der konventionell-histologischen Färbung (HE).....	56
4.3	Ergebnisse der Immunhistochemie .....	63
4.3.1	Durchschnittliche Infiltration: Ergebnisübersicht aller Färbungen .....	63
4.3.2	LCA .....	66
4.3.3	CD68.....	69
4.3.4	CD45-R0.....	71
4.3.5	Statistische Signifikanz der immunhistochemischen Ergebnisse.....	73
4.3.6	Lokalisation der Infiltrate im Myokard .....	74
4.3.7	Infiltration in einzelnen Fällen und Probeentnahmestellen .....	76
4.3.8	Infiltration und Lebensalter .....	78
4.4	Ergebnisse der TUNEL-Methode.....	79
4.4.1	Fälle mit Nachweis von apoptotischen Zellen.....	79
4.4.2	Merkmale der TUNEL-positiven Fälle .....	81
4.4.3	Verteilung apoptotischer Zellen im Herzen .....	81
4.4.4	Verteilung apoptotischer Zellen innerhalb eines Präparats .....	83
4.4.5	Anzahl apoptotischer Myozyten/mm <sup>2</sup> im Gesamtkollektiv.....	84
4.4.6	Anzahl apoptotischer Myozyten/mm <sup>2</sup> im TUNEL-positiven Präparat.....	85

4.4.7	Statistische Signifikanz der TUNEL-Ergebnisse .....	90
4.5	Vergleich der Ergebnisse aller Methoden .....	91
4.5.1	Auffällige SIDS-Fälle der HE-Färbung.....	91
4.5.2	Auffällige SIDS-Fälle der Leukozytenfärbung .....	99
4.5.3	Auffällige TUNEL-Fälle im Methodenvergleich.....	101
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>102</b>
5.1	Studienkollektiv .....	102
5.1.1	Anzahl der Fälle .....	102
5.1.2	Merkmale des SIDS-Kollektivs.....	103
5.2	Myokardgewebe .....	104
5.3	Myokardfläche .....	104
5.4	Zählmethode.....	107
5.5	HE-Methode und DALLAS-Kriterien .....	107
5.6	Immunhistochemie .....	110
5.6.1	Methode.....	110
5.6.2	Ergebnisse der Immunhistochemie.....	111
5.6.2.1	Ergebnisse im Studienvergleich .....	112
5.6.2.2	Ergebnisse im Kontext der Grenzwerte.....	114
5.6.2.3	Statistische Signifikanz versus Klinische Relevanz .....	120
5.6.2.4	Mittelwertproblematik .....	121
5.7	Molekularbiologie .....	124
5.8	Apoptose.....	126
5.8.1	Einordnung der Ergebnisse.....	126
5.8.2	Methodenkritik .....	127
<b>6.</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>129</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>133</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>149</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>APC</b>	Antigen-präsentierende Zelle
<b>AV-Blockierungen</b>	Atrioventrikuläre Blockierungen
<b>BNP</b>	Brain Natriuretic Peptid
<b>BTM</b>	Betäubungsmittel
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CK-MB</b>	Creatinkinase vom Myokardtyp
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>Dest.</b>	Destilliert
<b>DCM</b>	Dilatative Kardiomyopathie
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dUTP</b>	Desoxyuridintriphosphat
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>EMB</b>	Endomyokardbiopsie
<b>Fa.</b>	Firma
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HHV 6</b>	Humanes Herpes Virus 6
<b>HPF</b>	High-power-Field
<b>Ig</b>	Immunglobuline
<b>IgG</b>	Immunglobulin G

<b>LCA</b>	Leucocyte Common Antigen
<b>LDH</b>	Laktat-Dehydrogenase
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>N</b>	Nummer, Anzahl
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>OP</b>	Operation
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PES</b>	Probeentnahmestelle
<b>RSV</b>	Respiratory Syncytial Virus
<b>SHT</b>	Schädel-Hirn-Trauma
<b>SIDS</b>	Sudden Infant Death Syndrome
<b>SUDI</b>	Sudden unexpected death in infancy
<b>Staph. aureus</b>	Staphylococcus aureus
<b>STIKO</b>	Ständige Impfkommission
<b>TdT</b>	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP <b>nick end labeling</b>
<b>WHF</b>	World Heart Federation

## 1. Einleitung

Die Inzidenz des Plötzlichen Kindstods ist durch Identifikation von Risikofaktoren und durch Aufklärungskampagnen in den letzten Jahren weltweit stark zurückgegangen. Dennoch ist der Plötzliche Kindstod in den Industrieländern auch heute noch die häufigste Todesursache in der Postneonatalperiode.

In den vergangenen Jahrzehnten sind viele unterschiedliche Theorien über Pathogenese und Ätiologie dieses Phänomens untersucht worden, die Ursache ist jedoch nach wie vor ungeklärt. Einen Schwerpunkt bildet dabei die Erforschung von Infektionen als Todesursache, vor allem, weil ein Großteil der Säuglinge in den Tagen vor ihrem Tod Zeichen eines banalen Infektes aufweist; meist Infektionen der oberen Atemwege. Heute werden auch akute Myokarditiden als mögliche Todesursache in Fällen des Plötzlichen Kindstods diskutiert und sind auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Mit konventionell-histologischen und immunhistochemischen Verfahren wird der Frage nachgegangen, ob in Fällen des Plötzlichen Kindstods eine Myokarditis als Haupttodesursache anzunehmen ist. Neben dem Nachweis typischer zellulärer Infiltration im Rahmen einer Myokarditis wird in dieser Arbeit erstmalig auch das Vorkommen myokardialer Apoptose in Fällen des Plötzlichen Kindstods untersucht.



## 1.1 Der Plötzliche Kindstod

### 1.1.1 Begriffsbestimmung

Die Definition des Begriffs Plötzlicher Kindstod – auch „Sudden Infant Death Syndrome“ bzw. „SIDS“ – unterliegt in den vergangenen Jahrzehnten einem stetigen Prozess mit dem Ziel, eine international einheitliche Definition festzulegen. Die national wie international verschiedenen Begriffsbestimmungen der letzten Jahrzehnte unterscheiden sich vor allem in ihrer Präzision und der Anzahl der Ein- bzw. Ausschlusskriterien. Allen ist jedoch gemein, dass sie den unerwarteten Tod eines Säuglings beschreiben, für den es keine hinreichend erklärende Ursache gibt.

Im Jahr 1970 veröffentlichte Beckwith in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der zweiten internationalen Konferenz in Seattle über den plötzlichen Tod von Kindern erstmals eine allgemeine offizielle Definition. Der Plötzliche Kindstod wird darin definiert als „the sudden death of any infant or young child, which is unexpected by history, and in which a thorough post-mortem examination fails to demonstrate an adequate cause of death“ (Beckwith, 1970).

Aufgrund dieser sehr allgemeinen, unspezifischen Definition ohne weitere gemeinsame oder abschließende Kriterien (Beckwith, 2003; Krous et al., 2004) erfolgte in den folgenden Jahrzehnten eine stetige Überarbeitung und Erweiterung der Diagnosekriterien. So setzte 1991 ein Expertenteam des „National Institute of Child Health and Human Development“ für die Diagnose des Plötzlichen Kindstod neben der Obduktion auch die Berücksichtigung der Krankengeschichte, die Untersuchung des Sterbeortes sowie die Beschränkung des Säuglingsalters auf Säuglinge unter einem Jahr voraus: „SIDS is the sudden death of an infant under one year of age, which remains unexplained after a thorough case investigation, including performance of a complete autopsy, examination of the death scene, and review of the clinical history“ (Willinger et al., 1991).

Heute ist die 2004 in San Diego festgelegte Definition anerkannt, die neben einer einleitenden allgemeinen Definition eine zusätzliche Unterteilung in drei weitere Kategorien enthält. Darin werden genaue und unterschiedlich weit gefasste Kriterien zu Todesumständen, Obduktionsmerkmalen und der Krankengeschichte festgelegt. Die allgemeine Definition lautet: „SIDS is defined as the sudden unexpected death of an infant <1 year of age, with onset of the fatal episode apparently occurring during sleep, that remains unexplained after a thorough investigation, including

performance of a complete autopsy and review of the circumstances of death and the clinical history“ (Krous et al., 2004). Die drei weiteren Kategorien werden wie folgt unterschieden (zitiert und übersetzt nach Krous et al., 2004 bzw. nach Madea und Drexler, 2012):

### **Kategorie IA:**

**Klinik:** Älter als 21 Tage und jünger als 9 Monate, unauffällige klinische Vorgeschichte, inklusive unauffälligem Schwangerschaftsverlauf (Dauer > 37 Wochen), normales Wachstum und Entwicklung sowie keine ähnlichen Todesfälle unter Geschwistern und nahen Verwandten [...] oder anderen Kindern in der Obhut der gleichen Betreuer.

**Todesumstände:** Untersuchung verschiedener Orte, an denen todesursächliche Vorfälle stattgefunden haben könnten und Feststellung, dass diese den Tod nicht erklären. Sichere Schlafumgebung ohne Hinweis auf einen unfallbedingten Tod.

**Obduktion:** Fehlen potentiell tödlicher pathologischer Befunde [...], keine Hinweise auf Traumata, Missbrauch, Vernachlässigung oder unbeabsichtigte Verletzung [...], negative Ergebnisse der toxikologischen, mikrobiologischen, radiologischen und postmortalen biochemischen Untersuchungen sowie der Stoffwechseluntersuchungen.

### **Kategorie IB:**

Alle Fälle, die neben der allgemeinen Definition auch die Kriterien der Kategorie IA erfüllen, außer dass die Untersuchung der verschiedenen Orte, an denen todesursächliche Vorfälle stattgefunden haben könnten, nicht durchgeführt wurde und/oder mehr als eine der folgenden Untersuchungsmethoden nicht durchgeführt wurde: toxikologische, mikrobiologische, radiologische, postmortal biochemische oder Stoffwechseluntersuchung.

### **Kategorie II:**

Alle Fälle, die neben der allgemeinen Definition auch die Kriterien der Kategorie IA erfüllen, außer folgenden Kriterien:

**Klinik:** Altersspanne außerhalb Kategorie IA [...], ähnliche Todesfälle unter Geschwistern und nahen Verwandten [...] oder anderen Kindern in der Obhut der gleichen Betreuer [...], neonatale oder perinatale Besonderheiten, die zum Zeitpunkt des Todes nicht mehr bestehen.

**Todesumstände:** Erstickungstod durch mechanische äußere Ursache oder Überliegen kann nicht sicher festgelegt werden.

**Obduktion:** Vorliegen von gestörtem Wachstum und Entwicklung, welches allerdings nicht als todesursächlich angesehen wird. Vorliegende entzündliche Veränderungen oder Abnormalitäten sind nicht ausreichend, um als eindeutige Todesursache anerkannt zu werden.

### 1.1.2 Inzidenz, Risikofaktoren und Prävention

Der Plötzliche Kindstod ist in den Industrieländern auch heute noch die häufigste Todesursache in der Postneonatalperiode. Die Inzidenz der SIDS-Fälle ist in Deutschland seit 1991 allerdings stark rückläufig. Unter Berücksichtigung des Geburtenrückgangs zeigt sich eine Abnahme der Sterberate von 1,78/1.000 Lebendgeborenen im Jahr 1991 auf 0,29/1.000 Lebendgeborenen im Jahr 2009. Folgende eigene Darstellung der veröffentlichten Daten des Statistischen Bundesamtes zeigt diesen Rückgang eindrucksvoll (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010):

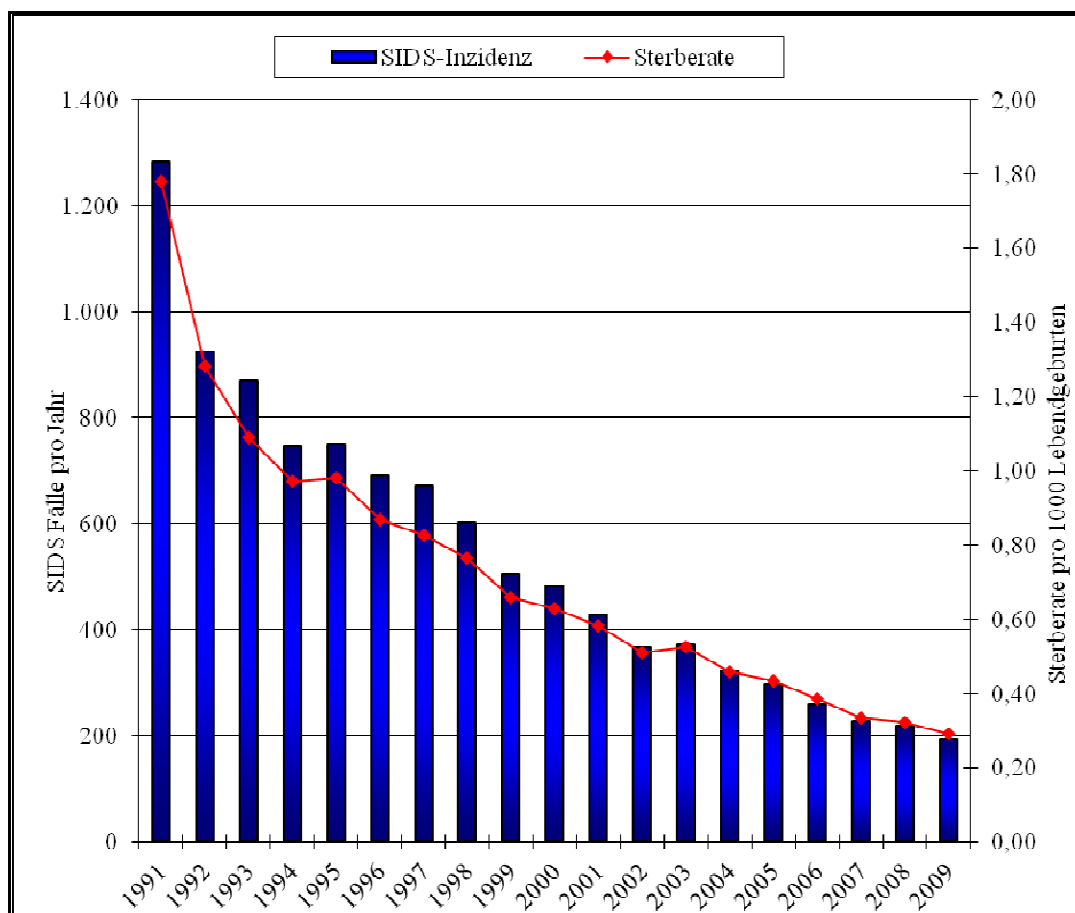


Abbildung 1: Inzidenz des Plötzlichen Kindstods und Sterberate bezogen auf 1000 Lebendgeborene in Deutschland, 1991-2009

Maßgebliche Ursache für diesen starken Rückgang der SIDS-Inzidenz in Deutschland, aber auch weltweit, war die Identifikation bestimmter Risikofaktoren, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für den Plötzlichen Kindstod verbunden sind, sowie vor allem die forcierte Veröffentlichung von Kampagnen zur Umsetzung der daraus abgeleiteten protektiven Maßnahmen.

Den größten Effekt hatte dabei die Identifizierung der Bauchlage als wichtigster Risikofaktor und die Empfehlung des Schlafens in Rückenlage, welche 1989 vor allem durch den Pädiater De Jonge in den Niederlande publik gemacht wurde und dann weltweit, unter anderem in Kampagnen wie die „Back to Sleep“-Kampagne in Ländern des British Commonwealth of Nation und den USA, mit Nachdruck verbreitet wurde (siehe v.a. De Jonge et al., 1989; Dwyer et al., 1995; Mitchell et al., 1999; Wennergren, 1997). In einigen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass auch das Schlafen in Seitenlage als Risikofaktor anzusehen ist, vor allem deshalb, weil Säuglinge daraus leicht in die Bauchlage rollen können (Fleming et al., 1996; Scragg und Mitchell, 1998). Relevant ist dabei, dass Säuglinge erst mit ca. 5-6 Monaten in der Lage sind, ihre Schlafposition selbst zu ändern (Harrison et al., 1999a).

Weitere Risikofaktoren sowie präventive Maßnahmen sind im Folgenden dargestellt:

- Rauchen der Mutter, insbesondere während der Schwangerschaft, aber auch postpartal, erhöht das SIDS-Risiko dramatisch (Anderson und Cook, 1997; Blair et al., 1996; Bulterys et al., 1990; Haglund und Cnattingius, 1990; Malloy et al., 1988; Oyen et al., 1997; Raza et al., 1999; Schlaud et al., 1996; Schoendorf und Kiely, 1992; Steele und Langworth, 1966). Dabei steigt das Risiko mit der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten (Blair et al., 1996; Wisborg et al., 2000). Auch ein anderweitiger Drogenkonsum der Mutter stellt einen Risikofaktor dar (Blair et al., 1996; Chavez et al., 1979; Kandall und Gaines, 1991).
- Schlafen im Bett der Eltern, sogenanntes „Bed-Sharing“, ist insbesondere bei rauchenden, alkoholisierten oder drogenabhängigen Elternteilen sowie bei Kindern unter 4 Monaten mit einem signifikant höheren Risiko verbunden (Blair et al., 1999; Fleming et al., 1996; Scragg et al., 1993). Allerdings konnte auch für Kinder, die alleine im eigenen Zimmer schlafen, ein erhöhtes SIDS-Risiko nachgewiesen werden; die Ursache ist dabei noch unklar (Blair et al., 1999; Tappin et al., 2005). Daher wird empfohlen, dass Säuglinge in den ersten Lebensmona-

ten im eigenen Bett im elterlichen Schlafzimmer schlafen, sogenanntes „Co-Sleeping“ (Blair et al., 1999; Jorch et al., 2003; Tappin et al., 2005). Das gemeinsame Schlafen auf einem Sofa ist unabhängig von weiteren Faktoren stark kindstodgefährdend und sollte immer vermieden werden (Blair et al., 1999; Tappin et al., 2005).

- Eine Überhitzung des Säuglings, insbesondere in Bauchlage, konnte als weiterer Risikofaktor identifiziert werden (Fleming et al., 1996; Gilbert et al., 1992; Kleemann et al., 1996; Mitchell et al., 2008; Nelson et al., 1989). Daher wird empfohlen, die Raumtemperatur zwischen 16°C und 18°C zu regulieren (Jorch et al., 2003), sowie auf das Schlafen mit weichen Matratzen, Kissen, Bettdecken, Schaffellen und Ähnlichem im Kindsbett zu verzichten (Hauck et al., 2003; Mitchell et al., 1996; Scheers et al., 1998; Wilson et al., 1994). Dies natürlich auch um die akzidentielle Verlegung der Atemwege zu verhindern. Stattdessen wird das Schlafen in einem Schlafsack empfohlen (Jorch et al., 2003).
- Bestimmte kindseigene Merkmale, die allerdings wenig beeinflussbar sind, stehen ebenfalls im Zusammenhang mit einem erhöhten SIDS-Risiko: Frühgeburtlichkeit (< vollendete 37. SSW), niedriges Geburtsgewicht (< 2500 g) sowie männliches Geschlecht (siehe u.a. Byard und Krous, 2003; De Jonge et al., 1993; Hoffmann et al., 1988; Mitchell et al., 1997; Oyen et al., 1997; Rintahaka und Hirvonen, 1986; Steele und Langworth, 1966).
- Auch bestimmte mütterliche Faktoren sind mit einem erhöhten Risiko verbunden. Dazu zählen unter anderem sozioökonomische Merkmale wie eine geringe Schulbildung, schlechte Wohnverhältnisse und junges Alter der Mutter (Peterson et al., 1982; Rintahaka und Hirvonen, 1986; Steele und Langworth, 1966).
- Durch verschiedene Studien als protektiv nachgewiesen und daher heute empfohlen wird sowohl das Stillen des Kindes (Ford et al., 1993; Hauck et al., 2003; Vennemann et al., 2009) als auch das Verwenden eines Schnullers (Fleming et al., 1999; Hauck et al., 2003; Li et al., 2006; Mitchell et al., 1993; Zotter et al., 2002).
- Aufgrund der zeitlichen Nähe zwischen den ersten von der Ständigen Impfkommission (STIKO) empfohlenen Impfungen ab dem 3. Lebensmonat und dem gehäuften Auftreten von

SIDS im zweiten bis vierten Lebensmonat wurde schließlich untersucht, ob eine Impfung das SIDS-Risiko erhöht. In den 1970er Jahren veröffentlichte das Center for Disease Control and Prevention in Tennessee einen Bericht, in dem ein Zusammenhang zwischen der Tetanus-Diphtherie-Pertussis-Impfung und dem Plötzlichen Kindstod vermutet wurde (Hutcheson, 1979). In späteren Studien, unter anderem der TOKEN-Studie des Robert-Koch-Instituts, konnte allerdings nachgewiesen werden, dass es keine Verbindung zwischen dem gehäuftem Auftreten des Plötzlichen Kindstods und den Impfungen gibt. Stattdessen konnte sogar gezeigt werden, dass das SIDS-Risiko bei ungeimpften Säuglingen höher als bei geimpften Kindern ist (Essery et al., 1999; Mitchell et al., 1995; Schlaud et al., 2012; siehe v.a. Metaanalyse von Vennemann et al., 2007).

### **1.1.3 Infektionen als Todesursache?**

Aufgrund von epidemiologischen Auffälligkeiten steht in den letzten Jahren besonders die Erforschung von Infektionen als Todesursache in Fällen des Plötzlichen Kindstods im Vordergrund.

So weist zum Beispiel ein Großteil der Säuglinge in den Tagen vor dem Tod Zeichen eines Infektes der oberen Atemwege auf. In einer Studie von Adelson und Kinney (1956) zeigten 80 von 126 Kindern (63 %) „histories of mild illness for 48 hours or less prior to death“. Gilbert et al. (1990) wiesen sogar für 66 von 95 Säuglingen (69 %) Erkältungssymptome bis zu zwei Wochen vor deren Tod nach. Die Symptome waren jedoch meist unspezifisch und mild, so dass der Tod für Pädiater, die von der SIDS-Gruppe vermehrt aufgesucht worden waren, nicht vorhersehbar war.

Daneben zeigten sich während der Obduktion der verstorbenen Säuglinge regelmäßig Anzeichen eines Infektes, vor allem der oberen und unteren Atemwege, wie zum Beispiel einer Otitis media, einer Tracheobronchitis sowie Zeichen einer milden Pneumonie (Althoff, 1977, 1986; Aoki, 1994; Coe und Hartmann, 1960; Johnstone und Lawy, 1966; Madea und Drexler, 2012).

Weiterhin ist auffällig, dass der Kindstod vermehrt in der kalten Jahreszeit vorkommt bei gleichzeitig erhöhter Inzidenz von Atemwegsinfekten bzw. Grippeerkrankungen (Beal und Porter, 1991; Carpenter und Gardner, 1982; Douglas et al., 1996, 1998; Guntheroth et al., 1992; Rintahaka und Hirvonen, 1986).

Auch die Tatsache, dass der plötzliche Kindstod vor allem zwischen dem 2. und 4. Lebensmonat auftritt (Byard und Krous, 2003; Goldberg et al., 1986; Rintahaka und Hirvonen, 1986; Steele und Langworth, 1966), und damit einhergeht mit der Phase, in der die Konzentration der diaplazentar übertragenen mütterlichen Immunglobuline (Ig) bei noch bestehender Unreife des kindlichen Immunsystems abfällt, kann mit einer erhöhten Infektionsgefahr verbunden werden: „Maternal IgG protects against infection in the early weeks of life so that the risk of infection will rise as maternal IgG levels falls“ (Morris, 1999; siehe auch Raza und Blackwell, 1999). Durch das Stillen erhält der Säugling allerdings zudem einen nichtimmunologischen Schutz vor Infektionen, z.B. durch Glykoproteine oder Oligosachharide (Peterson et al., 1998), sodass dies als protektiv empfohlen wird.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden daher bereits früh bakterielle Infekte als Ursache für den Plötzlichen Kindstod erforscht (Johnstone und Lawy, 1966). Neben dem Nachweis von *Staph. aureus* in Blut und Gewebe (Goldwater, 2009) wurden unter anderem Infektionen mit *E. coli* (Pearce et al., 1999) oder *Helicobacter pylori* (Pattison und Marshall, 1997) als mögliche Todesursache diskutiert. Harrison et al. (1999b) wiesen in morgendlichen nasopharyngealen Abstrichen nach, dass asymptomatische Kinder in Bauchlage eine höhere bakterielle Besiedlung mit *Staph. aureus* hatten als in Rückenlage, wobei bei männlichen Säuglingen und in Wintermonaten besonders hohe bakterielle Konzentrationen nachgewiesen wurden. Eine Ursache könnte sein, dass die nasale Temperatur in Bauchlage signifikant höher ist als in Rückenlage, was die Toxinproduktion von *Staph. aureus* begünstigt (Molony et al., 1999).

Forschungsgegenstand neben bakteriellen Infekten sind aber vor allem Virusinfektionen des Respirationstraktes. Dabei erfolgte der serologische sowie heute meist molekularbiologische Virusnachweis insbesondere im Lungengewebe, aber auch in anderen Organen bzw. Geweben wie Myokard, Speicheldrüsen und Blut. Unter anderem wurden Infektionen mit CMV (Cecchi et al., 1995; Dettmeyer et al., 2006a), Influenzaviren (Zink et al., 1987), Adenoviren (An et al., 1993; Bajanowski et al., 1996) und RSV (An et al., 1993; Williams et al., 1984) in einem Kollektiv aus Fällen des Plötzlichen Kindstods (syn. SIDS-Kollektiv) nachgewiesenen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Interleukin 6, ein Akut-Phase-Protein bei entzündlichen Prozessen, in Kindstodfällen erhöht ist „comparable to those we found in infants dying from infectious diseases like meningitis and septicaemia“ (Vege und Rognum, 2004 sowie Vege et al., 1995). Eine ausführli-

che Studienübersicht zur infektiologischen Hypothese des Kindstodes findet sich in Dettmeyer (2004), S. 15ff.

Dennoch ergibt sich aus einer viralen oder bakteriellen Infektion alleine noch keine hinreichende Erklärung für den Tod eines Säuglings (Madea, 2009; Williams et al., 1984; Zink et al., 1987). Eine akute Myokarditis dagegen ist als Ursache plötzlicher Todesfälle, insbesondere auch bei jungen Erwachsenen, bekannt (Basso, et al., 2001; Doolan et al., 2004). Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine Myokarditis ursächlich für den Plötzlichen Kindstod sein könnte, zumal sie meist viral bedingt ist und klinisch auch asymptomatisch verlaufen bzw. nur mit leichten Erkältungssymptomen einhergehen kann.

In der vorliegenden Arbeit wird daher der Frage nachgegangen, ob eine Myokarditis als Haupttodesursache im SIDS-Kollektiv angesehen werden kann. Dazu werden im folgenden Kapitel die Ätiologie, Pathogenese und Diagnostik einer Myokarditis sowie die bisherigen Forschungsergebnisse zur Myokarditis im Kindstodfalle ausführlich und gesondert dargestellt.



## 1.2 Myokarditis

### 1.2.1 Histopathologische Definition nach Aretz (= DALLAS-Kriterien)

1987 wurde in Dallas erstmals durch ein Pathologengremium um H. Thomas Aretz festgelegt, wie eine Myokarditis histopathologisch definiert ist. Diese Definition und ihre Kriterien werden auch als die „DALLAS-Kriterien“ bezeichnet (Aretz, 1987).

Eine Myokarditis ist demnach histopathologisch definiert als ein „process characterized by an inflammatory infiltrate of the myocardium with necrosis and/or degeneration of adjacent myocytes not typical of the ischemic damage associated with coronary artery disease“ (Aretz et al., 1987). Demnach ist eine Myokarditis eine maßgeblich histologisch zu stellende Diagnose, die mit einer Entzündung und einer Nekrose des Myokards einhergeht, ohne dass eine Ischämie ursächlich ist.

Nach Aretz et al. (1987) können in einer ersten Biopsie zwei Formen unterschieden werden: eine aktive Myokarditis mit inflammatorischen Infiltraten und Myozytenschäden sowie eine sogenannte Borderline-Myokarditis, die durch wenige vereinzelte Infiltrate bzw. durch keine lichtmikroskopisch sichtbaren Myozytenschäden gekennzeichnet ist. Im Verlauf und nur durch eine weitere Biopsie kann eine Myokarditis dann in „ongoing“ (weiterhin unveränderte Infiltration), „resolving“ (abnehmende Infiltration, heilend) und „resolved“ (abgeheilt, keine Infiltration mehr sichtbar) unterteilt werden (Aretz et al., 1987).

Infiltrate können weiter nach der vorherrschenden Zellart in „lymphocytic, eosinophilic, neutrophilic, giant cell, granulomatous“ (Aretz et al., 1987) unterschieden werden. Außerdem können sie nach der Ausprägung der Infiltrate als mild, moderat und schwer sowie nach ihrer Verteilung als fokal, konfluierend oder diffus beschrieben werden.

Eine virale Myokarditis zeichnet sich vor allem durch lymphozytäre Infiltrate aus. Dabei gilt ein Infiltrat von weniger als fünf Lymphozyten pro High-Power-Field (=HPF, Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung) als normal (Aretz et al., 1987).

## 1.2.2 Ätiologie und Symptomatik

Häufigste Ursache einer Myokarditis sind Virusinfektionen. In früheren Studien wurden vor allem Enteroviren als Hauptagens identifiziert, wobei insbesondere Coxsackieviren (B1-5) nachgewiesen werden konnten (Bowles et al., 1986; Burch et al., 1968; Dettmeyer et al., 2002; Kim et al., 2001; Kühl et al., 2005b; Woodruff, 1980). Daneben sind Infektionen mit Adenoviren (Bowles et al., 2003), Influenzaviren (Fairley et al., 1996) und Cytomegalieviren beschrieben worden, letztere insbesondere in Fällen von letaler Myokarditis (Kytö et al., 2005). In den vergangenen zehn Jahren zeichnet sich ein Erregerwechsel der kardiotropen Viren ab. So weisen verschiedene Studien eine höhere Prävalenz für Parvovirus B19 und HHV6 nach als für Entero- und Adenoviren (Kühl et al., 2005a, 2005b; Mahrholdt et al., 2006; Pankuweit und Maisch, 2010).

Weitere mögliche Ursachen einer Myokarditis sind bakterielle Infektionen durch Streptokokken, Mykoplasmen, Borrelien (McAlister et al., 1989) und Chlamydien; Infektionen durch Parasiten und Pilze; toxische Myokarditiden durch z.B. Medikamente und assoziierte Myokarditiden bei diversen Autoimmunerkrankungen. Eine detaillierte Übersicht über potentielle Ursachen einer Myokarditis findet sich u.a. in Dennert et al., 2008; Pankuweit und Maisch, 2010 sowie Strauer et al., 2001.

Die klinischen Symptome einer Myokarditis sind je nach Virulenz, Art des Erregers und Ausmaß der Infektion vielfältig und größtenteils unspezifisch. Sie reichen von keinen bzw. nur milden Symptomen bis hin zur schweren Herzinsuffizienz und Tod. Anzeichen einer Myokarditis können grippeähnliche Krankheitszeichen wie Müdigkeit, Fieber oder Myalgien sein, aber auch kardiale Beschwerden wie Belastungsdyspnoe, Synkopen, Palpitationen, Angina pectoris und neu aufgetretene Herzgeräusche (Cooper, 2009; Klein et al., 2000; Mahrholdt et al., 2006; Pankuweit und Maisch, 2010). In einigen Fällen zeigt sich eine Myokarditis auch mit allen Anzeichen eines akuten Myokardinfarkts, inklusive infarkttypischer EKG-Veränderungen (Angelini et al., 2000; Kühl et al., 2003). Insbesondere der plötzliche Tod durch Herzrhythmusstörungen (Chimenti et al., 2004; Cooper, 2009; Heusch et al., 1996; Klein et al., 2000) macht eine Myokarditis in Fällen des Plötzlichen Kindstods als hypothetische Todesursache interessant.

### 1.2.3 Pathogenese und Verlauf

In der Erforschung der Pathogenese einer Virusmyokarditis an Tiermodellen konnten drei aufeinanderfolgende Krankheitsphasen identifiziert werden:

1. Virusreplikation mit direkter Zellschädigung und Zelluntergang des Myokards durch das Virus oder seine Toxine (McManus et al., 1993).
2. Aktivierung einer Immunreaktion mit verstärkter Aktivierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Antigen-präsentierenden Zellen (APC), proinflammatorischen Cytokinen (Matsumori et al., 1994) sowie vor allem von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten (Cooper, 2009; Esfandiarei und McManus, 2008). In dieser Phase, die etwa 2-4 Tage nach der Virusinfektion beginnt, zeigen sich typische Infiltrate im Myokard (Esfandiarei und McManus, 2008). Durch die Immunreaktion, insbesondere durch NK-Zellen, die die virusinfizierten Zellen zerstören, wird das Myokard in dieser Phase weiter geschädigt (Dennert et al., 2008; Esfandiarei und McManus, 2008). Der immunologische Ablauf einer Infektion mit kardiotropen Viren wird in der folgenden Abbildung dargestellt:

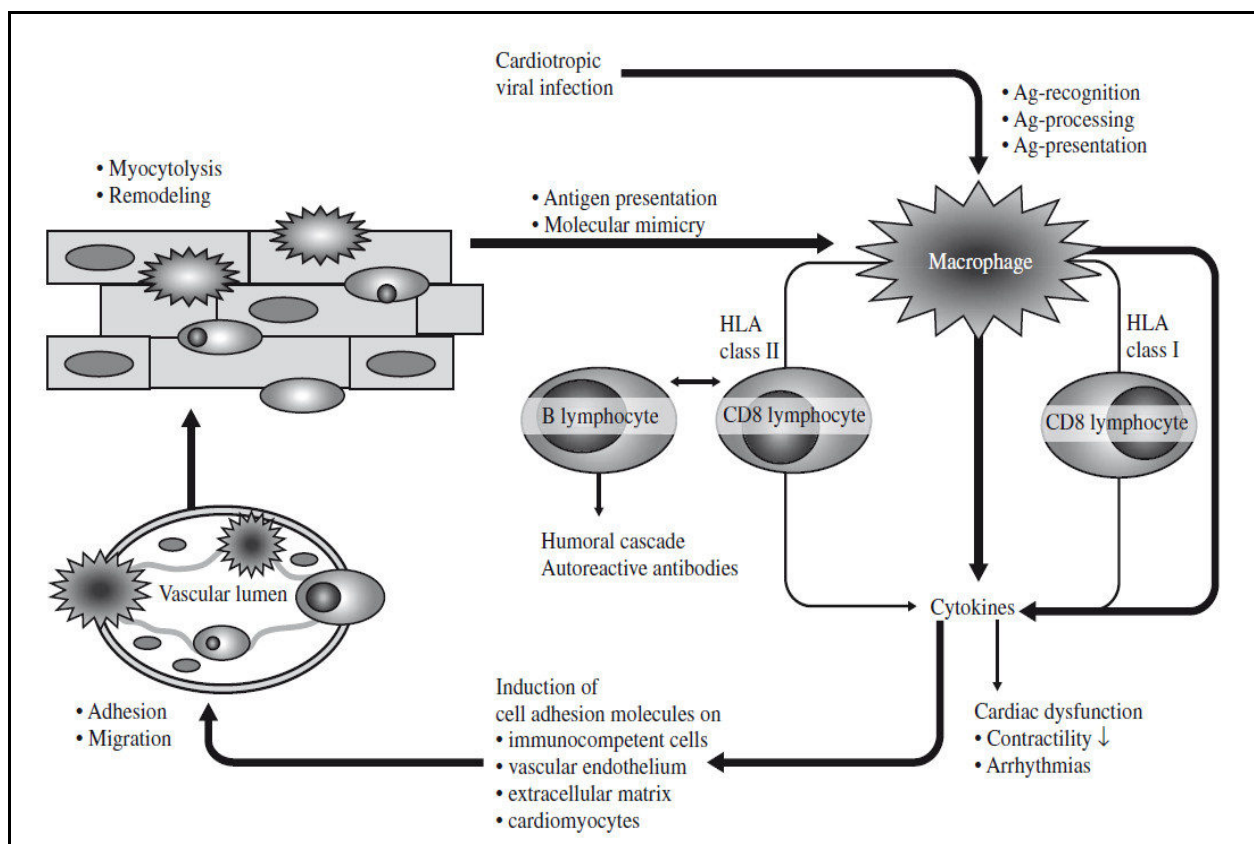


Abbildung 2: Immunreaktion kardiotroper Infektionen (Noutsias et al., 2002)

3. Viruselimination und Downregulation der Immunreaktion: In dieser Phase kommt es im besten Fall zur völligen Viruselimination mit Stopp der Virusreplikation und Beendigung der Immunreaktion. Dabei kommt es zu Umbauprozessen („Remodelling“) des Myokards mit Fibrose und Kalzifizierung. Je nach Schweregrad bzw. Ausmaß der Myokardschädigung resultiert daraus in unterschiedlicher Ausprägung eine Linksherzinsuffizienz mit eingeschränkter Pumpfunktion, Herzrhythmusstörungen, eine Myokardhypertrophie oder eine dilatative Kardiomyopathie (DCM). Ist die Viruselimination nicht vollständig, führt dies zu einer chronischen Immunreaktion mit nachweisbaren Infiltraten und Persistenz von Virusgenom mit massiver Reduktion der Pumpfunktion (Kühl et al., 2005b) und schneller Entwicklung einer DCM (Adams et al., 2006; Cooper, 2009; Dennert et al., 2008; Esfandiarei und McManus, 2008; Kandolf et al., 1993; Klingel et al., 1992, 2000; Kühl et al., 2005a, 2005b; Liu und Mason, 2001).

Nach ihrem Verlauf können Myokarditiden schließlich noch eingeteilt werden in fulminante, subakute, chronisch aktive und chronisch persistierende Myokarditiden:

- Fulminante Myokarditis: Schnelle kardiale Linksherzdekompensation mit u.a. kardiogenem Schock bis hin zum Tod. Typisch ist ein plötzlicher und heftiger Beginn der Symptomatik (Lieberman et al., 1993). Meist gute Prognose mit vollständiger Erholung bei unmittelbarer Therapieeinleitung, die Ursache für die bessere Prognose trotz des heftigen Verlaufs ist noch unklar (Dennert et al., 2008).
- Subakute Myokarditis: Mäßige linksventrikuläre Dysfunktion, geringere histologische Infiltrate sowie unklarer Beginn der Symptomatik (Liebermann et al., 1993). Die Patienten entwickeln häufig eine DCM und chronisch persistierende Infektionen. Sie haben eine schlechtere Prognose als bei der fulminanten Verlaufsform (McCarthy et al., 2000).
- Chronische Myokarditis („ongoing myocarditis“): Andauernder Nachweis von Infiltraten und Zellschädigung mit unterschiedlicher Ausprägung der linksventrikulären Dysfunktion. Bei gleichzeitigem Virusnachweis wird diese Form auch als chronisch persistierende Myokarditis bezeichnet (Aretz et al., 1987; Esfandiarei und McManus, 2008; Lieberman et al., 1993).

### 1.2.4 Diagnoseverfahren und -kriterien

Die Diagnose einer Myokarditis ist aufgrund ihrer unspezifischen Symptome und verschiedener methodischer Schwierigkeiten nicht einfach zu stellen. Dabei muss zwischen den diagnostischen Möglichkeiten beim Lebenden oder Verstorbenen unterschieden werden: „Für den Kliniker gehört die Myokarditis-Diagnose zu den schwierigsten, für den Pathologen ist sie bei ausgeprägter Entzündung leicht, aber sie wird um so problematischer, je geringer die entzündlichen Infiltrate sind“ (Hort, 1999).

Liegt ein klinischer Verdachtsfall vor, sollte zur Einleitung einer effizienten Therapie und zur Verbesserung der jeweiligen Prognose die Diagnose mittels folgender Verfahren gesichert werden:

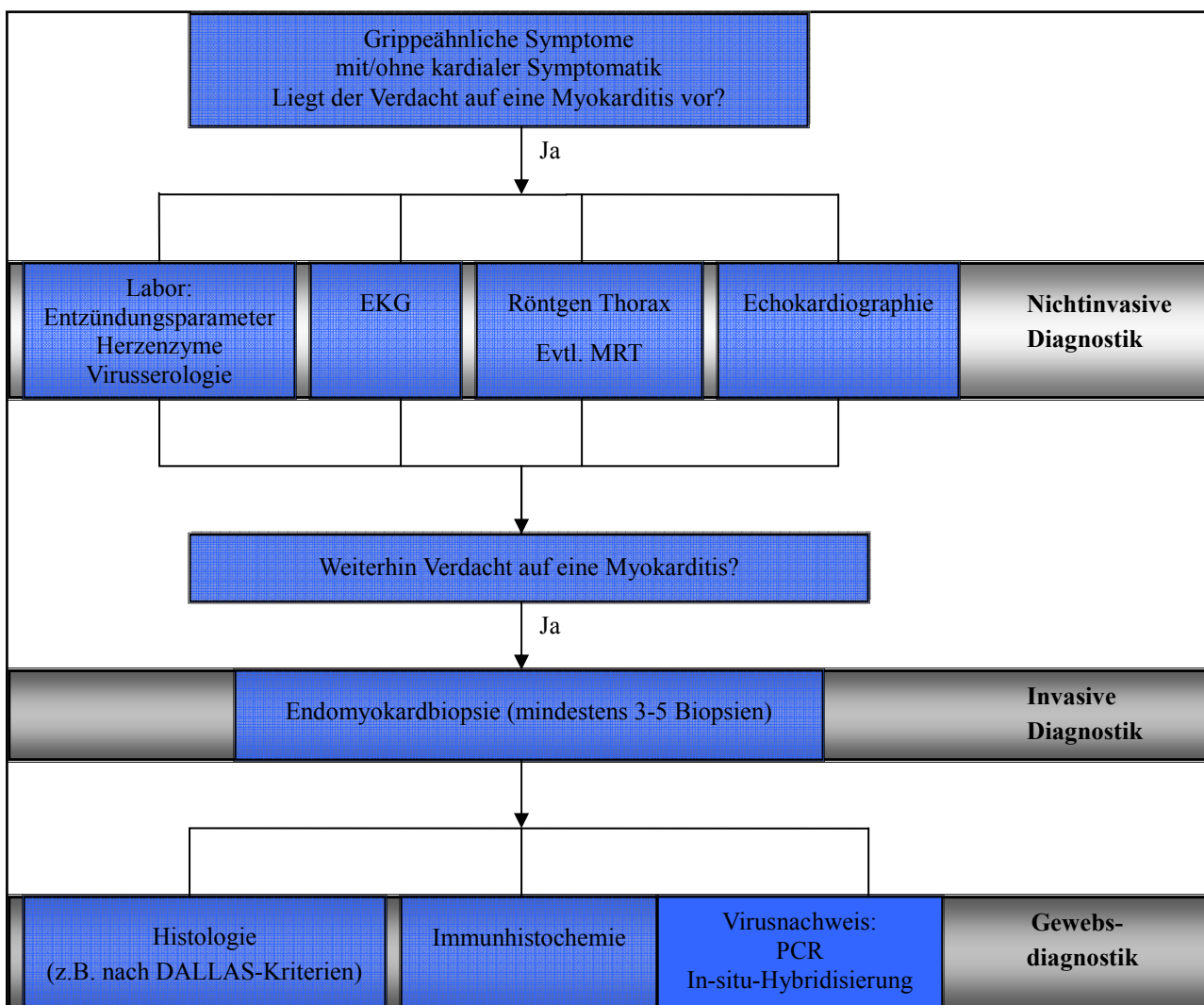


Abbildung 3: Ablaufschema Myokarditisiagnostik, modifiziert nach McManus et al. (2008)

1. Nichtinvasive Diagnostik: Im EKG zeigen sich bei einer akuten Myokarditis u.U. ventrikuläre oder supraventrikuläre Arrhythmien, ST-Strecken-Veränderungen, AV-Blockierungen, ein pathologisches „Q“ oder Extrasystolen. Im Labor können erhöhte Herzenzyme (Troponin I und T, LDH, CK-MB, BNP) bzw. erhöhte Infektparameter nachgewiesen werden. Pumpfunktions- bzw. Kinetikstörungen sind in der Farbdoppler-Echokardiographie nachweisbar und eine eventuelle Herzvergrößerung im Thorax-Röntgen. Bereits aufgetretene Myokardschäden können zusätzlich mittels kardialem MRT dargestellt und vor allem lokalisiert werden. Die nuklearmedizinische Untersuchung mittels kardialer Szintigraphie spielt heute nur noch eine untergeordnete Rolle und wird nicht mehr empfohlen (AWMF, 2009; Cooper, 2009; Dennert et al., 2008; Heusch et al., 1996; Klein et al., 2000; Kühl et al., 1997; Mahrholdt et al., 2004; Magnani und Dec, 2006; Pankuweit und Maisch, 2010; Strauer et al., 2001).
2. Invasive Diagnostik: Nachteil der nichtinvasiven Verfahren ist, dass eine Entzündungsreaktion im Myokard nicht nachgewiesen werden kann und eine weitere Differenzierung in Art und Ursache der Myokarditis somit nicht möglich ist. Daher ist heute, insbesondere in fulminanten und therapieresistenten Verläufen, die invasive Diagnostik mittels Endomyokardbiopsie (EMB) über Links- bzw. Rechtsherzkatheter der Goldstandard. Dabei ist es wichtig, ausreichend viele Biopsien an verschiedenen Stellen des Myokards zu gewinnen, damit fokale Infiltrate nicht übergangen werden, sog. „sampling error“. Heute gilt die Entnahme von mindestens 3-5, besser 8-10 Gewebeproben als Standard, dabei steigt die Sensitivität der Methode mit der Anzahl der entnommenen Biopsien (Aretz et al., 1987; Billingham, 1985; Cunningham et al., 2006; Chow et al., 1989; Hauck et al., 1989).
3. Gewebsdiagnostik: Anschließend werden heute die durch eine Endomyokardbiopsie gewonnenen Gewebeproben mit verschiedenen histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren untersucht. Dabei gibt es innerhalb der verschiedenen Verfahren jeweils bestimmte Kriterien bzw. Grenzwerte, die für das Vorliegen einer Myokarditis sprechen. Da die Ableitung der Myokarditisdiagnose aus Gewebeproben Grundlage der vorliegenden Arbeit ist, sollen diese myokarditisdefinierenden Kriterien hier dargestellt werden:
  - Konventionell-histologische Verfahren: Die für Endomyokardbiopsien geltenden DAL-LAS-Kriterien von 1987 (siehe Kapitel 1.2.1) sind auch heute noch aktuell; als alleiniges

Diagnoseverfahren allerdings umstritten. Die Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Präparate werden auf Anzeichen einer Myokarditis untersucht. Dabei gelten weniger als 5 Lymphozyten pro High-Power-Field im Myokard als normal (Aretz et al., 1987). Dieser Wert wurde durch eine Untersuchung von Foley und Edwards (1988) bestätigt, die an 100 gesunden Herzen die als normal geltende Anzahl an Leukozyten ausgezählt haben. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass in 95 % der Proben weniger als 5 Lymphozyten pro High-Power-Field gefunden wurden. Eine weitere Untersuchung von Edwards et al. kommt bereits 1982 zu dem Ergebnis, dass das Vorkommen von mehr als 5 Lymphozyten gemittelt über 20 HPF mit der Diagnose einer Myokarditis zu vereinbaren ist. Entscheidender Nachteil der konventionell-histologischen Verfahren ist, dass verschiedene Zellarten im HE-Schnitt leicht zu verwechseln sind, so dass zur Beurteilung eine hohe diagnostische Erfahrung notwendig ist (Aretz et al., 1987). Daher gibt es selbst zwischen Experten eine hohe Interpretationsvarianz, die sog. „Interobserver Variability“ (Shanes et al., 1987), so dass die ausgewiesene Inzidenz von Myokarditiden innerhalb eines Studienkollektivs enorm schwanken kann (siehe auch Kapitel 1.2.5).

- Immunhistochemische Verfahren: Aufgrund dessen werden heute zusätzlich immunhistochemische Verfahren angewandt, die es ermöglichen, Oberflächenantigene von Zellen spezifisch anzufärben, um damit eine schnelle und eindeutige Identifikation verschiedener Zellarten zu ermöglichen und die entzündliche Reaktion des Myokards nachzuweisen (Dennert et al., 2008; Dettmeyer, 2004; Dettmeyer et al., 2006b; Forcada et al., 1996; Klingel et al., 2004; Kühl et al., 1997; Magnani und Dec, 2006; Maisch et al., 2000; Pan-kuweit und Maisch, 2010; Strauer et al., 2001).

Für Erwachsene gilt heute nach der Definition der World Heart Federation, dass eine akute Myokarditis vorliegt bei  $\geq 14$  Leukozyten/mm<sup>2</sup>, „bestehend aus T-Lymphozyten (CD3) oder aktivierten T-Lymphozyten (zum Beispiel CD45-R0)“ (Maisch et al.; 2000).

- Molekularbiologie: Schließlich gehört heute der Nachweis bekannter kardiotoxischer Viren mittels PCR oder In-Situ-Hybridisierung zum Standard in der Myokarditisdiagnostik. Die bisherige Virusserologie wird dadurch ersetzt (Dettmeyer, 2004; Dennert et al., 2008; Klingel et al., 2004; Kühl et al., 1997; Maisch et al., 2000; Strauer et al., 2001).

Auch postmortal ist, insbesondere in Fällen eines plötzlichen Todes, die korrekte Diagnosestellung einer Myokarditis auch für Hinterbliebene von Bedeutung. Im Unterschied zum Vorgehen beim Lebenden stehen hier – statt der nichtinvasiven Verfahren und der Endomyokardbiopsie – vor allem die Berücksichtigung der individuellen Krankengeschichte sowie eine Obduktion zur Verfügung. Letztere dient auch zum Ausschluss von Differentialdiagnosen und Erhebung von pathologischen makroskopischen Befunden des Myokards. Danach schließt sich ebenfalls die Gewebsdiagnostik an, allerdings steht hier nun die gesamte Fläche des Myokards zur Verfügung.

Die genannten Grenzwerte in den konventionell-histologischen sowie den immunhistochemischen Verfahren werden auch auf autoptisch gewonnenes Myokard übertragen. Für Säuglinge werden allerdings deutlich höhere Zellzahlen pro High-Power-Field als normwertig toleriert:

- Nach der „State of the art conference on the stratification of SUDI“ werden für postmortal gewonnenes Myokard von Säuglingen „≤15 lymphocytes (10 HPF, using a 40 objective) in one section in the absence of myocyte necrosis“ (Rognum et al., 2003) als normal angesehen. Eine Angabe, wie diese Grenzwerte ermittelt wurden, findet sich allerdings nicht.
- Dettmeyer et al. (2004) bzw. Dettmeyer (2004) veröffentlichten ebenfalls nach Zellarten differenzierte Grenzwerte für eine Myokarditis an autoptisch gewonnenem Myokardgewebe bei Säuglingen. Diese wurden aus den Ergebnissen einer eigenen Untersuchung zum Nachweis von myokardialen Infiltrationen innerhalb eines SIDS-Kollektivs abgeleitet. Eine genaue Angabe, wie diese Grenzwerte statistisch begründet wurden, findet sich allerdings nicht, zumal kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Infiltration zwischen SIDS- und Kontroll-Kollektiv nachgewiesen wurde (Dettmeyer, 2004). Die folgende Tabelle zeigt das publizierte Grenzwertkonzept:

Myokarditis	Leukozyten (LCA)	>15/HPF*
Myokarditis	T-Lymphozyten (CD45-R0)	>10/HPF*
Myokarditisverdächtig	T-Lymphozyten (CD45-R0)	5–9/HPF*
Myokarditisverdächtig	Makrophagen (CD68)	>10/HPF*
*HPF=High-Power-Field, Wert als Durchschnitt von 20 HPF (400fache Vergrößerung)		

Tabelle 1: Myokarditisgrenzwerte (nach Dettmeyer et al., 2004 sowie Dettmeyer, 2004)



### 1.2.5 Myokarditis und Plötzlicher Kindstod

In den vergangenen Jahrzehnten wurde bereits in einigen Studien der Frage nachgegangen, ob eine Myokarditis im SIDS-Kollektiv als (Haupt-)Todesursache festgestellt werden kann. Die jeweiligen Untersuchungen unterscheiden sich jedoch stark hinsichtlich der angewandten Diagnose- und Auswertungsverfahren, Umfang des Studienkollektivs, Art und Umfang der Kontrollgruppe sowie wesentlich auch in ihren Ergebnissen. Überwiegend wurden dabei Myokarditis-Inzidenzen im SIDS-Kollektiv von 0 – 2 % ausgewiesen. Andere Untersuchungen weisen jedoch deutlich höhere Inzidenzen aus, teilweise bis zu 20 % (Dettmeyer et al., 1999, 2009; Dettmeyer, 2004; Rambaud et al., 1992; Rasten-Almquist et al., 2002; Shatz et al., 1997).

Einen Überblick über bisherige Studien und ihre Ergebnisse gibt die folgende Tabelle:

Studie	Studienkollektiv	Diagnoseverfahren*	Myokarditis-Fälle absolut	Myokarditis-Fälle in %
Beckwith (1973)	500 SIDS-Fälle	I	5	1 %
DeSa (1985)	3086 Autopsiefälle (0-14 Jahre)	I	17	0,55 %
Noren et al. (1976)	90 plötzliche Todesfälle < 16Jahre (davon 79 < 1 Jahr) 48 Kontrollfälle (0-16 Jahre)	I	15 ( 8 < 1 Jahr) 2 (beide > 1 Jahr)	16,67 % (10 % < 1Jahr) 4,2 %
Rambaud et al. (1992)	143 SIDS-Fälle	I	24	16,8 %
Shatz et al. (1997)	35 SIDS-Fälle 18 Kontrollfälle	I +Blutkultur	7 0	20 % 0 %
Dettmeyer et al. (1999)	20 SIDS-Fälle	I+II	4	20 %
Rasten-Almquist et al. (2002)	410 SIDS Fälle 27 Kontrollfälle (alle < 1 Jahr)	I (+evtl. II)	69 2	16,8 % 7,4 %
Dettmeyer et al. (2002)	60 SIDS-Fälle	I+II+III	4	6,7 %
Dettmeyer (2004)	63 SIDS-Fälle  11 Kontrollfälle	I+II+III	10 +9 Verdachtsfälle 0	15,87 % (+ 14,29 %) 0 %
Dettmeyer et al. (2006a)	70 SIDS-Fälle	I+III	2	2,9 %
Weber et al. (2008)	1516 Autopsiefälle (0-18 Jahre)	I+III	28 (15 < 1 Jahr)	1,8 % (1% < 1 Jahr)
Krous et al. (2009)	24 SIDS Fälle, 25 Erstickungsfälle, 3 Myokarditisfälle	II+III	0	0 %
Dettmeyer et al. (2009)	133 SIDS-Fälle  17 Kontrollfälle (o. Altersangabe)	I+II+III	15 +38 Verdachtsfälle 0	11,2 % 28,6 % 0 %

\*Diagnoseverfahren: I = konventionell-histologisch    II = Immunhistochemie    III = Virusnachweis

Tabelle 2: Studienübersicht: Myokarditis in Kindstodfällen bzw. im Kindesalter

In den frühen Studien (bis 1999) wurde die Diagnose einer Myokarditis ausschließlich histologisch gestellt, die Schwankungen der Inzidenzen können in dieser Zeit unter anderem auch mit der „Interobserver Variability“ erklärt werden (Shanes et al., 1987). Zudem wurde eine Myokarditis, insbesondere in der Zeit vor Festlegung der DALLAS-Kriterien, sehr unterschiedlich definiert, so dass die Ergebnisse nur schwer vergleichbar sind. So diagnostizierten Noren et al. (1977) eine Myokarditis dann, wenn mindestens ein Infiltrat mit „20 inflammatory cells with or without associated necrosis or fibrosis“ vorlag, während Shatz et al. (1997) eine Myokarditis feststellten, wenn „more than two large foci of inflammatory infiltration, along with muscle necrosis and oedema“ nachgewiesen wurden. Rasten-Almquist et al. (2002) hingegen genügte bereits der Nachweis von mindestens „15 inflammatory cells per high power field, associated with necrosis“ zur Diagnosestellung.

Durch die Entdeckung und Anwendung von spezifischen immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren konnte die Diagnosestellung einer Myokarditis weiterentwickelt, vereinfacht und präzisiert werden. Maßgeblich in der Erforschung der Myokarditis-Inzidenz im SIDS-Kollektiv sind dabei die Studien von Dettmeyer et al. (1999-2009). So zeigten sie erstmals, dass durch Anwendung immunhistochemischer Verfahren weitere Myokarditis-Fälle innerhalb eines SIDS-Kollektivs diagnostiziert werden konnten, die konventionell-histologisch als unauffällig gewertet worden waren (Dettmeyer et al., 1999). Durch das eigen konzipierte Grenzwertkonzept (siehe Kapitel 1.2.4) wurden damit bis zu 40 % eines SIDS-Kollektivs als Myokarditis bzw. als Myokarditis-verdächtig ausgewiesen (Dettmeyer et al., 2009, Dettmeyer 2004). Durch den Einsatz molekularbiologischer Verfahren zur myokardialen Detektion kardiotoxischer Viren wurde später je nach Suchspektrum in bis zu 43,5 % der SIDS-Fälle eine virale Infektion nachgewiesen ohne Erregernachweis im Kontroll-Kollektiv (Dettmeyer et al., 2004, 2006a, 2009).

Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch mit den Ergebnissen jüngerer Studien: So weisen Weber et al. (2008) ebenfalls unter Anwendung molekularbiologischer bzw. immunhistochemischer Verfahren nur eine sehr geringe Anzahl von Myokarditisfällen im Kindesalter auf, von 1516 Fällen ergab sich in nur 28 Fällen (1,8 %) der Nachweis einer Myokarditis. Auch Krous et al. (2009) kommen zu einem ähnlichen Ergebnis: Im Vergleich von 24 SIDS-Fällen mit 25 altersgleichen Erststickungs-Fällen sowie drei Fällen von gesicherter Myokarditis ergibt sich eine deutlich höhere Infiltration in der Myokarditisgruppe, die beiden anderen Gruppen unterscheiden

sich in den immunhistochemischen Ergebnissen nicht. Eine milde Infiltration wird dabei als normal angesehen. Auch Virusgenom konnte nicht nachgewiesen werden, so dass insgesamt in keinem SIDS-Fall eine Myokarditis festgestellt wurde. Die möglichen Ursachen dieser deutlichen Diskrepanz der Studienergebnisse sind nach Erhebung der eigenen Ergebnisse noch zu diskutieren (siehe Kapitel 5.6.2.1).

## **1.3 Apoptose**

### **1.3.1 Definition und Vorkommen**

Der Begriff Apoptose, von griechisch „apoptosis“, beschreibt in der Biologie den Prozess des „Abfallens“ von Blättern eines Baumes im Herbst. Erstmals 1972 übertrugen Kerr et al. diesen Begriff auf das von ihnen entdeckte Phänomen des programmierten Zelltods in menschlichen Zellen: „The term apoptosis is proposed for a hitherto little recognized mechanism of controlled cell deletion, which appears to play a complementary but opposite role to mitosis in the regulation of animal cell populations“ (Kerr et al., 1972).

Heute weiß man, dass Apoptose einen genetisch determinierten Zelluntergang darstellt, der auch als „programmierter Suizid“ einer Zelle bezeichnet wird. Dieser unterliegt einem aktiv energieverbrauchenden, sehr komplexen regulatorischen Prozess und findet physiologisch täglich im menschlichen Körper statt.

Apoptose ist ein essentieller Vorgang u.a. in der Embryogenese, der Hämatopoese, der Entwicklung des Immunsystems und in der Erhaltung der Gewebshomöostase (Cohen, 1993; Kerr et al., 1972). Daneben spielt der pathologische Ablauf der Apoptose eine wichtige Bedeutung in der Entstehung von Erkrankungen, vor allem bei Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und neurologisch-degenerativen Erkrankungen, aber auch im Verlauf von Erkrankungen wie z.B. nach einem Myokardinfarkt (Carson und Ribeiro, 1993; Eguchi, 2001; Gschwend, 1996; Kerr et al., 1972; Mattson, 2000; Saraste et al., 1997). Schließlich ist Apoptose auch ein wichtiger Mechanismus in der Elimination virusinfizierter Zellen (O'Brien, 1998).

### 1.3.2 Merkmale einer apoptotischen Zelle

Eine apoptotische Zelle weist bestimmte charakteristische, v.a. morphologische Merkmale auf, die im Kontrast mit einer nekrotischen Zelle stehen (siehe vor allem Kerr et al., 1972; aber auch Cohen, 1993; Gschwend, 1996; Pankuweit et al., 1999; Cruchten und Broeck, 2002). Dieser morphologisch sichtbare Prozess wird in der folgenden Abbildung nach seinem zeitlichen Ablauf anhand einer apoptotischen Zelle sowie einer nekrotischen Zelle im Vergleich dargestellt:

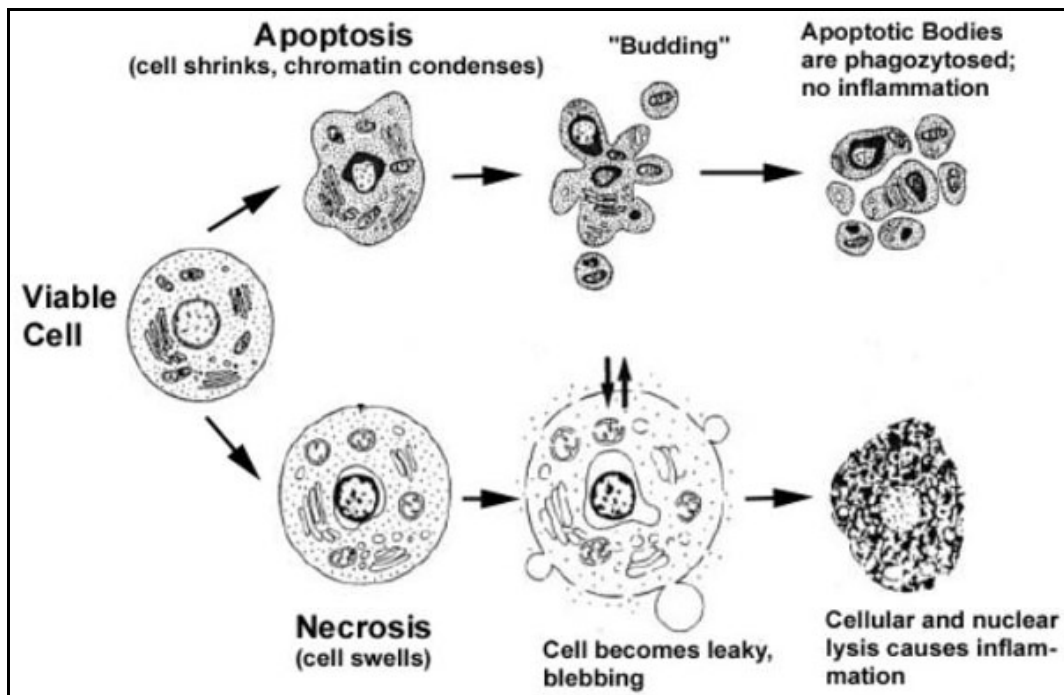


Abbildung 4: Ablauf von Apoptose und Nekrose (aus Gewies, 2003 nach Majno und Joris, 1995)

Dabei handelt es sich im Einzelnen um folgende typische Schritte einer apoptotischen Zelle:

- Kondensation des Chromatins und Schrumpfung des Zellkerns
- Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen in Fragmente aus je 180 Basenpaaren mit Freilegung von freien 3'OH-Gruppen (siehe Prinzip des TUNEL-Verfahrens, Kapitel 2.5.1)
- Schrumpfung des Zellvolumens mit Ausbildung von Membranausstülpungen („Budding“)
- Entstehung von membranumhüllten Apoptosekörperchen, sogenannten „apoptotic bodies“
- Phagozytose der apoptotischen Körperchen durch Nachbarzellen oder Makrophagen
- Kein Nachweis einer inflammatorischen Reaktion, keine Freisetzung des Zellinhaltes

### 1.3.3 Apoptose und Myokarditis

Myozyten galten lange Zeit als nicht regenerierbar. Beltrami et al. (2001) wiesen allerdings nach, dass Myozyten nach einem Infarkt sehr wohl mitotisch aktiv sind. Dennoch ist Zellregeneration im Sinne einer regelhaften Erneuerung der Zellpopulation im Myokard nicht physiologisch. Daher ist auch Apoptose im Gegensatz zu vielen anderen Geweben im gesunden Myokard nicht nachweisbar (Narula et al., 1996), sondern Ausdruck eines pathologischen Prozesses. In verschiedenen Studien konnten bereits bei Patienten mit Myokardinfarkt, aber auch bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie apoptotische Zellen in relativ geringem Anteil nachgewiesen werden (Alter et al., 2001; Narula et al., 1996; Olivetti et al., 1997; Pankuweit et al., 1999). Dabei wurde in den meisten Studien die TUNEL-Methode angewandt, die auch in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis apoptotischer Zellen angewandt wird (siehe Kapitel 2.5).

Da Apoptose auch ein wichtiger Mechanismus zur Elimination virusinfizierter Zellen ist, liegt es nahe zu vermuten, dass auch bei einer viralen Myokarditis apoptotische Zellen nachgewiesen werden können. In Fällen von aktiver und fataler Myokarditis bei Erwachsenen konnte in einigen Studien dieser signifikant erhöhte Nachweis von apoptotischen Zellen bereits erbracht werden (Abbate et al., 2009; Alter et al., 2001; Corradi et al., 2004; Kytö et al., 2004; Zorc-Pleskovic et al., 2006). In Tiermodellen korreliert dabei die Rate der apoptotischen Zellen mit der Höhe des Virustiters im Myokard (Saraste et al., 2003). Dabei liegen die apoptotischen Zellen vor allem in kleinen Gruppen bzw. Clustern vor (Narula et al., 1996; Zorc-Pleskovic et al., 2006).

Apoptose ist also bereits bekannt als ein „common mechanism of myocardial damage in severe acute human myocarditis“ (Kytö et al., 2004) und trägt nachweislich auch zur Entwicklung eines progressiven Herzversagens bzw. zur Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie bei (Narula et al., 1996; Saraste et al., 2003, Zorc-Pleskovic et al., 2006). Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich für die vorliegende Arbeit, dass, unter der Annahme einer viralen Myokarditis als Haupttodesursache in Fällen des Plötzlichen Kindstods, auch in dem vorliegenden SIDS-Kollektiv erhöhte Raten apoptotischer Zellen nachzuweisen sein müssten.

## 1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Wie ausführlich dargestellt, gibt es starke epidemiologische Hinweise darauf, dass eine infektiologische Ursache für den Plötzlichen Kindstod anzunehmen ist. Eine Myokarditis mit ihren vielen symptomatischen Facetten und ihrer vor allem viralen Ätiologie wäre als hypothetische Todesursache für dieses Phänomen denkbar. Daher ist die primäre Fragestellung der vorliegenden Arbeit:

- 1. Gibt es eine erhöhte zelluläre myokardiale Infiltration in Fällen des Plötzlichen Kindstods? Kann daraus auf das Vorliegen einer Myokarditis geschlossen werden, so dass eine Myokarditis als Haupttodesursache für dieses Phänomen anzunehmen ist?**

Dazu wurde mit verschiedenen konventionell-histologischen und immunhistochemischen Verfahren an einer repräsentativen Myokardfläche die durchschnittliche zelluläre myokardiale Infiltration in einem SIDS-Kollektiv und einem Kontroll-Kollektiv ermittelt. In der Literatur werden immunhistochemische Grenzwerte für das Vorliegen einer Myokarditis sowohl für Erwachsene als auch für Säuglinge definiert. Daher wird weiterhin untersucht:

- 2. Ist die Herleitung und Anwendung der bekannten Grenzwerte für eine Myokarditis im SIDS-Kollektiv überhaupt richtig und sinnvoll? Kann ab einer kritischen Anzahl von Entzündungszellen auf das Vorliegen einer letalen Myokarditis geschlossen werden?**

Außerdem soll in dieser Arbeit erstmals auch das Vorkommen myokardialer Apoptose in Fällen des Plötzlichen Kindstods mit der Frage untersucht werden:

- 3. Gibt es im SIDS-Kollektiv erhöhte Apoptoseraten als Hinweis, dass eine Myokarditis als wesentlicher, zum Tode führender Pathomechanismus anzunehmen ist?**

Schließlich sollen die in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden im Vergleich mit den gewählten Methoden bisheriger Studien kritisch diskutiert werden:

- 4. Sind die gewählten Methoden zur Diagnostik einer Myokarditis zielführend und sinnvoll? Was ist bei ihrer Interpretation zu beachten?**

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Das SIDS-Kollektiv**

Untersuchungsschwerpunkt der vorliegenden Dissertation ist das Myokardgewebe des SIDS-Kollektivs des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn. Berücksichtigt wurden 92 SIDS-Fälle der Jahre 1997-2009, die nach der Obduktion, der toxikologischen sowie histologischen Untersuchung im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn der Todesursache Plötzlicher Kindstod zugeordnet wurden.

Angelehnt an die San-Diego-Definition wurden dabei nur diejenigen Fälle als SIDS-Fälle definiert, bei denen die Verstorbenen jünger als ein Jahr waren. Eine Ausnahme bilden dennoch zwei Fälle, bei denen die Altersobergrenze von 365 Tagen lediglich um 2 bzw. 6 Tage überschritten wurde. Da im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn keine eigene Untersuchung des Sterbeortes durch die Rechtsmediziner in Fällen des Plötzlichen Kindstod erfolgte, erfüllt das vorliegende SIDS-Kollektiv in 75 von 92 Fällen die Kriterien der Gruppe IB nach der San-Diego-Definition. Von den restlichen 17 Fällen sind 14 Fälle lediglich altersbedingt der Kategorie II zuzuordnen sowie 3 Fälle aufgrund ähnlicher Todesfälle in der nahen Verwandtschaft (siehe Kapitel 1.1.1).

Die folgende Tabelle zeigt das SIDS-Kollektiv, wobei die Daten durch Analyse der Obduktionsprotokolle gewonnen wurden. Es werden insbesondere die in der Literatur immer wieder im Zusammenhang mit dem Phänomen Plötzlicher Kindstod untersuchten Merkmale Geschlecht, Herkunft, Alter zum Todeszeitpunkt, Todesmonat, Lage im Bett sowie Besonderheiten in der Vorgeschichte dargestellt. Die Besonderheiten in der Vorgeschichte enthalten vor allem solche Merkmale, die in der Literatur mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Plötzlichen Kindstod assoziiert sind (siehe Kapitel 1.1.2), wie z.B. Frühgeburtlichkeit, Infekte, SIDS in der Familie, Rauchen bzw. Drogenabusus der Mutter, aber auch andere Merkmale:

Nr.	G	Herkunft	Todesalter (Tage)	Todes- monat	Lage	Besonderheiten in der Vorgeschichte
1	w	deutsch	221	Feb	Rücken	-
2	m	deutsch	82	Feb	Bauch	Erkältung
3	m	deutsch	125	Nov	Bauch	-
4	m	deutsch	233	Dez	Bauch	Erkältung
5	m	deutsch	216	Jan	Bauch	Erbrechen
6	m	deutsch	275	Jan	Bauch	Erkältung
7	m	syrisch	226	Mrz	Bauch	Erkältung
8	m	deutsch	209	Apr	-	Frühgeburt
9	w	deutsch	140	Mai	Bauch	Erkältung
10	m	deutsch	100	Jun	-	-
11	m	deutsch	272	Sep	Seite r.	Erkältung, Asthma
12	m	deutsch	177	Okt	Bauch	-
13	w	deutsch	58	Feb	Bauch	Mundsoor
14	w	deutsch	146	Mrz	Rücken	Magendarminfekt, Impfung
15	w	türkisch	30	Mrz	Rücken	-
16	w	deutsch	43	Jun	Bauch	Erkältung
17	m	deutsch	221	Jul	Rücken	-
18	m	deutsch	211	Aug	Bauch	-
19	m	deutsch	36	Okt	Bauch	Erkältung, Frühgeburt
20	w	deutsch	142	Feb	Bauch	Erkältung, Impfung
21	m	deutsch	67	Feb	-	Mutter: ehem. Drogenabusus
22	w	deutsch	125	Feb	-	Erkältung, Mutter: Heroinabusus
23	m	deutsch	325	Mrz	-	Erkältung
24	m	deutsch	91	Apr	Bauch	Erkältung, Impfung
25	w	deutsch	305	Nov	-	Mutter: Raucherin
26	m	albanisch	131	Nov	Bauch	Erkältung
27	m	türkisch	371	Jan	-	Erkältung
28	m	deutsch	292	Jan	Bauch	Erkältung
29	m	deutsch	162	Mai	Bauch	Frühgeburt, Zwilling, Mutter: Depression
30	w	deutsch	68	Jul	-	Candidainfektion, Impfung
31	w	deutsch	77	Jul	Bauch	Cousine an SIDS verstorben, Impfung
32	m	deutsch-togo	43	Sep	Bauch	Frühgeburt
33	m	deutsch	58	Nov	-	Fieber
34	m	deutsch	250	Dez	Bauch	Erkältung, Vitium
35	m	deutsch	80	Dez	Bauch	Erkältung
36	m	deutsch	112	Dez	Rücken	Fistel-OP am Hinterkopf vor 4 Wo.
37	m	deutsch	203	Feb	-	Obere Plexuslähmung



Nr.	G	Herkunft	Todesalter (Tage)	Todesmonat	Lage	Besonderheiten in der Vorgeschichte
38	w	deutsch	52	Apr	-	Mutter: Raucherin
39	m	deutsch	42	Apr	-	Bekanntes Herzgeräusch
40	m	deutsch	76	Mai	Bauch	Erkältung, Erbrechen, Mutter: Raucherin
41	w	deutsch	7	Mai	Seite	Mutter: ehem. Heroinabusus
42	w	persisch/dt.	181	Jun	Rücken	Mutter: BTM-Abusus, Raucherin
43	w	deutsch	138	Jul	-	Erkältung
44	w	asiatisch	63	Aug	Bauch	Trinkschwäche, Dyspnoe
45	m	deutsch	43	Sep	-	-
46	m	deutsch	82	Sep	Bauch	Frühgeburt, Reflux, Eltern: Raucher
47	w	deutsch	60	Nov	Seite	Erkältung
48	m	deutsch	79	Dez	-	Atemstillstand vor 4 Wochen, Septumdefekt
49	w	deutsch	177	Apr	Bauch	-
50	m	deutsch	108	Jun	-	Gedeihstörung
51	m	deutsch	93	Jun	-	-
52	m	deutsch	53	Jun	Seite r.	Herzgeräusch
53	m	deutsch	244	Okt	Rücken	Fieber
54	m	türkisch	156	Okt	Rücken	Bronchitis
55	w	deutsch	78	Nov	Bauch	-
56	w	deutsch	69	Nov	Bauch	-
57	m	deutsch	154	Dez	Bauch	Frühgeburt, Impfung, Eltern: Raucher
58	m	deutsch	341	Jan	Rücken	Frühgeburt, Amnioninfektionssyndrom
59	w	deutsch	41	Jan	-	Erkältung
60	w	deutsch	69	Mrz	Bauch	Mutter: Raucherin; Geschwister: erkältet
61	w	türkisch	59	Apr	-	Erkältung, Impfung
62	m	deutsch	123	Apr	Bauch	Impfung
63	w	deutsch	55	Sep	-	Geschwisterkind an Herzfehler verstorben
64	m	deutsch	116	Okt	-	Cousine an SIDS verstorben, Impfung
65	m	türkisch	26	Dez	-	-
66	m	deutsch	56	Jan	Bauch	Erkältung
67	w	deutsch	367	Feb	Bauch	-
68	w	deutsch	39	Mrz	-	-
69	w	deutsch	226	Jun	Bauch	-
70	m	türkisch	64	Aug	Bauch	Frühgeburt, Erkältung, Mutter: Opiatabusus
71	m	deutsch	258	Okt	Rücken	-
72	m	deutsch	127	Jan	-	Erkältung, Frühgeburt
73	m	deutsch	95	Feb	-	Frühgeburt, Dystrophie
74	m	deutsch	202	Mrz	-	-

Nr.	G	Herkunft	Todesalter (Tage)	Todesmonat	Lage	Besonderheiten in der Vorgeschichte
75	m	deutsch	111	Aug	Bauch	-
76	m	deutsch	13	Sep	-	-
77	m	deutsch	287	Okt	Seite li.	-
78	w	deutsch	16	Feb	-	Erkältung
79	w	deutsch	105	Mai	Rücken	-
80	m	deutsch	32	Okt	Bauch	Erkältung
81	m	deutsch	255	Okt	Bauch	Schlafzeiten bis zu 15 Std. am Stück
82	m	türkisch	156	Mrz	Bauch	Impfung
83	m	deutsch	41	Jun	Bauch	Raucherwohnung, Schimmel, Frühgeburt
84	m	deutsch	56	Jul	-	-
85	w	deutsch	28	Okt	Rücken	1 SIDS-Fall in Familie
86	m	deutsch	78	Okt	Bauch	Zyanoseanfall, Mutter: ehem. Drogenabusus
87	w	deutsch	54	Dez	Bauch	-
88	w	türkisch	323	Dez	Seite	-
89	m	russisch	114	Apr	Bauch	Erkältung
90	m	deutsch	24	Okt	Rücken	-
91	m	deutsch	14	Dez	Seite li.	Raucherwohnung, Zangengeburt
92	m	deutsch	92	Dez	Bauch	Erkältung, Impfung am Vortag

Tabelle 3: Merkmale des Kindstodkollektivs der vorliegenden Arbeit

## 2.2 Das Kontroll-Kollektiv

Zum Vergleich wurde ein Kontroll-Kollektiv des gleichen Studienzeitraumes untersucht. Dieses besteht aus 15 altersgleichen Todesfällen unterschiedlicher Todesursache. Auch hier wurde aus Gründen der glücklicherweise nur geringen Anzahl von Todesfällen in diesem Lebensalter ein Fall berücksichtigt, der die Altersgrenze von 365 Tagen um 26 Tagen überschreitet.

In der folgenden Tabelle werden die mit dem SIDS-Kollektiv vergleichbaren Merkmale Geschlecht, Herkunft, Alter zum Todeszeitpunkt, Todesmonat sowie als Abgrenzungsmerkmal die Todesursache dargestellt. Als Todesursache finden sich in diesem Alterskollektiv vor allem nicht natürliche Todesursachen. Insbesondere der Hirntod nach Gewalteinwirkung ist mit insgesamt vier Fällen Haupttodesursache. Weiterhin finden sich Fälle von Ertrinken, Erhängen sowie

Rauchgas- und Medikamentenintoxikation. In drei Fällen lagen Infektionen als Todesursache vor (Fall Nr. 3, Nr. 4 und Nr. 10).

Nr.	G	Herkunft	Todesalter (Tage)	Todesmonat	Todesursache
1	w	deutsch	347	Dez	Hirnblutung nach Gewalteinwirkung
2	m	deutsch	267	Mai	Hirnblutung nach Sturz
3	w	deutsch	294	Jun	Meningitis
4	w	ecuadorianisch	64	Okt	Sepsis
5	m	deutsch	158	Jun	Hirntod nach Bolusgeschehen
6	w	deutsch	271	Jul	Rauchgasintoxikation
7	m	deutsch	294	Feb	Rauchgasintoxikation
8	w	deutsch	181	Mrz	Hirntod
9	w	deutsch	195	Sep	Medikamentenintoxikation
10	w	russisch	230	Jul	Sepsis
11	w	deutsch	391	Dez	Ertrinken
12	m	deutsch	342	Jan	atypisches Erhängen
13	m	deutsch	50	Mrz	Hirnblutung nach Gewalteinwirkung
14	w	italienisch	66	Jun	Hirntod nach Gewalteinwirkung
15	m	deutsch	255	Mrz	Strangulation

Tabelle 4: Merkmale des Kontroll-Kollektivs der vorliegenden Arbeit

### 2.3 Entnahme des Myokardgewebes: Probeentnahmestellen & Asservierung

In den 92 Fällen des SIDS-Kollektivs und 15 Fällen des Kontroll-Kollektivs wurde in der Obduktion an standardisierten Stellen Myokardgewebe entnommen, um eine repräsentative Beurteilung des Myokards zu ermöglichen. Insgesamt sind folgende acht Probeentnahmestellen (PES) als Standard im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn definiert, wie bereits in früheren Publikationen des Instituts zu diesem Thema gezeigt wurde (Dettmeyer et al., 1999, 2009; Dettmeyer 2004; Madea, 2009).

A	Herzkammerwand rechts, basisnah	E	Vorderwand linke Herzkammer, basisnah
B	Herzkammerwand rechts, spitzennah	F	Vorderwand linke Herzkammer, spitzennah
C	Septum interventrikulare, basisnah	G	Hinterwand linke Herzkammer, basisnah
D	Septum interventrikulare, spitzennah	H	Hinterwand linke Herzkammer, spitzennah

Tabelle 5: Myokardiale Probeentnahmestellen während der Obduktion

Das Myokardgewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme, getrennt für jede der acht Probeentnahmestellen A-H, in neutralem phosphat-gepuffertem Formaldehyd fixiert, entwässert und anschließend in Kapseln – wie unten abgebildet – in Paraffin eingebettet. Dabei haben die Kapseln eine Fläche von 3,3 cm x 2,7 cm. Die entnommenen Myokardproben sind unterschiedlich groß, im Durchschnitt haben sie eine Fläche von etwa 1 x 1cm bzw. 100 mm<sup>2</sup>.

Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch für den SIDS-Fall Nr. 90 aus dem Jahr 2009 das gesamte entnommene Myokardgewebe, geordnet nach den Probeentnahmestellen A-H zur Verdeutlichung der Größenverhältnisse bzw. Fläche des untersuchten Gewebes:

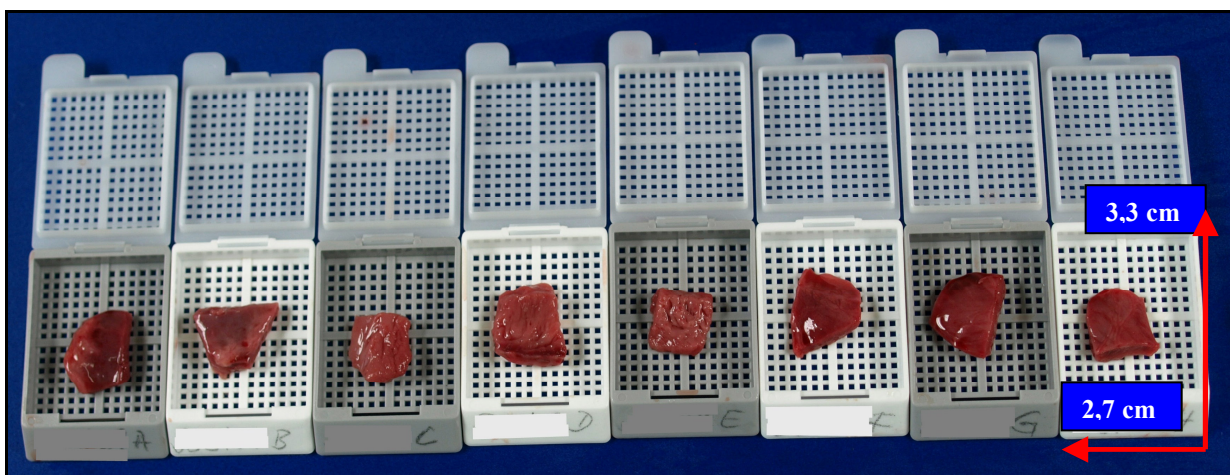


Abbildung 5: Entnommenes Gewebe pro Fall, Probeentnahmestellen A-H, Fall Nr. 90

## 2.4 Konventionelle und immunhistochemische Färbemethoden

Die gewonnenen Myokardproben wurden im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn im Anschluss an die Obduktion routinemäßig durch das histologische Labor des Instituts mit den unten aufgeführten konventionellen und immunhistochemischen Methoden gefärbt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde größtenteils auf das bereits gefärbte, vorhandene Material zurückgegriffen. In den Fällen, in denen die Originalfärbungen nicht mehr ausreichend beurteilbar waren, wurden aus dem noch asservierten Myokardgewebe Nachfärbungen durch das histologische Labor angefertigt.

Folgende Färbemethoden wurden angewandt:

- **Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE):** Routineverfahren zur Übersicht. Saure Elemente werden durch das Hämatoxylin blau gefärbt (u.a. Zellkerne), basische Elemente durch das Eosin rot bzw. rosa (u.a. Zytoplasma).
- **LCA (Leucocyte Common Antigen = CD45 Antigen):** Das CD45 Antigen ist ein membranständiges Glycoprotein, das außer von Erythrozyten und Proerythroblasten von nahezu allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, einschließlich T-Lymphozyten und Makrophagen (Scheid und Triglia, 1979). Antikörper: Anti-Human CD45, Abcam, monoklonal, Klon MEM-28.
- **CD68 (Makrophagen):** Das Glycoprotein CD68 wird von Makrophagen und Monozyten auf der Zelloberfläche exprimiert (Micklem et al., 1989). Antikörper: Anti-Human CD68, Dako, monoklonal, PG-M1.
- **CD45-R0 (T-Lymphozyten):** Diese Isoform von CD45 Antigen ist ein spezifisches Oberflächenantigen von T-Lymphozyten (Smith et al., 1986). Antikörper: Anti-Human CD45-R0, Dako, monoklonal, Klon UCHL1.

Auf eine weitergehende detaillierte Beschreibung der einzelnen Färbemethoden wird wegen der weiten Verbreitung verzichtet.

In der HE-Färbung lagen in allen 92 SIDS-Fällen und in allen 15 Kontroll-Fällen jeweils sämtliche 8 Probeentnahmestellen zur Begutachtung vollständig vor. Auch in den immunhistochemischen Verfahren ist eine ausreichend repräsentative Aussage über die zelluläre Infiltration des gesamten Myokards möglich, da durch ergänzende Nachfärbungen aus asserviertem Material ein Minimum von vier der insgesamt acht Probeentnahmestellen pro Fall vorlag.

## **2.5 Die TUNEL-Methode**

### **2.5.1 Prinzip**

Mit der TUNEL-Methode – terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling – können apoptotische Zellen auch im Frühstadium des programmierten Zelltodes nachgewiesen werden.

Das Prinzip der TUNEL-Methode beruht darauf, dass im Rahmen der Apoptose in der betroffenen Zelle die DNA durch Endonukleasen spezifisch fragmentiert wird, so dass freie 3'-OH-Enden entstehen. An diese kann mit Hilfe des Enzyms Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) die Addition von Nucleotidtriphosphaten (dUTP) katalysiert werden. Dieses Polymer wiederum kann lichtmikroskopisch durch Markierung mit Farbstoffen sichtbar gemacht werden. Eine ausführliche Darstellung zeigen die Erstbeschreiber dieser Methode (Gavrieli et al., 1992).

### **2.5.2 Durchführung und Färbeprotokoll**

Die TUNEL-Methode an nichtvitalen Kardiomyozyten wird im Folgenden ausführlich dargestellt, da sie bislang nicht zu den Standardmethoden im Nachweis einer Myokarditis gehört und im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig an nichtvitalen Myokardgewebe in Fällen des plötzlichen Kindstods angewandt wurde. Zentrale Fragestellung war, ob im Kindstodkollektiv vermehrt apoptotische Myozyten nachgewiesen werden können.

Zur Durchführung der TUNEL-Methode wurden von sämtlichen Fällen des SIDS-Kollektivs und des Kontroll-Kollektivs aus allen noch vorhandenen in Paraffin eingebetteten Myokardblöcken am Mikrotom neue Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und für mindestens 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Insgesamt lag noch Myokard von 88 der 92 SIDS-Fälle vor. Diese zugeschnittenen Myokardproben wurden danach eigenständig mit dem „CardioTACS In Situ Apoptosis Detection Kit“ der Fa. Trevigen/R&D Systems, Cat.#TA5353 unter Verwendung des nachfolgenden Protokolls gefärbt.

Angewandtes Färbeprotokoll der TUNEL-Methode:

1. Entparaffinieren in Xylol, 25 min.
2. Rehydrieren in Ethanol in absteigender Alkoholreihe: → 2 x 100 %igem, 2 x 96 %igem, 2 x 70%igem und 50 %igem Ethanol, jeweils 2 min.
3. Waschen in Aqua dest. DNase-free, 2 x 2 min.
4. Waschen in PBS-Puffer (100 ml 10X PBS auf 900 ml Aqua dest. DNase-free), 10 min.
5. Permeabilisieren mit 50 µl Proteinase K Working Solution pro Slide (1 µl Proteinase K auf 50 µl Aqua dest. DNase-free) bei Raumtemperatur, 30 min.
6. Waschen in Aqua dest. DNase-free, 2 x 2 min.
7. Herstellung der Positivkontrolle: 1 Slide mit 50 µl TACS-Nuclease Mix (1 µl TACS-Nuclease mit 50 µl TACS-Nuclease-Buffer) inkubieren bei 37°C, 15 min.
8. Waschen der Positivkontrolle in Aqua dest. DNase-free, 2 x 2 min.
9. Block der endogenen Peroxidase mit 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 45 ml Methylalkohol, 5 min.
10. Waschen in Aqua dest. DNase-free, 1 x 1 min.
11. Spülen in 50 ml Labeling Buffer (5 ml 10X TdT Labeling Buffer auf 45 ml Aqua dest. DNase-free), 5 min.
12. Enzym-Reaktion: 50 µl Labeling-Reaction Mix pro Slide (1 µl TdT dNTP Mix, 1 µl 50X Mn<sup>2+</sup>, 1 µl TdT Enzym, 50 µl Labeling Buffer), Inkubation bei 37°C, 60 min.
13. Stopp der Reaktion in TdT Stop Buffer (5 ml 10X Stopp Buffer auf 45 ml Aqua dest. DNase-free), 5 min.
14. Waschen in PBS-Puffer, 2 x 5 min.
15. Färbung mit Streptavidin-HRP-Working Solution 50 µl pro Slide (1µl Streptavidin-HRP auf 800 µl Blue Streptavidin-HRP Diluent), 10 min.
16. Waschen in PBS-Puffer, 2 x 5 min.
17. Färben mit TACS Blue Label, 50 µl pro Slide, 2 min.
18. Waschen in Aqua dest., 2 x 5 min.
19. Färben mit Kernechtrot, 2-3 min.
20. Waschen in Aqua dest., 2 min.
21. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe (siehe Punkt 2), jeweils 2 min.
22. Klären in Xylol, 2 x 5 min.
23. Eindecken mit Corbit-Balsam

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der verwendeten Enzyme wurden einerseits die tiefgekühlten Enzyme erst während der Färbung kurz vor der jeweiligen Verwendung aufgetaut (Protokollschritt Nr. 5, Nr. 7, Nr. 12), um die Enzymlösungen herzustellen, andererseits wurde bei jeder Färbung eine Positivkontrolle durchgeführt, um falsch negative Ergebnisse durch Enzymdefekte auszuschließen. Im seltenen Fall einer negativen Positivkontrolle wurde die Färbung wiederholt, unter Annahme eines Enzymdefektes oder Färbefehlers. Außerdem wurde in jedem Durchlauf eine Negativkontrolle mitgeführt.

Zusätzlich wurde bis zum Abschluss der enzymatischen Reaktionen (Protokollschritt Nr. 13) ausschließlich Aqua dest. DNase-free verwendet, um eine artifizielle Spaltung der Kardiomyozyten-DNA im Färbelauf und folglich die Produktion von falsch positiven Ergebnissen zu vermeiden.

Anschließend wurden die Färbungen innerhalb der nächsten 24-72 Stunden lichtmikroskopisch auf apoptotische Zellen untersucht, um ein zeitabhängiges Verblassen der Färbung und damit die Erhebung von falsch negativen Ergebnissen zu verhindern.



### 3. Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der gefärbten Myokardproben wurde mit einem Olympus BX40 Lichtmikroskop durchgeführt. Die Bildaufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit einer weiteren Doktorandin des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn mit einer Olympus DP 10 Mikroskop-Digitalkamera angefertigt und anschließend mit PhotoScape 3.5 bearbeitet. Von jedem Fall wurden Übersichtsaufnahmen in 100facher und Detailaufnahmen in 400facher Vergrößerung angefertigt, in ausgewählten Fällen auch in 200facher bzw. 1000facher Vergrößerung.

#### 3.1 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE)

Die HE-gefärbten Schnitte wurden entsprechend der DALLAS-Kriterien auf Myozytolyse, Nekrosen, lymphomonozytäre Infiltrate und Ödeme untersucht. Dabei wurde jeweils das gesamte Präparat in 100facher und 400facher Vergrößerung mikroskopisch durchgesehen, um keine Entzündungs-Foci zu übersehen. Das folgende Bild zeigt einen Myokarditis-Fall im SIDS-Kollektiv (Fall Nr. 4) mit allen histologischen Anforderungen einer Myokarditis: Neben wenigen intakten Kardiomyozyten finden sich massive lymphozytäre Infiltrate, Myozytolysen und Nekrosen:

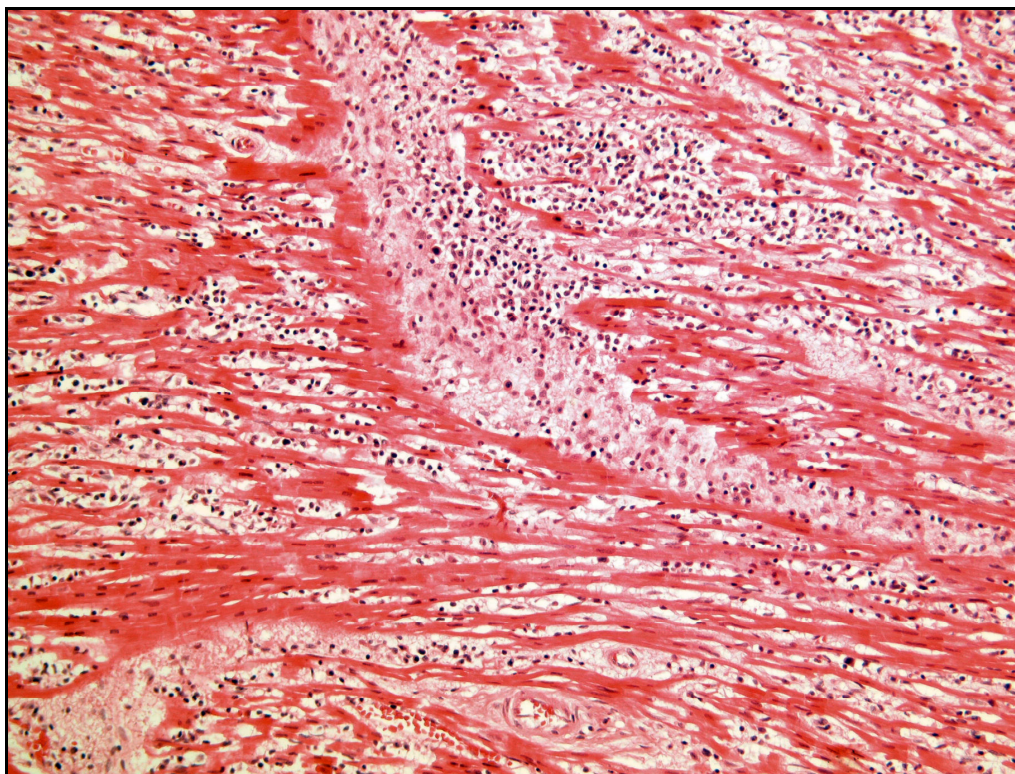


Abbildung 6: HE x 200, Fall Nr. 4, Myokarditis mit Nekrosen, lymphozytären Infiltraten und Ödemen im Bereich der Hinterwand linke Herzkammer, basisnah (G)

## **3.2 Auswertung der Immunhistochemie und der TUNEL-Methode**

### **3.2.1 Zählmethode in Quadratmillimeter**

#### **3.2.1.1 Motivation**

In der konventionell-histologischen Diagnostik erfolgt die Begutachtung und die Auszählung des Myokardgewebes typischerweise in High-Power-Fields. Ein High-Power-Field ist definiert als der in 400facher Vergrößerung mikroskopisch sichtbare Präparatanteil. Auch in den bisherigen Studien zur Myokarditis in Fällen des Plötzlichen Kindstods wurde die quantitative Auswertung stets in High-Power-Fields durchgeführt (siehe Kapitel 1.2.5). Auch die publizierten Grenzwerte für Erwachsenen- und Säuglingsmyokard (siehe Kapitel 1.2.4) beziehen sich meist auf diese mikroskopische Größe.

Nachteile dieser Auszählung sind allerdings, dass der sichtbare Präparatanteil vom benutzten Mikroskop bzw. dessen Sehfeldzahl abhängig ist und die Ergebnisse verschiedener Studien somit nicht exakt miteinander verglichen werden können. Außerdem wird nur ein sehr kleiner Präparatanteil ausgewertet, eine Übersicht über das gesamte Präparat wird bei der strikt zufälligen Auswahl der High-Power-Fields nicht erreicht.

Heute ist es daher zunehmend üblich, Zellzahlen pro mm<sup>2</sup> Gewebe anzugeben. Dies zeigt sich unter anderem in der Definition der World Heart Federation (WHF), die eine akute Myokarditis eines Erwachsenen ab einer Infiltration von  $\geq 14$  Leukozyten/mm<sup>2</sup> definiert. (Maisch et al., 2000).

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen (LCA, CD68, CD45-R0) als auch der TUNEL-Methode nicht High-Power-Fields, sondern einzelne Quadratmillimeter ausgezählt.

### 3.2.1.2 Durchführung der Auszählung

Zur Auszählung der Immunhistochemie und des TUNEL-Verfahrens wurde ein speziell angefertigtes Raster vor das Okular gelegt, dessen Fläche exakt  $1 \text{ mm}^2$  entspricht. Zur einfacheren Auszählung ist der Quadratmillimeter noch unterteilt in die Quadrate A-C. Dabei musste die Auswertung aufgrund der mikroskopischen Abbildungsfläche zwingend in 100facher Vergrößerung erfolgen. Das folgende Bild zeigt den Blick durch das Mikroskop ohne aufliegendes Präparat:

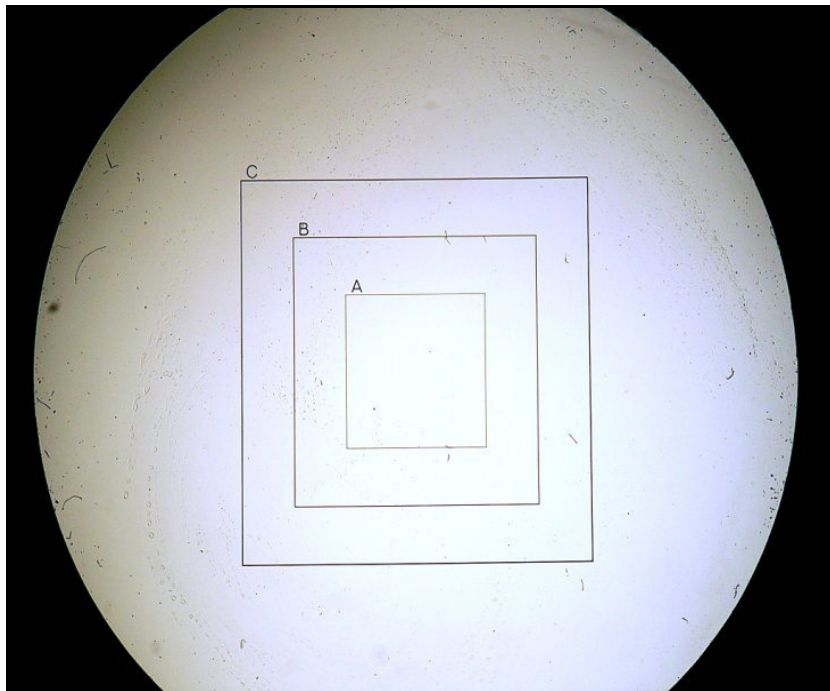


Abbildung 7: Blick durch das Mikroskop. Die Rasterfläche (aufgeteilt in die Quadrate A bis C) entspricht exakt  $1 \text{ mm}^2$ .

Die jeweilig spezifisch angefärbten Zellen wurden in jeder Probeentnahmestelle (A-H) an 10 zufällig ausgewählten Stellen mäanderförmig quantitativ ausgezählt. Dies entspricht  $10 \text{ mm}^2$  ausgezähltem Myokardgewebe pro Probeentnahmestelle. Insgesamt konnte so je nach Vollständigkeit der Probeentnahmestellen (A-H) zwischen 40 und  $80 \text{ mm}^2$  Myokardgewebe pro Fall und pro Färbung untersucht werden. Zusätzlich wurden die TUNEL-Präparate im Anschluss an die zufällige Auswahl und Auszählung noch einmal komplett mikroskopiert, um eine typische Anordnung apoptotischer Zellen in fokalen Clustern nicht zu übersehen.

### 3.2.1.3 Statistische Auswertung der Zählergebnisse

Die Auswertung und graphische Darstellung der mathematisch-statistischen Ergebnisse erfolgte mit GrapPad Prism5.

Zur Berechnung der durchschnittlichen Infiltration pro Fall wurde für jede Färbung aus den zehn ausgezählten Quadratmillimetern pro Probeentnahmestelle zunächst die durchschnittliche Infiltration für diese als Mittelwert gebildet. Daraus wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse aller (maximal acht) Probeentnahmestellen eines Falles die durchschnittliche Infiltration pro Fall berechnet, mathematisch repräsentiert durch den Mittelwert pro Fall. Schließlich bilden in den Kollektiven die einzelnen Mittelwerte pro Fall dann die Grundlage für die Berechnung des Kollektiv-Gesamtmittelwertes für die jeweilige immunhistochemische Färbung (siehe Kapitel 4.3.1).

Die statistische Signifikanzprüfung der Zählergebnisse in beiden Kollektiven wurde auf Basis der Mittelwerte pro Fall durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.5 und 4.4.7). Dazu wurde ein nicht-parametrischer Test für zwei unabhängige Stichproben nach Mann-Whitney-Wilcoxon durchgeführt. Die errechnete zweiseitige asymptotische Signifikanz wird dargestellt als p-Wert. Das Signifikanzniveau wird auf 5 % festgelegt ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2.1.4 Berechnung eines Umrechnungsfaktors

Die Ergebnisse dieser Zählmethode in Quadratmillimetern werden in der vorliegenden Arbeit zum einen mit bisherigen Studienergebnissen sowie mit einer zeitgleichen, noch nicht publizierten Dissertation im Institut der Rechtsmedizin Bonn von Oswald (2013) ausführlich verglichen (siehe Kapitel 5.6.2.1). Dazu war es notwendig, die Fläche eines High-Power-Fields für das verwendete Mikroskop Olympus BX 40 (Sehfeldzahl 22mm) zu berechnen, um einen Umrechnungsfaktor zwischen den Maßeinheiten High-Power-Field und Quadratmillimeter zu ermitteln.

Die Anleitung zur Berechnung erfolgte in Rücksprache mit der Firma Olympus (Email von Herrn Behrendt, 26.08.2009). Mit Hilfe der Formel zur Berechnung der Kreisfläche wurde die Abbildungsfläche in 400facher Vergrößerung berechnet. Dabei entspricht die Sehfeldzahl eines Mikroskops dem Durchmesser eines Kreises in 10facher Vergrößerung:

- Kreisformel: Fläche (A) =  $\pi \times d^2/4$
- Sehfeldzahl = Durchmesser (d) des Kreises bei 1er Objektiv (10er Vergrößerung)  
= 22 mm
- Durchmesser (d) für 10 er Objektiv (100fache Vergrößerung): 2,2 mm
- Durchmesser (d) für 40 er Objektiv (400fache Vergrößerung): 0,55 mm
- Fläche (400fache Vergrößerung)  $A = \pi \times (0,55 \text{ mm})^2/4 = 0,2376 \text{ mm}^2$

Folglich müssen, um 1 mm<sup>2</sup> Gewebe in der 100fachen Vergrößerung auszuzählen, insgesamt 4,21 High-Power-Fields mit je einer Fläche von 0,2375 mm<sup>2</sup> in der 400fachen Vergrößerung ausgezählt werden. Künftig wird daher zum Studienvergleich der **Umrechnungsfaktor 4,21** angewendet. Dieser ist allerdings abhängig von der Sehfeldzahl des verwendeten Mikroskops.

Da wichtige Vergleichsstudien, insbesondere die Untersuchungen von Dettmeyer et al. (1999), Dettmeyer (2004) sowie die laufende Dissertation von Oswald (2013), im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn an einem Mikroskop mit der gleichen Sehfeldzahl durchgeführt wurden, sind diese Ergebnisse exakt und direkt vergleichbar. Lediglich bei Krous et al. (2009) ergeben sich möglicherweise geringe Abweichungen, da die in dieser Studie verwendete Sehfeldzahl nicht bekannt ist (siehe Kapitel 5.6.2.1).

### 3.2.1.5 Größenvergleich neue Zählmethode mit bisherigen Zählmethoden

Im folgenden Bild wird zunächst die untersuchte Fläche des durchschnittlich in der Obduktion pro Probeentnahmestelle entnommenen Gewebes (A) – mit einer Fläche von etwa 100 mm<sup>2</sup> – mit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fläche pro Probeentnahmestelle von 10 mm<sup>2</sup> (B) verglichen. Weiterhin wird einerseits ein Vergleich gezogen mit der durchschnittlich in einer Endomyokardbiopsie untersuchten Myokardfläche von 1 mm<sup>2</sup> pro Stanze (C) (u.a. Baandrup und Olsen, 1981; siehe auch Kapitel 5.3) sowie andererseits mit der untersuchten Fläche in früheren Studien (D) zum Thema Myokarditis und Plötzlicher Kindstod (u.a. Dettmeyer 2004; Krous et al., 2009). In diesen Studien wurden in jedem SIDS-Fall insgesamt 20 High-Power-Fields ausgezählt, was einer Fläche von etwa 4,75 mm<sup>2</sup> pro Herz, aber lediglich 2,5 High-Power-Fields, also 0,59 mm<sup>2</sup> pro Probeentnahmestelle entspricht.

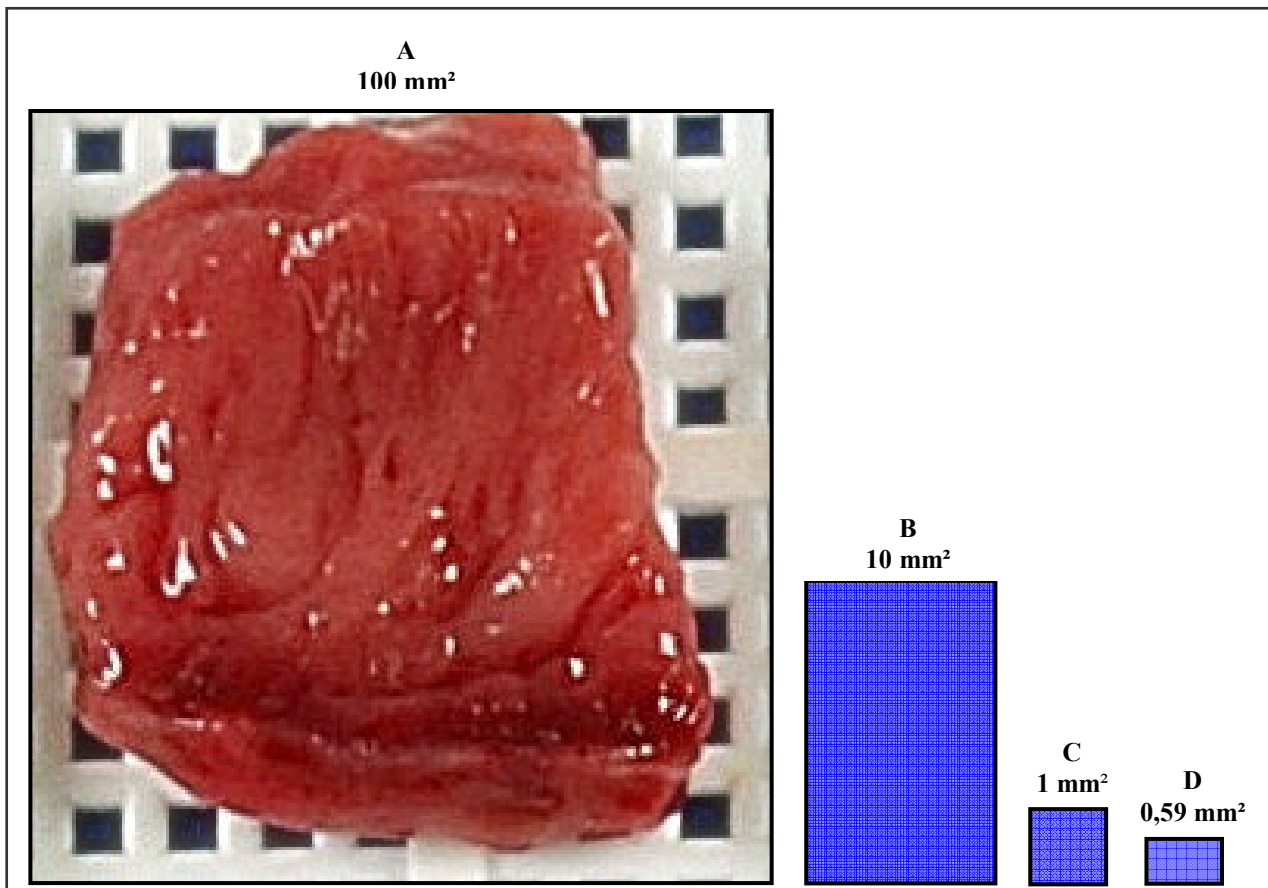


Abbildung 8: Untersuchte Myokardfläche im Vergleich mit der durchschnittlich verfügbaren Fläche pro Probeentnahmestelle. Obduktionsbild Fall Nr. 90, Septum interventrikuläre, spitzennah (D), Maßstab 10:1

Anhand dieser Abbildung wird deutlich, dass allein durch die Steigerung der untersuchten Fläche pro Herz in der angewandten Methode (B), nämlich um den Faktor 17 im Vergleich zu den bisherigen Methoden (D), eine deutlich höhere Repräsentativität der Ergebnisse erzielt wird.

### 3.3 Mikroskopische Darstellung der Immunhistochemie

Die folgenden Bilder zeigen einen Überblick über die mikroskopische Darstellung der einzelnen Zellen in den verschiedenen Färbemethoden. In den immunhistochemischen Färbungen stellen sich die Kerne der Lymphozyten, Leukozyten und Makrophagen rot, die Kerne der Kardiomyozyten blau dar:

LCA (Leucocyte Common Antigen = CD45 Antigen):

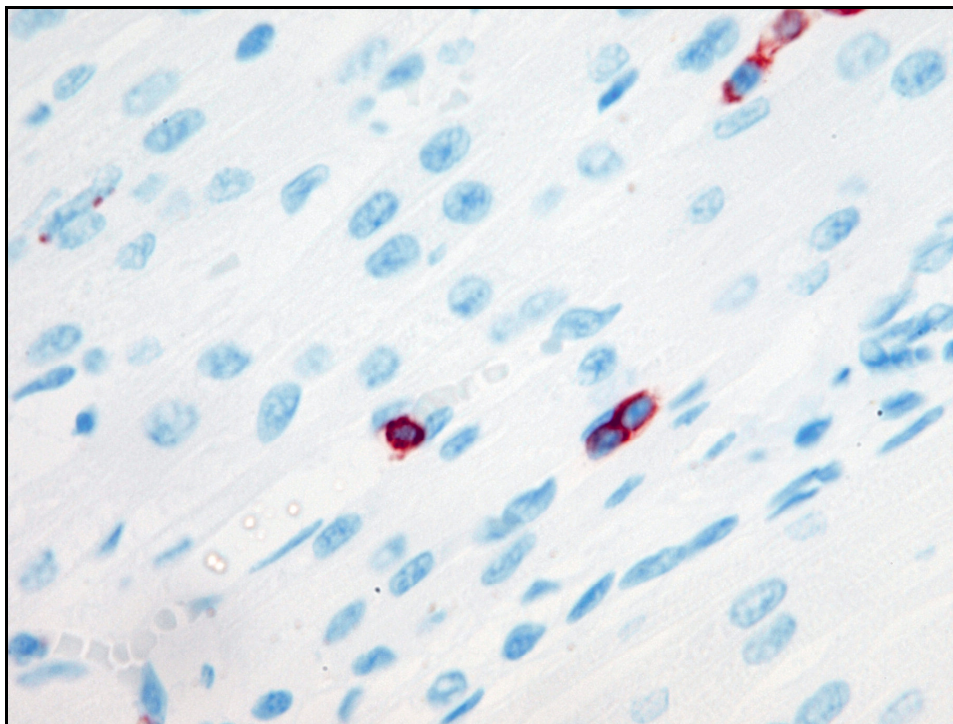


Abbildung 9: LCA x 1000, Fall Nr. 60, Septum interventrikulare, spitzennah (D)

CD68 (Makrophagen):

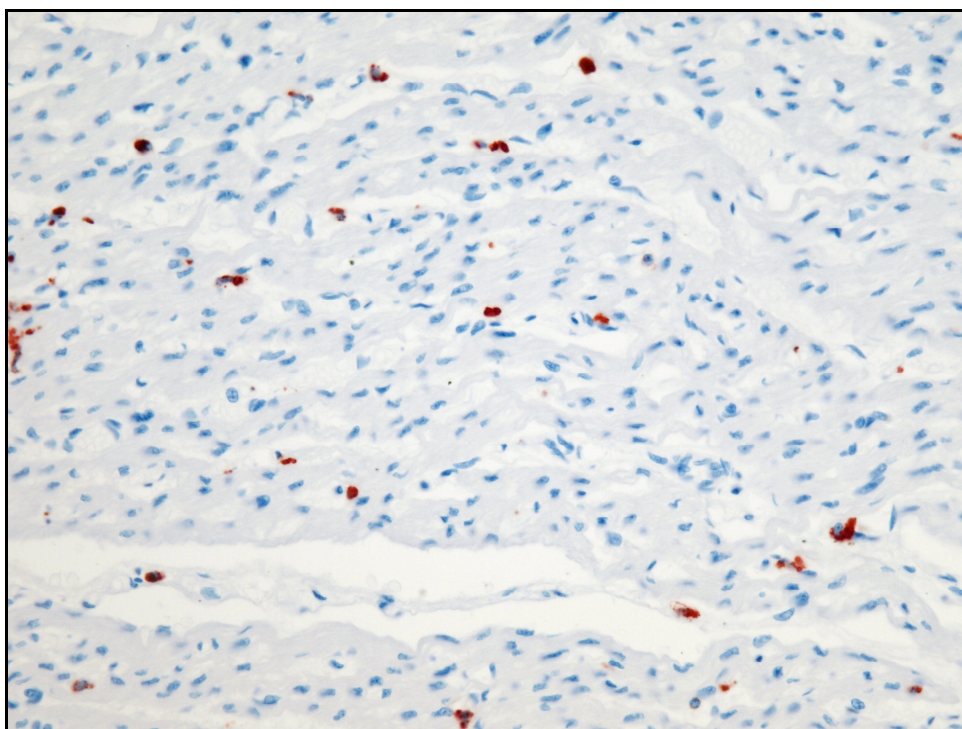


Abbildung 10: CD68 x 400, Fall Nr. 45, Vorderwand linke Herzkammer, spitzennah (F)

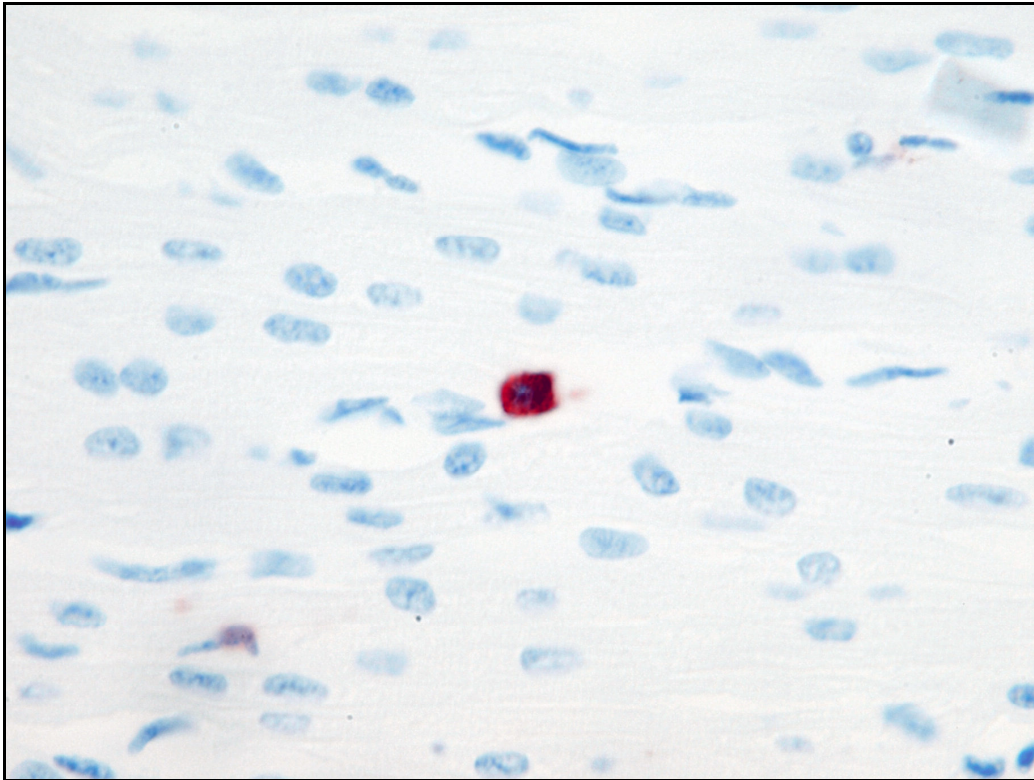
CD45R0 (T-Lymphozyten):

Abbildung 11: CD45-R0 x 1000, Fall Nr. 73, Vorderwand linke Herzkammer, basisnah (E)

### 3.4 Mikroskopische Darstellung der TUNEL-Methode

Apoptotische Zellkerne färben sich in der TUNEL-Methode je nach Alter des Myokardgewebes blau bis schwarz, die Kerne der intakten Kardiomyozyten sind blass-rosa. Optimale Ergebnisse werden vor allem dann erreicht, wenn die Färbung zeitnah an die Materialgewinnung durchgeführt wird. Im vorliegenden Kollektiv war dies im Zeitraum der Erstellung der vorliegenden Arbeit nur für das Jahr 2009 möglich. Die lichtmikroskopische Darstellung der TUNEL-Methode soll durch das folgende Beispielbild verdeutlicht werden. Das erste Bild zeigt eine Positivkontrolle, bei der durch die Spaltung der DNA mittels spezifischer Nukleasen (s. Protokollschritt Nr. 7, Kapitel 2.5.2) nahezu alle Myozytenkerne dieses Präparates blau-schwarz angefärbt wurden:



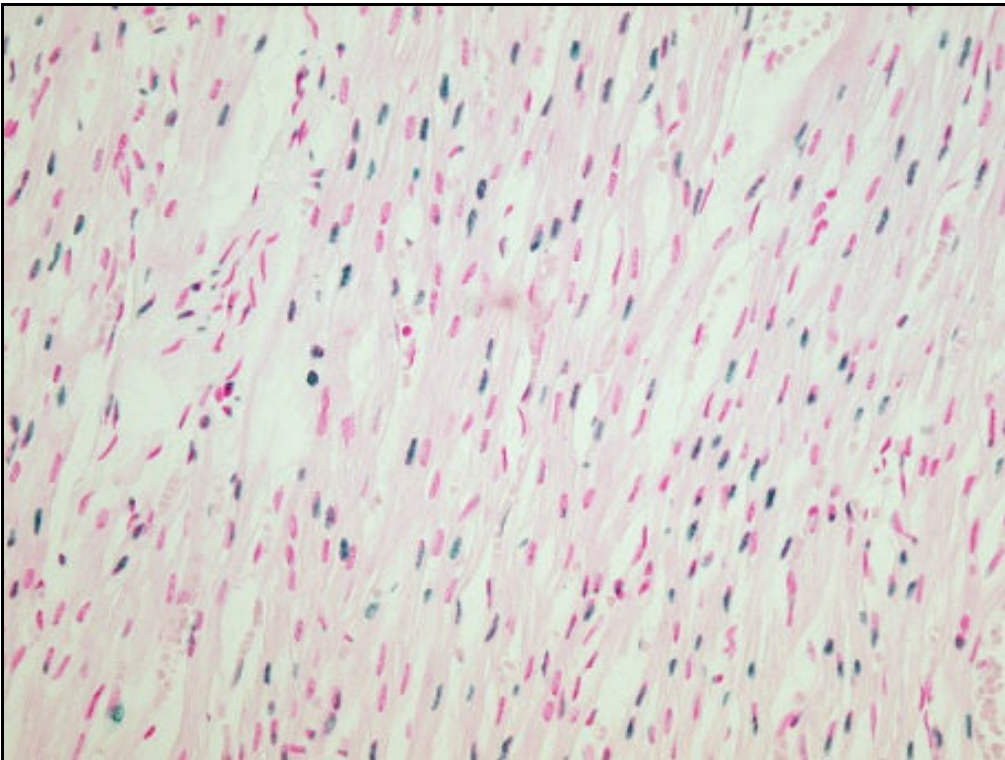


Abbildung 12: TUNEL x 400, Fall Nr. 79, Positivkontrolle. In der regulären TUNEL-Färbung stellt sich der Fall Nr. 79 als insgesamt unauffällig dar.

Das folgende Bild zeigt einen TUNEL-positiven Fall in 1000facher Vergrößerung

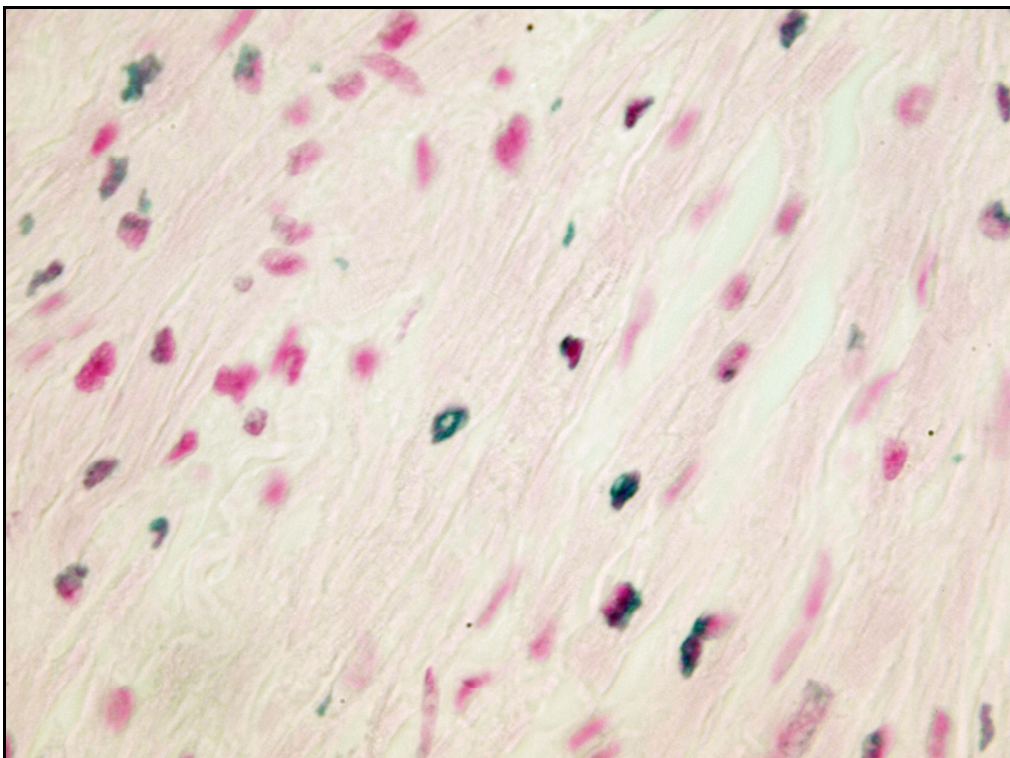


Abbildung 13: TUNEL x 1000, Fall Nr. 89, Vorderwand linke Herzkammer, basisnah (E)

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Obduktionsprotokolle

#### 4.1.1 SIDS-Inzidenz

Im vorliegenden SIDS-Kollektiv zeigt sich – wie auch im bundesdeutschen Durchschnitt (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010) – ein deutlicher Rückgang der Inzidenz des Plötzlichen Kindstods im Einzugsgebiet des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit 92 SIDS-Fälle untersucht, beginnend im Januar 1997 bis einschließlich Dezember 2009. Im Durchschnitt wurden in diesem Gesamtzeitraum  $7,08 \pm 2,40$  Fälle pro Jahr registriert. Dieser Jahresdurchschnitt wird allerdings seit 2004 nicht mehr erreicht bzw. mit nur noch vier Fällen im Jahr 2009 sogar deutlich unterschritten.

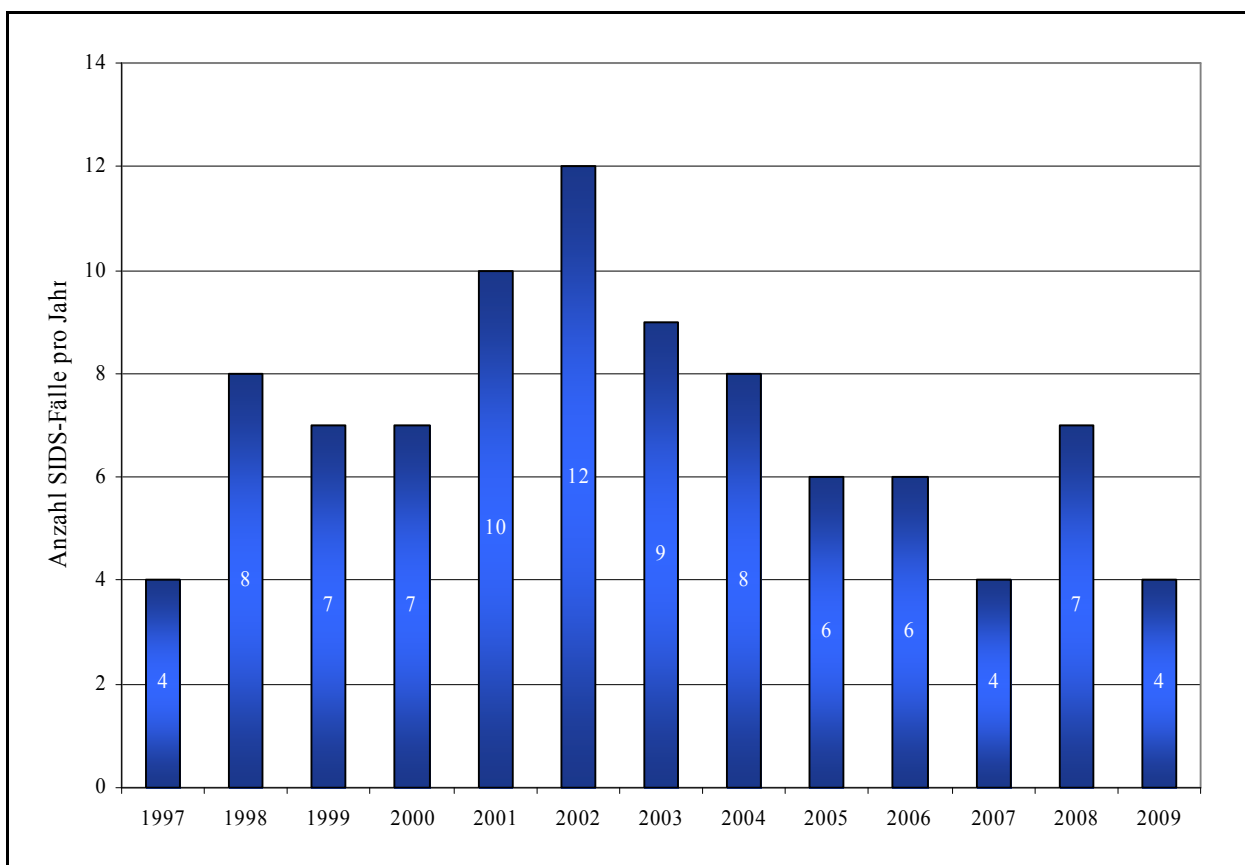


Abbildung 14: SIDS-Fälle 1997-2009 im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn

#### 4.1.2 SIDS-Fälle und ihre monatliche Verteilung

In Hinsicht auf die Verteilung der SIDS-Fälle innerhalb eines Jahres zeigt sich auch in diesem Kollektiv, dass es mit 60,87 % eine leichte Häufung von SIDS-Fällen in der kalten Jahreszeit (Oktober bis März) gibt (siehe Kapitel 1.1.3).

Der Oktober ist dabei mit zwölf Fällen (13,04 % aller Fälle) der Monat mit der höchsten Anzahl von SIDS-Fällen im Jahr, gefolgt von Dezember mit elf und Februar mit je zehn Todesfällen. Allerdings kann aufgrund der vorliegenden Daten der Plötzliche Kindstod nicht als ein alleiniges Phänomen der kalten Jahreszeit angesehen werden, da in der warmen Jahreszeit mit insgesamt 39,13 % der Fälle zwar ein leichter, aber kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ist. Faktisch wird im April und Juni mit je acht Fällen die durchschnittliche Anzahl von  $7,67 \pm 2,46$  Fällen pro Monat sogar überschritten. Dennoch ist auch die auffallend niedrige Anzahl von nur 4 SIDS-Fällen im Monat August zu erwähnen.

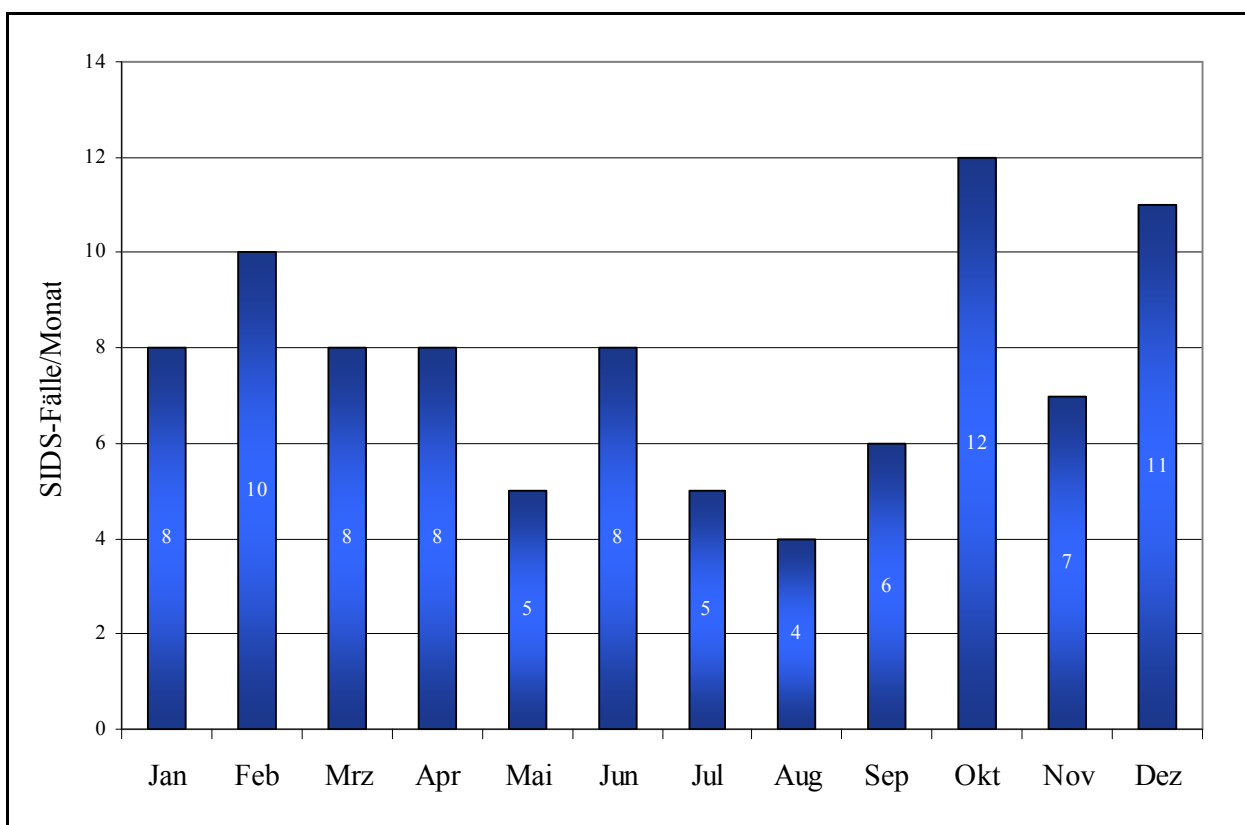


Abbildung 15: SIDS-Fälle der Jahre 1997-2009 und ihre monatliche Verteilung

### 4.1.3 Körperlage zum Todeszeitpunkt im SIDS-Kollektiv

Im untersuchten SIDS-Kollektiv wird im Obduktionsprotokoll für die Mehrzahl der Fälle als Körperlage zum Zeitpunkt des Auffindens im Kinderbett die Bauchlage angegeben.

Im Ganzen wurden von 92 Gesamtfällen 43 Säuglinge (47 %) in Bauchlage, 13 Säuglinge (14 %) in Rückenlage sowie 7 Säuglinge in Seitenlage (8 %) leblos vorgefunden. Allerdings fehlen innerhalb des Studienkollektivs bei insgesamt 29 Todesfällen (31 %) Angaben zur Auffindeposition bzw. es konnten keine Angaben dazu gemacht werden.

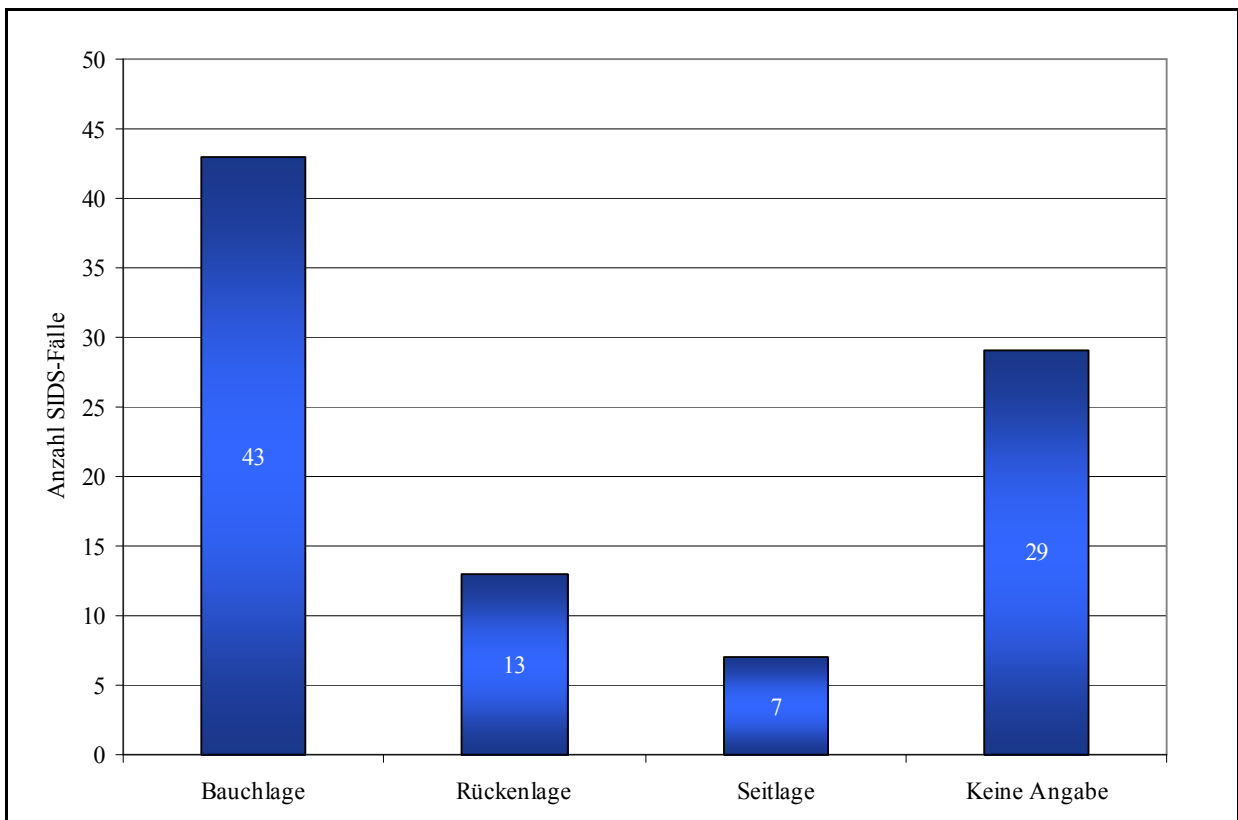


Abbildung 16: Körperlage der Säuglinge bei Auffindung

#### 4.1.4 Geschlechterverteilung

Wie auch in zahlreichen Studien (siehe Kapitel 1.1.2) beschrieben, zeigt sich für das SIDS-Kollektiv des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn in den Jahren 1997-2009, dass männliche Säuglinge häufiger vom Plötzlichen Kindstod betroffen ist.

So sind insgesamt 65,22 % aller im vorliegenden SIDS-Kollektiv verstorbenen Säuglinge männlichen Geschlechts. Für das Kontroll-Kollektiv ergibt sich eine inverse Darstellung: Von insgesamt fünfzehn Säuglingen sind neun weiblichen und nur sechs männlichen Geschlechts.

	SIDS-Kollektiv		Kontroll-Kollektiv	
	absolut	relativ (%)	absolut	relativ (%)
Männlich	60	65,22 %	6	40 %
Weiblich	32	34,78 %	9	60 %
Gesamt	92	100 %	15	100 %

Tabelle 6: Geschlechterverteilung innerhalb des SIDS-Kollektivs und des Kontroll-Kollektivs

#### 4.1.5 Nationalität

Entsprechend der Bevölkerungsstruktur in Deutschland haben 80 der 92 verstorbenen Säuglinge (87 %) die deutsche Staatsangehörigkeit, darunter sind in zwei Fällen gemischte Nationalitäten vorhanden (deutsch-togolesisch und deutsch-persisch).

Als zweitstärkste Nation, ebenfalls analog zur Bevölkerungsstruktur in Deutschland, besitzen acht Säuglinge die türkische Staatsangehörigkeit, was einem prozentualen Anteil von 8,7 % entspricht. Daneben gibt es noch je einen Säugling mit albanischer, syrischer, russischer sowie nicht näher bezeichneter asiatischer Nationalität.

Von den insgesamt 15 Fällen des Kontroll-Kollektivs besitzen 13 Säuglinge die deutsche, ein Säugling die italienische sowie ein Säugling die ecuadorianische Staatsangehörigkeit.

#### 4.1.6 Säuglingsalter zum Todeszeitpunkt im SIDS-Kollektiv

Im betrachteten Studienkollektiv von 92 SIDS-Fällen liegt das mittlere Todesalter bei 129,79 Tagen mit einer Standardabweichung von  $\pm 92,71$  Tagen.

Sowohl für weibliche als auch männliche Säuglinge liegt das Maximum der Todesfälle im zweiten Lebensmonat. Damit entsprechen bereits allein die 19 Todesfälle im zweiten Lebensmonat ca. einem Fünftel aller SIDS-Fälle. Mit steigendem Alter der Säuglinge nimmt dann die Anzahl der Todesfälle deutlich ab, so dass im Alter von elf bzw. zwölf Monaten nur noch je drei Kindstodfälle innerhalb des Studienzeitraums von 13 Jahren zu verzeichnen waren. Die genaue monatliche Verteilung der SIDS-Fälle ist in der folgenden Abbildung nach Geschlecht getrennt aufgeführt:

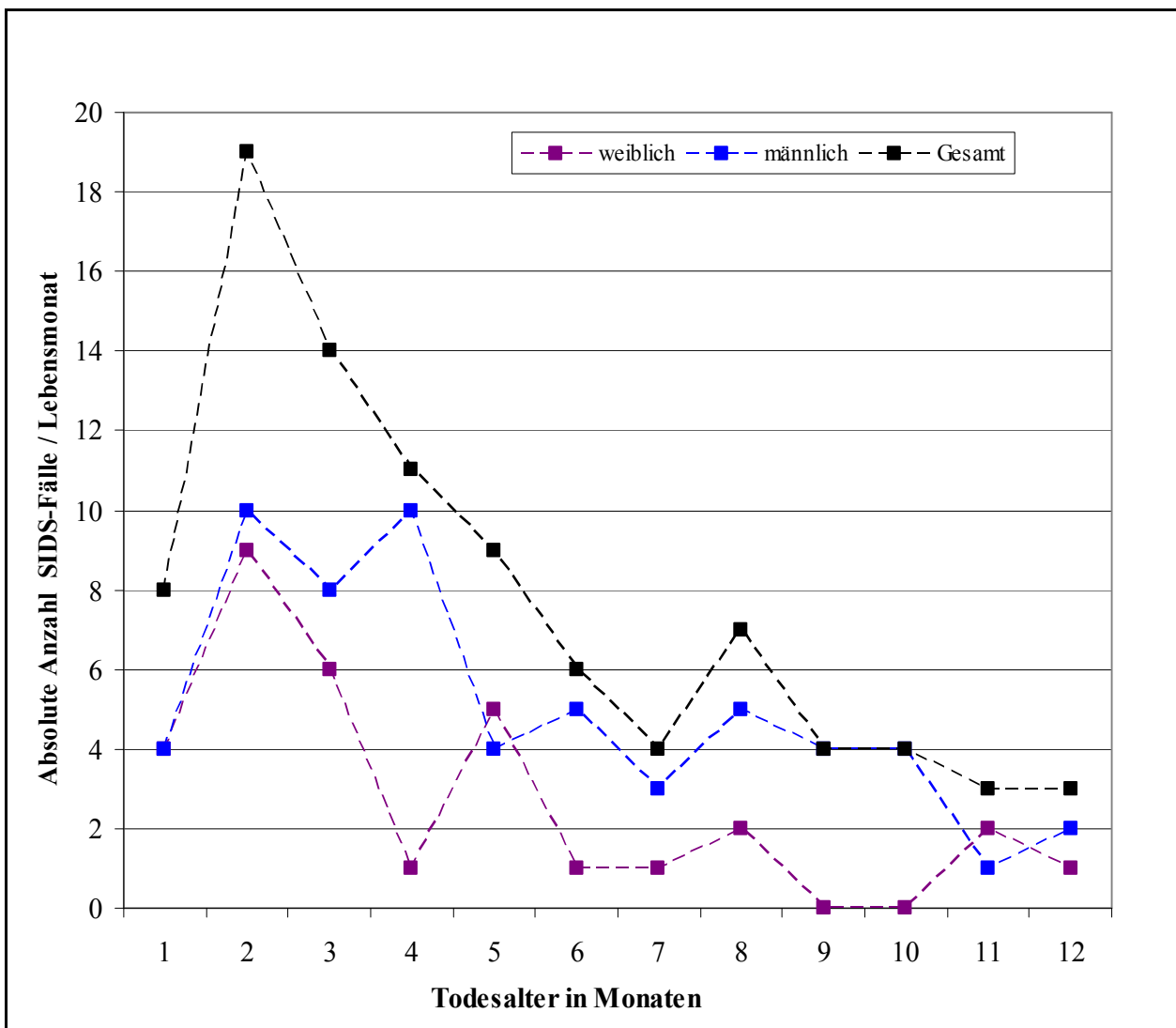


Abbildung 17: Anzahl der SIDS-Fälle nach Lebensalter zum Todeszeitpunkt

Die Kumulation der relativen Anteile der nach Alter beim Todeseintritt sortierten SIDS-Fälle in der folgenden Abbildung zeigt, dass bereits nach Ablauf des vierten Lebensmonats mehr als die Hälfte aller SIDS-Fälle aufgetreten sind (56,52 % aller Fälle) bzw. nach Ablauf des sechsten Lebensmonats mehr als 2/3 aller Fälle (72,83 %):

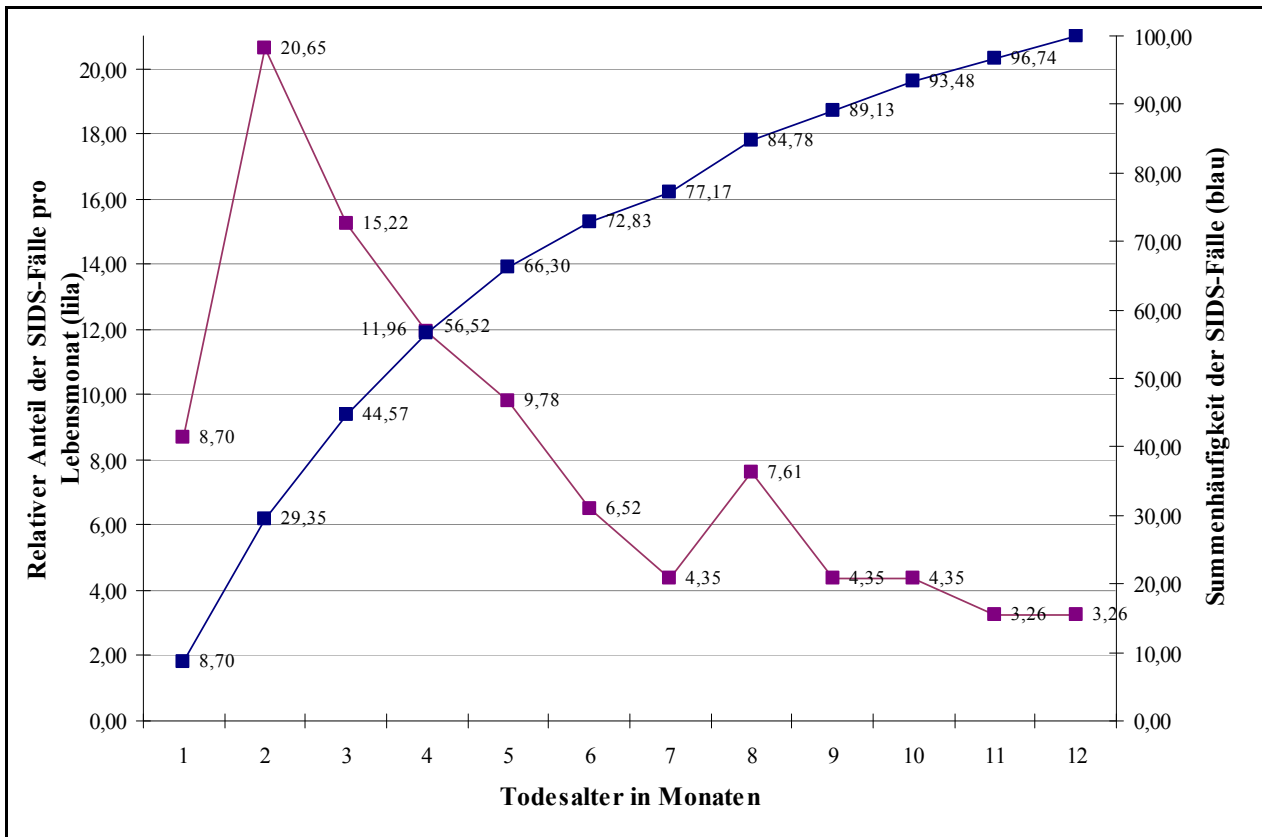


Abbildung 18: Alter der Säuglinge des SIDS-Kollektivs zum Todeszeitpunkt, relative Häufigkeit (lila) und Summenhäufigkeit (blau)

#### 4.1.7 Weitere Besonderheiten des Studienkollektivs

Die Auswertung der in Kapitel 2.1 im SIDS-Kollektiv aufgeführten weiteren Besonderheiten vor dem Tod der Säuglinge ergab, dass 32 von 92 Kindern vor ihrem Tod laut Obduktionsprotokoll eine teilweise fieberhafte Erkältung hatten. Dies sind immerhin 34,78 % aller verstorbenen Kinder. In den restlichen Fällen fehlen die Angaben bzw. waren die Kinder augenscheinlich gesund.

Als weitere SIDS-assoziierte Risikofaktoren lagen laut Obduktionsprotokoll in elf Fällen Frühgeburten vor. Neun Kinder stammten aus Raucherfamilien, in sechs Fällen wurde ein mütterlicher Drogenabusus vor bzw. während der Schwangerschaft beschrieben. In drei Familien gab es be-

reits einen Kindstodfall, davon waren in zwei Fällen jeweils die Cousinen der verstorbenen Kinder betroffen, in einem Fall wurden keine weiteren Angaben gemacht.

Weiterhin wurden in einigen Fällen anamnestische Besonderheiten genannt, die zwar nicht mit einem erhöhten SIDS-Risiko einhergehen, aber durchaus von Interesse sind. Dazu zählen Vitien, Zyanoseanfälle in der Vorgeschichte, Schimmelbefall der Wohnung, mütterliche Depression, an einem Herzfehler verstorbene Geschwisterkinder, Dystrophie, Reflux und Trinkschwäche.

Wegen der zeitlichen Nähe zwischen den empfohlenen Impfterminen und dem Häufigkeitsgipfel des Plötzlichen Kindstods im zweiten bis vierten Lebensmonats, wird auch im vorliegenden SIDS-Kollektiv in elf Fällen eine Impfung in unmittelbarer Nähe zum Todeszeitpunkt angegeben. Impfungen stellen wie bereits beschrieben nach aktueller Studienlage allerdings keinen Risikofaktor dar, sondern gelten sogar als protektiv, da sie nachweislich das Risiko des Plötzlichen Kindstods reduzieren (siehe Studien dazu in Kapitel 1.1.2).

## **4.2 Ergebnisse der konventionell-histologischen Färbung (HE)**

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) lagen für beide Kollektive sämtliche Schnitte aller acht Probeentnahmestellen vor. Daher wurde mit dieser Methode im Vergleich zu den immunhistochemischen Methoden und zur TUNEL-Methode in allen Fällen der Querschnitt des gesamten entnommenen Myokards untersucht und damit die insgesamt größte Fläche an Myokardgewebe ausgewertet. Es war mit diesem Verfahren also möglich, über 100 % des entnommenen Gewebes eine Aussage über das histologische Vorliegen einer Myokarditis zu machen.

Die nach der HE-Methode gefärbten Präparate wurden lichtmikroskopisch gemäß den DALLAS-Kriterien auf das Vorliegen einer Myozytolyse, Nekrose, eines interstitiellen Ödems sowie auf lymphomonozytäre Infiltration untersucht. Dabei weisen 83 der 92 SIDS-Fälle (90 %) und alle Kontroll-Fälle unauffälliges Myokardgewebe auf. Für diese Fälle kann konventionell-histologisch das Vorliegen einer Myokarditis ausgeschlossen werden. In zwei SIDS-Fällen konnte allerdings eine Myokarditis im Sinne der DALLAS-Kriterien mit histologischen Auffälligkeiten in allen acht Probeentnahmestellen eindeutig nachgewiesen werden (Fall Nr. 4 und 10), wie die folgenden Bilder deutlich zeigen:



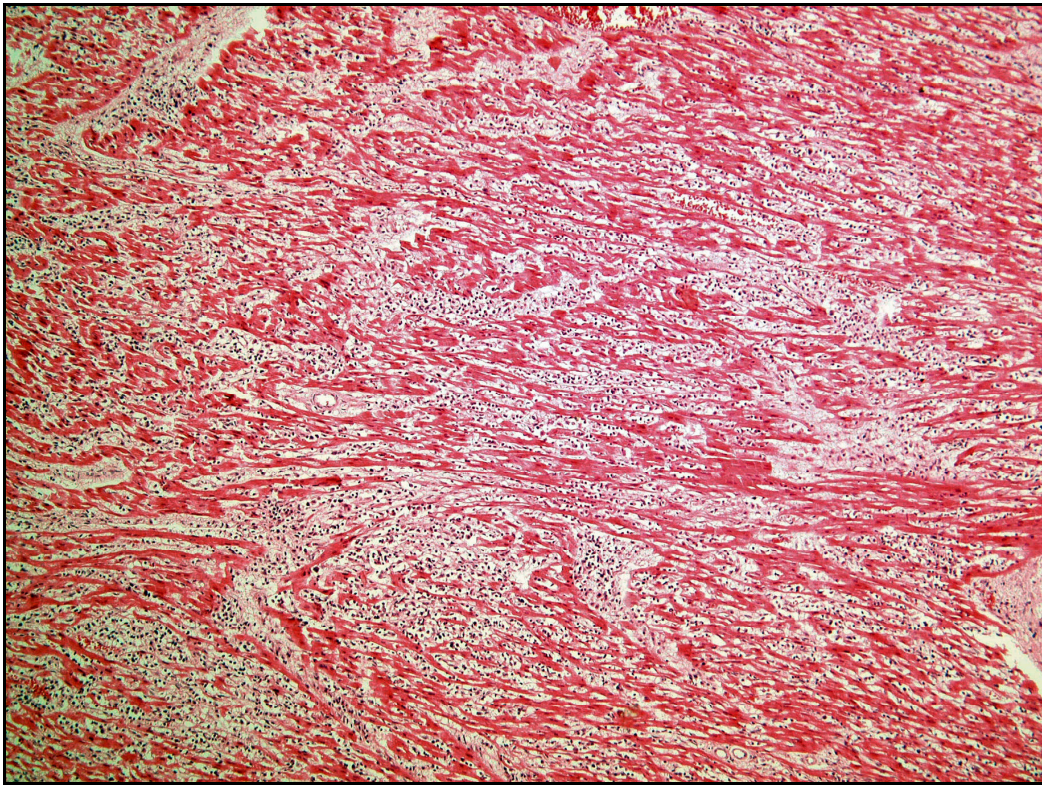


Abbildung 19: HE x 100, Fall Nr. 4, Myokarditis mit Myozytolyse, Nekrose, Infiltraten und Ödemen, Hinterwand linke Herzkammer, basisnah (G)

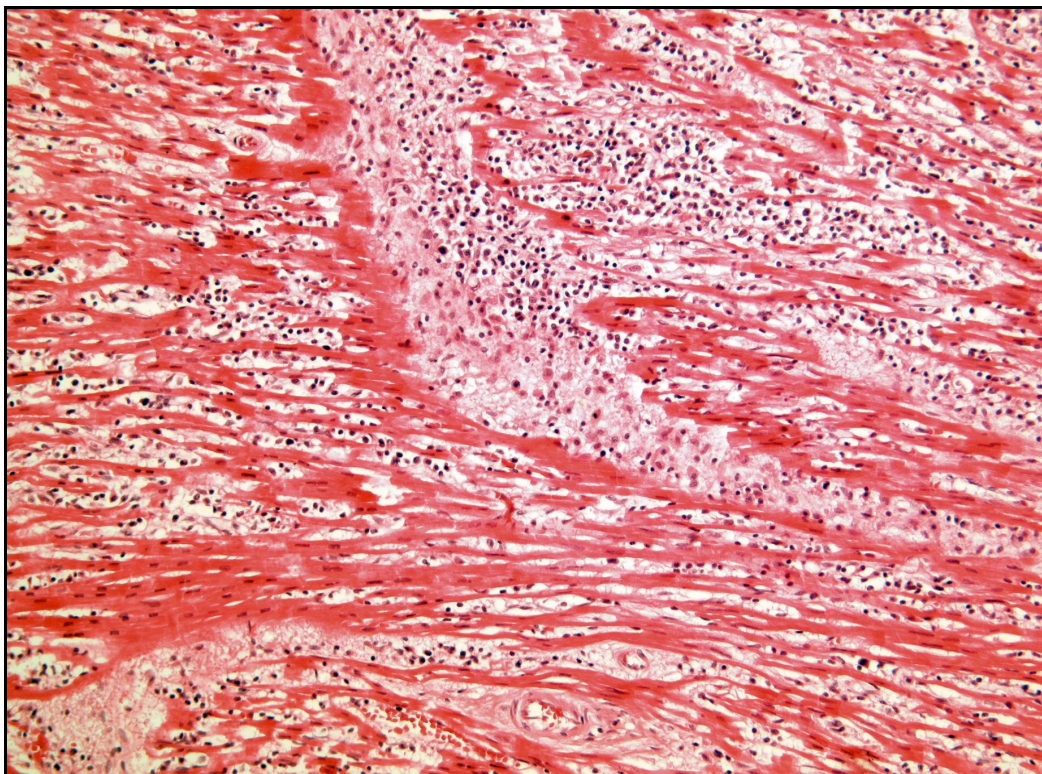


Abbildung 20: HE x 200, Fall Nr. 4, Myokarditis mit Myozytolyse, Nekrose, Infiltraten und Ödemen, Hinterwand linke Herzkammer, basisnah (G)

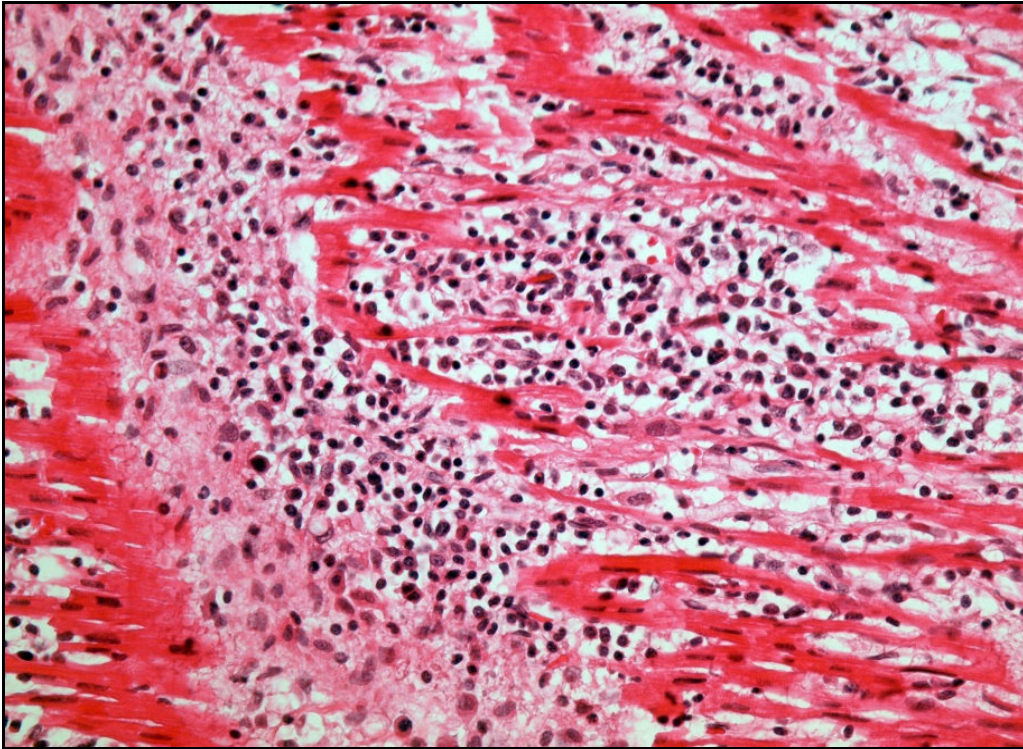


Abbildung 21: HE x 400, Fall Nr. 4, Myokarditis mit Myozytolyse, Infiltraten und Ödemen, Hinterwand linke Herzkammer, basisnah (G)

Fall Nr. 10 zeigt ebenfalls sämtliche Merkmale einer Myokarditis in schwächerer Ausprägung:

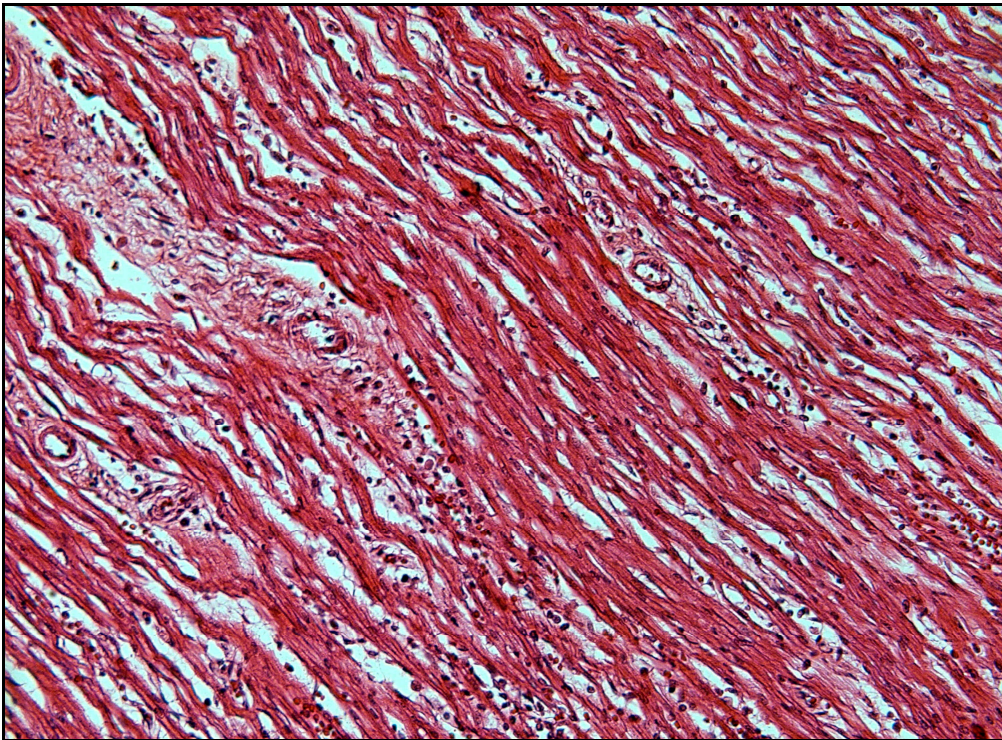


Abbildung 22: HE x 200, Fall Nr. 10, Hinterwand linke Herzkammer, spitzennah (H)

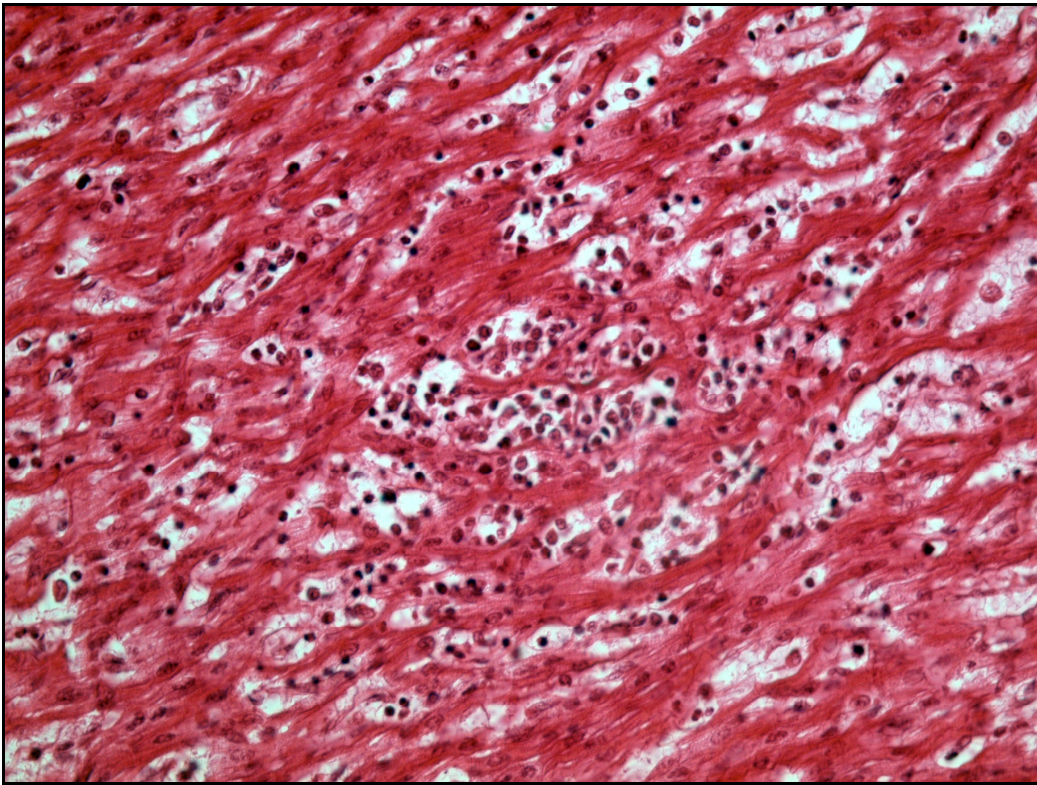


Abbildung 23: HE x 400, Fall Nr. 10, Herzkammerwand rechts, basisnah (A)

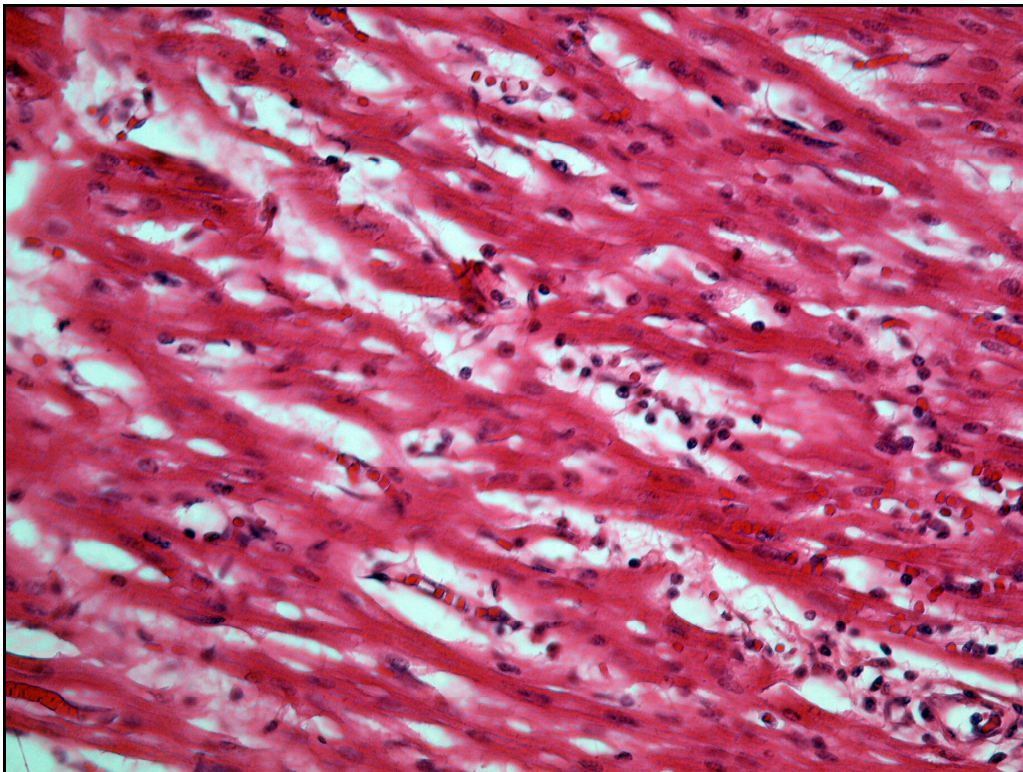


Abbildung 24: HE x 400, Fall Nr. 10, Vorderwand linke Herzkammer, basisnah (E)

In einem weiteren Fall konnten fokal begrenzt sowohl Ödeme als auch erhöhte zelluläre Infiltration in drei der acht Probeentnahmestellen nachgewiesen werden (Fall Nr. 8). Allerdings wurde das Vorliegen einer klassischen Myokarditis nach den DALLAS-Kriterien zunächst verneint, da es sich im konventionellen Schnitt lediglich um fokale Infiltrate ohne das Vorkommen von Nekrose handelt. Es sei jedoch an dieser Stelle bereits vorweggenommen, dass eine Diskussion über diesen besonderen Fall nach Auswertung der immunhistochemischen und TUNEL-Ergebnisse zu führen sein wird (siehe Kapitel 4.5.1).

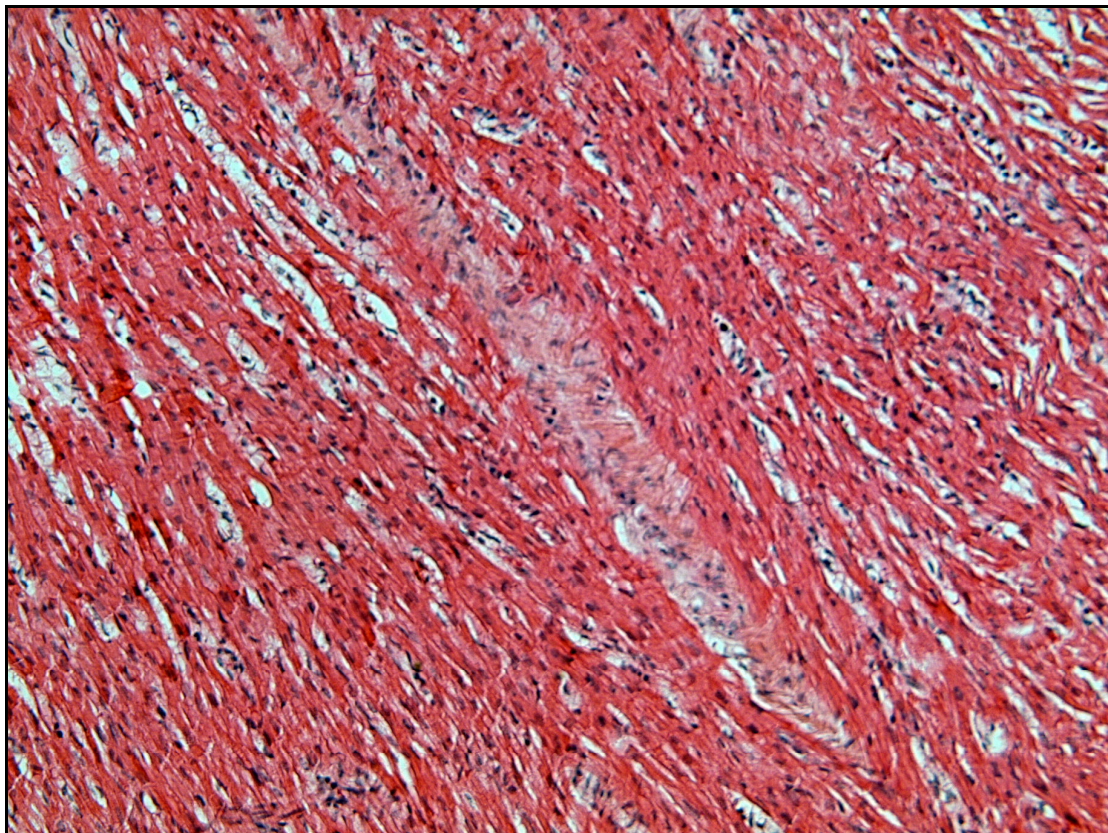


Abbildung 25: HE x 200, Fall Nr. 8, Hinterwand linke Herzkammer, spitzennah (H)

Drei weitere Fälle zeigen, wie im vorherigen Fall, fokale zelluläre Infiltrate, allerdings nur in einer einzigen Probeentnahmestelle ohne Nekrose, Ödem oder Myozytolyse und erfüllen damit ebenfalls nicht die Kriterien einer Myokarditis (Fall Nr. 2, 36 und 39). Die folgenden Bilder zeigen diese Infiltrate für den Fall Nr. 2 und Nr. 36:

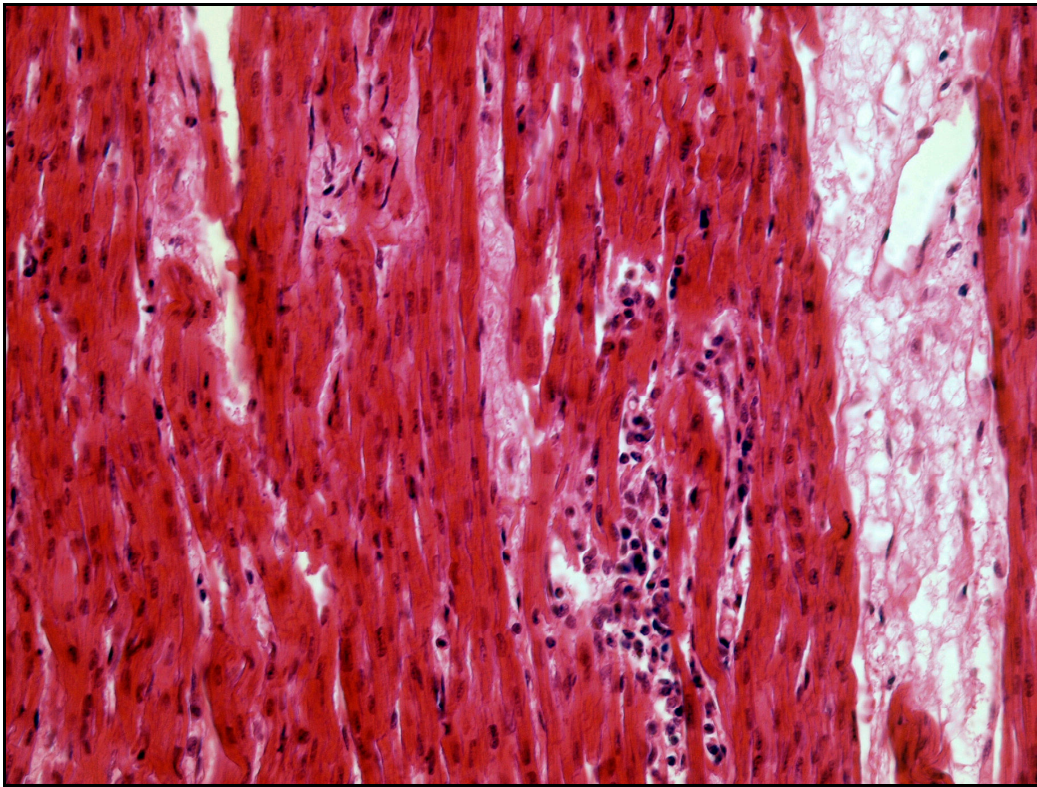


Abbildung 26: HE x 400, Fall Nr. 36, Fokale Infiltration, Vorderwand linke Herzkammer, spitzennah (F)

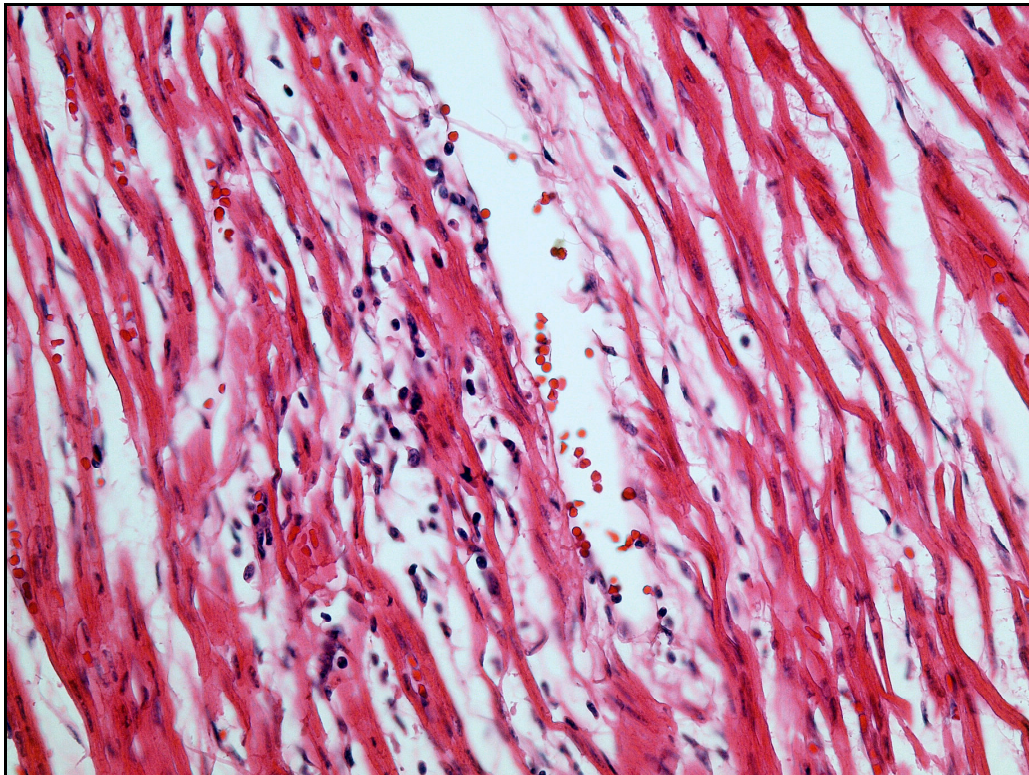


Abbildung 27: HE x 400, Fall Nr. 2, Fokale Infiltration, Herzkammerwand rechts, basisnah (A)

Schließlich weisen drei Fälle (Fall Nr. 9, 45 und 47) lediglich interstitielle Ödeme ohne Infiltrate, Nekrose oder Myozytolyse auf. Exemplarisch dafür ist hier ein Bild des Falls Nr. 9 dargestellt.

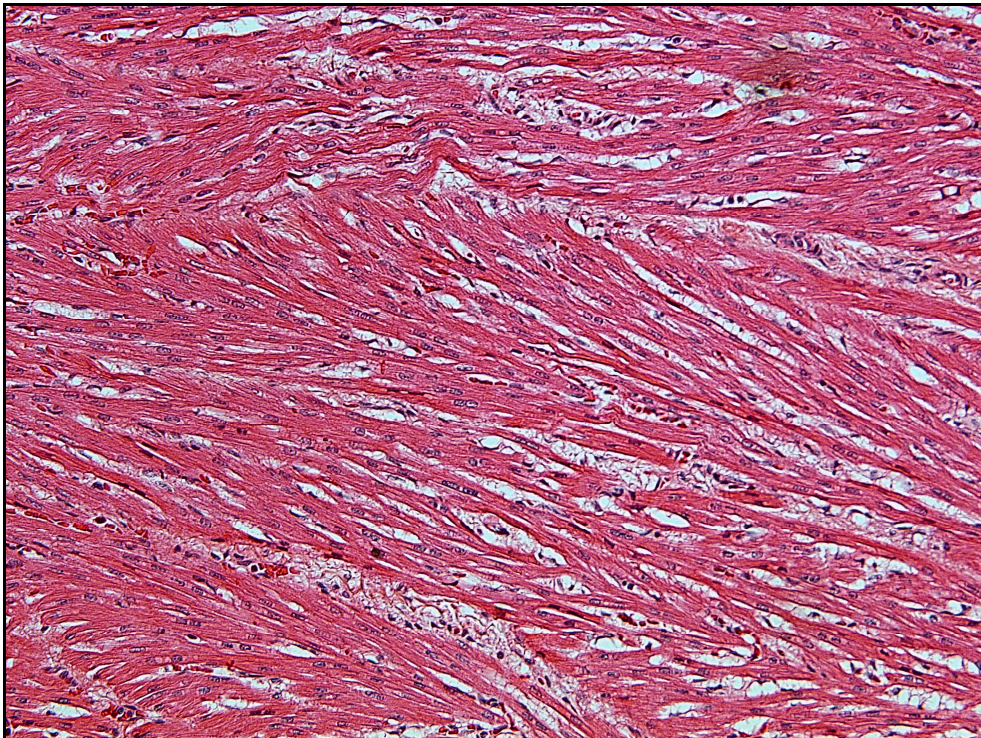


Abbildung 28: HE x 200, Fall Nr. 9, Myokardiale Ödeme ohne Infiltration oder Nekrose, Septum interventrikuläre, spitzennah (D)

Abschließend sind noch einmal die histologischen Auffälligkeiten im SIDS-Kollektiv dargestellt. Dabei sind nach alleiniger Auswertung dieser Methode zwei Fälle aus dem SIDS-Kollektiv fälschlicherweise der Todesursache Plötzlicher Kindstod zugeordnet worden, da bei einer so ausgeprägten Infiltration und Nekrose eine Myokarditis als Todesursache festgestellt werden kann.

SIDS-Fall Nr.	Histologische Besonderheiten
2	erhöhte zelluläre Infiltration nur in A
4	<b>Myokarditis in A-H</b>
8	Ödem, erhöhte zelluläre Infiltration in C, G, H
9	Ödem
10	<b>Myokarditis in A-H</b>
36	erhöhte zelluläre Infiltration nur in F
39	erhöhte zelluläre Infiltration nur in E
45	Ödem
47	Ödem

Tabelle 7: SIDS-Fälle mit Auffälligkeiten in der konventionellen Auswertung nach DALLAS

### 4.3 Ergebnisse der Immunhistochemie

Die konventionelle HE-Färbung und Auswertung nach den DALLAS-Kriterien hat den Nachteil, dass verschiedene Zellarten nicht einfach erkannt bzw. auch von Experten sehr unterschiedlich interpretiert werden („Interobserver Variability“, Shanes et al., 1987). Aus diesem Grund werden heute zusätzlich immunhistochemische Verfahren standardmäßig in der Myokarditisdiagnostik angewandt, so dass auch geringe sowie frühzeitige Infiltrate eindeutig identifiziert und dargestellt werden können (zur Myokarditisdiagnostik siehe Kapitel 1.2.4).

Zentrale Frage der angewandten immunhistochemischen Färbungen mit Darstellung verschiedener Zellarten ist, ob im SIDS-Kollektiv eine erhöhte zelluläre Infiltration nachgewiesen und daraus auf das Vorliegen einer Myokarditis geschlossen werden kann, sodass eine Myokarditis als Haupttodesursache in Fällen des Plötzlichen Kindstods anzunehmen ist.

#### 4.3.1 Durchschnittliche Infiltration: Ergebnisübersicht aller Färbungen

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde unter Berücksichtigung der Auszählergebnisse aller Probeentnahmestellen eines Falles die durchschnittliche Infiltration pro Fall berechnet (Mittelwert pro Fall, siehe Kapitel 3.2.1.3).

Die folgende Boxplot-Darstellung der drei immunhistochemischen Färbungen LCA (Leukozyten), CD68 (Makrophagen) und CD45-R0 (T-Lymphozyten) zeigt die durchschnittliche Infiltration pro Fall in beiden Kollektiven. Dabei bilden in den Kollektiven die einzelnen Mittelwerte pro Fall die Grundlage für die Berechnung des Gesamtmittelwertes. In der vorliegenden Arbeit ist ein Boxplot folgendermaßen definiert: Die Box entspricht den mittleren 50 % der erhobenen Daten (25. bis 75. Perzentile). Der Median wird als horizontale Linie, der Gesamtmittelwert als Pluszeichen dargestellt. Die Whisker zeigen Minimum und Maximum der erhobenen Daten an.

Es wird deutlich, dass nach Auszählung aller Myokardgewebestellen für das SIDS-Kollektiv höhere Zellzahlen pro Quadratmillimeter für Leukozyten (LCA) und T-Lymphozyten (CD45-R0) ausgewiesen werden als im Kontroll-Kollektiv. Makrophagen (CD68) zeigen in beiden Kollektiven eine annähernd gleiche Verteilung:

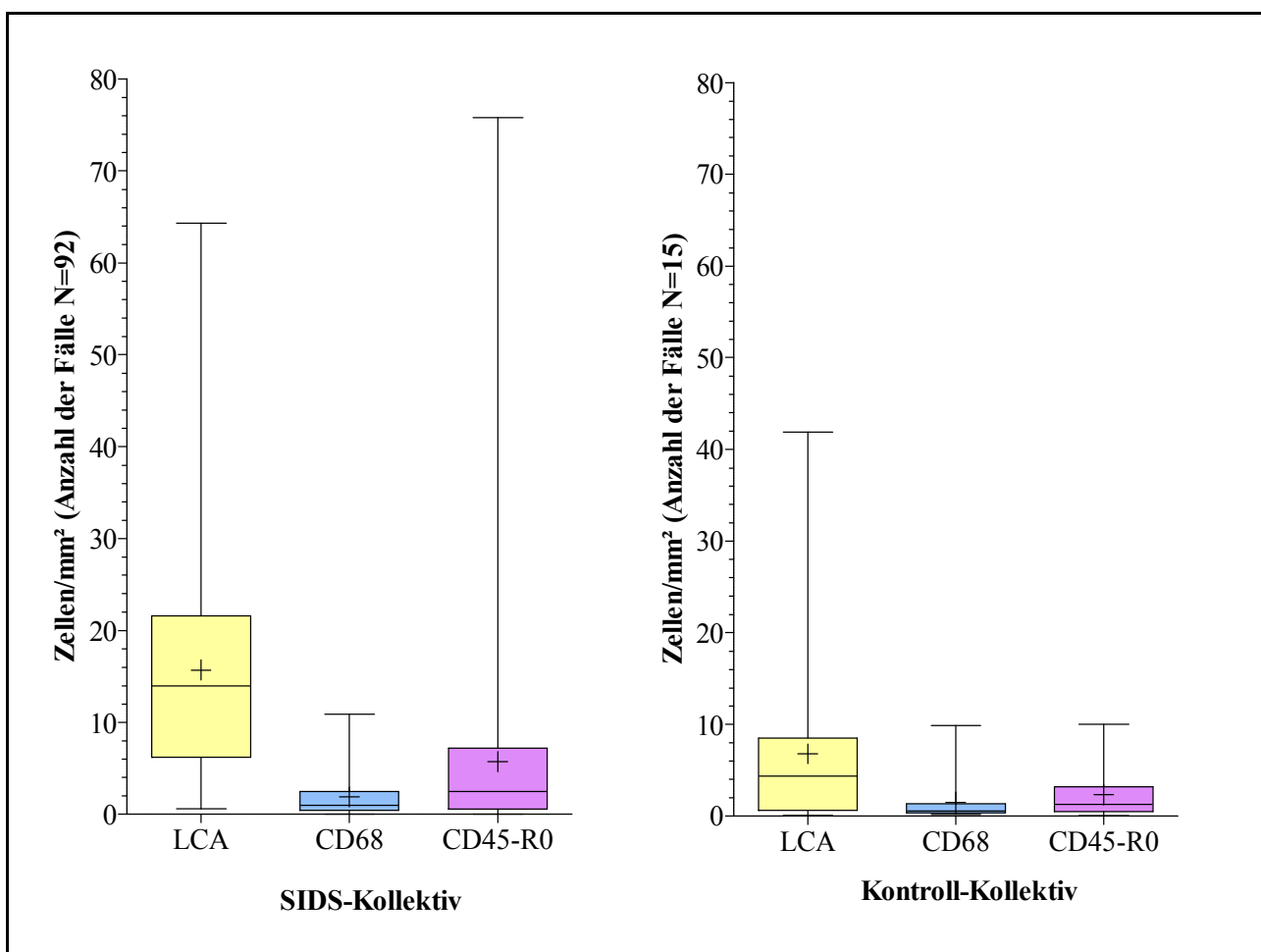


Abbildung 29: Boxplot, Mittelwerte pro Fall, sortiert nach Kollektiv und Färbung

Die starke Abweichung der Whisker zeigt aber auch, dass es vor allem im SIDS-Kollektiv in der Leukozyten und T-Lymphozyten-Färbung vereinzelt Fälle mit sehr hoher Anzahl von inflammatorischen Zellen gibt. Dazu zählt vor allem der in der HE-Färbung nachgewiesene Myokarditis-Fall Nr. 4. Dieser ist in beiden genannten Färbungen mit Abstand der zellreichste Fall. Der andere konventionell nachgewiesene Myokarditis-Fall (Nr. 10 des SIDS-Kollektivs) zeigt immunhistochemisch keine erhöhte Infiltration für Leukozyten und Makrophagen, allerdings gegenüber dem Mittelwert für T-Lymphozyten etwa 2-fach höhere T-Lymphozyten mit 10,34/mm<sup>2</sup>.



Stellt man das SIDS-Kollektiv korrigiert dar, d.h. ohne die beiden HE-Myokarditis-Fälle, so nimmt die Spannweite der Whisker und damit die maximal erreichte Zellzahl deutlich ab. Median und Mittelwert des Gesamtkollektivs bleiben allerdings nahezu unverändert. Auch die Darstellung ohne die weiteren sieben SIDS-Fälle, die in der konventionellen Auswertung nach DALLAS zwar nicht sämtliche Kriterien einer Myokarditis erfüllten, aber an einzelnen Probeentnahmestellen verschiedene Auffälligkeiten zeigten (siehe Tabelle 7, Kapitel 4.2), zeigt einen Abfall der Infiltrationsspannweite. Der Einfluss auf die durchschnittliche Infiltration in Form einer Veränderung des Mittelwertes oder des Medians ist allerdings ebenfalls nur gering:

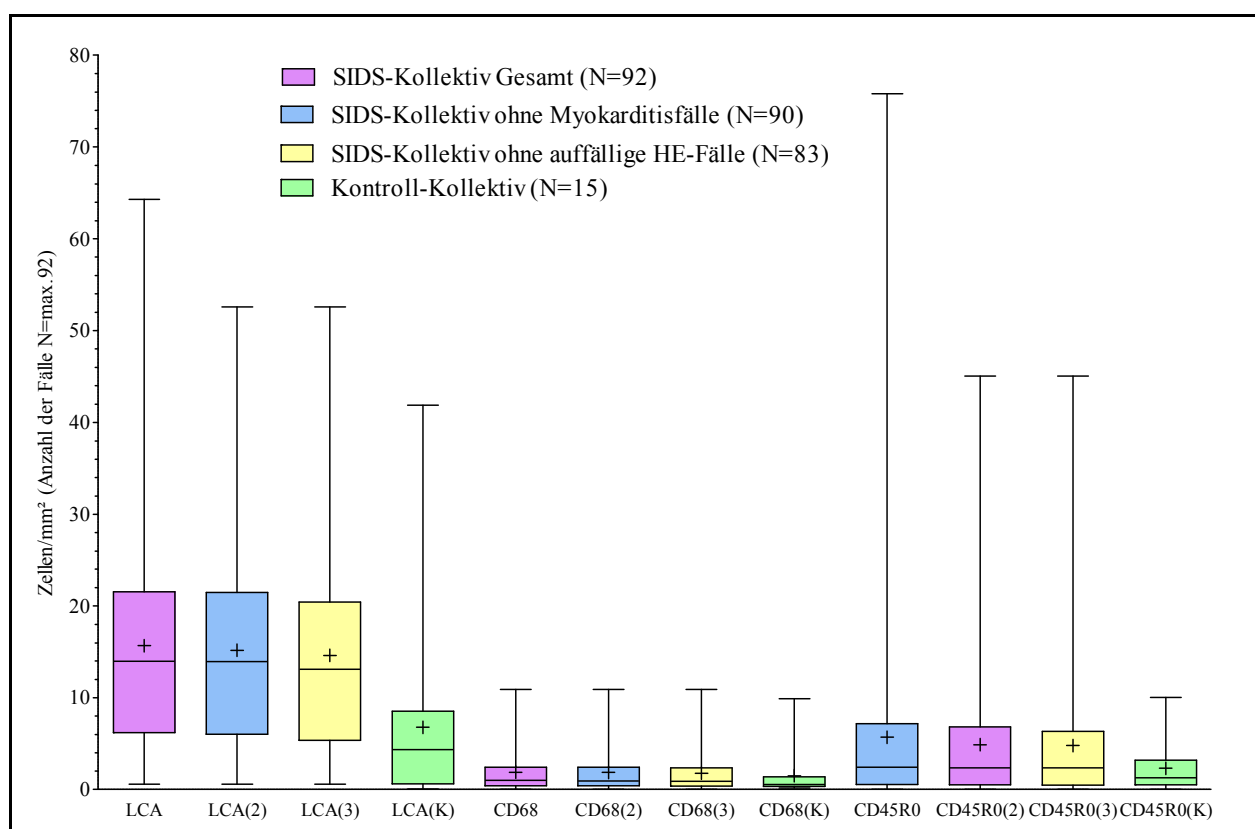


Abbildung 30: Immunhistochemische Ergebnisse für das gesamte SIDS-Kollektiv (lila), unter Ausschluss der beiden HE-Myokarditis-Fälle (2, blau) bzw. aller konventionell auffälligen SIDS-Fälle (3, gelb) sowie für das Kontroll-Kollektiv (K, grün)

Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse, getrennt nach den verschiedenen Färbungen, erfolgt in den nachfolgenden Kapiteln.

### 4.3.2 LCA

Im SIDS-Kollektiv werden durchschnittlich  $15,69 \pm 12,13$  Leukozyten/mm<sup>2</sup> und im Kontroll-Kollektiv  $6,79 \pm 10,34$  Leukozyten/mm<sup>2</sup> nachgewiesen. Die Leukozytenanzahl pro Quadratmillimeter ist damit im SIDS-Kollektiv mehr als doppelt so hoch wie im Kontroll-Kollektiv.

	SIDS-Kollektiv Gesamt	SIDS-Kollektiv ohne Myokarditis-Fälle	SIDS-Kollektiv ohne auffällige HE-Fälle	Kontroll-Kollektiv
Anzahl der Fälle	92	90	83	15
Minimum*	0,575	0,575	0,575	0,075
25 % Perzentile*	6,2	6,02	5,36	0,61
Median*	13,96	13,94	13,09	4,37
75 % Perzentile*	21,56	21,47	20,45	8,52
Maximum*	64,30	52,60	52,60	41,88
Mittelwert*	15,69	15,17	14,61	6,79
Standardabweichung (SD)*	12,13	11,12	11,09	10,34

Tabelle 8: Ergebnisse der LCA-Färbung (\*Leukozyten/mm<sup>2</sup>)

Allerdings handelt es sich in beiden Kollektiven um sehr niedrige Zellzahlen pro Quadratmillimeter. Verdeutlicht wird diese Tatsache, wenn man die Einheit „Leukozyten pro Quadratmillimeter“ in die bisher üblichen „High-Power-Fields“ umrechnet (siehe Kapitel 3.2.1.4). Unter Verwendung des Umrechnungsfaktors 4,21 entsprechen die durchschnittlichen 15,69 Leukozyten/mm<sup>2</sup> in 100-facher Vergrößerung lediglich 3,73 Leukozyten pro HPF in 400-facher Vergrößerung und liegen damit weit unter den publizierten Grenzwerten (siehe Kapitel 1.2.4). Legt man den von Dettmeyer et al. (2004) veröffentlichten, noch zu diskutierenden Grenzwert für eine Myokarditis an autoptischen Gewebe im Säuglingsmyokard von fünfzehn Leukozyten pro High-Power-Field zu Grunde – dies entspricht umgerechnet 63,15 Leukozyten pro Quadratmillimeter – so ist in der Immunhistochemie nur der bereits identifizierte Myokarditis-Fall Nr.4 mit 64,30 Leukozyten pro Quadratmillimeter als Myokarditis zu definieren.

Die folgenden Bilder einer Probeentnahmestelle mit einer Infiltration von 15 Leukozyten/mm<sup>2</sup> zeigen beispielhaft, dass es sich tatsächlich um eine sehr geringe Infiltration handelt. Es werden lediglich interstitielle Leukozyten berücksichtigt. Es liegt nahe, dass bei dieser Infiltration nicht von einer letalen Dysfunktion des Myokards ausgegangen werden kann.

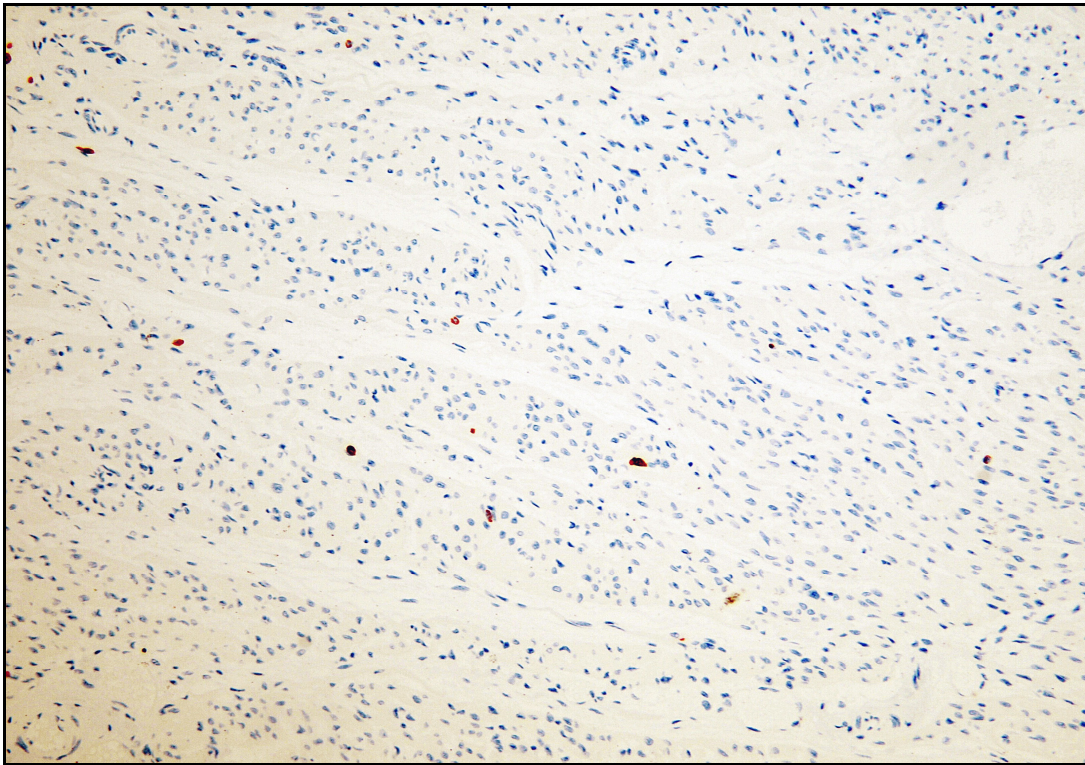


Abbildung 31: LCA x 200, Fall Nr. 60, vereinzelte interstitielle Leukozyten (rot) im Myokard, Herzkammerwand rechts, basisnah (A)

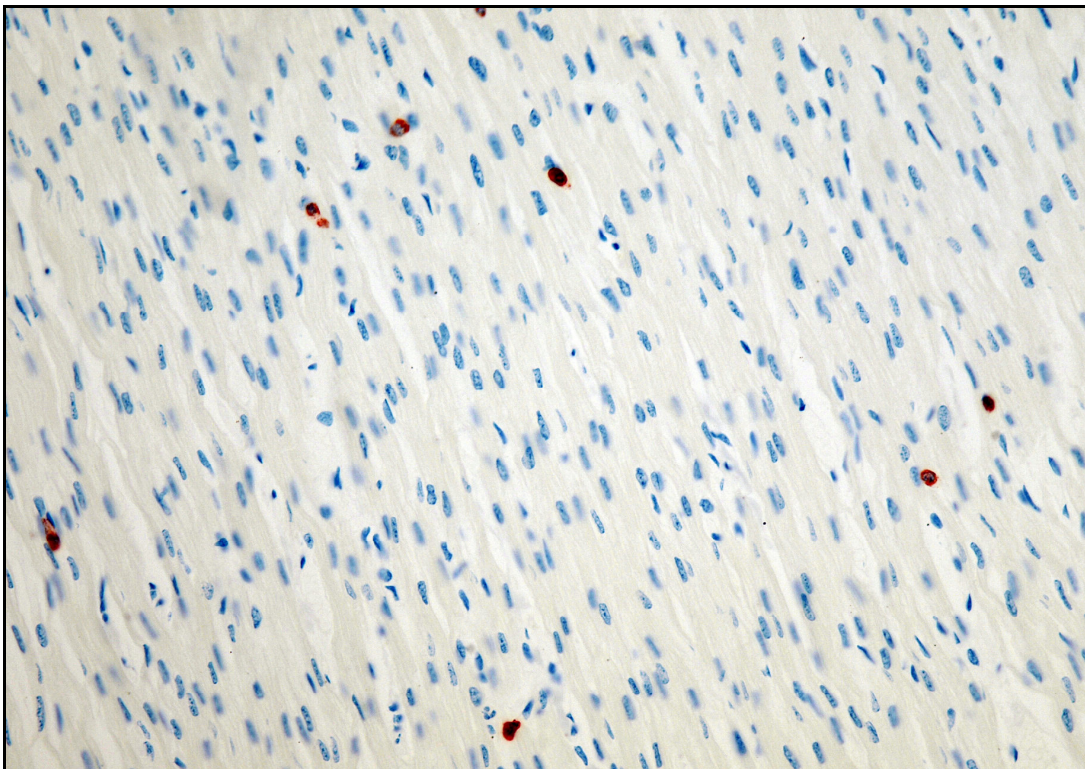


Abbildung 32: LCA x 400, Fall Nr. 60, Vereinzelt interstitielle Leukozyten (rot) im Myokard, Hinterwand linke Herzkammer, basisnah (G)

Es wurde bereits gezeigt, dass es in der Leukozytenfärbung innerhalb der Kollektive von Fall zu Fall erhebliche Schwankungen bezüglich der nachgewiesenen Infiltration gibt. Dabei variieren die Mittelwerte im SIDS-Kollektiv zwischen minimal 0,575 Leukozyten/mm<sup>2</sup> und maximal 64,30 Leukozyten/mm<sup>2</sup> pro Fall. Letztere maximale Infiltration zeigt sich im Myokarditis-Fall Nr. 4 und entspricht einer etwa 4-fachen Erhöhung im Vergleich zum Gesamtmittelwert des SIDS-Kollektivs. Im Kontroll-Kollektiv liegt das Maximum bei 41,88 Leukozyten/mm<sup>2</sup>. Dieser Maximalwert kann dem Kontroll-Fall Nr. 14 zugeordnet werden, wobei als Todesursache in der Obduktion ein Schädel-Hirn-Trauma nach zweizeitiger größerer äußerer Gewalteinwirkung festgestellt wurde.

Die folgende Abbildung zeigt, wie stark die Leukozytenzahl pro Fall innerhalb beider Kollektive schwankt, Fälle gleicher Zellzahlen werden dabei zusammengefasst.

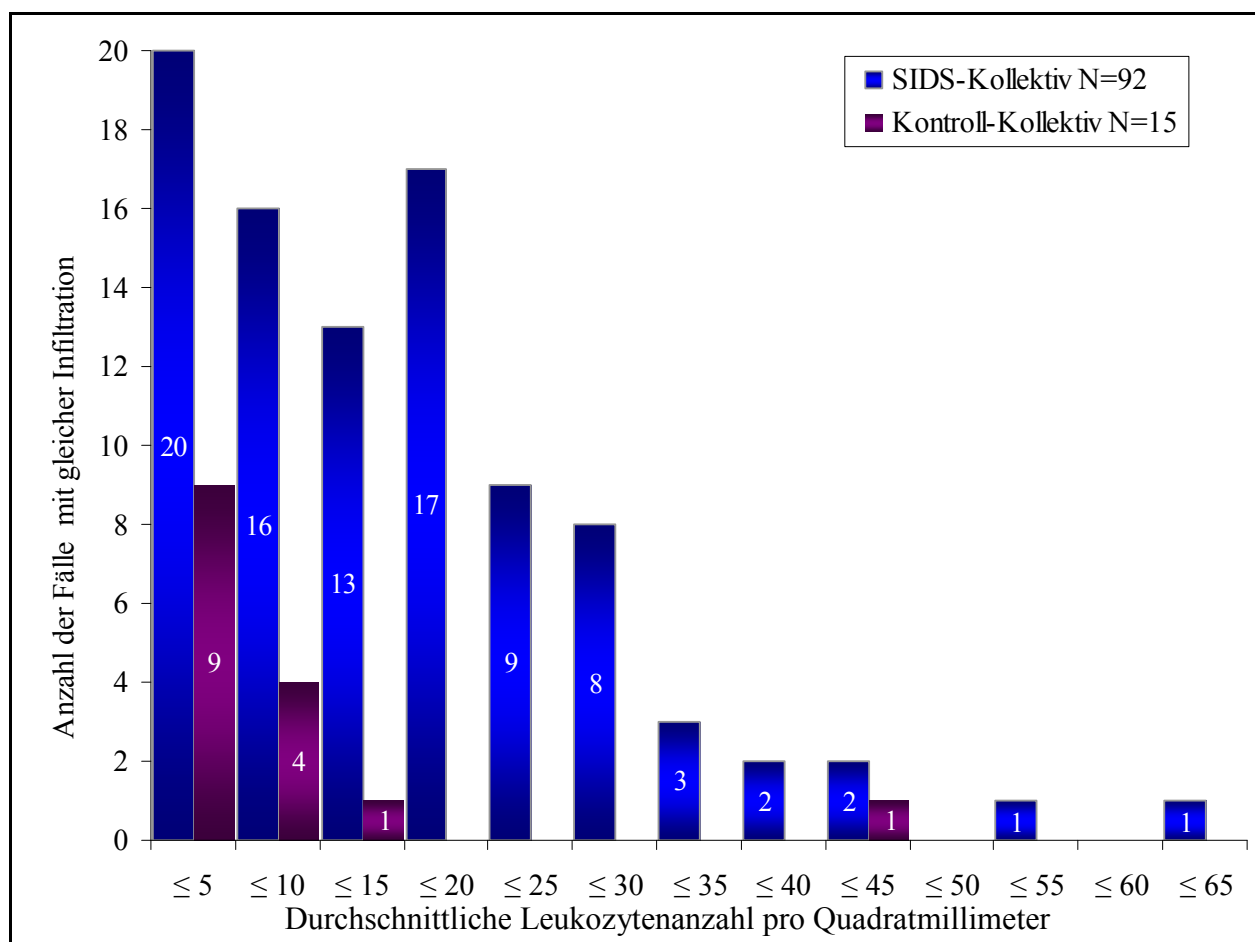


Abbildung 33: Verteilung der durchschnittlichen Leukozyten pro mm<sup>2</sup> in beiden Kollektiven

In 53,26 % aller SIDS-Fälle wird eine niedrigere Leukozytenanzahl pro Fall nachgewiesen als der Gesamtmittelwert und nur in zwei Fällen das Dreifache bzw. mehr erreicht.

Zusammenfassend bleibt daher festzuhalten, dass die durchschnittliche Leukozyteninfiltration in beiden Kollektiven sehr gering ist, aber zum Teil von Fall zu Fall erheblich schwankt. Massive Infiltrate werden allerdings nur in einzelnen Fällen bzw. im Myokarditis-Fall beobachtet.

### 4.3.3 CD68

Für die Makrophagen-Färbung (CD68) zeigt sich, dass die Unterschiede zwischen beiden Kollektiven, was sowohl die Mittelwerte als auch die Spannweite der Verteilung betrifft, minimal sind. So werden im SIDS-Kollektiv im Schnitt  $1,89 \pm 2,39$  Makrophagen pro Quadratmillimeter gefunden, im Kontroll-Kollektiv sind es  $1,49 \pm 2,52$  Makrophagen. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle:

	SIDS-Kollektiv Gesamt	SIDS-Kollektiv ohne Myokarditis- Fälle	SIDS-Kollektiv ohne auffällige HE-Fälle	Kontroll- Kollektiv
Anzahl der Fälle	92	90	83	15
Minimum*	0,0	0,0	0,0	0,17
25 % Perzentile*	0,42	0,41	0,37	0,35
Median*	0,98	0,93	0,88	0,56
75 % Perzentile*	2,44	2,43	2,36	1,38
Maximum*	10,89	10,89	10,98	9,88
Mittelwert*	1,89	1,87	1,80	1,49
Standardabweichung (SD)*	2,39	2,41	2,35	2,52

Tabelle 9: Ergebnisse der CD68-Färbung (\*Makrophagen/mm<sup>2</sup>)

Auch in dieser Färbung gibt es nur vereinzelt sehr zellreiche Fälle. So können nur in zwei Fällen mehr als 10 Makrophagen pro Quadratmillimeter ausgewiesen werden (Fall Nr. 32 und 74). Letzterer weist mit einer Infiltration von 10,89 Makrophagen/mm<sup>2</sup> die maximale Infiltration im SIDS-Kollektiv auf; dies entspricht mehr als dem 5-fachen des Mittelwertes in diesem Kollektiv. Im einem weiteren Fall (Nr. 66) liegt die durchschnittliche Infiltration bei 9,98 Makrophagen/mm<sup>2</sup>, hier wird anamnestisch eine dem Tod vorausgehende Erkältung angegeben. Die anderen Fälle sind bezüglich Infektionen in ihrer Vorgeschichte unauffällig. Konventionell-histologisch und in den anderen immunhistochemischen Färbungen sind die genannten Fälle unauffällig, und auch ohne Nachweis von apoptotischen Zellen. Lediglich der Fall Nr. 32 weist auch in der LCA-Färbung im Schnitt Leukozyten in zweifacher Höhe des Mittelwertes aus.

Im Kontroll-Kollektiv gibt es ebenfalls einen Ausreißer, den Fall Nr. 10. Dieser erreicht mit 9,88 Makrophagen/mm<sup>2</sup> mehr als das 6,6-fache des Mittelwertes im Kontroll-Kollektiv. Todesursache war eine Sepsis. In der folgenden Abbildung wird die Spannweite der Infiltration in beiden Kollektiven noch einmal dargestellt, dabei werden Fälle gleicher Zellzahlen zusammengefasst.

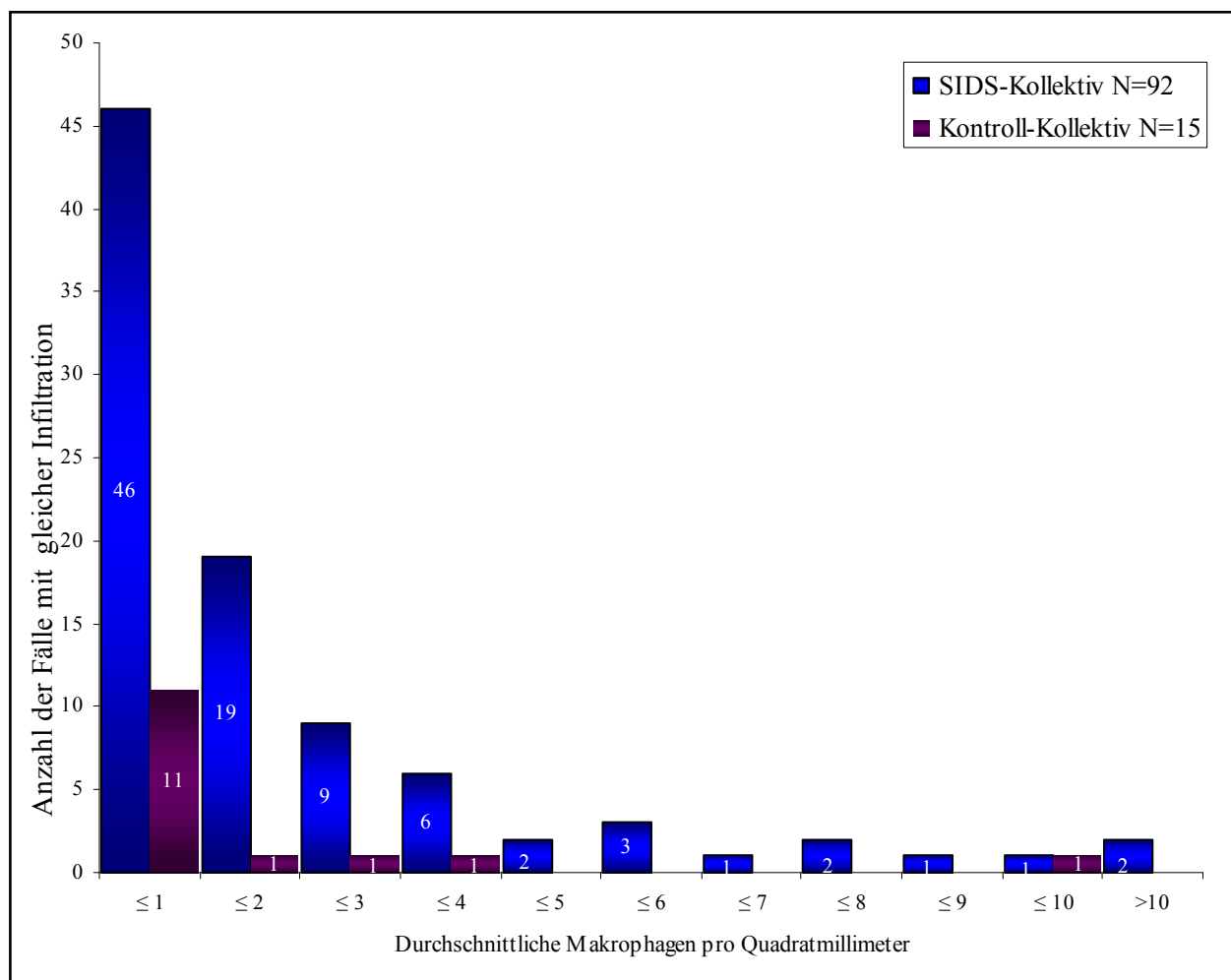


Abbildung 34: Verteilung der durchschnittlichen Makrophagen pro mm<sup>2</sup> in beiden Kollektiven

Nur aufgrund dieser isolierten Infiltration mit Makrophagen in einzelnen Fällen kann aber nicht auf das Vorliegen einer Myokarditis geschlossen werden. Im Gegenteil, in den beiden HE-Myokarditis-Fällen werden mit 4,32 Makrophagen/mm<sup>2</sup> im Fall Nr. 4 und 2,4 Makrophagen/mm<sup>2</sup> im Fall Nr. 10 nur sehr geringe Zellzahlen nachgewiesen. Dies ist besonders im Myokarditis-Fall Nr. 4 interessant, da dieser in den anderen immunhistochemischen Verfahren jeweils die Maximalwerte aufweist.

Analog zur Leukozytenfärbung ist es an dieser Stelle außerdem entscheidend zu verdeutlichen, dass es sich bei den maximal gezählten 10 Makrophagen pro Quadratmillimeter um sehr geringe Zellzahlen handelt. Zum Vergleich sind dies umgerechnet nur 2,375 Makrophagen pro High-Power-Field. Damit wird der von Dettmeyer et al. (2004) als „Myokarditis verdächtig“ geltende Wert von zehn oder mehr Makrophagen pro HPF – umgerechnet 42,1 Makrophagen pro Quadratmillimeter – in diesem Kollektiv in keinem Fall, in keiner einzelnen Probeentnahmestelle und auch nicht in einem einzelnen Quadratmillimeter erreicht.

Es stellt sich daher Frage, ob ein Grenzwert für Makrophagen überhaupt valide ist. Außerdem muss aufgrund der geringen Zellzahlen, aber auch aufgrund der Tatsache, dass in den Myokarditis-Fällen kaum Makrophagen nachzuweisen waren, diskutiert werden, ob diese Färbung als „Suchmethode“ für eine Myokarditis überhaupt sinnvoll ist und welche Aussagekraft sie hat.

#### 4.3.4 CD45-R0

Als letzte immunhistochemische Methode wurden T-Lymphozyten spezifisch angefärbt. Dabei können im SIDS-Kollektiv mit  $5,7 \pm 10,09$  T-Lymphozyten/mm<sup>2</sup> etwa doppelt so viele Zellen nachgewiesen werden wie im Kontroll-Kollektiv mit  $2,32 \pm 2,59$  T-Lymphozyten/mm<sup>2</sup>.

	SIDS-Kollektiv Gesamt	SIDS-Kollektiv ohne Myokarditis- Fälle	SIDS-Kollektiv ohne auffällige HE-Fälle	Kontroll- Kollektiv
Anzahl der Fälle	92	90	83	15
Minimum*	0,0	0,0	0,0	0,05
25 % Perzentile*	0,56	0,53	0,48	0,50
Median*	2,44	2,39	2,39	1,30
75 % Perzentile*	7,18	6,81	6,31	3,20
Maximum*	75,80	45,05	45,05	10,01
Mittelwert*	5,70	4,87	4,81	2,32
Standardabweichung (SD)*	10,09	6,92	7,03	2,59

Tabelle 10: Ergebnisse der CD45-R0-Färbung (\*T-Lymphozyten/mm<sup>2</sup>)

Vereinzelt gibt es auch in dieser Färbung vor allem im SIDS-Kollektiv erhebliche Schwankungen der durchschnittlichen Infiltration. Dabei variieren die mittleren Zellzahlen pro Fall zwischen minimal 0 und 75,80 T-Lymphozyten/mm<sup>2</sup> maximal. Dieser Maximalwert, mit einer etwa 13-fachen

Erhöhung der Infiltration pro Quadratmillimeter gegenüber dem SIDS-Gesamtmittelwert, kann auch dem Myokarditis Fall Nr. 4 zugeordnet werden. Besonders hervorzuheben ist die Abnahme der maximalen Infiltration von 75,80 Zellen/mm<sup>2</sup> auf 45,05 Zellen/mm<sup>2</sup>, wenn dieser Fall nicht berücksichtigt wird (siehe Abbildung 30, Kapitel 4.3.1). Es werden also in diesem Fall ca. 30 T-Lymphozyten pro Quadratmillimeter mehr nachgewiesen, als in dem Fall mit der zweithöchsten Infiltration. Die genaue Verteilung der Infiltration mit T-Lymphozyten in beiden Kollektiven zeigt sich in der folgenden Abbildung, Fälle gleicher Infiltration sind dabei zusammengefasst:

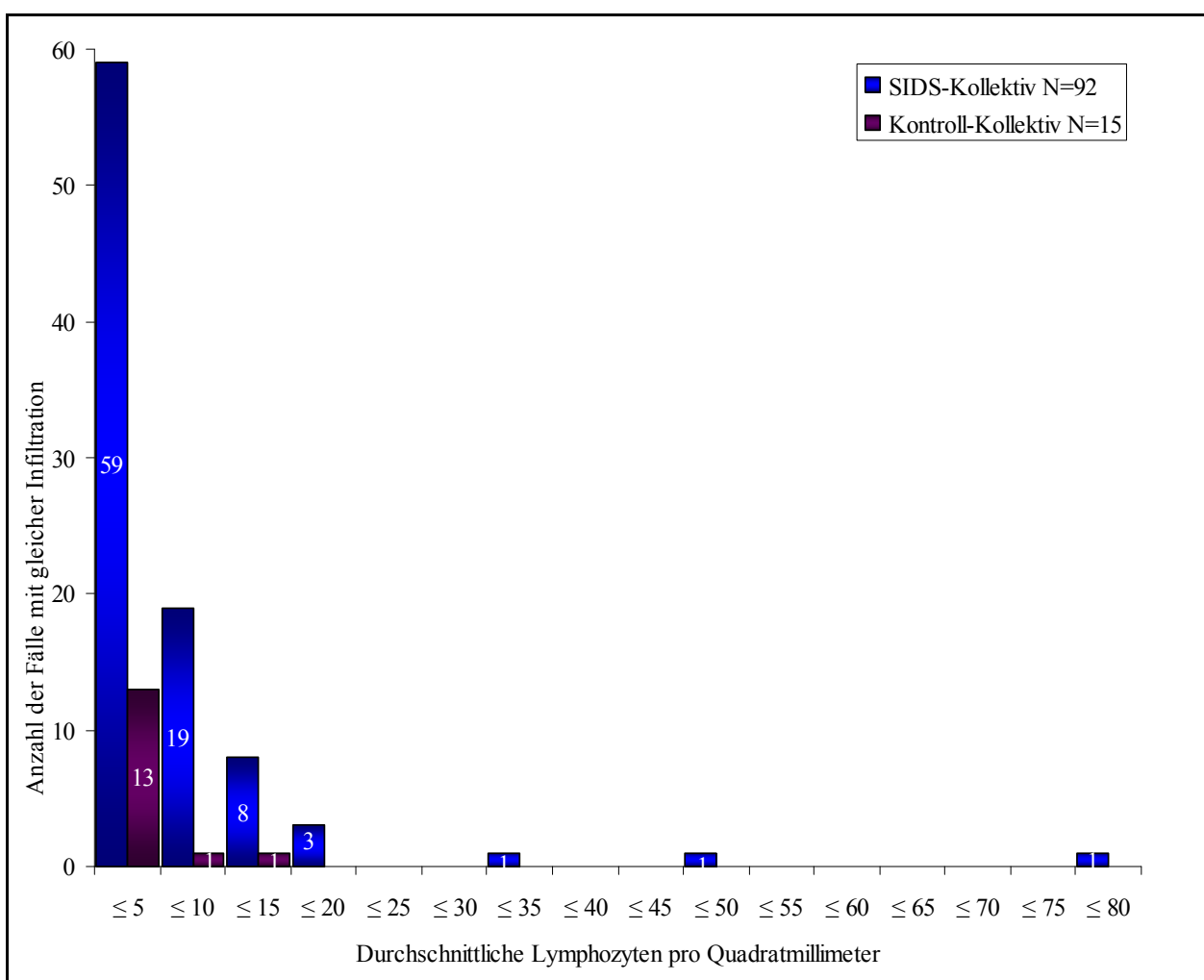


Abbildung 35: Verteilung der durchschnittlichen T-Lymphozyten pro mm<sup>2</sup> in beiden Kollektiven

Letztlich handelt es sich auch in den meisten Fällen der T-Lymphozytenfärbung um sehr niedrige Zellzahlen pro Quadratmillimeter. So entsprechen die mittleren 5,7 T-Lymphozyten pro Quadratmillimeter lediglich 1,35 T-Lymphozyten pro HPF und liegen damit ebenfalls weit unter den von Dettmeyer et al. (2004) publizierten Grenzwerten für eine Myokarditis von mehr als zehn T-Lymphozyten pro HPF. Auch die als verdächtig geltenden 5 T-Lymphozyten pro HPF werden deutlich



unterschritten (siehe Kapitel 1.2.4). Insgesamt wären nach diesem Grenzwertkonzept im SIDS-Kollektiv zwei Fälle als Myokarditis zu definieren, Fall Nr. 4 und Fall Nr. 75, sowie ein Fall als Myokarditis-verdächtig (Fall Nr. 63). Im Fall Nr. 75 gelingt zwar auch ein erhöhter Nachweis von Leukozyten ( $52,60/\text{mm}^2$ ), ansonsten ist für diesen Fall sowie für Fall Nr. 63 sowohl die Krankengeschichte als auch die weitere Diagnostik unauffällig (siehe Kapitel 4.5.2).

An dieser Stelle stellt sich insgesamt die Frage, ob eine grenzwertüberschreitende Infiltration in einer oder zwei immunhistochemischen Färbungen wie im Fall Nr. 75 ausreicht, um die Diagnose einer Myokarditis zu stellen bzw. ob die immunhistochemische Färbung alleine als Entscheidungsmerkmal für eine Myokarditis überhaupt geeignet ist, oder ob die Diagnose nur in Zusammenschau verschiedener Untersuchungsmethoden gestellt werden kann. Alternativ muss hinterfragt werden, ob das Grenzwertkonzept zur Identifikation einer Myokarditis valide ist (siehe Kapitel 5.6.2.2).

#### 4.3.5 Statistische Signifikanz der immunhistochemischen Ergebnisse

In den bisherigen Ergebnissen wurden im SIDS-Kollektiv höhere Zellzahlen für Leukozyten (LCA) und T-Lymphozyten (CD45-R0) nachgewiesen als im Kontroll-Kollektiv. Daher wird im Folgenden geprüft, ob dieser Unterschied auch statistisch signifikant ist. Die folgende Tabelle stellt die p-Werte für die immunhistochemischen Färbungen dar:

	Alle Fälle	Ohne Myokarditis-Fälle	Ohne auffällige HE-Fälle
<b>LCA</b>			
p-Wert	0,0004	0,0005	0,0009
Unterschied signifikant?	ja	ja	ja
<b>CD68</b>			
p-Wert	0,2416	0,2738	0,3588
Unterschied signifikant?	nein	nein	nein
<b>CD45-R0</b>			
p-Wert	0,2507	0,3008	0,346
Unterschied signifikant?	nein	nein	nein

Tabelle 11: Signifikanzprüfung des Studienkollektivs für die immunhistochemischen Färbungen nach Mann-Whitney-Wilcoxon

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven, unter Annahme eines Signifikanzniveaus von 5 %, ergibt sich nur für die Leukozytenfärbung, die Ergebnisse der Makrophagen- und T-Lymphozytenfärbung sind nicht signifikant verschieden. Die Unterschiede zwischen beiden Kollektiven bleiben auch unter Ausschluss der HE-Myokarditis-Fälle bzw. aller in der HE-Färbung auffälligen SIDS-Fälle konstant. Der Nachweis des signifikanten Unterschiedes in der Leukozytenfärbung führt aufgrund der bereits beschriebenen niedrigen Gesamtinfiltration (siehe Kapitel 4.3.2) zu der Frage, ob der mathematisch beschriebene Unterschied zwischen den beiden Kollektiven auch tatsächlich klinisch relevant ist bzw. ob daraus tatsächlich auf eine erhöhte Myokarditis-Inzidenz im SIDS-Kollektiv geschlossen werden kann (siehe ausführliche Diskussion dazu in Kapitel 5.6.2).

#### **4.3.6 Lokalisation der Infiltrate im Myokard**

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass es zwar vereinzelt zellreiche Fälle gibt, insgesamt ist die Infiltration in beiden Kollektiven aber gering. In der bisherigen Darstellung als durchschnittlich berechnete Infiltration pro Fall, bleibt jedoch unberücksichtigt, dass in der Berechnung dieses fallbezogenen Mittelwertes stark infiltrierte Regionen des Myokards durch andere nicht infiltrierte Regionen des Myokards maskiert werden können.

Daher wird im Folgenden untersucht, ob zelluläre myokardiale Infiltrate an einer der acht standardisierten Probeentnahmestellen bevorzugt nachzuweisen sind. Dazu wird die durchschnittliche Infiltration der einzelnen Probeentnahmestellen A-H getrennt für die drei Färbemethoden untersucht.

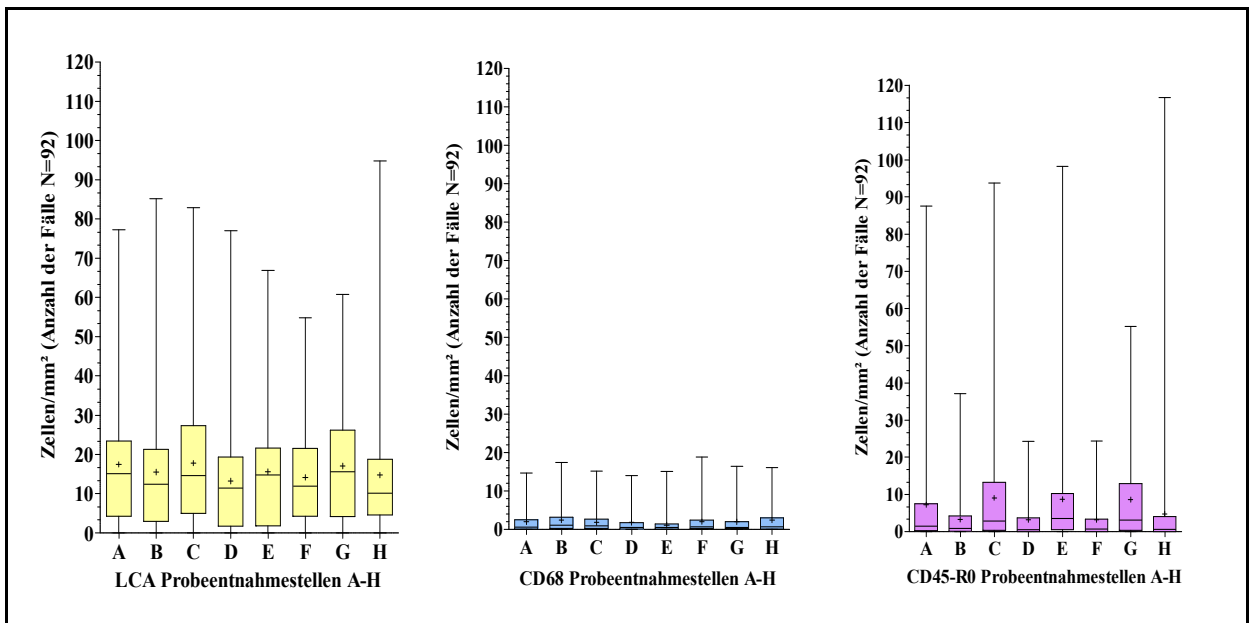


Abbildung 36: Durchschnittliche Infiltration getrennt nach Färbung und Probenentnahmestellen (A-H) im SIDS-Kollektiv

Es zeigt sich, dass es im SIDS-Kollektiv für keine der drei angefärbten Entzündungszellen eine bevorzugte Lokalisation im Myokard gibt. Über alle Probenentnahmestellen hinweg findet sich eine relative Gleichverteilung von Infiltraten. Mediane und Mittelwerte bleiben nahezu gleich. Einzelne Ausreißer können hier v.a. dem Myokarditis-Fall Nr. 4 zugeordnet werden.

Auch für das Kontroll-Kollektiv findet sich keine bevorzugte Lokalisation von Infiltraten:

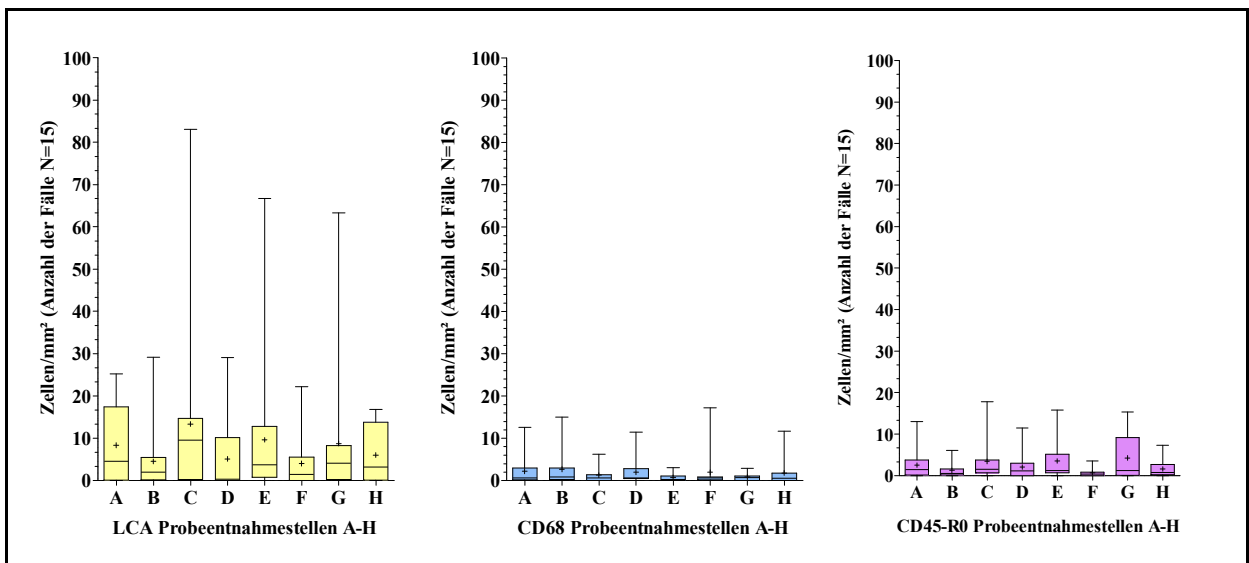


Abbildung 37: Durchschnittliche Infiltration getrennt nach Färbung und Probenentnahmestellen (A-H) im Kontroll-Kollektiv

### 4.3.7 Infiltration in einzelnen Fällen und Probeentnahmestellen

Bei Betrachtung der einzelnen Fälle, losgelöst von der Darstellung des Gesamtkollektivs, fällt in einigen Fällen auf, dass es massive Schwankungen der Infiltrationen von Leukozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten innerhalb eines Falles gibt. Dabei zeigen sich nicht nur massive Schwankungen der Zellzahlen von Probeentnahmestelle zu Probeentnahmestelle, sondern auch innerhalb der ausgezählten Quadratmillimeter einer einzigen Probeentnahmestelle.

Diese Tatsache soll anhand des nachfolgenden Beispielsfalles (Fall Nr. 76) illustriert werden. In diesem Fall ohne anamnestische Besonderheiten liegt eine deutliche Ungleichverteilung der Leukozyten im Myokard vor. Diese variieren zwischen 0 bis 81 Leukozyten/mm<sup>2</sup>. Der Mittelwert über alle acht Probeentnahmestellen beträgt allerdings nur 13 Leukozyten/mm<sup>2</sup> (3,4 Leukozyten/HPF). Daher wäre eine Myokarditis nach den publizierten Grenzwerten sowohl für Erwachsene als auch für Säuglinge auszuschließen (Aretz et al., 1987; Dettmeyer et al., 2004; Edwards et al., 1982; Maisch et al., 2000). Die folgende Abbildung zeigt die durchschnittliche Infiltration der acht Probeentnahmestellen sowie zusätzlich die Infiltration in den zehn ausgezählten Quadratmillimetern der auffälligen Probeentnahmestelle C (Septum interventrikulare, basisnah):

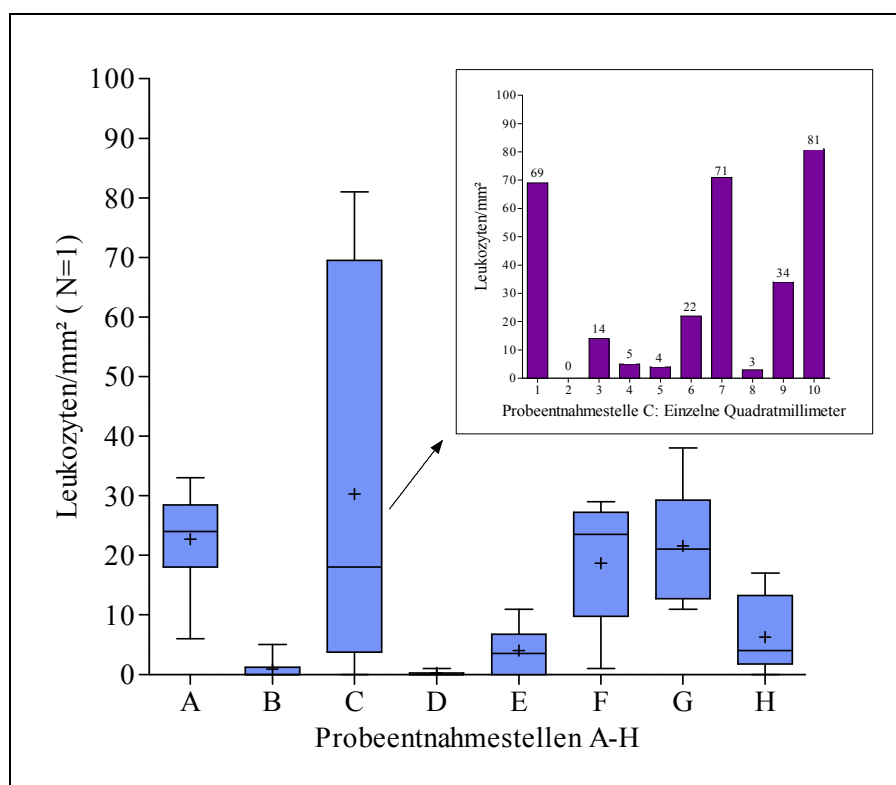


Abbildung 38: Fall Nr. 76, leukozytäre Infiltration der Probeentnahmestellen A-H sowie der einzelnen Quadratmillimeter in der Probeentnahmestelle (C), Septum interventrikulare, basisnah

Auch die folgenden Bilder aus diesem Fall zeigen eindrucksvoll, wie unterschiedlich das mikroskopische Bild mit durchschnittlich nur 13 Zellen pro Quadratmillimeter sein kann. Beide Bilder zeigen die auffällige Probeentnahmestelle C (Septum interventriculare, basisnah) in der LCA-Färbung. Im ersten Bild ist eine normale bis minimal leicht erhöhte Infiltration nachweisbar. Im zweiten Bild zeigt sich eine massive fokale Infiltration von Leukozyten, so dass das Vorliegen einer fokalen myokardialen Dysfunktion möglich scheint. Auch in der Lymphozytenfärbung werden auffällige Ergebnisse in dieser Probeentnahmestelle erreicht. Die konventionell-histologische und die TUNEL-Methode zeigen allerdings unauffällige Ergebnisse, insbesondere auch für die Probeentnahmestelle C.

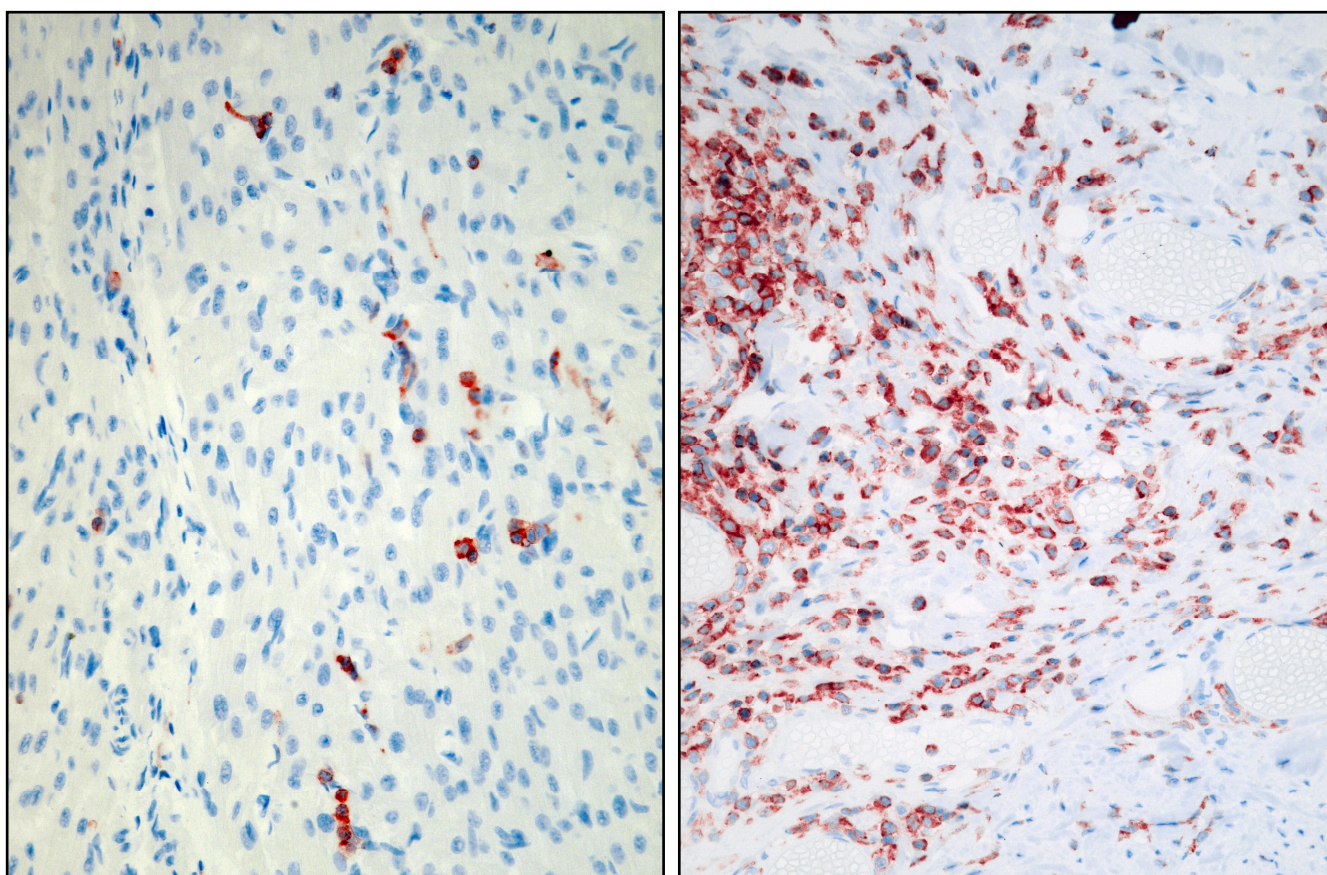


Abbildung 39 und 40: Fall Nr. 76, LCA x 400, unterschiedlich stark ausgeprägte leukozytäre Infiltration im Bereich des Septums interventriculare, basisnah (C)

Dieser Fall wirft die Frage auf, ob der in früheren Studien verwendete Mittelwert pro Fall – als mathematischer Repräsentant für die durchschnittliche Infiltration des Herzens mit Entzündungszellen – überhaupt dazu geeignet ist, eine Aussage über das Vorkommen und die tatsächliche Verteilung von Infiltraten im Myokard zu machen. Daraus ergibt sich aber auch, dass die Eignung des Mittelwertes als Entscheidungskriterium für das Vorliegen einer Myokarditis, wie bisher üb-

lich, fraglich ist und ob das Festlegen eines Grenzwertes, basierend auf diesem Mittelwert pro Fall, valide sein kann (siehe dazu Kapitel 5.6.2.4).

Insgesamt führt dies zwingend zur Frage, wie die immunhistochemischen Ergebnisse sinnvoll quantifiziert bzw. interpretiert werden können, insbesondere der Umgang mit fokalen Infiltraten, die durch unauffälliges umgebendes Myokardgewebe statistisch „vernachlässigt“ werden, muss diskutiert werden (siehe Kapitel 5.6.2.4).

#### 4.3.8 Infiltration und Lebensalter

Die Tatsache, dass der Plötzliche Kindstod vor allem zwischen dem 2. und 4. Lebensmonat auftritt und in dieser Zeit die Konzentration der diaplazentar übertragenen mütterlichen Immunglobuline im Serum abfällt, kann ein Indiz dafür sein, dass Infektionen in dieser Zeit Ursache des Plötzlichen Kindstods sind (siehe Kapitel 1.1.3).

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die zelluläre Infiltration im Myokard besonders in diesem Alterskollektiv signifikant höher ist als im gesamten SIDS-Kollektiv, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass eine Myokarditis in diesem Alter die wahrscheinliche Todesursache ist.

In der folgenden Tabelle wird die durchschnittliche Infiltration der jeweiligen immunhistochemischen Färbemethoden als Mittelwert angegeben, getrennt nach dem Alter der SIDS-Fälle:

Alter in Monaten	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anzahl SIDS- Fälle	8	19	14	11	9	6	4	7	4	4	3	3
Leukozyten/mm <sup>2</sup> (LCA)	11,26	17,96	12,97	15,76	16,29	24,43	17,67	18,29	6,06	8,68	15,05	14,94
Makrophagen/mm <sup>2</sup> (CD68)	2,10	2,48	1,37	2,08	1,54	2,37	3,45	2,16	0,76	0,74	0,74	1,10
Lymphozyten/mm <sup>2</sup> (CD45-R0)	3,64	5,73	2,98	11,33	2,69	4,28	5,28	13,53	6,57	2,96	1,05	4,34

Tabelle 12: Altersabhängige zelluläre Infiltration im SIDS-Kollektiv

Diese altersabhängigen Unterschiede der Infiltration innerhalb einer Färbung sind allerdings unter Annahme eines Signifikanzniveaus von 5 % ( $p \leq 0,05$ ) statistisch nicht signifikant im Vergleich

mit dem Gesamtmittelwert des SIDS-Kollektivs. Dies zeigt, dass besonders in der Altersgruppe von 2-4 Monaten keine erhöhte myokardiale Infiltration nachgewiesen werden kann. Es findet sich folglich trotz der beschriebenen Veränderung des Immunsystems kein Hinweis auf eine erhöhte Myokarditisinzidenz in dieser Altersgruppe.

#### 4.4 Ergebnisse der TUNEL-Methode

##### 4.4.1 Fälle mit Nachweis von apoptotischen Zellen

Die TUNEL-Methode wurde in beiden Kollektiven an dem gesamten, noch in Paraffin eingebetteten, Myokardgewebe angewandt. Im SIDS-Kollektiv konnte Myokard von 88 der 92 Fälle auf apoptotische Zellen untersucht werden, wobei insgesamt 488 verschiedene Myokardgewebeproben angefärbt wurden. Dies entspricht bei maximal acht entnommenen Probeentnahmestellen pro Fall einer Färbequote von 66,3 % aller in der Obduktion entnommenen Proben. Daher kann im SIDS-Kollektiv über 2/3 des gesamten entnommenen Myokardgewebes eine Aussage über das Vorliegen einer Apoptose getroffen werden. Im Kontroll-Kollektiv konnten insgesamt 99 Präparate aus dem asservierten Myokardgewebe der fünfzehn Kontrollfälle angefertigt werden, so dass die Färbequote mit 82,5 % höher ist als im SIDS-Kollektiv.

In den 488 angefärbten Myokardgewebeproben des SIDS-Kollektivs wurden in 41 Präparaten (= 8,4 %) TUNEL-positive Zellen nachgewiesen; 91,6 % aller Präparate sind frei von apoptotischen Myozyten. Auch im Kontroll-Kollektiv wurden mit 94,95 % TUNEL-negativen Präparaten annähernd gleiche Ergebnisse erzielt. Diese Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst:

	SIDS-Kollektiv	Kontroll-Kollektiv
<b>Anzahl angefärbter Myokardproben</b>	488	99
– in % aller entnommen Myokardproben	66,30 %	82,50 %
<b>Myokardproben mit TUNEL-positiven Zellen</b>	41	5
– in % aller gefärbten Myokardproben	8,40 %	5,05 %
<b>Unauffällige Myokardschnitte</b>	447	94
– in % aller gefärbten Myokardproben	91,60 %	94,95 %

Tabelle 13: Anteil TUNEL-positiver und TUNEL-negativer Myokardproben

Die 41 TUNEL-positiven Präparate des SIDS-Kollektivs können abschließend genau 21 SIDS-Fällen zugeordnet werden. Dies bedeutet, dass in 23,86 % der Fälle mindestens in einer Probeentnahmestelle apoptotische Zellen nachgewiesen wurden. Im Kontroll-Kollektiv können die fünf Präparate mit apoptotischen Zellen genau vier Fällen zugeordnet werden, so dass bei einer Gesamtzahl von fünfzehn Fällen sogar 26,67 % aller Fälle apoptotische Zellen enthalten:

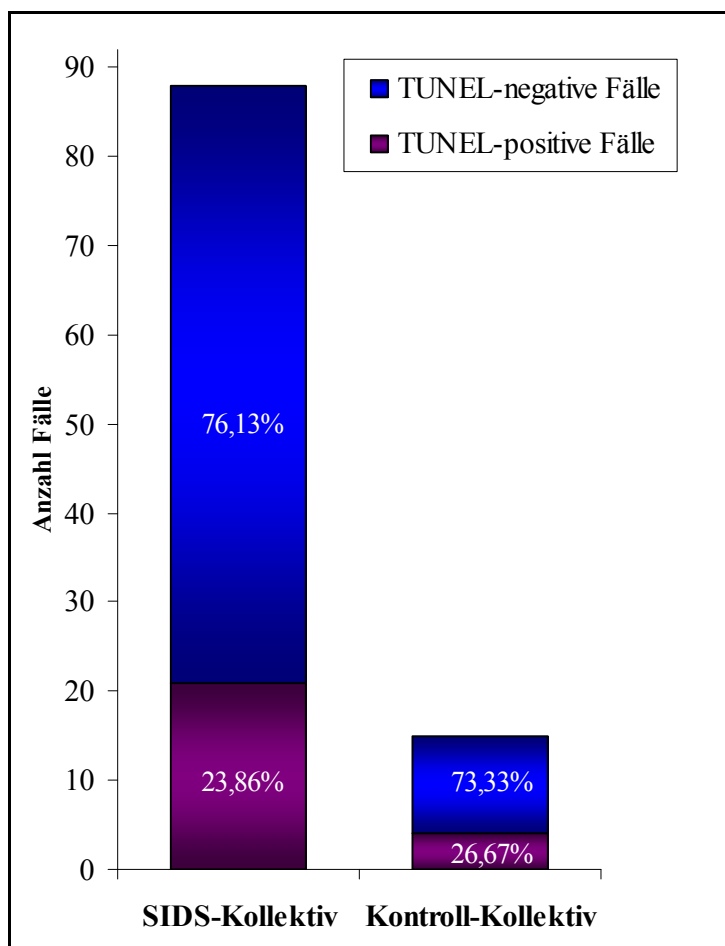


Abbildung 41: Anzahl und Anteil TUNEL-positiver und negativer Fälle beider Kollektive

Daraus ist bereits jetzt zu schließen, dass der Nachweis erhöhter Apoptoseraten in Fällen des Plötzlichen Kindstods nicht erbracht werden konnte, da kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Fälle vorliegt. Die Apoptoserate, d.h. der Anteil der Fälle mit Nachweis von apoptotischen Zellen, ist im Kontroll-Kollektiv sogar um 2,81 Prozentpunkte höher.



#### 4.4.2 Merkmale der TUNEL-positiven Fälle

Das mittlere Alter der Kinder zum Zeitpunkt des Todes liegt im TUNEL-positiven Kollektiv bei  $131,05 \pm 81,34$  Tagen und entspricht damit dem durchschnittlichen Alter des gesamten Studienkollektivs von  $129,79 \pm 92,71$  Tagen.

Vergleicht man die TUNEL-positiven SIDS-Fälle mit den Daten der Obduktionsprotokolle (siehe Kapitel 2.1) zeigt sich, dass nur in drei TUNEL-positiven Fällen keine Besonderheiten in der Vorgeschichte vorlagen (Fall Nr. 3, 87 und 88). In neun der insgesamt 21 TUNEL-positiven Fällen, also in 42,86 %, lag vor Todeseintritt eine Erkältung vor, wobei der Anteil der Erkältungsfälle im gesamten SIDS-Kollektiv bei 34,78 % liegt. Allerdings finden sich in 23 weiteren SIDS-Fällen mit Erkältung keine TUNEL-positiven Zellen. Umgekehrt finden sich also in 28,13 % aller Erkältungsfälle TUNEL-positive Zellen. In je drei TUNEL-positiven Fällen lag eine Frühgeburt (Fall Nr. 8, 57 und 83) oder eine Impfung in unmittelbarer Nähe zum Todestag (Fall Nr. 14, 30 und 57) vor. Jedoch liegen auch hier jeweils in acht Fällen mit den gleichen Merkmalen keine TUNEL-positiven Zellen vor. Mütterlicher Drogenabusus und Tabakkonsum findet sich in insgesamt vier TUNEL-positiven Fällen (Fall Nr. 22, 57, 83 und 86).

Als Todesursache der TUNEL-positiven Kontroll-Fälle wurde in einem Fall Hirntod nach Gewalteinwirkung (Fall Nr. 1), in einem Fall Hirntod nach Sturz (Fall Nr. 2), in einem Fall Strangulation (Fall Nr. 15) und in einem Fall Ertrinken (Fall Nr. 11) festgestellt. Interessanterweise wurden in den beiden Fällen, in denen eine Sepsis als Todesursache vorlag (Fall Nr. 4 und Nr. 10) sowie im Meningitis-Fall (Fall Nr. 3) keine apoptotischen Zellen im Myokard nachgewiesen.

Zusammenfassend zeigt sich also, dass sich die Fälle mit apoptotischen Zellen nicht wesentlich vom Studienkollektiv unterscheiden. Damit konnten keine Merkmale oder Risikofaktoren identifiziert werden, die mit dem Auftreten von apoptotischen Zellen spezifisch assoziiert sind.

#### 4.4.3 Verteilung apoptotischer Zellen im Herzen

In 16 von den insgesamt 25 TUNEL-positiven Fällen finden sich ausschließlich in einer Probenentnahmestelle TUNEL-positive Zellen, dabei sind diese annähernd gleich verteilt in allen untersuchten Bereichen des Herzens (rechter Ventrikel, Septum interventriculare, linker Ventrikel). Da-

her kann keine bevorzugte Lokalisation apoptotischer Myozyten im Herzen nachgewiesen werden. Die übrigen neun Fälle (8 SIDS-Fälle und ein 1 Kontroll-Fall) weisen an mehreren Probeentnahmestellen im Herzen apoptotische Zellen auf (4 x 2, 1 x 3, 1 x 4 und 3 x 5 TUNEL-positive PES). Die drei Fälle mit 5 auffälligen Probeentnahmestellen sind die SIDS-Fälle Nr. 8, 13 und 89 (zur Einordnung der Ergebnisse siehe auch Kapitel 4.5.3). Im Fall Nr. 8 war noch Myokardgewebe von sechs Probeentnahmestellen vorhanden. Es ist davon auszugehen, dass auch im nicht mehr nachzufärbenden Gewebe TUNEL-positive Zellen nachgewiesen werden können, da sowohl in der Leukozytenfärbung (LCA) an den fehlenden Stellen (B und H) deutliche Infiltrate vorlagen als auch in der HE-Färbung in der fehlenden Probeentnahmestelle H (siehe auch Kapitel 4.5.1).

Eine Übersicht über die Verteilung der TUNEL-positiven Präparate im Herzen auf die Probeentnahmestellen A-H ist im Folgenden dargestellt:

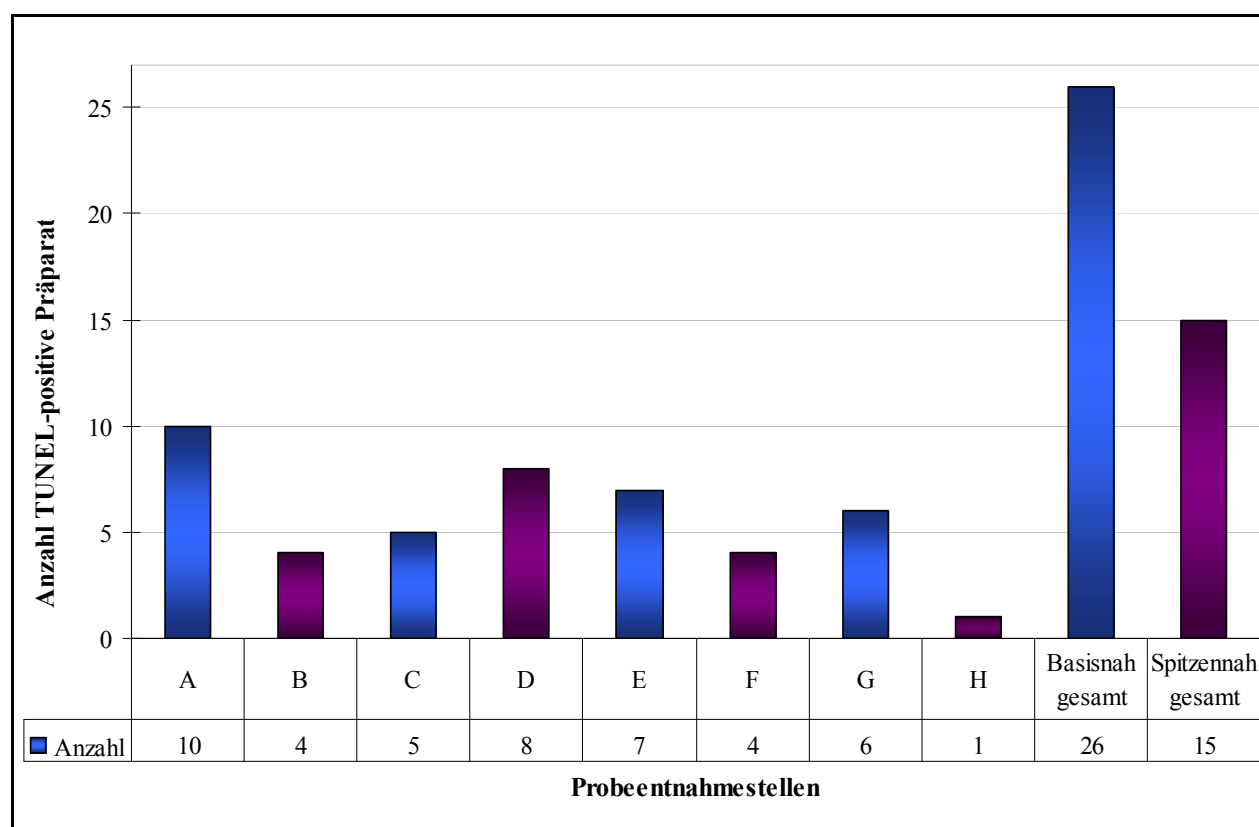


Abbildung 42: Verteilung der TUNEL-positiven Präparate im SIDS-Kollektiv

Es zeigt sich also, dass alle Bereiche des Herzens von der rechten Herzkammer über das Septum bis zur linken Herzkammer apoptotische Zellen aufweisen, mit leichtem Überhang der basisnahen Bereiche des Herzens.

#### 4.4.4 Verteilung apoptotischer Zellen innerhalb eines Präparats

Kennzeichnend für die TUNEL-Färbung ist – im Gegensatz zu den immunhistochemischen Färbungen, wo über das gesamte Präparat immer wieder Infiltrate zu finden sind –, dass typischerweise nur an einer bestimmten Stelle des Gewebeschnittes TUNEL-positive Zellen vorkommen (siehe Kapitel 1.3.3). Die lokale Ausbreitung apoptotischer Zellen variiert dann von wenigen einzelnen Zellen bis zu flächendeckenden, mehrere Quadratmillimeter umfassenden Bereichen. Interessanterweise findet sich regelhaft um diese Stellen herum völlig unauffälliges Myokardgewebe ohne auch nur eine einzige weitere TUNEL-positive Zelle. Das folgende Bild zeigt dieses typische Nebeneinander von apoptotischem und intaktem Myokard innerhalb eines Präparates:

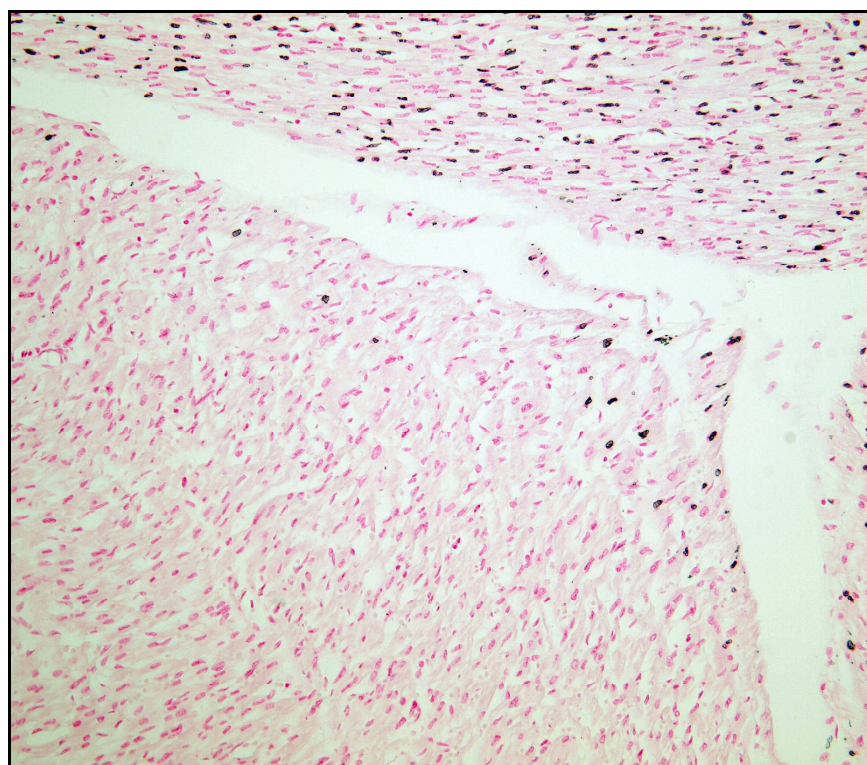


Abbildung 43: TUNEL x 200, Fall Nr. 89, Nebeneinander von Bereichen mit vielen apoptotischen Zellen (schwarz) und intaktem Myokard (Zellkerne rosa), hier rechte Herzkammer, spitzennah (B)

Die Tatsache, dass Apoptose im vorliegenden Kollektiv nur in einzelnen, umschriebenen Bereichen innerhalb des Myokards vorkommt, wurde für das vorliegende Kollektiv im Anschluss an die Auszählung der zehn zufällig, mäanderförmig im Präparat ausgewählten mm<sup>2</sup> zur statistischen Auswertung durch eine weitere Sichtung der Präparate bestätigt. Dabei wurde jedes Präparat erneut vollständig mikroskopisch untersucht, um keine TUNEL-positiven Foci im Präparat zu über-

sehen. Tatsächlich wurde dann in keinem der 488 Präparate auch nur eine weitere TUNEL-positive Zelle gefunden, die in der zufälligen Fächerung nicht berücksichtigt worden war. Dies spricht auch dafür, dass in der neu angewandten Zählmethode durch die Ausweitung der untersuchten Gewebefläche um den Faktor 17 im Vergleich zu den bisherigen Studien eine ausreichend repräsentative Fläche eines Schnittes untersucht wird (siehe auch Kapitel 3.2.1.5 und 5.3).

#### 4.4.5 Anzahl apoptotischer Myozyten/mm<sup>2</sup> im Gesamtkollektiv

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu der Methode der Immunhistochemie. In jedem Präparat wurden in je zehn zufällig ausgewählten Quadratmillimetern die apoptotischen Zellen gezählt. Daraus wurde dann die mittlere Anzahl apoptotischer Zellen pro Quadratmillimeter für die jeweilige Probeentnahmestelle, für den jeweiligen Fall und für das Gesamtkollektiv berechnet. Im Mittel konnten  $15,15 \pm 54,33$  TUNEL-Zellen/mm<sup>2</sup> im SIDS-Kollektiv sowie  $7,03 \pm 16,52$  TUNEL-Zellen/mm<sup>2</sup> im Kontroll-Kollektiv nachgewiesen werden. Damit sind die apoptotischen Zellenzahlen pro Quadratmillimeter im SIDS-Kollektiv mehr als doppelt so hoch.

Die Darstellung als Boxplot analog zur Darstellung in der Immunhistochemie (siehe Kapitel 4.3.1) ist bei den vorliegenden Auswertungsergebnissen nicht sinnvoll, da im SIDS-Kollektiv sowohl Minimum, 25. Perzentile, Median und sogar die 75. Perzentile noch bei „null“-TUNEL-Zellen/mm<sup>2</sup> liegen. Erst durch extrem hohe Zellzahlen in den wenigen TUNEL-positiven Präparaten mit maximal 371 Zellen/mm<sup>2</sup> in SIDS-Fall Nr. 13 ergibt sich der Mittelwert von  $15,15$  TUNEL-Zellen/mm<sup>2</sup>. Eine Übersicht über die statistischen Parameter zeigt die folgende Tabelle:

	SIDS-Kollektiv Gesamt	SIDS-Kollektiv ohne Myokarditis-Fälle	SIDS-Kollektiv ohne auffällige HE-Fälle	Kontroll-Kollektiv
Anzahl der Fälle	88	86	80	15
Minimum*	0	0	0	0
25 % Perzentile*	0	0	0	0
Median*	0	0	0	0
75 % Perzentile*	0	0	0	3,53
Maximum*	371	371	371	58,9
Mittelwert*	15,15	15,05	11,45	7,035
Standardabweichung (SD)*	54,33	54,88	45,36	116,52

Tabelle 14: Ergebnisse der TUNEL-Methode (\*TUNEL-Zellen/mm<sup>2</sup>)

Die Konsequenz dieser Ergebnisse ist, dass der Gesamtmittelwert als Vergleichsparameter nicht geeignet ist, um eine Aussage über die tatsächliche Verteilung von apoptotischen Zellen in beiden Kollektiven zu machen. Im Gegenteil, im SIDS-Kollektiv weist er durch die einzelnen extremen Ausreißer eine deutlich zu hohe mittlere Zellzahl pro mm<sup>2</sup> aus, während er im Kontroll-Kollektiv künstlich nach unten korrigiert wird: Zum einen sind wesentlich mehr Myokardgewebeprobe des Kontroll-Kollektivs vorhanden (82,5 vs. 66,57 % im SIDS-Kollektiv), zum anderen sind diese im Kontroll-Kollektiv auch noch zu einem höheren Prozentsatz TUNEL-negativ (94,95 vs. 91,60 %).

Sinnvoller ist es bei diesen Ergebnissen des TUNEL-Kollektivs, den gegenüber Ausreißern deutlich unempfindlicheren Median beider Kollektive zu vergleichen. Dieser zeigt, dass in beiden Kollektiven in den ersten 50 % der Fälle keine TUNEL-positiven Zellen nachgewiesen werden können.

#### 4.4.6 Anzahl apoptotischer Myozyten/mm<sup>2</sup> im TUNEL-positiven Präparat

Wie gezeigt, eignet sich der Mittelwert des Gesamtkollektivs nicht, um eine Aussage über die tatsächliche Verteilung der TUNEL-positiven Zellen zu machen. Daher ist es gerade für diese Färbung mit der typischen Clusteranordnung und den extremen Ausreißern interessant, sich die Anzahl der apoptotischen Zellen pro Quadratmillimeter ausschließlich in den TUNEL-positiven Probeentnahmestellen unter Ausschluss der TUNEL-negativen Präparate anzuschauen.

Die Anzahl apoptotischer Zellen pro Quadratmillimeter ausschließlich in den positiven Probeentnahmestellen variiert von 2,10/mm<sup>2</sup> bis 753,10/mm<sup>2</sup>. Unter Vernachlässigung der negativen Fälle ergeben sich folgende korrigierte Mittelwerte:

	Anzahl Präparate	Mittelwert	Standardabweichung (SD)
SIDS-Kollektiv Gesamt	41	187,3*	±196,0*
SIDS-Kollektiv ohne Myokarditis-Fälle	40	188,2*	±198,4*
SIDS-Kollektiv ohne auffälligen HE-Fälle	34	158,4*	±166,7*
Kontroll-Kollektiv	5	142,7*	±150,4*

Tabelle 15: Statistisches Ergebnis der TUNEL-positiven Präparate (\*TUNEL-Zellen/mm<sup>2</sup>)

Die folgende Boxplot-Darstellung dieser korrigierten Ergebnisse zeigt, dass sich beide Kollektive letztlich vor allem durch die Höhe der Ausreißer unterscheiden.

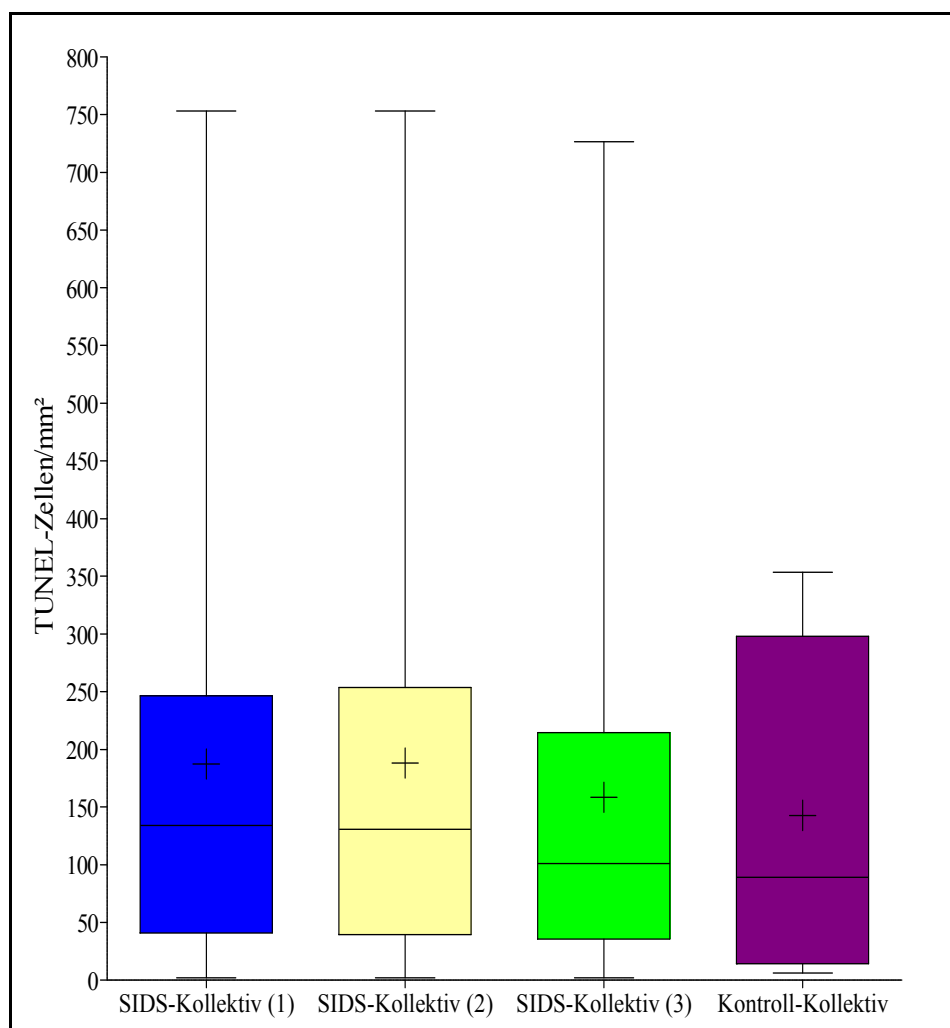


Abbildung 44: Boxplot-Darstellung der TUNEL-positiven Präparate im gesamten SIDS-Kollektiv (1, blau), unter Ausschluss der HE-Myokarditis-Fälle (2, gelb), unter Ausschluss aller HE-auffälligen Fälle (3, grün) und für das Kontroll-Kollektiv (lila)

Diese Abbildung stellt allerdings noch nicht dar, wie hoch die Anzahl der apoptotischen Myozyten in den einzelnen TUNEL-positiven Präparaten ist. Daher wird in der folgenden Abbildung für beide Kollektive gemeinsam für jedes der insgesamt 46 TUNEL-positiven Präparate die Anzahl der apoptotischen Myozyten dargestellt, sortiert nach Höhe der Zellzahlen pro Quadratmillimeter. Farblich gesondert hervorgehoben sind zum einen der Mittelwert des jeweiligen Kollektivs und zum anderen zur Einordnung die Ergebnisse des Myokarditis-Falles Nr. 4 (grau), der Myokarditis-Fall Nr. 10 weist keine apoptotischen Zellen auf.

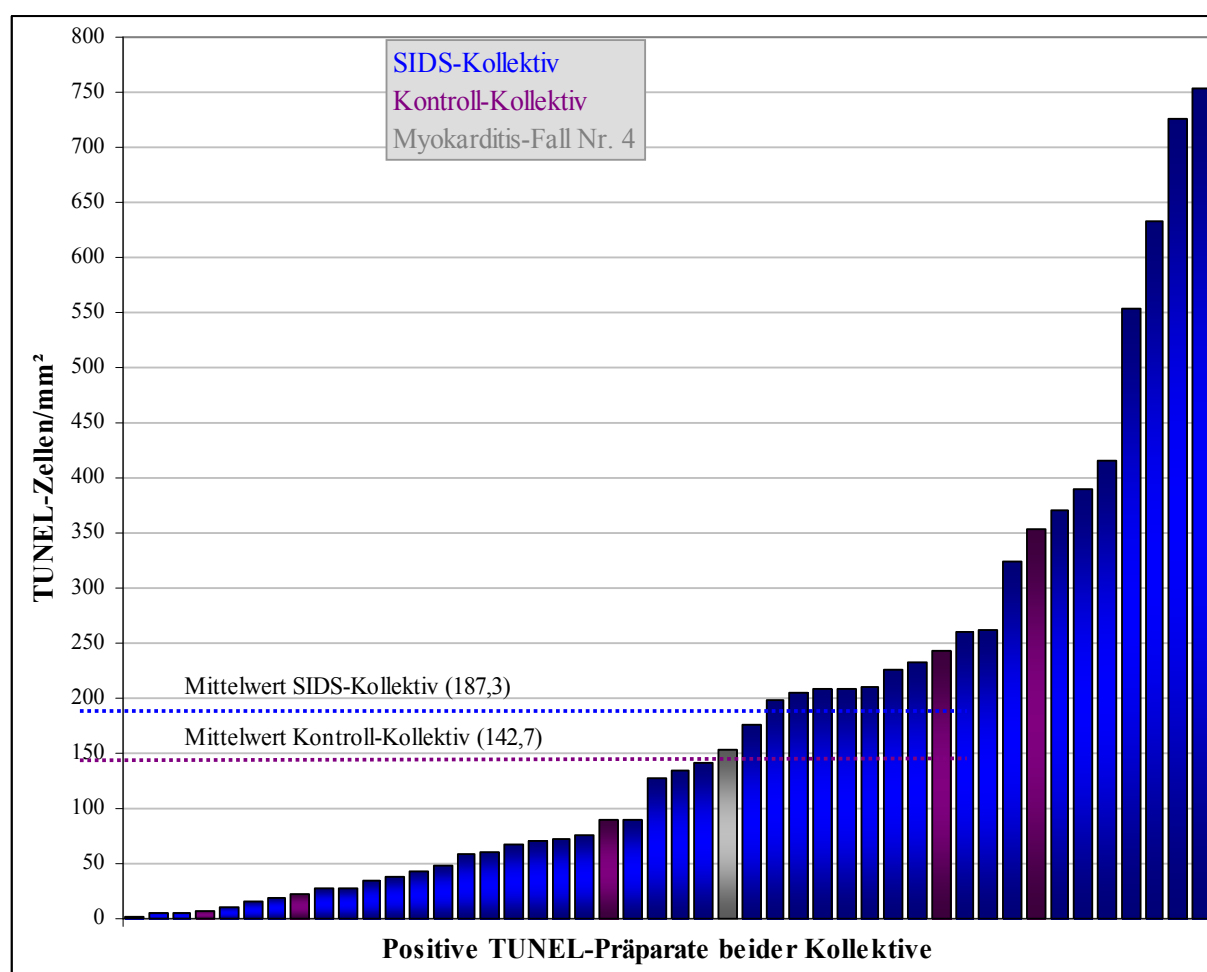


Abbildung 45: Mittlere Anzahl apoptotischer Zellen der TUNEL-positiven Probeentnahmestellen, gemittelt über 10 ausgezählte Quadratmillimeter pro Probeentnahmestelle.

Der Myokarditis-Fall Nr. 4 liegt mit 154 TUNEL-Zellen/mm<sup>2</sup> in dem TUNEL-positiven Präparat (PES E) zwischen den Mittelwerten beider Kollektive. Die weitaus höchsten apoptotischen Zellzahlen werden für den SIDS-Fall Nr. 8 mit durchschnittlich 753,10 Zellen/mm<sup>2</sup> (PES D) und 632 Zellen/mm<sup>2</sup> (PES A) ausgewiesen. Ebenfalls hohe Zellzahlen liegen im SIDS-Fall Nr. 13 mit 552,7 Zellen/mm<sup>2</sup> (PES A) und 726,30 Zellen/mm<sup>2</sup> (PES B) vor.

Damit zeigt sich im Vergleich zu den immunhistochemischen Verfahren, dass trotz nahezu identischer Mittelwerte für das Gesamtkollektiv in der TUNEL-Färbung und der LCA-Färbung (15,15 TUNEL-Zellen/mm<sup>2</sup> vs. 15,69 Leukozyten/mm<sup>2</sup>) eine völlig andere Verteilung der positiven Zellen vorliegt. Die Zellzahlen sind, sofern ein Präparat an einer Stelle positiv ist, mit mehreren hundert apoptotischen Zellen/mm<sup>2</sup>, um ein Vielfaches höher als in der Immunhistochemie. Die ma-

ximale Anzahl gefärbter Zellen in einem positiven Präparat liegt in der TUNEL-Methode bei 753,10 TUNEL-Zellen/mm<sup>2</sup>.

Da Apoptose typischerweise lokal begrenzt vorkommt und über 90 % der Präparate negativ sind, ist der Mittelwert der TUNEL-Färbung zu niedrig und sagt nichts über die tatsächliche Verteilung aus. In der Immunhistochemie dagegen, insbesondere in der LCA-Färbung, finden sich in nahezu jedem Präparat Leukozyten. Die Anzahl schwankt zwar auch erheblich von PES zu PES und von Quadratmillimeter zu Quadratmillimeter, insgesamt sind aber wesentlich weniger Leukozyten/mm<sup>2</sup> zu finden. Eine massive Infiltration mit weit über 100 Leukozyten/mm<sup>2</sup> findet sich in keinem Präparat, die maximale Infiltration in einer PES liegt bei 94,8 Leukozyten/mm<sup>2</sup> im Myokarditis-Fall Nr. 4. Außerdem ist die Verteilung der Infiltrate im Vergleich mit der TUNEL-Methode deutlich regelmäßiger und nicht so typisch auf einen bestimmten Bereich begrenzt.

Das mikroskopische Bild TUNEL-positiver Präparate mit ihren extrem hohen Zellzahlen wird im Folgenden durch verschiedene Bilder in 200facher und 400facher Vergrößerung veranschaulicht:

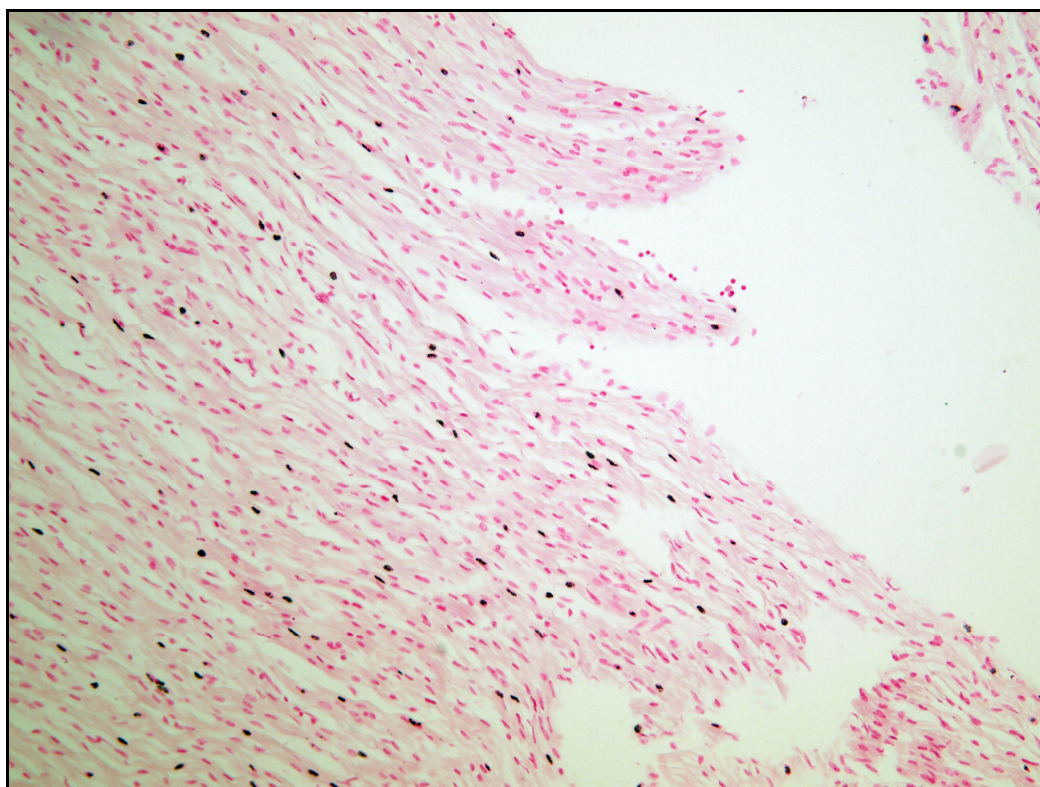


Abbildung 46: TUNEL x 200, Fall Nr. 89, Septum interventrikuläre, spitzennah (D), mäßige Apoptose, für das gesamte Präparat wurden durchschnittlich 28,10 Zellen/mm<sup>2</sup> ausgewiesen.



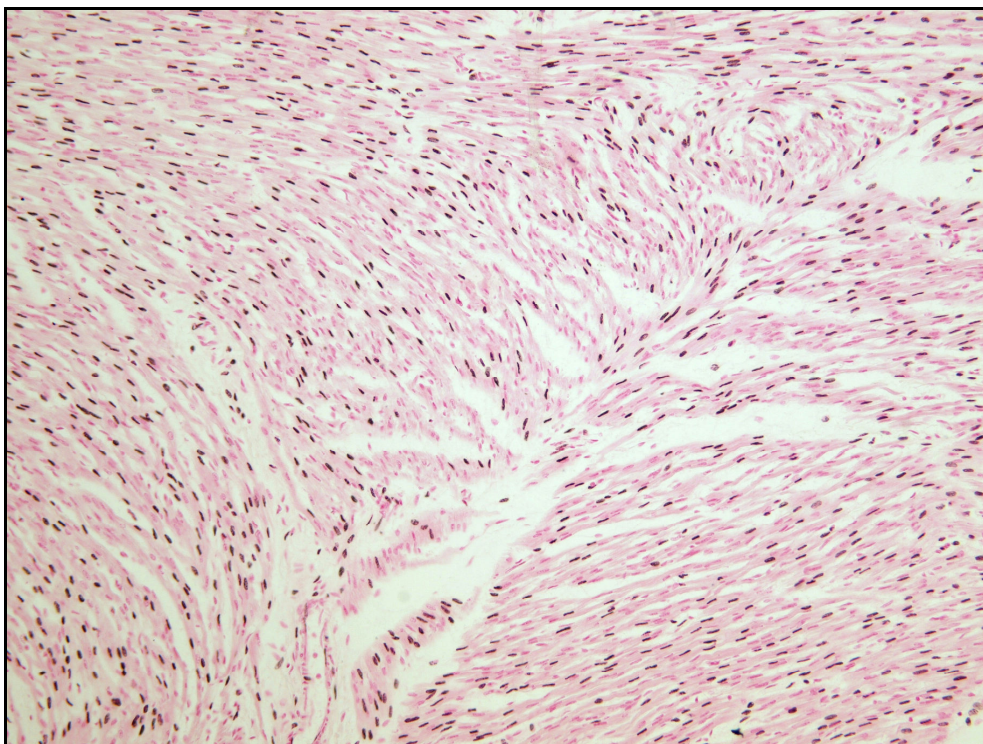


Abbildung 47: TUNEL x 200, Fall Nr. 13, Hinterwand linke Herzkammer, basisnah (G), massive Apoptose. Im Ganzen wurde für das Präparat durchschnittlich 232 Zellen/mm<sup>2</sup> ausgewiesen, dabei schwanken die Zellzahlen der einzelnen mm<sup>2</sup> zwischen 53 und 591 Zellen/mm<sup>2</sup>.

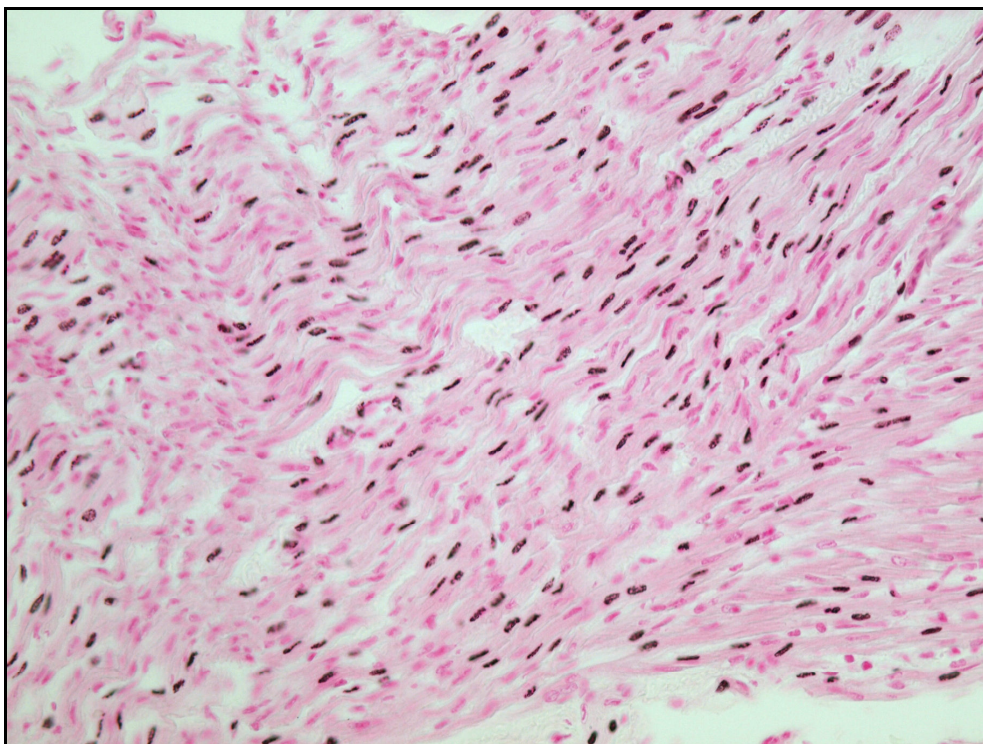


Abbildung 48: TUNEL x 400, Fall Nr. 13, Hinterwand linke Herzkammer, basisnah (G)

#### 4.4.7 Statistische Signifikanz der TUNEL-Ergebnisse

Analog zur statistischen Signifikanzprüfung der immunhistochemischen Verfahren wurden auch die quantitativen Auszählergebnisse des TUNEL-Verfahrens in beiden Kollektiven auf Signifikanzunterschiede untersucht:

	Alle Fälle	Ohne Myokarditis-Fälle	Ohne auffällige HE-Fälle
<b>TUNEL Gesamtkollektiv</b>			
p-Wert	0,9011	0,8528	0,7666
Unterschiede signifikant?	nein	nein	nein

Tabelle 16: Signifikanzprüfung aller Fälle auf Basis der Mittelwerte pro Fall

Es zeigt sich, dass es zwischen beiden Kollektiven im TUNEL-Verfahren unter der Annahme eines Signifikanzniveaus von 5 % keine statistisch signifikanten Unterschiede gibt. Wie schon dargestellt, ist der Mittelwert pro Fall aufgrund der vielen negativen Präparate in dieser Methode allerdings nicht uneingeschränkt als Vergleichskriterium geeignet. Daher wurde in einem zweiten Schritt nur für die TUNEL-positiven Präparate untersucht, ob es zwischen beiden Kollektiven im Falle des Apoptosenachweises einen statistisch signifikanten Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Zellen gibt:

	Alle Fälle	Ohne Myokarditis-Fälle	Ohne auffällige HE-Fälle
<b>TUNEL nur positive Präparate</b>			
p-Wert	0,7241	0,7315	0,9832
Unterschiede signifikant?	nein	nein	nein

Tabelle 17: Signifikanzprüfung auf Basis der positiven Präparate in beiden Kollektiven

Letztlich kann also, wie bereits vermutet, in Fällen des Plötzlichen Kindstods keine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu einem altersgleichen Kontroll-Kollektiv nachgewiesen werden, die Ergebnisse zwischen beiden Kollektiven bleiben auch unter Ausschluss der HE-Myokarditis-Fälle bzw. aller in der HE-Färbung auffälligen SIDS-Fälle konstant.

## 4.5 Vergleich der Ergebnisse aller Methoden

### 4.5.1 Auffällige SIDS-Fälle der HE-Färbung

Die neun SIDS-Fälle, die in der konventionellen Färbung auffällig waren, können unterschieden werden in die zwei Myokarditis-Fälle (Fall Nr. 4 und Nr. 10), die in allen Probeentnahmestellen sämtliche Kriterien einer Myokarditis erfüllen sowie in die übrigen Fälle (Fall Nr. 2, Nr. 8, Nr. 9, Nr. 36, Nr. 39, Nr. 45 und Nr. 47), die nur einzelne Kriterien einer Myokarditis erfüllen bzw. nur an einzelnen Probeentnahmestellen auffällig waren (siehe Kapitel 4.2). Für diese Fälle werden die Ergebnisse der DALLAS-Kriterien im Folgenden mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Verfahren und der TUNEL-Methode verglichen.

SIDS-Fälle mit isoliertem Ödemnachweis (Fall Nr. 9, Nr. 45 und Nr. 47):

In den Fällen Nr. 9 und Nr. 47 finden sich in allen immunhistochemischen Verfahren nur sehr niedrige Zellzahlen pro Quadratmillimeter. Allerdings finden sich im Fall Nr. 9 apoptotische Zellen im Bereich des Septums interventrikuläre, spitzennah (siehe nachfolgende Abbildung). In diesem Fall war das Kind vor seinem Tod an einer Erkältung erkrankt, ansonsten ist die Vorgeschichte unauffällig.

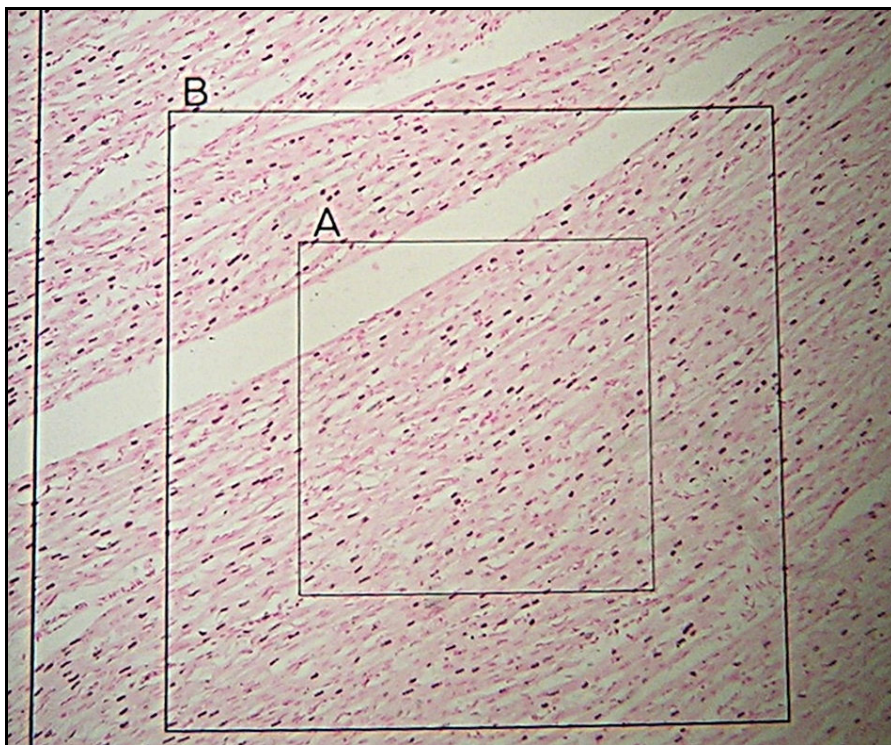


Abbildung 49: Fall Nr. 9, TUNEL x 100, mikroskopischer Myokardausschnitt mit vielen apoptotischen Zellen (schwarz) im Bereich des Septums interventrikuläre, spitzennah (D)

Dagegen konnte für den Fall Nr. 45 in allen Probeentnahmestellen A-H eine erhöhte Infiltration mit Leukozyten (LCA) nachgewiesen werden, im Schnitt finden sich 36,39 Leukozyten/mm<sup>2</sup>. Makrophagen und T-Lymphozyten sind nicht vermehrt und apoptotische Zellen sind gar nicht nachweisbar. In der Anamnese finden sich keine Hinweise auf eine Infektion. Exemplarisch ist im folgenden Bild die Infiltration mit Leukozyten dargestellt. Da die Infiltration mit 36,39 Leukozyten/mm<sup>2</sup> (=8,64 Leukozyten/HPF) zwar erhöht ist, aber zum einen noch deutlich unter den publizierten Grenzwerten von 15 Leukozyten/HPF liegt (siehe Kapitel 1.2.4.) sowie zum anderen isoliert ist ohne Nachweis von Zelluntergang oder weiteren Infiltraten anderer Zellreihen, ist in diesem Fall am ehesten nicht von einer Myokarditis als Todesursache auszugehen.

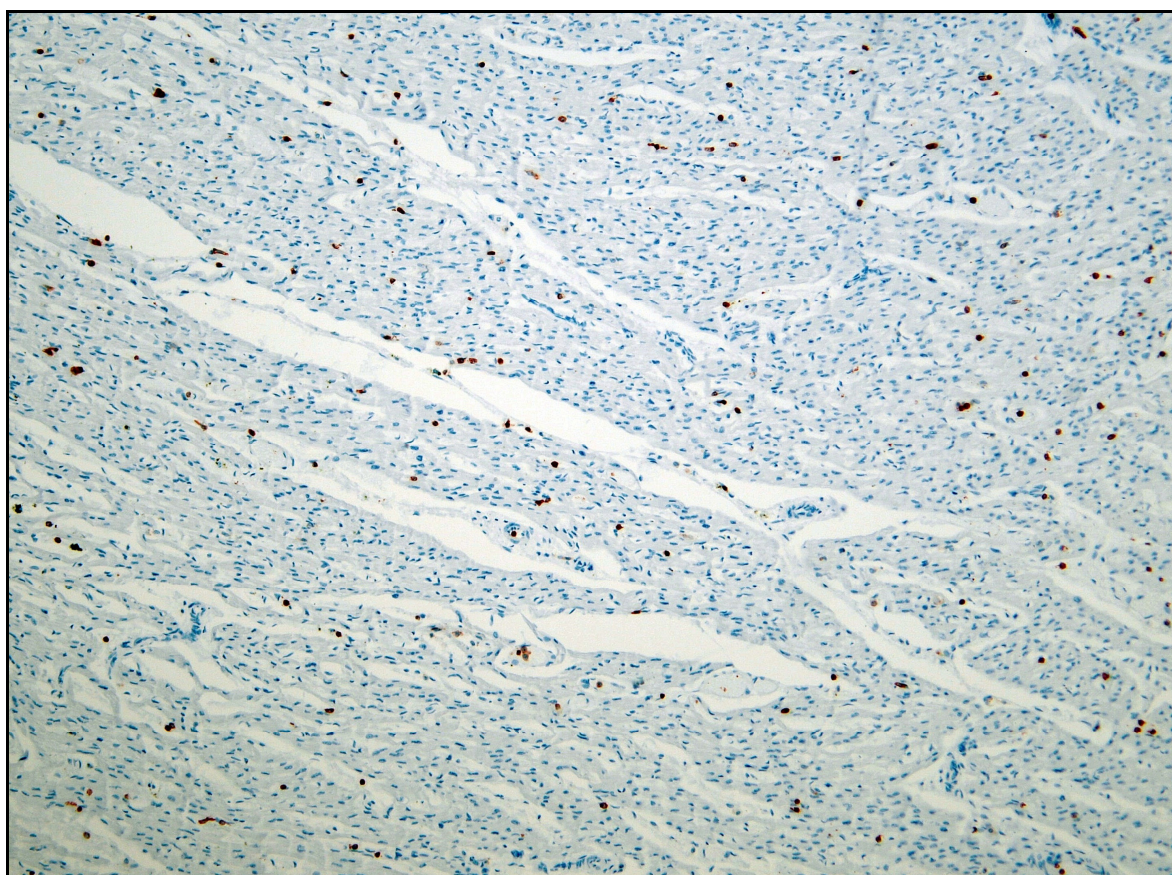


Abbildung 50: LCA x 100, Fall Nr. 45, ubiquitäre leukozytäre Infiltration im Myokard, Vorderwand linke Herzkammer, spitzennah (F)

SIDS-Fälle mit isoliertem Nachweis von Infiltraten (Fall Nr. 2, Nr. 36 und Nr. 39):

In diesen Fällen zeigen sich in der HE-Färbung fokal an einzelnen Stellen zelluläre Infiltrate. Immunhistochemisch kann dies weder für die in der HE-Färbung auffälligen noch für die übrigen Probeentnahmestellen dieser Fälle bestätigt werden. Die Zellzahlen pro Quadratmillimeter liegen in allen drei Färbungen im Bereich der Mittelwerte des Gesamtkollektivs und sind als unauffällig

zu werten. In der TUNEL-Methode finden sich in keinem Fall apoptotische Zellen. Nur im Fall Nr. 2 findet sich eine Erkältung in der Vorgeschichte.

#### SIDS-Fall Nr. 8

In diesem Fall konnten sowohl Ödeme als auch fokale zelluläre Infiltrate in drei der acht Probeentnahmestellen (C, G und H) nachgewiesen werden. Da keine Nekrose nachweisbar war und in den übrigen Probeentnahmestellen keine Auffälligkeiten nach den DALLAS-Kriterien zu finden waren, wurde die Diagnose einer Myokarditis nach alleiniger Auswertung dieser Methode nicht gestellt.

In den immunhistochemischen Methoden zeigt dieser Fall in der Leukozytenfärbung (LCA) eine deutliche Infiltration, wobei Makrophagen- und T-Lymphozytenfärbung unauffällig sind. Die durchschnittliche Infiltration über alle Probeentnahmestellen liegt bei 33,96 Leukozyten/mm<sup>2</sup>.

Auch in der TUNEL-Färbung gelingt der Nachweis von apoptotischen Zellen und zwar in nahezu allen vorhandenen Probeentnahmestellen (A, C, D, E und F, siehe Kapitel 4.4.3). Dabei weist dieser Fall mit durchschnittlich 753,10 Zellen/mm<sup>2</sup> im spitzennahen Septum interventrikuläre (D) sogar die höchste Zellzahl aller positiven Präparate auf (siehe Kapitel 4.4.6). Für die Probeentnahmestellen B und H war kein asserviertes Myokardgewebe mehr vorhanden, allerdings ist davon auszugehen, dass auch an diesen Stellen apoptotische Zellen nachgewiesen werden können, da sowohl in der Leukozytenfärbung (LCA) an beiden Stellen deutlich erhöhte Zellzahlen nachgewiesen wurden als auch in der HE-Färbung in der Probeentnahmestelle H eine erhöhte zelluläre Infiltration zu sehen war.

Die folgende Grafik zeigt die Ergebnisse der LCA-Färbung (lila) und der TUNEL-Methode (blau) für diesen Fall, getrennt nach den Probeentnahmestellen A-H. Dabei wird auch grafisch deutlich, dass dieser Fall in beiden Methoden massiv auffällig ist, mit Zellzahlen, die die jeweiligen Mittelwerte deutlich überschreiten:

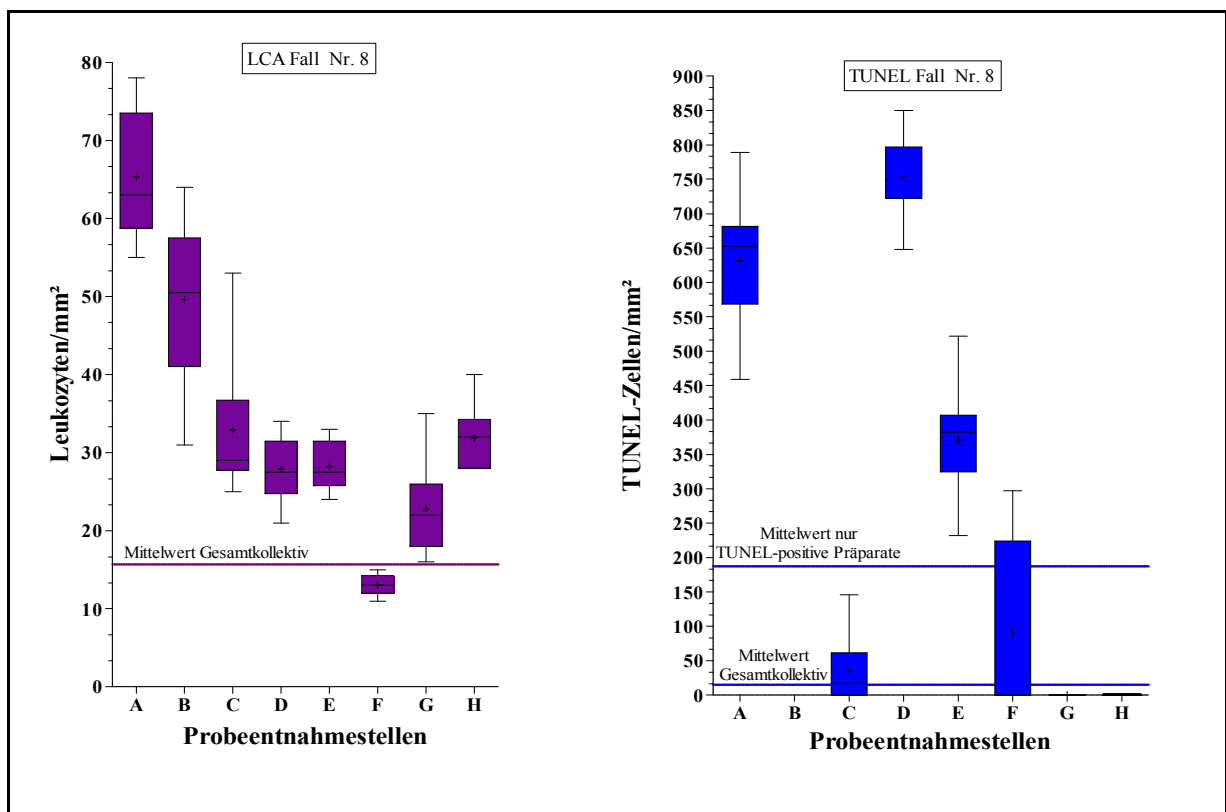


Abbildung 51: Fall Nr. 8. Ergebnisse der LCA und der TUNEL-Methode

Die folgenden Bilder zeigen die tatsächliche Ausprägung der TUNEL-Färbung dieses Falles:

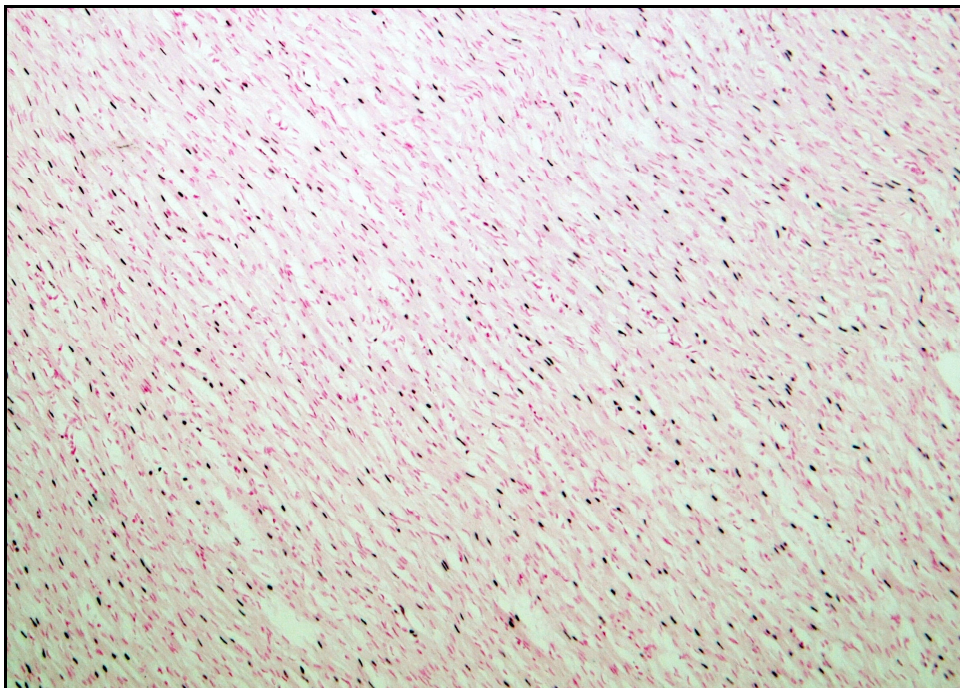


Abbildung 52: TUNEL x 100, Fall Nr. 8, Myokard mit vielen apoptotischen Zellen (schwarz) im Bereich der Vorderwand linke Herzkammer, basisnah (E)

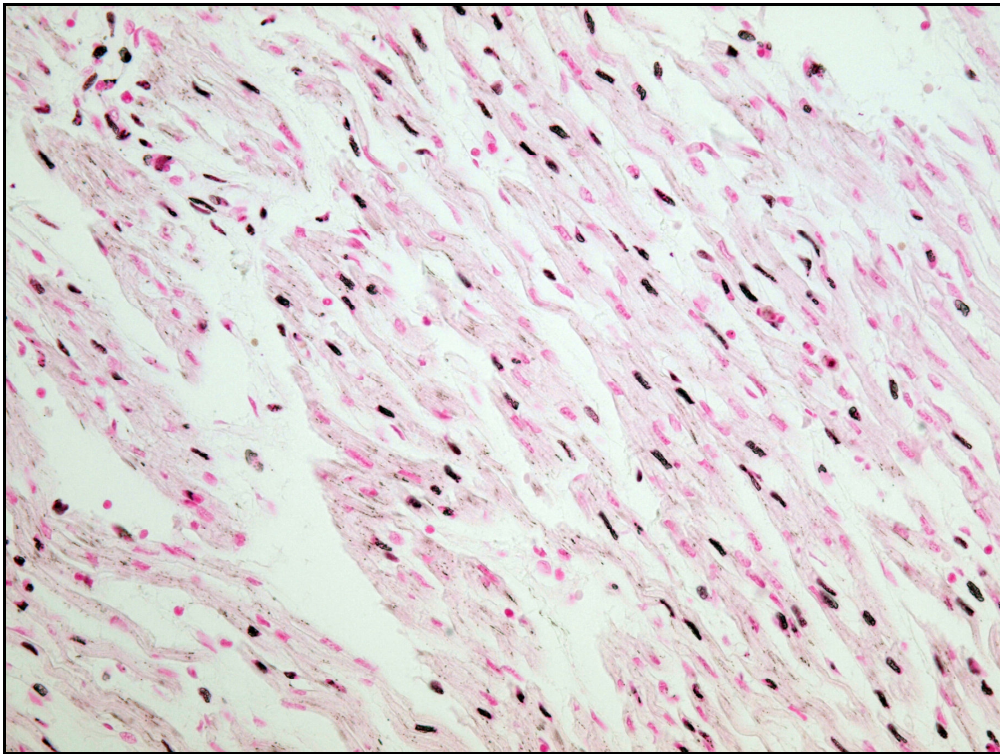


Abbildung 53: TUNEL x 400, Fall Nr. 8, neben intaktem Myokardgewebe (blass-rosa) auch hier massenhaft apoptotische Zellen (schwarz) im Bereich der Herzkammerwand rechts, basisnah (A)

Zusammenfassend ist daher unter Berücksichtigung sämtlicher Ergebnisse zu diskutieren, ob in diesem Fall nicht doch von dem Vorliegen einer Myokarditis auszugehen ist, zumal neben Infiltraten und Ödemen in der konventionellen Diagnostik das Vorliegen von Leukozyteninfiltraten immunhistochemisch bestätigt werden konnte und als weiteres wichtiges Myokarditiskriterium auch Zelluntergang in Form von Apoptose nachgewiesen wurde.

#### SIDS-Fälle mit Nachweis einer Myokarditis (Fall Nr. 4 und Nr. 10):

Im vorliegenden Kollektiv konnte für diese zwei SIDS-Fälle eine eindeutige Myokarditis im Sinne der DALLAS-Kriterien mit histologischen Auffälligkeiten in allen acht Probeentnahmestellen nachgewiesen werden.

Aus den Obduktionsprotokollen (siehe Kapitel 2.1) geht hervor, dass im Fall Nr. 4 dem Tod eine Erkältung vorausging. Das Kind verstarb im Dezember im Alter von 8 Monaten. Der Fall Nr. 10 zeigt keine Besonderheiten in der Vorgeschichte. Dieses Kind verstarb im Juni im Alter von 4 Monaten.

Immunhistochemisch bestätigt sich im Fall Nr. 4 das Vorliegen massivster Infiltrate. Dieser Fall ist mit Abstand der zellreichste Fall, sowohl was die durchschnittliche Infiltration mit Leukozyten ( $64,30$  Leukozyten/ $\text{mm}^2$ ) als auch mit T-Lymphozyten ( $75,80$  T-Lymphozyten/ $\text{mm}^2$ ) betrifft (siehe Kapitel 4.3.2 und Kapitel 4.3.4). Lediglich Makrophagen sind nicht vermehrt nachweisbar.

Die folgenden Bilder von verschiedenen Probeentnahmestellen geben einen Eindruck von der Infiltration mit T-Lymphozyten und Leukozyten in diesem Fall mit zum Teil nahezu unzählbar vielen Entzündungszellen pro Quadratmillimeter und bestätigen zweifelsfrei die Diagnose einer Myokarditis.

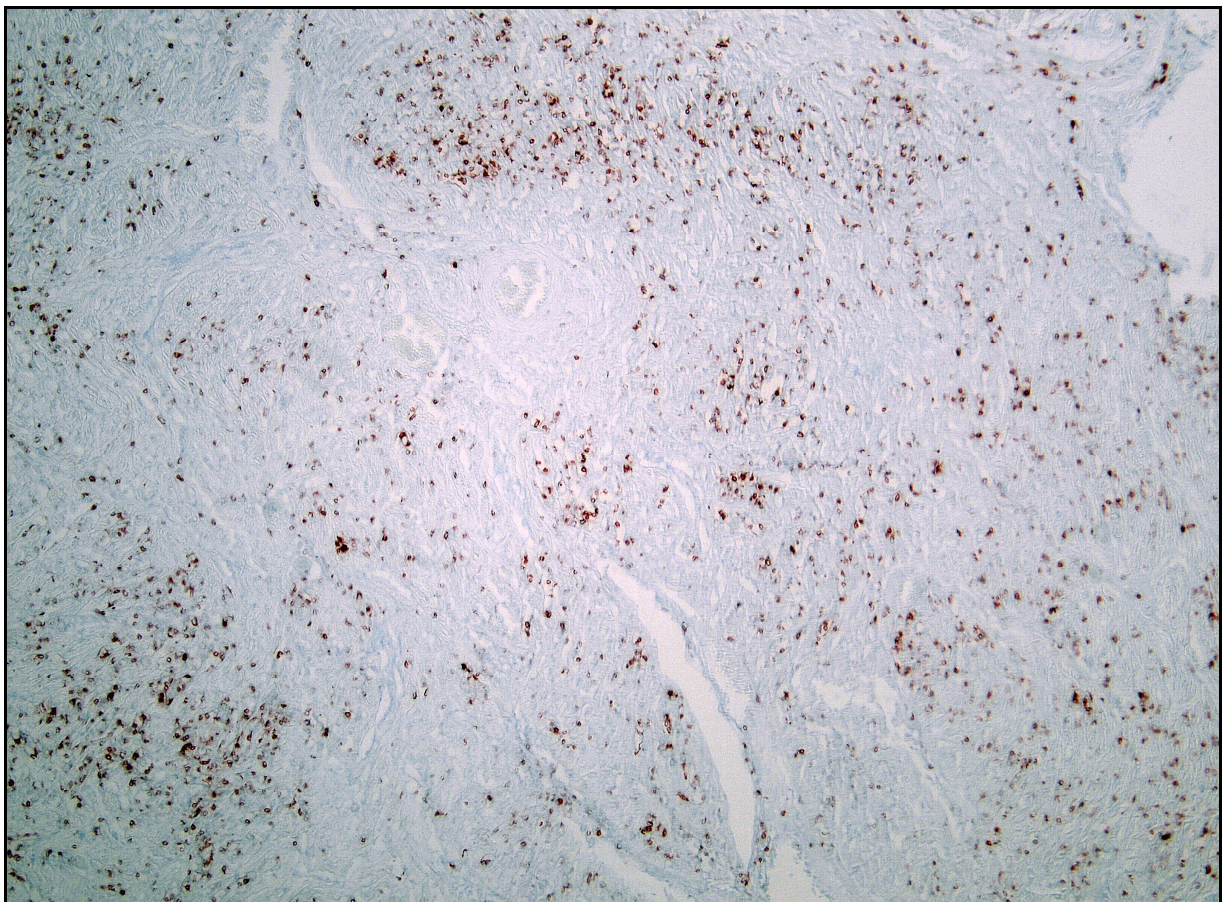


Abbildung 54: CD45-R0 x 100, Fall Nr. 4, massive lymphozytäre Infiltration (rote Zellen) im Bereich des Septums interventriculare, basisnah (C)



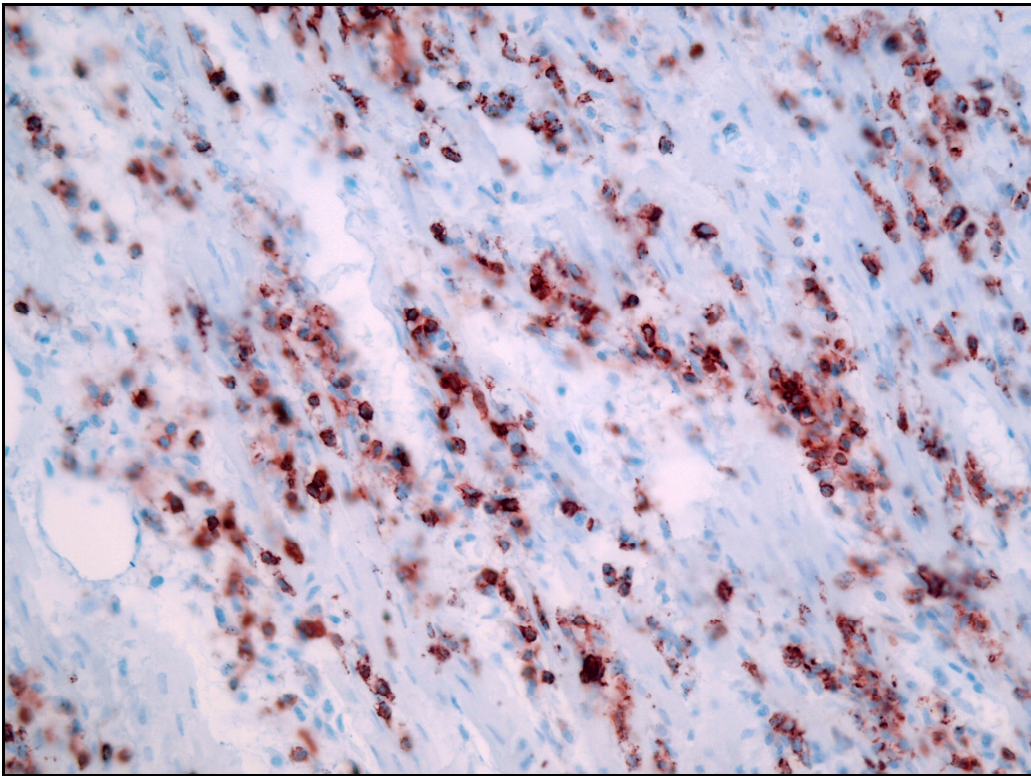


Abbildung 55: CD45-R0 x 400, Fall Nr. 4, massive lymphozytäre Infiltration (rote Zellen) im Bereich der Hinterwand linke Herzkammer, spitzennah (H)

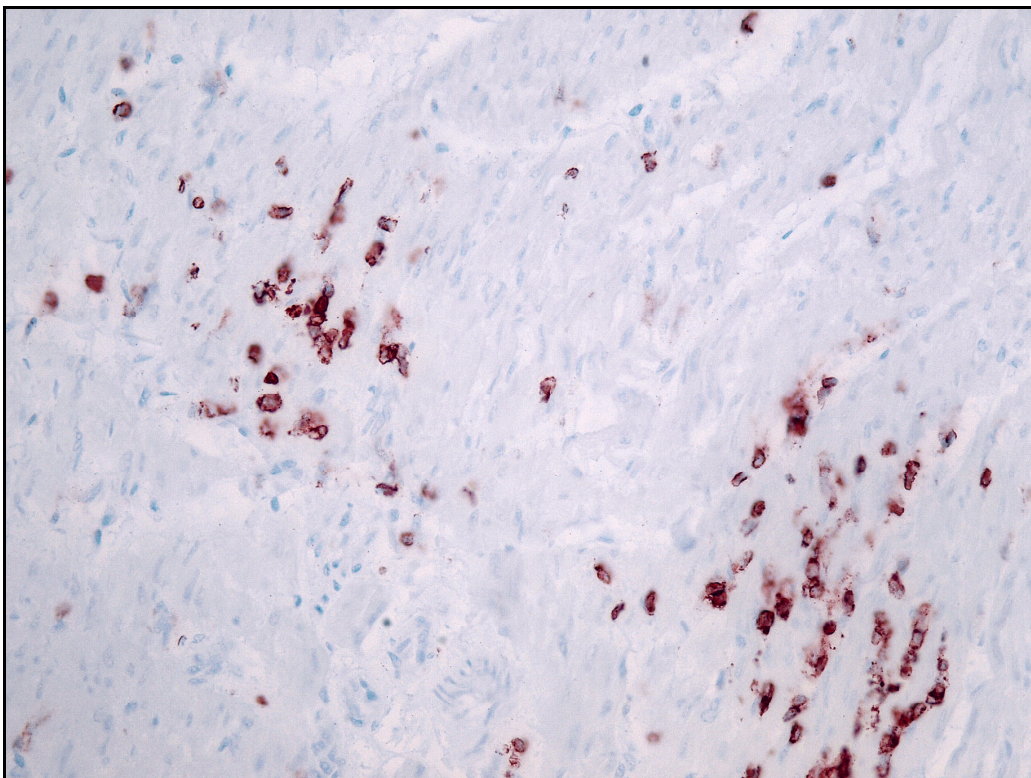


Abbildung 56: LCA x 400, Fall Nr. 4, ebenfalls deutliche leukozytäre Infiltrate (rote Zellen) im Bereich der Herzkammerwand rechts, spitzennah (B)

Für den Fall Nr. 10 ergeben sich dagegen völlig unauffällige immunhistochemische Ergebnisse für Leukozyten und Makrophagen, lediglich die T-Lymphozyten sind mit 10,34/mm<sup>2</sup> (=2,46 T-Lymphozyten/HPF) gegenüber dem Mittelwert des Gesamtkollektivs von 5,7 leicht erhöht, allerdings ist dieser Wert als normwertig anzusehen (Aretz et al., 1987; Foley und Edwards, 1988, siehe auch Grenzwertdiskussion Kapitel 5.6.2.2).

Die TUNEL-Methode weist ebenfalls nur im Fall Nr. 4 apoptotische Zellen nach:

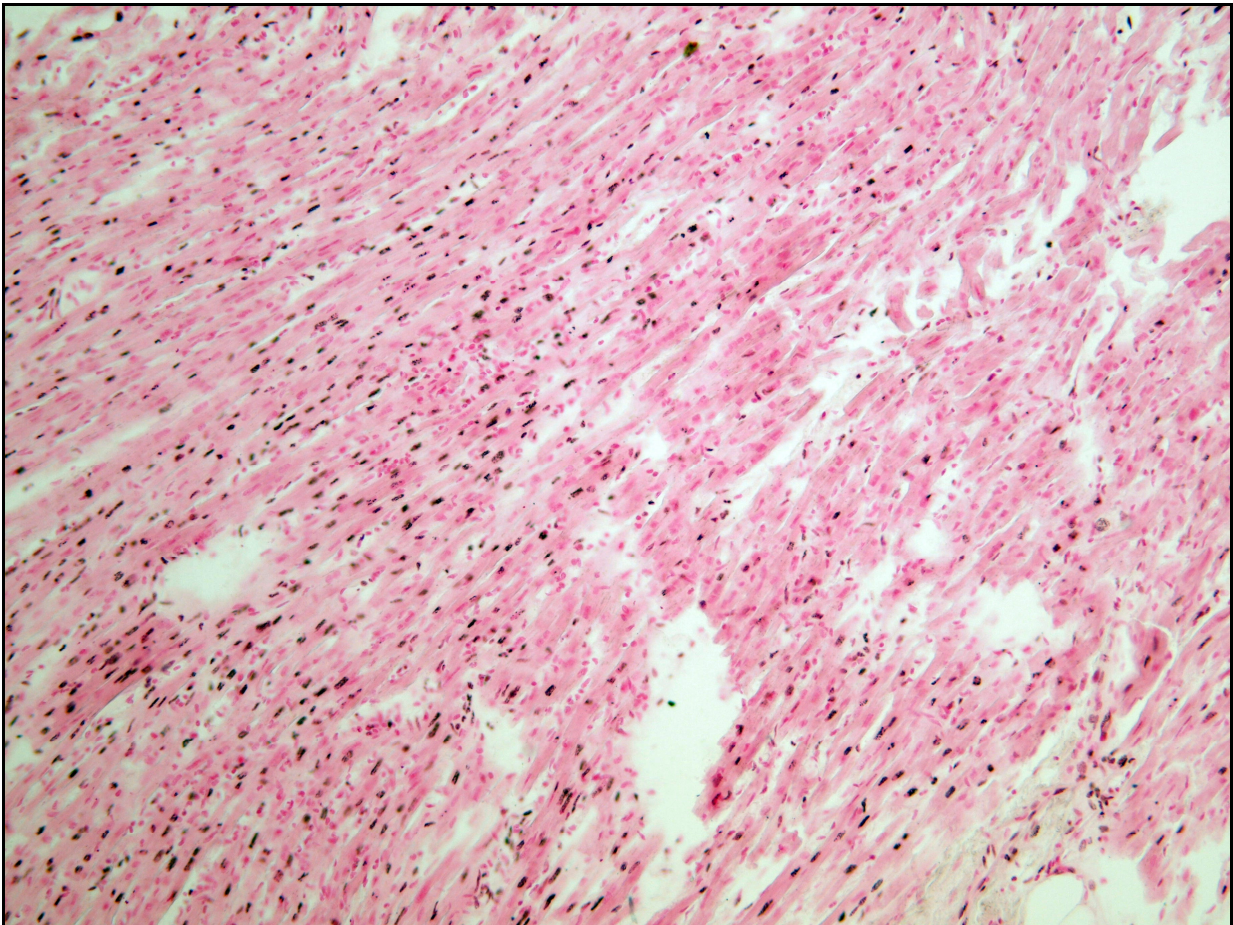


Abbildung 57: TUNEL x 200, Fall Nr. 4, massive apoptotische Bereiche (schwarze Zellen) im Bereich der Vorderwand linke Herzkammer, basisnah (E)

Im Fall Nr. 4 kann daher mit Hilfe der TUNEL-Methode mit dem Nachweis des Zelluntergangs im Myokard ein weiteres Diagnosekriterium einer Myokarditis bestätigt werden. In Fall Nr. 10 jedoch bestätigt sich die konventionell gesicherte Diagnose weder in der Immunhistochemie noch in der TUNEL-Methode.

#### 4.5.2 Auffällige SIDS-Fälle der Leukozytenfärbung

Von den drei durchgeführten immunhistochemischen Verfahren konnte nur für die Leukozytenfärbung (LCA) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen SIDS-Kollektiv und Kontroll-Kollektiv nachgewiesen werden. Daher ist es interessant, die einzelnen zellreichen Fälle dieser Methode abschließend einmal genauer zu betrachten.

Nimmt man den Mittelwert des SIDS-Gesamtkollektivs für Leukozyten von 15,69 Leukozyten/mm<sup>2</sup> als Grundlage, so sind v.a. die Ausreißer-Fälle interessant, die außerhalb der zwei- bis dreifachen Standardabweichung dieses Mittelwertes liegen. Insgesamt sind demnach fünf Fälle als Ausreißer zu bezeichnen. Drei Fälle liegen in der zweifachen Standardabweichung, dies sind die Fälle Nr. 29, Nr. 32 und Nr. 88. Lediglich im Fall Nr. 32 zeigen sich zusätzlich erhöhte Werte für Makrophagen (10,64 Makrophagen/mm<sup>2</sup>), die zwar im Vergleich mit dem Kollektiv hoch, allerdings insgesamt sehr niedrig sind ( $\approx 2,53$  Makrophagen/HPF). Die TUNEL-Färbung zeigt nur im Fall Nr. 88 in zwei Probeentnahmestellen apoptotische Zellen. In der Vorgeschichte und in der konventionell histologischen Beurteilung sind diese Fälle alle unauffällig. Insgesamt stellt sich die Frage, wie diese Befunde zu interpretieren sind, da die Zellzahlen bei weitem unter den Grenzwerten liegen, die heute noch als normal gelten (siehe Kapitel 1.2.4) und in der Gesamtbeurteilung in diesen Fällen aufgrund der isolierten Leukozyteninfiltrate nicht von einer Myokarditis auszugehen ist.

Zwei weitere Fälle allerdings, die innerhalb der dreifachen Standardabweichung liegen, sind anders zu beurteilen: Zum einen der bereits beschriebene Myokarditis-Fall Nr. 4, der mehr als das Vierfache des Mittelwertes als durchschnittliche Infiltration aufweist und zum anderen der Fall Nr. 75, dessen Ergebnisse im Folgenden zu diskutieren sind. In diesem Fall wird mit 52,60 Leukozyten/mm<sup>2</sup> mehr als das Dreifache des Mittelwertes erreicht, außerdem finden sich auch in der T-Lymphozytenfärbung deutliche Infiltrate (45,05 T-Lymphozyten/mm<sup>2</sup>), allerdings ohne Nachweis von apoptotischen Zellen oder Besonderheiten in der Vorgeschichte. Auch die konventionelle Diagnostik nach DALLAS ist in diesem Fall unauffällig. Für diesen Fall Nr. 75 ist daher das Vorliegen einer Myokarditis beziehungsweise zumindest der Verdacht auf eine Myokarditis zu diskutieren. Die folgenden Bilder geben eine Übersicht über die Infiltration in diesem Fall:

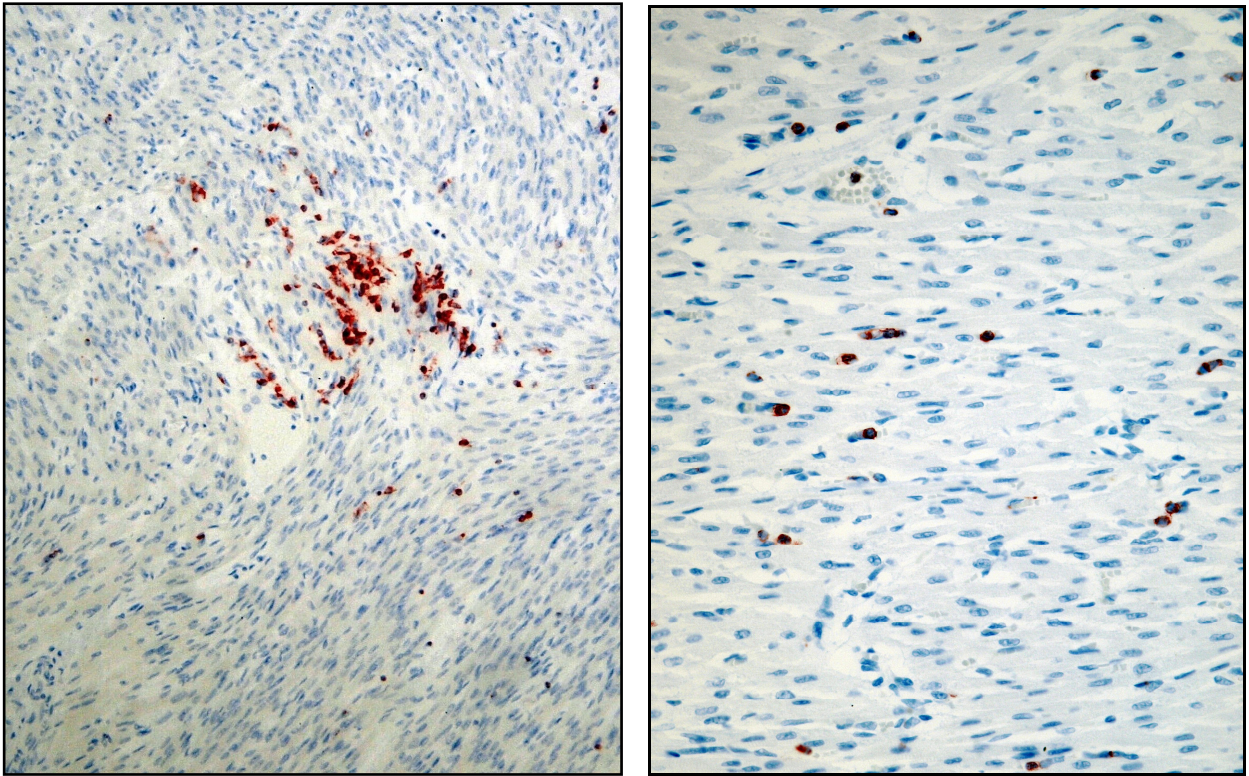


Abbildung 58 und 59: Fall Nr. 75, links: LCA x100 Septum interventrikuläre, basisnah (C), rechts: LCA x 400, Hinterwand linke Herzkammer, spitzennah (H)

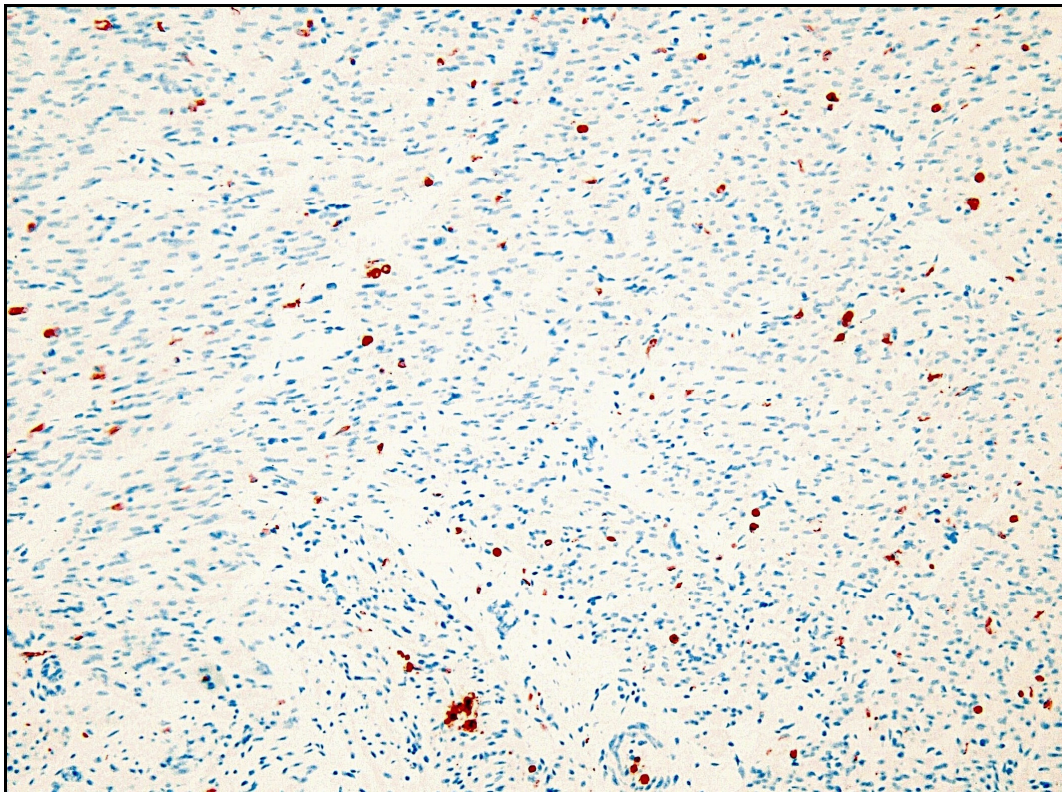


Abbildung 60: CD45-R0 x 100, Fall Nr. 75, Herzkammerwand rechts, basisnah (B)

### 4.5.3 Auffällige TUNEL-Fälle im Methodenvergleich

Für die TUNEL-Methode ergibt sich im Vergleich mit der konventionell-histologischen HE-Färbung, dass nur in 3 der 21 SIDS-Fälle mit Nachweis von apoptotischen Fällen auch Auffälligkeiten in der HE-Färbung gefunden wurden (Fall Nr. 4, Fall Nr. 8 und Fall Nr. 9). Diese sind bereits im Kapitel 4.5.1 ausführlich dargestellt worden. Die anderen auffälligen HE-Fälle weisen keine apoptotischen Zellen auf.

In den immunhistochemischen Verfahren fällt ebenfalls auf, dass die überwiegende Mehrzahl der SIDS-Fälle mit Apoptosenachweis, insgesamt 19 von 21 Fälle, keine erhöhte Infiltration vorweist, dazu zählen vor allem auch die beiden Fälle Nr. 13 und Nr. 89, in denen jeweils 5 Probenentnahmestellen apoptotische Zellen aufwiesen. Für den Fall Nr. 89 konnte eine Erkältung vor dem Tode festgestellt werden, im Fall Nr. 13 fand sich lediglich Mundsoor als Besonderheit in der Obduktion. Lediglich im Fall Nr. 4 und Fall Nr. 88 konnten erhöhte Werte für Leukozyten nachgewiesen werden. Infiltrate durch Makrophagen sind in keinem Fall nachweisbar, Lymphozyteninfiltrate nur im Myokarditis-Fall Nr. 4.

Gleiche Ergebnisse werden im Kontroll-Kollektiv erreicht. Hier sind alle Präparate in der HE-Färbung unauffällig, in der TUNEL-Färbung weisen jedoch fünf Präparate von vier Fällen apoptotische Zellen auf, die allerdings immunhistologisch ebenfalls unauffällig sind. In den beiden Sepsis-Fällen (Fall Nr. 4 und Nr. 10) und auch im Meningitis-Fall (Fall Nr. 3) werden keine apoptotischen Zellen im Myokard nachgewiesen.

Neben der Tatsache, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den apoptotischen Zellzahlen in beiden Kollektiven gibt, fällt an dieser Stelle zudem auf, dass die Ergebnisse der TUNEL-Methode völlig unabhängig von den Ergebnissen der immunhistochemischen oder konventionellen Diagnostik sind. Lediglich im Myokarditis Fall Nr. 4 und im möglichen Myokarditis-Fall Nr. 8 kann die TUNEL-Methode die Ergebnisse der anderen Methoden unterstützend belegen.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Studienkollektiv**

#### **5.1.1 Anzahl der Fälle**

Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit ist ein aus 92 Fällen bestehendes SIDS-Kollektiv sowie ein 15 Fälle umfassendes, altersgleiches Kontroll-Kollektiv des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn aus den Jahren 1997 bis 2009. Alle Säuglinge wurden einer Obduktion, einer toxikologischen sowie einer histologischen und immunhistochemischen Untersuchung wichtiger Organsysteme, u.a. des Myokards unterzogen.

Die Anzahl der SIDS-Fälle ist mit 92 betrachteten Fällen ausreichend groß im Vergleich mit den bisherigen Studien zu diesem Thema, insbesondere im Vergleich mit denen nach der Bevölkerungsstruktur und -anzahl am ehesten zu vergleichenden Studien aus Deutschland von Dettmeyer et al. (siehe Tabelle 2, Kapitel 1.2.5).

Das Kontroll-Kollektiv wurde bewusst altersgleich ausgewählt, um gleiche physiologische und anatomische Voraussetzungen des Myokards zu erhalten. Aufgrund des zunehmenden Wachstums von Myozyten im Alter wird nur bei strukturell und gewichtsmäßig altersgleichen Herzen eine annähernd gleiche Anzahl von Myokardzellen in einem Quadratmillimeter abgebildet (zur Morphologie der Herzmuskelzellen siehe Adler, 1972; Fleischer et al., 1978; Linzbach, 1956). Diese Einschränkung führt allerdings dazu, dass das Kontroll-Kollektiv mit nur 15 Fällen sehr klein ist. Dieser Schwachpunkt eines meist nicht einmal halb so großen Kontroll-Kollektivs findet sich auch in anderen, thematisch vergleichbaren Studien wieder (Dettmeyer et al., 2009; Dettmeyer, 2004; Noren et al., 1977; Shatz et al., 1997; Rasten-Almquist et al., 2002). Teilweise fehlt der Vergleich mit einem Kontroll-Kollektiv ganz (u.a. Dettmeyer et al., 1999).

Die bereits von Madea (2009) gestellte Forderung nach einem mindestens doppelt so großen Kontroll-Kollektiv ist allerdings unter alleiniger Berücksichtigung der Fälle des Instituts der Rechtsmedizin Bonn nicht möglich, da ein altersgleiches Kontroll-Kollektiv naturgemäß glücklicherweise sehr klein ist. Ein Lösungsansatz für weitere Untersuchungen wäre möglicherweise die Errichtung einer Datenbank deutschlandweiter bzw. weltweiter Kontroll-Fälle.

### 5.1.2 Merkmale des SIDS-Kollektivs

Die inhaltlichen Merkmale dieses Kollektivs wurden durch eine retrospektive Analyse der Obduktionsprotokolle herausgearbeitet. Dabei zeigt sich, dass die verfügbare Datenmenge über die Todesumstände, die Auffindesituation, die klinische Anamnese und die Familienanamnese teilweise unvollständig ist (siehe Tabelle 3, Kapitel 2.1). Ursache dafür ist vor allem die fehlende direkte und standardisierte Befragung der Eltern durch die Rechtsmediziner zu den bekannten typischen Merkmalen des Plötzlichen Kindstods, weil in Deutschland bzw. im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn in aller Regel in Kindstodfällen keine Besichtigung des Leichenfundortes durch die Rechtsmediziner erfolgt. Von einer ergänzenden, erneuten Befragung der Eltern wurde aus ethischen Gesichtspunkten Abstand genommen, zumal die Analyse der Todesumstände nicht Hauptuntersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Die Fälle des SIDS-Kollektivs können daher nach den San-Diego-Kriterien überwiegend der Gruppe IB zugeordnet werden, nur wenige Fälle altersbedingt der Kategorie II (siehe Kapitel 1.1.1).

Trotz teilweise lückenhafter Angaben zeigt sich durch die Auswertungsergebnisse der Obduktionsprotokolle (siehe Kapitel 4.1), dass das vorliegende Kollektiv als repräsentativ zu werten ist. Es finden sich, analog zur Studienlage (siehe Kapitel 1.1.2 sowie 1.1.3), die im Folgenden aufgelisteten, charakteristischen Merkmale eines Kindstodkollektivs:

- Die Fallzahlen im Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn zeigen einen starken Rückgang der Inzidenz des Plötzlichen Kindstods.
- Die Bauchlage wird für die Mehrzahl der Säuglinge (47 %) als Körperlage zum Zeitpunkt des Auffindens im Kinderbett angegeben.
- Männliche Säuglinge sind etwas häufiger betroffen.
- Es zeigt sich eine leichte Häufung der Fälle in der kalten Jahreszeit.
- Das Maximum der Todesfälle liegt im zweiten Lebensmonat.
- Etwa 1/3 aller Kinder weist im vorliegenden Kollektiv Anzeichen einer Erkältung auf, die den Tod nicht hinreichend erklären kann, aber Hinweise auf eine infektiologische Todesursache geben. Damit liegen diese noch deutlich unter den Ergebnissen von Adelson und Kinney (1956) sowie von Gilbert et al. (1990) mit betroffenen 2/3 aller Kinder.

## 5.2 Myokardgewebe

In jeder Obduktion wurde allen Säuglingen Myokardgewebe an den acht vordefinierten Stellen entnommen (siehe Kapitel 2.3), um eine möglichst repräsentative Aussage über das gesamte Myokard machen zu können. Die Sicherstellung der Standardisierung der Probeentnahmestellen wurde zudem durch eine hohe Kontinuität der Obduzenten gewährleistet.

Durch eine zügige Obduktion nach Todeseintritt sowie durch eine unmittelbare Verarbeitung des Gewebes nach der Entnahme kann eine postmortale Autolyse weitestgehend verhindert werden. In dem vorliegenden Kollektiv liegt die mittlere Zeitspanne zwischen Todeszeitpunkt und Durchführung der Obduktion bzw. Verarbeitung der Proben bei  $2,1 \pm 1,6$  Tagen.

Es wurden in der vorliegenden Arbeit nur die Fälle berücksichtigt, in denen nach einer Nachfärbung aus noch vorhandenen, in Paraffin gebetteten Myokardblöcken mindestens vier der acht Probeentnahmestellen in den immunhistochemischen Färbungen vorlagen, so dass mit dieser Methode über mindestens 50 % des Myokards eine Aussage bezüglich der Infiltration getroffen werden kann. Diese Lückenhaftigkeit in den immunhistochemischen Färbungen wird jedoch, wie bereits beschrieben, dadurch ausgeglichen, dass in der konventionellen Hämatoxylin-Eosin-Färbung für alle Fälle sämtliche acht Probeentnahmestellen vorlagen und beurteilt werden konnten. Für die TUNEL-Methode, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals an dem vorhandenen Säuglingsmyokard durchgeführt wurde, wurde sämtliches Myokardgewebe verwendet, unabhängig von der Vollständigkeit der beurteilbaren Probeentnahmestellen pro Fall.

## 5.3 Myokardfläche

Die Endomyokardbiopsie ist der heutige Goldstandard der Myokarditisdiagnostik beim Lebenden (siehe Kapitel 1.2.4). Dabei haben die über einen Rechts- bzw. Linksherzkatheter gewonnenen, Gewebestücke heute je nach Biopptom eine Größe zwischen  $0,5 \text{ mm}^2$  und  $2 \text{ mm}^2$  (Baandrup und Olsen, 1981; Cunningham et al., 2006). Bei älteren Untersuchungen zu diesem Thema muss berücksichtigt werden, dass die ersten Biopptome nach Konno und Sakakibara (1963) mit einer durchschnittlichen Biopsatfläche von  $2\text{-}3 \text{ mm}^2$  noch größer waren (Ali et al., 1973; Billingham, 1985; Konno und Sakakibara, 1963).



Entscheidender Nachteil der Endomyokardbiopsie ist allerdings, dass nur eine begrenzte Anzahl von Proben des vitalen Herzgewebes gewonnen werden kann. Dies kann durch Abbildung von unauffälligem Gewebe bei tatsächlichem Vorliegen einer vor allem fokalen Myokarditis zu falsch-negativen Befunden führen. Es ist daher von besonderer Bedeutung, möglichst viele Biopsien an verschiedenen Stellen des Myokards zu nehmen, um diesen „sampling error“ zu vermeiden (Aretz et al., 1987; Billingham, 1985). So konnten Hauck et al. (1989) zum Beispiel durch eine postmortale Untersuchung von histologisch eindeutigen Myokarditisfällen zeigen, dass durch eine Endomyokardbiopsie nur 17 % der Proben des rechten Ventrikels und 20 % der linksventrikulären Proben Anzeichen einer Myokarditis aufweisen. Daraus ergeben sich zahlreiche falsch-negative Befunde auch bei hoher Probenanzahl: „Even when 10 biopsy specimens per ventricle were evaluated, the frequency of false-negative results was 45 % for the left and 37 % for the right ventricle“ (Hauck et al., 1989).

Demgegenüber haben die postmortal gewonnenen Myokardproben den naturgemäßen Vorteil, dass das gesamte Myokardgewebe des Herzens zur Beurteilung zur Verfügung steht, so dass die Gefahr des „sampling errors“ deutlich reduziert ist.

Dieser Flächenvorteil der postmortalen Myokarduntersuchung wurde in den bisherigen Studien zu Myokarditis und Plötzlicher Kindstod allerdings kaum genutzt. Tatsächlich wurde nur ein Bruchteil des verfügbaren Gewebes auf Myokarditiszeichen untersucht und quantitativ ausgewertet. Die thematisch am ehesten vergleichbaren Studien von Krous et al. (2009) sowie von Dettmeyer et al. (1999-2009) analysieren und quantifizieren in allen Untersuchungen lediglich 20 High-Power-Fields pro Herz. Dabei untersuchten Dettmeyer et al. je 2,5 High-Power-Fields an den identischen 8 Probeentnahmestellen A-H, wie in der vorliegenden Arbeit, während Krous et al. (2009) die 20 High-Power-Fields aus 2-4 verfügbaren Proben des linken Ventrikels und des Septums ausgewählt haben.

Die Fläche eines High-Power-Fields, definiert als mikroskopisch sichtbarer Präparatanteil in 400facher Vergrößerung, ist allerdings abhängig von der Sehfeldzahl des jeweiligen Mikroskops. Leider wird in den meisten Studien weder die Größe eines High-Power-Fields noch die Sehfeldzahl des Mikroskops angegeben, sodass die untersuchten Myokardflächen nicht exakt vergleichbar sind. Für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroskop wurde eine Fläche von

0,2375 mm<sup>2</sup> für ein High-Power-Field berechnet (siehe Kapitel 3.2.1.4). Unter Annahme gleicher Sehfeldzahlen bedeutet dies für die oben genannten Studien, dass in diesen lediglich eine Fläche von 4,75 mm<sup>2</sup> (20 x 0,2375 mm<sup>2</sup>) pro Herz ausgewertet wurde. Im Vergleich mit der Diagnostik mittels Endomyokardbiopsie am Lebenden entspricht dies einer untersuchten Fläche von nur ca. 2-4 Biopsien pro Herz mit neueren Biopptomen (s.o.). Damit liegt die untersuchte Myokardfläche in den genannten postmortalen Studien sogar noch unter den in den DALLAS-Kriterien geforderten 3-5 Biopsien pro Herz für Endomyokardbiopsien (Aretz et al., 1987, siehe Kapitel 1.2.4).

Es ist offensichtlich, dass diese kleine untersuchte Fläche dem „sampling error“ und bei rein zufälliger Auswahl der Gesichtsfelder einer hohen falsch-negativen Befundrate unterliegen muss. Auch eine Aussage über die durchschnittliche Infiltration des Herzens bzw. über die Verteilung von Infiltraten innerhalb einer Probeentnahmestelle oder des Herzens kann auf diese Art nicht erfolgen, zumal auch Krous et al. (2009) keine Aussage über die rechtsventrikuläre Infiltration des Myokards treffen können, da sie nur Proben des linken Ventrikels und des Septums berücksichtigt haben.

In der vorliegenden Arbeit wird unter Kenntnis dieser Tatsache die untersuchte Myokardfläche deutlich vergrößert. Die entnommenen Proben sind im vorliegenden Kollektiv unterschiedlich groß, allerdings haben sie im Durchschnitt etwa eine Fläche von bis zu 100 mm<sup>2</sup> pro Probe. Dabei decken die Proben in der vorliegenden Arbeit beide Ventrikel und das Septum interventrikuläre ab, im Gegensatz zu einer reinen Rechts- bzw. Linksherzkatheteruntersuchung in der Endomyokardbiopsie bzw. zu der Studie von Krous et al. (2009). Es wird pro Herz bis zu 80 mm<sup>2</sup> Myokardgewebe in jeder Methode ausgewertet.

Es ist offensichtlich, dass durch die Steigerung der untersuchten Fläche pro Herz um den Faktor 17 im Vergleich zu den oben genannten Studien eine deutlich höhere Repräsentativität der Ergebnisse erzielt wird. In Analogie zur Endomyokardbiopsie entspricht die untersuchte Fläche dieser Arbeit etwa 40-80 Biopsien pro Herz, so dass eine Aussage über Infiltration und deren Verteilung sicher möglich ist.

## 5.4 Zählmethode

Neben der Vergrößerung der Fläche wurde gleichzeitig auch eine neue Zählmethode eingeführt. Dabei wurde das Myokardgewebe statt in High-Power-Fields (400fache Vergrößerung) in Quadratmillimetern (100fache Vergrößerung) ausgezählt. Diese Zählmethode hat zwar im Vergleich mit der stärkeren Vergrößerung eines High-Power-Fields den Nachteil, dass Zellstrukturen nicht mit gleicher Präzision erkannt werden und möglicherweise einzelne Artefakte, insbesondere in den immunhistochemischen Verfahren, als Zellstrukturen verkannt werden können, dennoch können Myokardproben mit dieser Methode schnell und sicher beurteilt und ausgezählt werden. Zudem ist mit dieser Zählmethode die Vergleichbarkeit von Ergebnissen durch die mikroskopunabhängige Skalierung gegeben (siehe dazu auch Kapitel 3.2.1.1).

Durch die Abbildung größerer Myokardareale insgesamt, aber auch auf einen Blick – 1 mm<sup>2</sup> entspricht 4,21 High-Power-Fields –, erhält man einen guten Überblick über das Präparat. Fokale Infiltrate werden mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit auch in der zufälligen Auswahl der Quadratmillimeter erfasst. Insbesondere in der bisherigen Auswertung in High-Power-Fields fehlt dieser Überblick über das Präparat. Im Gegenteil, es erscheint nahezu unmöglich, durch eine zufällige Auswahl von nur 2-4 High-Power-Fields mit einer Größe von je 0,2375 mm<sup>2</sup> in einem 100 mm<sup>2</sup> großen Präparat ein fokales Infiltrat einzustellen (siehe Kapitel 5.3).

## 5.5 HE-Methode und DALLAS-Kriterien

Mit den sogenannten DALLAS-Kriterien von 1987 (Aretz et al., 1987, siehe Kapitel 1.2.1) wurde erstmals eine einheitliche histopathologische Definition für eine Myokarditis entwickelt, die auch heute noch aktuell ist. Diese Definition bezieht sich auf die histologische Auswertung Hämatoxylin-Eosin gefärbter Myokardpräparate von Erwachsenen, die durch eine Endomyokardbiopsie am Lebenden gewonnen wurden (Aretz et al., 1987).

Nach alleiniger Auswertung mittels dieser Kriterien konnten im SIDS-Kollektiv zwei Fälle als eindeutige Myokarditis identifiziert werden. In sieben weiteren Fällen lagen zwar einzelne Auffälligkeiten vor, die allerdings nicht alle Kriterien einer Myokarditis erfüllten. Eine Myokarditis ist definiert als „a process characterized by an inflammatory infiltrate of the myocardium **with**

necrosis **and/or** degeneration of adjacent myocytes” (Aretz et al., 1987). Das Kontroll-Kollektiv zeigte keinerlei Auffälligkeiten.

Es lagen für alle Fälle sämtliche acht Probeentnahmestellen als HE-gefärbte Schnitte vor, so dass die größtmögliche Fläche an Myokard im Vergleich zu den immunhistochemischen Methoden sowie zur TUNEL-Methode untersucht werden konnte. Eine repräsentative Aussage über alle Bereiche des Herzens ist daher zuverlässig möglich.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch fokale Infiltrate mit der HE-Methode abgebildet werden, zumal das gesamte Präparat mikroskopisch untersucht wurde. Ein Hauptkritikpunkt der Auswertung der Endomyokardbiopsie nach den DALLAS-Kriterien, nämlich der beschriebene „sampling error“ (Aretz et al., 1987; Billingham, 1985; Baughman, 2006), ist für diese Methode in dieser postmortalen Untersuchung damit nahezu auszuschließen.

Dennoch sind die DALLAS-Kriterien heute, insbesondere als alleiniges Diagnoseverfahren, auch aus folgenden anderen Gründen umstritten (Baughman, 2006; Dettmeyer et al., 2006b):

Zunächst ist ein wichtiger Kritikpunkt, dass die histologische Beurteilung eines HE-Präparates sehr schwierig ist. Die DALLAS-Kriterien wurden von und für Pathologen mit hoher diagnostischer Erfahrung festgelegt (Aretz et al., 1987). Shanes et al. (1987) konnten zeigen, dass es selbst unter erfahrenen Experten eine hohe „Interobserver Variability“ der Ergebnisse gibt. Die Analyse wird zudem durch den Ausschluss wichtiger Differentialdiagnosen im Erwachsenenalter erschwert, wie vor allem einem ischämischen Myokardinfarkt, aber auch hämatologischer Erkrankungen wie Lymphome oder Autoimmunerkrankungen (Aretz et al., 1987). Die meisten dieser Differentialdiagnosen sind in einem SIDS-Kollektiv jedoch zu vernachlässigen, da sie im Säuglingsalter Raritäten sind bzw. postmortal ausgeschlossen werden können. Aufgrund der schwierigen Beurteilung konventionell-histologischer Präparate nach den DALLAS-Kriterien wurden die in der Arbeit untersuchten Proben bzw. die Ergebnisse durch einen zweiten Begutachter überprüft und ggf. korrigiert.

Außerdem ist heute die alleinige Analyse von Endomyokardbiopsien mit dieser Methode umstritten, da bekannt ist, dass zwischen Infektionsbeginn und sichtbaren Infiltraten bzw. Myozyten-

schäden eine Zeitspanne von 24 Stunden bis 4 Tagen liegen kann, so dass eine Infektion in dieser Zeit im konventionell-histologischen Präparat noch nicht abgebildet wird (Dettmeyer et al., 2006b; Esfandiarei und McManus, 2008; Madea und Drexler, 2012; Madea, 2009; McManus et al., 1993; siehe auch Kapitel 1.2.3). Eine zu früh durchgeführte Biopsie liefert daher möglicherweise falsch-negative Ergebnisse. Aus diesem Grund werden heute immunhistochemische Verfahren in der Myokarditisdiagnostik eingesetzt, die auch beginnende Infiltrate leicht sichtbar machen, sowie molekularbiologische Methoden zum Virusnachweis.

Dennoch dürfen vor allem postmortal in Fällen des Plötzlichen Kindstods unauffällige konventionelle Ergebnisse mit Verweis auf diese „diagnostische Lücke“ nicht komplett vernachlässigt werden. Insbesondere in den folgenden Studien wird die Diagnose einer Virusmyokarditis in Fällen des Plötzlichen Kindstodes nahezu ausschließlich entweder durch molekularbiologischen Virusnachweis (siehe auch Kapitel 5.7) oder durch leichte immunhistochemische Infiltrate nachgewiesen ohne Berücksichtigung der unauffälligen konventionellen Ergebnisse: Dettmeyer et al. 1999, 2002, 2004, 2006a, 2009; siehe auch Kapitel 1.2.5.

Es ist jedoch fraglich, ob ein Virusnachweis oder eine beginnende Infiltration ohne konventionell strukturell sichtbare Veränderungen todesursächlich sein können. Zumal Kariks et al. bereits 1988 zeigen konnten, dass „myocardial lesions [...] in every SIDS infant“ nachgewiesen werden konnten und auch Virusnachweise nicht pathognomonisch für eine Myokarditis sein müssen (u.a. Kindermann et al., 2008). Natürlich können letale Herzrhythmusstörungen in der Phase der „diagnostischen Lücke“ eine mögliche Folge von Myokarditiden sein (Chimenti et al., 2004; Dettmeyer et al., 2002; Heusch et al., 1996; Klein et al., 2000). Es ist allerdings zweifelhaft, dass diese auftreten, ohne einen einzigen postmortalen Nachweis von Infiltraten oder Nekrosen im restlichen Myokard zu zeigen. Bestätigt wird diese Ansicht auch durch eine Untersuchung von Casali et al. (2012). In dieser wurden untersucht, wo die anamnestischen, makroskopischen und histologischen Unterschiede zwischen einer todesursächlichen und einer zufällig postmortal entdeckten Myokarditis bei anderer Todesursache liegen. Signifikant ausgeprägter sind dabei in der Gruppe, in der die Myokarditis eindeutig todesursächlich ist, folgende Merkmale: „last days personal anamnesis positive for suggestive cardiac symptoms, acute pathological findings in the macroscopic analysis of the heart, pure or mixed neutrophilic infiltration, multiple sites myocyte necrosis, multiple sites interstitial oedema – especially in the interventricular septum – and presence of peri-

vascular cuffs“ (Casali et al., 2012). Es darf also bezweifelt werden, dass in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle des Plötzlichen Kindstods der Tod durch Herzrhythmusstörungen verursacht wird, bedingt durch eine virale Myokarditis, als Rechtfertigung für die Vernachlässigung unauffälliger konventioneller Ergebnisse. Vor allem auch, weil viele Säuglinge in den Tagen vor ihrem Tod Anzeichen eines Infektes aufweisen, so dass der Infektionsbeginn bereits länger zurückliegt und damit die Zeitspanne der „diagnostischen Lücke“ reduziert wird und damit im Falle einer Myokarditis Infiltrate nachzuweisen sein müssten.

## **5.6 Immunhistochemie**

### **5.6.1 Methode**

Mit den immunhistochemischen Verfahren gelingt es durch Farbstoffmarkierung von spezifischen Oberflächenantigenen sicher und zuverlässig, auch nach kurzer Einarbeitung „infiltrierende Zellen eindeutig zu identifizieren, phänotypisch zu charakterisieren und zu quantifizieren“ (Strauer et al., 2001). Damit ist nicht nur „die Verlaufsbeurteilung sowie die Beurteilung eines möglichen Therapieerfolgs sehr viel leichter und reproduzierbarer“, sondern auch „eine viel exaktere, reproduzierbarere und sicherere Diagnosefindung möglich“ (Strauer et al., 2001). Immunhistochemische Methoden sind daher heute Standard in der Myokarditisdiagnostik an Endomyokardbiopsien, aber auch in der postmortalen Beurteilung von Myokard (siehe Kapitel 1.2.4).

Die Immunhistochemie reduziert die Nachteile der konventionellen Diagnostik deutlich. Einerseits können myokardiale Infiltrate erkannt werden, andererseits ist durch die eindeutige Identifikation der Zellen die „Interobserver Variability“ (Shanes et al., 1987) deutlich reduziert.

Nachteilig ist allerdings, dass jede Zellart sowie Nekrose bzw. Apoptose gesondert, also kostenintensiv und zeitaufwändig, gefärbt werden muss. Daher ist aufgrund der Vielzahl der bislang bekannten Oberflächenantigenen eine gezielte Auswahl der angewandten Methoden notwendig, insbesondere bei dem beschriebenen Materialmangel nach einer Endomyokardbiopsie in vivo (siehe Kapitel 5.3). Postmortal ist der Materialmangel allerdings eher zu vernachlässigen. Da sich eine virale Myokarditis vor allem durch lymphozytäre Infiltrate auszeichnet (Aretz et al., 1987), wurde in der vorliegenden Arbeit neben einer Leukozytenfärbung (LCA) und einer Makrophagenfärbung (CD68), vor allem auch die T-Lymphozytenfärbung (CD45-R0) durchgeführt, analog zu

der Definition der World Heart Federation (Maisch et al., 2000, siehe Kapitel 1.2.4) und den wesentlichen Studien zum Thema Myokarditis beim Plötzlichen Kindstod (siehe Kapitel 1.2.5). Auf weitere Probleme der Immunhistochemie, insbesondere die Frage einer sinnvollen Quantifizierung und Auswertung, wird in den folgenden Kapiteln noch intensiv eingegangen.

### 5.6.2 Ergebnisse der Immunhistochemie

Zentrale Frage der in der vorliegenden Arbeit angewandten immunhistochemischen Färbungen ist, ob im SIDS-Kollektiv eine erhöhte zelluläre Infiltration vorliegt, die eine Myokarditis als Haupttodesursache in Fällen des Plötzlichen Kindstods wahrscheinlich macht.

Nach Auszählung aller Myokardgewebestellen für das SIDS-Kollektiv kann eine gegenüber dem Kontroll-Kollektiv signifikant erhöhte Infiltration für Leukozyten (LCA) nachgewiesen werden mit 15,69 Leukozyten/mm<sup>2</sup> im Vergleich zu 6,79 Leukozyten/mm<sup>2</sup> im Kontrollkollektiv. Für die weiteren Färbemethoden der Makrophagen (CD68) und T-Lymphozyten (CD45-R0) zeigt sich keine signifikant unterschiedliche zelluläre Infiltration. Eine bevorzugte Lokalisation der Leukozyten, Makrophagen oder T-Lymphozyten an einer der acht Probeentnahmestellen konnte ebenso wenig nachgewiesen werden wie eine altersabhängige Infiltration. Auch für das immunologisch bedeutsame Alter von 2-4 Monaten (Morris, 1999; Raza und Blackwell, 1999) ergibt sich kein Hinweis auf eine vermehrte myokardiale Infiltration im SIDS-Kollektiv (vgl. Kapitel 4.3.6 und 4.3.8).

Wie die signifikant höhere Infiltration mit Leukozyten im SIDS-Kollektiv zu bewerten ist, wird im Folgenden diskutiert. Dabei stehen folgende Fragen im Vordergrund:

1. Wie sind die Ergebnisse im Vergleich mit den bisherigen Studien einzuordnen?
2. Wie ist die mittlere Zellzahl von 15,69 Leukozyten/mm<sup>2</sup> in die Diagnosekriterien und Grenzwertdiskussion einzuordnen (siehe Kapitel 1.2.4)?
3. Bedeutet statistische Signifikanz auch klinische Relevanz?
4. Ist der verwendete Mittelwert als statistischer Vergleichsparameter überhaupt geeignet?

### 5.6.2.1 Ergebnisse im Studienvergleich

Die quantitativ ermittelten Zellzahlen in der vorliegenden Arbeit für die drei immunhistochemischen Methoden können mit den veröffentlichten Ergebnissen verschiedener Studien verglichen werden. Die folgende Abbildung gibt zunächst einen kurzen Überblick über die einzelnen Studienergebnisse. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der immunhistochemischen Auszählung. Da die Ergebnisse jedoch in Zellzahlen pro High-Power-Field angegeben wurden, wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebenfalls in Zellzahlen pro HPF umgerechnet. Ein ausführlicher Vergleich mit diesen Studien findet sich im Anschluss.

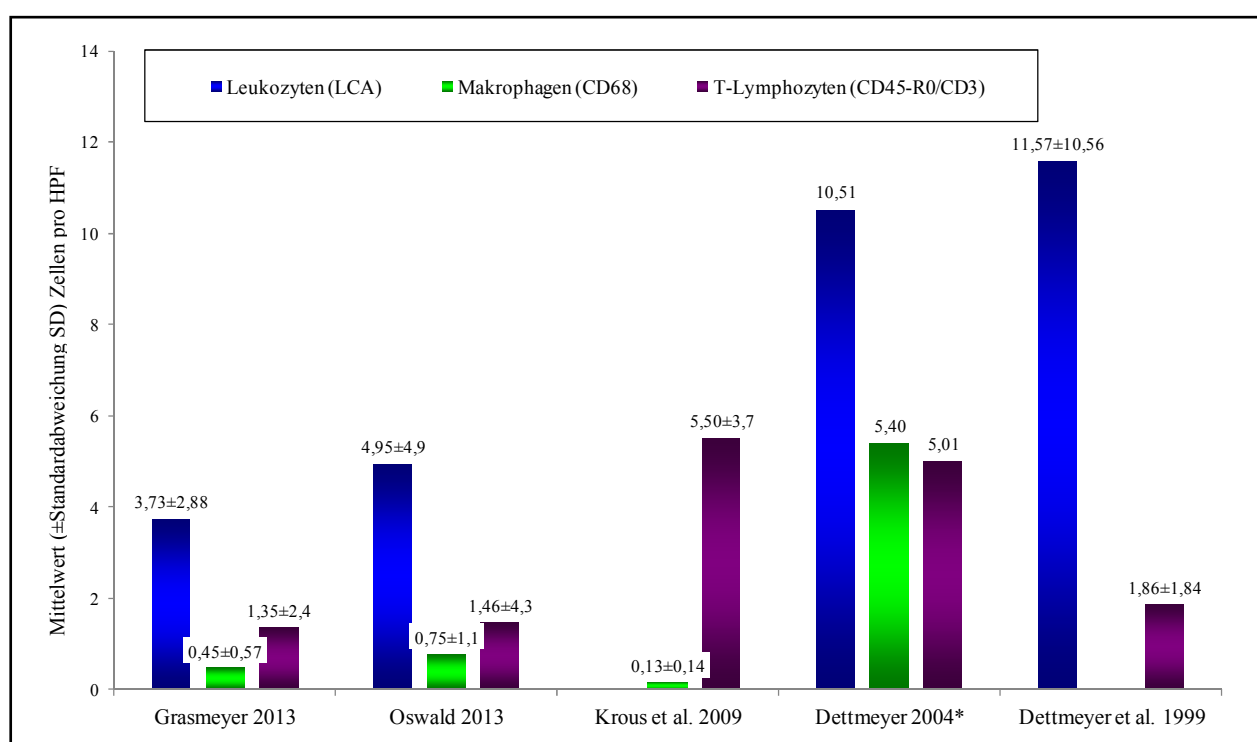


Abbildung 61: Ergebnisse der Studien zu myokardialer Infiltration im SIDS-Kollektiv

Zunächst ist die noch nicht publizierte Dissertation von Frau Elke Sylvia Oswald zu erwähnen. In dieser Arbeit am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn, die parallel zur vorliegenden Dissertation erstellt wurde, wird das identische SIDS-Kollektiv ebenfalls quantitativ auf Infiltrationen im Myokardgewebe untersucht. Allerdings erfolgt die Auszählung statt in Quadratmillimeter in High-Power-Fields. Dabei wird die ausgezählte Myokardfläche im Vergleich zu den bisherigen Studien um den Faktor 8 vergrößert. Das heißt, statt 20 High-Power-Fields pro Fall werden 20 High-Power-Fields pro Probeentnahmestelle ausgezählt. Bei 8 Probeentnahmestellen sind dies maximal 160 High-Power-Fields pro Fall. Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit den



Ergebnissen der vorliegenden Arbeit so zeigt sich, dass die Ergebnisse mit beiden Zählmethoden nahezu gleich sind bzw. sich nicht signifikant unterscheiden. Da sie unabhängig voneinander am identischen Schnitt ausgezählt wurden, kann so von einer validen Auszählung ausgegangen werden.

Auch in der Studie von Krous et al. (2009) werden die Mittelwerte pro High-Power-Field veröffentlicht. Diese wurden ebenfalls von zwei unabhängigen Untersuchern ausgezählt. Dabei wurden allerdings keine Leukozyten angefärbt, sondern Makrophagen und T-Lymphozyten (CD3). Auch ihre Ergebnisse zeigen, dass kaum Makrophagen nachgewiesen werden können. Allerdings werden mit 5 Lymphozyten pro High-Power-Field höhere Zellzahlen ermittelt. Kritikpunkte sind allerdings die geringe Auszählfläche von nur 20 High-Power-Fields pro Fall, die Vernachlässigung des rechten Ventrikels sowie eine variable Anzahl von 2-4 ausgezählten High-Power-Fields pro Probeentnahmestelle. Außerdem erfolgte die Auswahl der High-Power-Fields nicht wie in der vorliegenden Arbeit zufällig, sondern durch Vorauswahl benachbarter Felder, die repräsentativ für das gesamte Präparat waren (Krous et al., 2009).

Abschließend können die Ergebnisse noch mit den veröffentlichten Zellzahlen der Habilitation von Dettmeyer (2004) sowie einer weiteren Studie von Dettmeyer et al. (1999) verglichen werden. Im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Oswald (2013) fällt auf, dass deutlich höhere Zellzahlen pro High-Power-Field angegeben werden bei gleicher zufälliger Auswahl von Gesichtsfeldern, insbesondere für Leukozyten und Makrophagen. Für Leukozyten werden 2-3fach höhere Werte pro High-Power-Field, für Makrophagen sogar 10-20fach höhere Werte angegeben. Dies ist verwunderlich, da das Kollektiv beider Studien ebenfalls aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn entnommen wurde und in den Jahren 1997-2001 sogar nahezu identisch mit dem Kollektiv der vorliegenden Arbeit ist. Die Lymphozytenzahlen entsprechen den Werten, wie sie auch von Krous et al. (2009) angegeben werden. Die Gründe dieser massiv erhöhten Zellzahlen im Vergleich zu den anderen Studienergebnissen sind unklar und werden unter Umständen durch folgende Überlegung erklärt:

In der immunhistochemischen Auszählung der Myokardschnitte fiel auf, dass weite Flächen der Präparate unauffällig sind bzw. sich nur wenige Zellen über das gesamte Präparat verteilt finden. In einigen wenigen Fällen zeigten sich jedoch auch sehr begrenzt fokal vermehrte Zellen (siehe

Kapitel 4.3.7). Durch Ausweitung der ausgewerteten Myokardflächen wird also vor allem unauffälliges Myokardgewebe abgebildet. Dies kann als Analogie zum „sampling error“ in den Endomyokardbiopsien mit übermäßiger Abbildung unauffälliger Biopsien selbst beim Vorliegen einer Myokarditis (siehe Kapitel 5.3) gesehen werden. Eigentlich würde man daher erwarten, dass in den Arbeiten von Dettmeyer et al. (1999) und Dettmeyer (2004) durch eine zufällige Auswahl von nur 2,5 High-Power-Fields pro Schnitt ebenfalls die unauffälligen, zellarmen Gebiete vermehrt mikroskopiert werden. Daher verwundert es, dass trotz dieser viel geringeren ausgezählten Fläche entgegen jeder statistischen Wahrscheinlichkeit deutlich mehr Infiltrate nachgewiesen werden. Es kann nur vermutet werden, dass durch den fehlenden Überblick zur Einstellung eines Präparats in 400facher Vergrößerung unbewusst eine Vorauswahl eines zellreichen Areals über eine andere mikroskopische Vergrößerungsstufe erfolgt ist, mit faktisch falsch-positiven Befunden bzw. zu hoch ausgewiesenen Infiltraten in Form eines „umgekehrten sampling errors“.

Abschließend kann also festgehalten werden, dass im Studienvergleich in der vorliegenden Arbeit mit den ausgezählten mittleren 15,69 Leukozyten/mm<sup>2</sup> bzw. umgerechnet 3,73 Leukozyten pro High-Power-Field deutlich weniger Leukozyten im Myokardgewebe nachgewiesen wurden, dennoch liegt eine signifikante Erhöhung gegenüber dem Kontroll-Kollektiv vor. Eine Aussage über die Einordnung dieser absoluten Zellzahlen kann allerdings nur durch einen Vergleich mit den geltenden Normwerten bzw. Grenzwerten erfolgen.

### **5.6.2.2 Ergebnisse im Kontext der Grenzwerte**

Es stellt sich also die Frage, wie die Höhe der nachgewiesenen mittleren Zellzahl in die bestehenden Diagnosekriterien und in die Grenzwertdiskussion einzuordnen ist.

In einer Endomyokardbiopsie von Erwachsenen gelten bis zu 5 Lymphozyten pro High-Power-Field (400er Vergrößerung) als normal (Aretz et al., 1987; Foley und Edwards, 1988). In den DALLAS-Kriterien wird allerdings keine Aussage über Art und Umfang der Quantifizierung gemacht, wohingegen Edwards et al. (1982) die Lymphozytenanzahl durch Auswertung und Mittelwertberechnung von 20 High-Power-Fields erhalten (siehe Kapitel 1.2.4). Nach diesem Grenzwert von 5 Lymphozyten/HPF sind die ermittelten Werte von 3,73 Leukozyten/HPF in der vorliegenden Arbeit als normal zu werten, insbesondere wenn man berücksichtigt, dass in der Leukozy-

tenfärbung LCA neben Lymphozyten auch alle anderen hämatopoetischen Zellen außer Erythrozyten angefärbt werden (Scheid und Triglia, 1979). Neben dieser älteren Definition gibt es heute auch einen Grenzwert für Leukozyten/mm<sup>2</sup> im Rahmen einer Endomyokardbiopsie, dabei gelten für Erwachsene < 14 Leukozyten pro Quadratmillimeter als normal (Maisch et al., 2000). Danach wären die 15,69 Leukozyten/mm<sup>2</sup> des vorliegenden SIDS-Kollektivs als pathologisch anzusehen.

Beide Grenzwerte sind allerdings aus folgenden Gründen nicht auf die vorliegende Untersuchung zu übertragen: Erstens handelt es sich um autoptisches Gewebe und nicht um Endomyokardbiopsien. Es ist unklar, inwiefern die Quantifizierung auf postmortales Gewebe übertragen werden kann, da das gesamte Gewebe beurteilt werden kann und sich daher eine deutlich bessere Möglichkeit bietet, eine Myokarditis auch aufgrund der Verteilung der Infiltrate sowie weiterer qualitativer Merkmale zu diagnostizieren. Zweitens handelt es sich um Säuglingsmyokard, für das andere Größenverhältnisse vorliegen. Die Anzahl der sichtbaren Myozyten und Kapillaren pro Quadratmillimeter ist durch das noch geringe Längen- und Breitenwachstum der Myozyten in diesem Alter deutlich höher als im Myokard eines Erwachsenen. Drittens gab es bislang keine Studie, die vergleichend zu der Studie an Erwachsenen von Foley und Edwards (1988) untersucht hätte, welche Anzahl von Lymphozyten bzw. Leukozyten im Säuglingsalter physiologisch ist.

Letzteres kann implizit aus der vorliegenden Arbeit ermittelt werden. Säuglingsmyokard wird erstmalig ausreichend umfangreich ausgezählt in verschiedenen immunhistochemischen Färbungen. Vernachlässigt man die SIDS-Fälle, die in der HE-Färbung auffällig waren und alle Myokarditis-Fälle bzw. zusätzlich noch alle Fälle mit anamnestischer Infektion vorm Tod bzw. makroskopischer Infektzeichen in der Obduktion, so bleiben 12 Kontroll-Fälle und 44 SIDS-Fälle übrig, deren durchschnittliche myokardiale Infiltration als physiologisch gewertet werden kann:

	<b>Leukozyten (LCA)</b>	<b>Makrophagen (CD68)</b>	<b>T-Lymphozyten (CD45-R0)</b>
Anzahl Fälle (N)	56	56	56
Mittelwert (Zellen pro mm <sup>2</sup> )	12,98	1,65	4,13
Standardabweichung SD (Zellen pro mm <sup>2</sup> )	11,66	2,25	5,42
Mittelwert (Zellen pro HPF*)	3,08	0,39	0,98
Standardabweichung (Zellen pro HPF*)	2,77	0,53	1,29

Tabelle 18: Physiologische Infiltration im Säuglingsmyokard (\*Umrechnungsfaktor 4,21)

Die durchschnittliche Infiltration liegt für unauffälliges Säuglingsmyokard bei umgerechnet 3,08 Leukozyten, 0,98 T-Lymphozyten und 0,39 Makrophagen pro High-Power-Field. Die grafische Darstellung als Boxplot analog zu den Ergebnissen der Immunhistochemie zeigt, dass diese als physiologisch zu betrachteten Zellzahlen, anders als es aufgrund der altersbedingten anderen Größenverhältnisse zu erwarten gewesen wäre, noch unterhalb der Grenzen für Lymphozyten im Erwachsenenmyokard nach Edwards et al. (1982) liegen (grüne Linie):

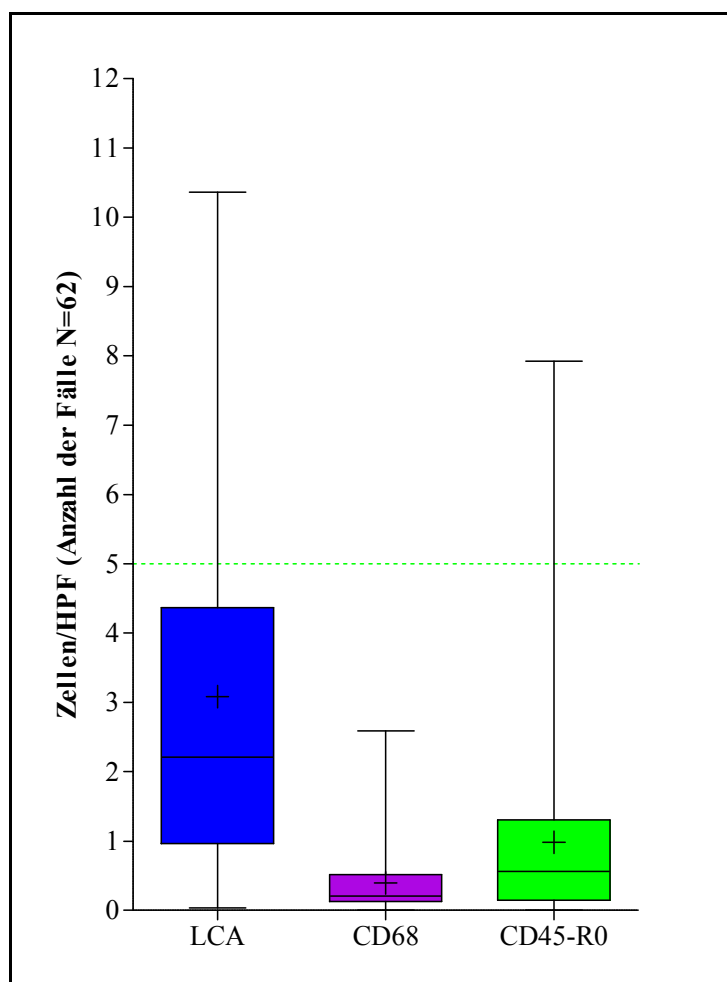


Abbildung 62: Boxplot Darstellung der physiologischen Infiltration für Säuglingsmyokard, die grüne Linie entspricht der lymphozytären Normalinfiltration nach Edwards et al., 1982 sowie Aretz et al., 1987 für Erwachsene.

Insbesondere für die Leukozytenfärbung (LCA) ist dies erstaunlich, da in dieser Färbung nicht nur eine Zellart angefärbt wird, sondern nahezu alle hämatopoetischen Zellen. Dazu zählen Leukozytenunterarten, wie T-Lymphozyten, Monozyten, eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten, aber auch Makrophagen.

An dieser Stelle wird daher auch deutlich, dass die von Maisch et al. 2000 publizierten Grenzwerte, bei deren Überschreiten bei Erwachsenen bereits eine Myokarditis diagnostiziert wird, selbst für Erwachsene deutlich zu niedrig angesetzt sind. Wenn man diese umrechnet in Zellzahlen pro HPF – 14 Leukozyten entsprechen 3,32 Leukozyten pro HPF –, dann liegt der Grenzwert für eine Myokarditis für Leukozyten um fast 2 Zellen pro HPF unterhalb der nur für Lymphozyten als normwertig geltenden Zellzahlen.

Analog und in Übereinstimmung mit der Darstellung für das Erwachsenenmyokard nach Edwards et al. (1982) zeigt sich abschließend für die einzelnen Fälle, dass in 98,2 % der Fälle die mittlere Infiltration von T-Lymphozyten kleiner als 5 pro High-Power-Field war. Für Leukozyten liegen in 78,6% der Fälle die Zellzahlen unter 5 pro High-Power-Field, Makrophagen werden in 92,8 % der Fälle praktisch nicht nachgewiesen ( $< 1$  Makrophage/HPF).

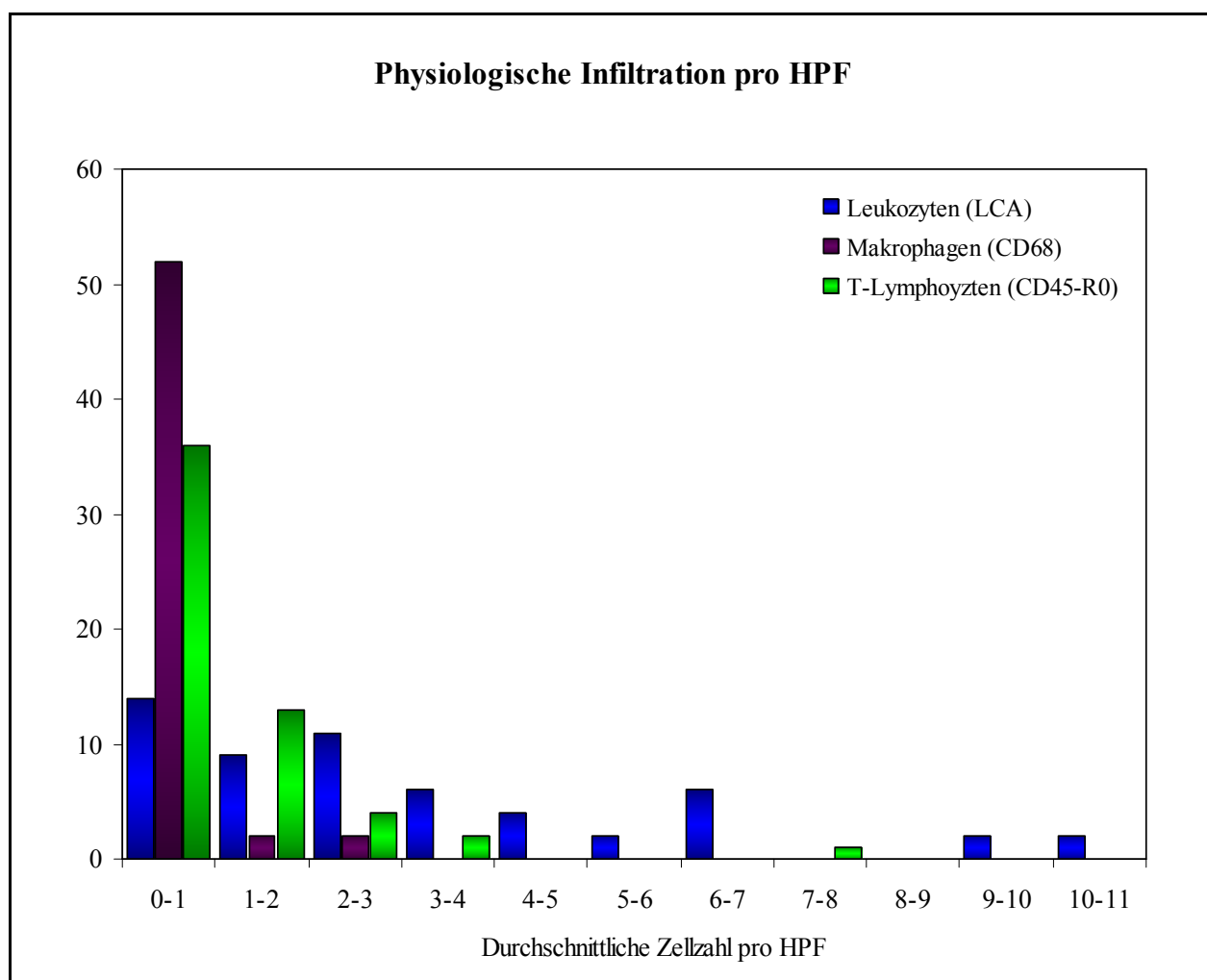


Abbildung 63: Physiologische Infiltration für jede immunhistochemische Färbung, Fälle gleicher Infiltration werden zusammenfasst.

Obwohl bislang, außer in der vorliegenden Arbeit, keine ausreichend umfangreiche Quantifizierung von Infiltraten im Säuglingsmyokard erfolgte, existieren wie in Kapitel 1.2.4 dargestellt bereits Grenzwerte für das Säuglingsmyokard, die im Falle eines Plötzlichen Kindstods unter Berücksichtigung der altersspezifischen Größenverhältnisse als pathologisch anerkannt werden.

Nach der „State of the art conference on the stratification of SUDI“ werden für postmortal gewonnenes Myokard von Säuglingen “<15 lymphocytes (10 HPF, using a 40 objective) in one section in the absence of myocyte necrosis” (Rognum et al., 2003) als normal angesehen. Wie dieser Grenzwert ermittelt wurde, wird allerdings nicht angegeben. Außerdem veröffentlichten Dettmeyer et al. (2004) ebenfalls Grenzwerte für eine Myokarditis an autoptisch gewonnenem Myokardgewebe in Fällen des Plötzlichen Kindstods: Es gelten mehr als 15 Leukozyten bzw. mehr als 10 Lymphozyten pro High-Power-Field als beweisend für eine Myokarditis, ebenfalls als Durchschnittswert gemittelt über 20 High-Power-Fields pro Herz. Weiterhin gelten mehr als 5 Lymphozyten und mehr als 10 Makrophagen als verdächtig für eine Myokarditis. Dabei wurden die Grenzwerte auf Basis eines Vergleichs mit dem Kontroll-Kollektiv und des untersuchten SIDS-Kollektivs ermittelt. Dieses Vorgehen ist kritisch zu hinterfragen bzw. nicht sinnvoll, da damit das Vorliegen von Myokarditis-Fällen innerhalb des SIDS-Kollektivs schon impliziert wird. Bereits Krous et al. (2009) kritisieren dieses Vorgehen: „they created a classification scheme for myocarditis that has not been verified to be clinically relevant and was arbitrarily based on their cell counts“.

Die Grenzwertbildung für eine Myokarditis aufgrund der berechneten Infiltration wäre nur dann sinnvoll, wenn für Säuglinge durch eine repräsentative Untersuchung die Infiltration innerhalb eines Kontroll-Kollektivs mit den Werten eines altersgleichen Myokarditis-Kollektivs verglichen würde. Wenn man zudem berücksichtigt, dass die ausgewiesenen Zellzahlen von Dettmeyer (2004) und Dettmeyer et al. (1999) ungewöhnlich hoch sind bzw. einem möglichen „umgekehrten sampling error“ (siehe Kapitel 5.6.2.1) unterliegen, dann sind diese Grenzwerte weder repräsentativ noch valide.

Trotzdem sollen die Ergebnisse dieser Arbeit noch abschließend mit diesen publizierten Grenzwerten für Säuglingsmyokard verglichen werden:

- Leukozyten: Legt man die als pathologisch publizierten 15 Leukozyten/HPF zu Grunde, so liegen die umgerechnet 3,73 Leukozyten/HPF in der vorliegenden Arbeit deutlich darunter und sind trotz statistischer Signifikanz gegenüber dem Kontroll-Kollektiv definitiv nicht als pathologisch anzusehen. Andererseits entsprechen die 15 Leukozyten/HPF umgerechnet 63,15 Leukozyten/mm<sup>2</sup> in 100facher Vergrößerung. Diese hohe Leukozytenanzahl erreicht dann in der Tat auch nur der eindeutig als Myokarditis ausgewiesene Fall Nr. 4 mit durchschnittlich 64,30 Leukozyten pro Quadratmillimeter.
- T-Lymphozyten: Die publizierten Grenzwerte von 10 Lymphozyten/HPF (= 42,1 Lymphozyten/mm<sup>2</sup>) werden nur in zwei Fällen erreicht, die mittlere Lymphozytenanzahl liegt mit 1,35 T-Lymphozyten/HPF deutlich darunter. Auffällig wären demnach ebenfalls der Myokarditis-Fall Nr. 4 sowie der Fall Nr. 75, ein weiterer Fall wäre als „Myokarditis verdächtig“ (5-9 Lymphozyten/HPF) einzustufen (Fall Nr. 63). Von den beiden letztgenannten Fällen zeigt sich allerdings nur im Fall Nr. 75 ein ebenfalls erhöhter Nachweis von Leukozyten bei unauffälliger Anamnese und unauffälliger weiterer Diagnostik, so dass dieser Fall zumindest als „Myokarditis verdächtig“ betrachtet werden kann. Der von Rognum et al. (2003) als normwertig publizierte Grenzwert von 15 Lymphozyten/HPF wird in diesem Kollektiv nur von dem Myokarditis-Fall Nr. 4 überschritten.
- Makrophagen: Der als „Myokarditis verdächtig“ geltende Wert von zehn oder mehr Makrophagen pro HPF – umgerechnet 42,1 Makrophagen pro Quadratmillimeter – wird in dem vorliegenden Kollektiv in keinem Fall, in keiner einzelnen Probeentnahmestelle und auch nicht in einem einzelnen Quadratmillimeter erreicht.

Zusammenfassend kann daher festgehalten werden, dass die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Anzahl von 15 Leukozyten/mm<sup>2</sup> sowohl nach geltenden Grenzwerten für Erwachsene an vitalem Myokardgewebe (Aretz et al., 1987; Foley und Edwards, 1988) als auch nach den publizierten Grenzwerten für unauffälliges Myokard im Kindstod-Kollektiv nicht als pathologisch angesehen werden kann (Dettmeyer et al., 2004; Rognum et al., 2003). Lediglich der tatsächliche Myokardi-

tis-Fall Nr. 4 kann auch als solcher diagnostiziert werden und ein weiterer Fall als „Myokarditis verdächtig“ angesehen werden (Fall Nr. 75). Zwei weitere, im SIDS-Kollektiv als Myokarditis diagnostizierte Fälle, werden nach Auswertung aller Methoden durch das immunhistochemische Grenzwertkonzept nicht erfasst (Fall Nr. 10 und Fall Nr. 8, siehe Kapitel 4.5.1).

Eine hohe Myokarditis-Inzidenz in diesem Kollektiv bestätigt sich unter Anwendung einer repräsentativ ausgezählten Fläche nicht. Maximal 4 von 92 SIDS-Fällen (4,34 %) sind nach Auswertung aller Methoden als Myokarditis zu definieren und fälschlicherweise als SIDS-Fälle klassifiziert worden. Damit bestätigt sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine nur geringe Myokarditis-Inzidenz innerhalb eines SIDS-Kollektivs bzw. im Kindesalter (siehe Beckwith, 1973; DeSa, 1985, Krous et al., 2009; Noren et al., 1977, Weber et al.; 2008, siehe auch Studienüberblick in Kapitel 1.2.5).

Allerdings stehen die Ergebnisse in deutlichem Widerspruch zu den Ergebnissen von Dettmeyer (2004), der bei gleicher Methodik, teilweise identischem Kollektiv, aber viel geringerer ausgewerteter Myokardfläche eine weitaus höhere Anzahl von Myokarditiden nach Auswertung nach dem Grenzwertkonzept im SIDS-Kollektiv angibt. Insgesamt wurden in dem verwendeten Kollektiv 10 Fälle als Myokarditis (15,8 % aller Fälle) eingestuft und weitere neun als Myokarditisverdachtsfälle (14,29 %). In der Studie weisen demnach mehr als 30 % aller Fälle des verwendeten SIDS-Kollektivs Auffälligkeiten im Sinne myokarditischer Veränderungen auf (Dettmeyer 2004, S. 73f.). Diese auffallend hohe Inzidenz ist allerdings, wie bereits ausführlich dargestellt, am ehesten auf die beschriebenen methodischen und statistischen Schwächen im Sinne eines „umgekehrten sampling errors“ und die Ableitung von Grenzwerten aus dem Studienkollektiv selbst zurückzuführen.

### **5.6.2.3 Statistische Signifikanz versus Klinische Relevanz**

Die Einordnung der Zellzahlen in die verschiedenen bestehenden Grenzwertkonzepte führt allerdings zu der Frage, wie die Ergebnisse der Signifikanzprüfung zu bewerten sind. Kann trotz der sehr geringen Zellzahl nur aufgrund des statistischen Signifikanzunterschiedes zwischen SIDS- und Kontroll-Kollektiv auch von einer klinischen Relevanz ausgegangen werden?



Bis heute existiert keine Untersuchung, die nachweislich vor allem physiologisch klären kann, ab welcher Infiltration des Gewebes eine so schwerwiegende myokardiale Infektion vorliegt, dass sie als todesursächlich angesehen wird. Auch Krous et al. (2009) kommen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass: „neither ours or any of the existing studies succeed in establishing a clinically verifiable or even minimal level of myocardial inflammation and cardiomyocyte necrosis sufficient to cause sudden infant death“.

Für das vorliegende SIDS-Kollektiv mit der signifikanten Erhöhung an Leukozyten ergibt sich daher abschließend, dass bei den nachgewiesenen Zellzahlen für Leukozyten, die weit unter den als normwertig geltenden Werten für Erwachsenenmyokard und Säuglingsmyokard liegen, bei fehlenden altersgleichen Vergleichswerten für ein Myokarditis-Kollektiv sowie bei einem derart kleinen Kontroll-Kollektiv nicht davon ausgegangen werden kann, dass die nachgewiesene inflammatorische Reaktion eine klinische, letale Bedeutung hat. Lediglich auf Basis der mathematischen Signifikanz auf das Vorliegen vermehrter Myokarditiden bzw. auf eine im SIDS-Kollektiv todesursächliche Infiltration mit Leukozyten zu schließen, ist schlichtweg nicht möglich. Insgesamt ist dieser Signifikanzunterschied klinisch also zu vernachlässigen.

#### **5.6.2.4 Mittelwertproblematik**

Schließlich stellt sich wegen der beschriebenen mangelnden Verifizierung von Grenzwerten und der mangelnden Verwertbarkeit statistisch signifikanter Ergebnisse die Frage, ob der bisher und in der vorliegenden Arbeit verwendete Mittelwert als Beurteilungsfaktor eines immunhistochemischen Präparats überhaupt sinnvoll für die Entscheidungsfindung über das Vorliegen einer Myokarditis ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die durchschnittliche Infiltration in den immunhistochemischen Methoden über maximal 80 mm<sup>2</sup> Myokardgewebe pro Fall als Mittelwert berechnet. Dabei fiel in wenigen Fällen auf, dass es massive Schwankungen der Infiltrationen von Leukozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten innerhalb eines Falles gibt, wobei sich nicht nur massive Schwankungen der Zellzahlen von Probeentnahmestelle zu Probeentnahmestellen zeigen, sondern auch innerhalb der ausgezählten Quadratmillimeter einer einzigen Probeentnahmestelle (siehe Darstellung des Falls Nr. 76, Kapitel 4.3.7).

Fälle wie dieser zeigen, dass der gemittelte Wert pro Fall bei autoptisch gewonnenem Gewebe – als mathematischer Repräsentant für die durchschnittliche Infiltration des Herzens – nicht dazu geeignet ist, eine Aussage über das Vorkommen und die tatsächliche Verteilung von Infiltraten im Myokard zu machen, insbesondere weil große Schwankungen von Probeentnahmestelle zu Probeentnahmestelle sowie von  $\text{mm}^2$  zu  $\text{mm}^2$  unberücksichtigt bleiben. Es kann nicht alleine auf Basis der gemittelten Infiltration pro Fall auf das Vorliegen einer letalen Myokarditis geschlossen werden. Daher ist die Wahl des Mittelwertes als alleiniges Entscheidungskriterium für das Vorliegen einer Myokarditis an autoptischem Gewebe nicht sinnvoll.

Die Mittelwertbetrachtung für eine pathologische Infiltration der wenigen Quadratmillimeter Myokardgewebe aus einer Endomyokardbiopsie kann vor allem deshalb nicht auf autoptisches Gewebe übertragen werden, da der fokale Charakter einer Myokarditis durch überwiegend unauffälliges Myokard vor allem dann maskiert wird, je größer die zur Verfügung stehende Myokardfläche ist. Implizit ergibt sich daraus aber auch zusätzlich, dass das Festlegen eines Grenzwertes, basierend auf dem Mittelwert pro Fall, als Entscheidungsgrundlage für das Vorliegen einer Myokarditis nicht valide ist.

Diese Feststellung führt allerdings unweigerlich zu der Frage, wie die immunhistochemischen Ergebnisse sinnvoll interpretiert und analysiert werden können, wenn es darum geht postmortem in einem unauffälligen Kollektiv als Hilfsinstrument in der Diagnosestellung einer Myokarditis zu wirken.

Zunächst erscheint es sinnvoll, jeden einzelnen Fall für sich gesondert zu analysieren und zu interpretieren. Eine Aussage auf Basis aller Fälle zu treffen ist sicherlich nicht sinnvoll. Insbesondere der Umgang mit fokalen Infiltraten, die durch unauffälliges umgebendes Myokardgewebe statistisch in der Mittelwertberechnung „vernachlässigt“ werden, muss geklärt werden. Krous et al. (2009) gehen sogar davon aus, dass ein Beurteilungssystem, welches auf quantitativen Größen beruht und gleichzeitig klinische Aussagekraft hat, niemals entwickelt wird: “it is highly unlikely that a clinically reliable quantitative classification scheme will ever be developed” (Krous et al., 2009).

Neuere Ansätze lösen sich ebenfalls von der rein zufälligen Auswahl einzelner Quadratmillimeter oder High-Power-Fields für postmortales Myokardgewebe und entwickeln Indizes, die sich an der Anzahl fokaler Inflammationsherde im gesamten Präparat orientieren: „We established the inflammatory index in order to classify the severity of myocarditis, by counting the mean number of inflammatory foci per section of myocardium“ (Kitulwate et al., 2010). Dafür ist es sicherlich erstrebenswert in einer weiteren Untersuchung, die normale Anzahl von fokalen Infiltraten für das Säuglingsmyokard innerhalb eines Myokarditis-Kollektivs in Abgrenzung zu einem umfangreichen Kontroll-Kollektiv zu ermitteln. Auch Casali et al. (2012) lösen sich von der rein quantitativen Beurteilung und schlagen einen multivariablen Score vor zur Diagnostik von letalen bzw. inzidentiellen Myokarditiden. Dieser setzt sich aus verschiedenen histologischen Befunden (Infiltrate, Ödeme und Nekrosen) und aber auch aus makroskopischen Befunden sowie anamnestischen Angaben kardialer Symptome zusammen.

Abschließend ist für die Immunhistochemie festzuhalten, dass die Aussagekraft der immunhistochemischen Methoden für die Diagnostik der Myokarditis als Todesursache begrenzt ist. Insbesondere als Suchmethode, um in einem unauffälligem Kollektiv die Myokarditis-Inzidenz zu ermitteln, ist sie aufgrund der beschriebenen Mängel in der Quantifizierung, fehlender physiologischer Untersuchungen zur Anzahl letaler Infiltrate und der damit verbundenen unklaren Interpretation der Ergebnisse nicht geeignet. Die Ergebnisse der Immunhistochemie können und dürfen nicht unabhängig von den anamnestischen, konventionell-histologischen und den molekularbiologischen Untersuchungen interpretiert werden. Ein isoliert auffälliges Ergebnis der Immunhistochemie darf aufgrund der beschriebenen Unsicherheit in der Quantifizierung und Interpretation nicht als Myokarditis gewertet werden, vor allem ohne Berücksichtigung der Myozytennekrose als wesentliches Merkmal einer letalen Myokarditis (Madea und Drexler, 2012; Casali et al. 2012).

In begründeten Verdachtsfällen einer Myokarditis eignet sich die immunhistochemische Methode allerdings gut, um die Diagnose durch Nachweis von deutlichen Infiltraten (siehe Fall Nr. 4) zu bestätigen. Eine Quantifizierung von Infiltraten ist in diesen Fällen allerdings aufgrund des eindrücklichen mikroskopischen Bildes nicht notwendig.

## 5.7 Molekularbiologie

In der Myokarditisdiagnostik sind heute auch molekularbiologische Untersuchungsverfahren Standard (siehe Kapitel 1.2.4). In der vorliegenden Arbeit wird dieses Verfahren nicht angewandt, da dies Gegenstand einer eigenen Untersuchung von Drexler et al. (2012a/b) am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn ist.

Diese Untersuchung, bestehend aus 149 SIDS-Fällen und 9 Kontroll-Fällen, kommt zu dem Ergebnis, dass in 11,4 % des SIDS-Kollektivs, aber auch in 22,2 % des Kontroll-Kollektivs, im nativen Myokardgewebe Enteroviren nachgewiesen werden konnten. Allerdings findet sich in den viruspositiven Fällen Virusgenom in gleicher oder höherer Konzentration auch im Herzblut, so dass eine Virämie nach respiratorischer oder gastrointestinaler Infektion als Ursache für den Virusnachweis möglich ist. Im Myokarditis-Fall Nr. 4 gelang kein Virusnachweis, auch die anderen viruspositiven Fällen weisen keine histologischen Anzeichen einer Myokarditis auf (Drexler et al., 2012a).

Diese Untersuchungsergebnisse stehen im Widerspruch mit diversen bisherigen Studienergebnissen. Eine Studie von Dettmeyer et al. (2004) weist Virusgenom in 43,5 % aller SIDS-Fälle (Enteroviren, Adenoviren, EBV, Parvovirus B 19, HHV 6) im Myokardgewebe nach, bei fehlendem Virusnachweis im Kontroll-Kollektiv. Trotz unauffälliger Immunhistochemie in 2/3 dieser viruspositiven Fällen und unauffälliger histologischer Diagnostik wird daraus geschlossen, dass es eine „more than doubled incidence of virus-induced myocardial affections in SIDS than originally assumed“ gibt, verglichen mit der Myokarditis-Inzidenz von 16,8 % im SIDS-Kollektiv einer Studie von Rambaud et al. (1992).

Ein ähnlich hoher myokardialer Virusnachweis wird von Dettmeyer et al. (2009) aufgezeigt. In dieser Studie gelingt in 28,6 % aller SIDS-Fälle der Nachweis von Erregergenom, insbesondere Enteroviren, aber auch Adenoviren, Parvoviren, EBV und CMV. Das Kontroll-Kollektiv ist ebenfalls ohne Erregernachweis. Immunhistochemisch ergibt sich nach Anwendung der beschriebenen Grenzwerte (Dettmeyer et al., 2004) für 11,2 % der SIDS-Fälle eine Myokarditis als Todesursache und weitere 28,6 % werden als myokarditisverdächtig eingestuft. Eine abschließende Gegenüberstellung der viruspositiven mit den immunhistochemisch auffälligen Fällen fehlt allerdings.

Letztlich schließt eine Studie von Dettmeyer et al. (2006) aus dem Virusnachweis von CMV in 2 von 70 SIDS-Fällen, der alleinige Nachweis „can be regarded as the cause of death in cases of SIDS“. Histologisch konnte jedoch nur in einem Fall ein minimaler inflammatorischer Fokus nachgewiesen werden.

Diese gegensätzlichen Ergebnisse der Studien von Dettmeyer und Drexler et al. (2012a/b) führen jedoch zu der Frage, ob der alleinige Virusnachweis tatsächlich ausreicht, um auch bei unauffälligen immunhistochemischen und konventionell-histologischen Ergebnissen ohne Nachweis von Nekrose oder Zelluntergang auf das Vorliegen einer letalen myokardialen Infektion zu schließen. Ist der Virusnachweis im Myokard per se als pathologisch zu werten bzw. pathognomonisch für eine Myokarditis?

Es ist bekannt, dass als kardiotope Viren insbesondere Enteroviren in Fällen einer viralen Myokarditis nachgewiesen werden (Bowles et al., 1986; Burch et al., 1968; Dettmeyer et al., 2002; Kim et al., 2001; Kühl et al., 2005a; Woodruff, 1980). Daneben gelang in den letzten Jahren zudem der vermehrte Nachweis von Parvovirus B19 und HHV6 als Ursache von Myokarditiden (Kühl et al., 2005a; 2005b; Mahrholdt et al., 2006; Pankuweit und Maisch, 2010).

Für Dettmeyer et al. (2004) ergibt sich schon aus dem myokardialen Nachweis von Enteroviren die Schlussfolgerung: „To us, these results lead to the conclusion that the detection of enteroviral genome within the myocardium is itself a pathologic finding“. Bereits 1992 zeigten Keeling et al. allerdings, dass Enteroviren als „common environmental pathogen“ angesehen werden können, da diese nicht nur bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie als Folgeerkrankung einer Myokarditis nachgewiesen werden konnten, sondern in gleichem Maße auch in einem Kontroll-Kollektiv. Zudem konnten Drexler et al. (2012a), Kindermann et al. (2008) als auch Martin et al. (1994) aufzeigen, dass „no direct correlation between positive histopathology and positive PCR analysis“ (Martin et al., 1994) besteht. Diese Dissonanz zwischen den Methoden kann nach Klingel et al. (2004) auch darauf zurückgeführt werden, dass „a major disadvantage of the PCR technique, however, is the failure to differentiate between infected cell types, and therefore the detection of virus in endomyocardial biopsy might reflect accidental amplification of viral sequences in persistently infected blood cells“.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der alleinige Virusnachweis nicht ausreicht, um die Diagnose einer letalen Myokarditis zu stellen, sondern dass die Diagnose einer Myokarditis nur in Verbindung mit histologischen bzw. immunhistochemischen Infiltraten bzw. Nekrose gestellt werden darf: „the detection of viral genomes appears to be of etiopathogenic importance only in the presence of an immunohistology-proven reactive inflammatory infiltrate” (Kindermann et al. 2008).

## **5.8 Apoptose**

### **5.8.1 Einordnung der Ergebnisse**

Apoptose bezeichnet einen komplex regulierten Zelluntergang, der sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen im Körper vorkommt (Kerr et al., 1972). Auch in der Elimination virusinfizierter Zellen spielt Apoptose eine wichtige Funktion (O’Brien, 1998). Speziell im Rahmen einer aktiven viralen Myokarditis konnten neben Nekrose auch eine signifikante Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen werden (Abbate et al., 2009; Alter et al., 2001; Corradi et al., 2004; Kytö et al., 2004; Zorc-Pleskovic et al., 2006). In Tiermodellen korreliert dabei die Rate der apoptotischen Zellen mit der Höhe des Virustiters im Myokard (Saraste et al., 2003). Der Nachweis von Apoptose im Myokard ist auch deshalb bedeutend bzw. als pathologisch zu werten, weil Apoptose im Gegensatz zu vielen anderen Geweben im vitalen Myokard nicht als physiologisch angesehen wird (Narula et al., 1996), (siehe dazu auch Kapitel 1.3).

Da Apoptose ein „common mechanism of myocardial damage in severe acute human myocarditis” (Kytö et al., 2004) ist, liegt es nahe zu vermuten, dass, wenn Myokarditis im SIDS-Kollektiv als Haupttodesursache vermutet wird, auch hier signifikant erhöhte Apoptoseraten nachzuweisen sind. Diese These konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Trotz repräsentativer Färbung von 2/3 des gesamten entnommenen Myokards im SIDS-Kollektiv und 82,5 % des entnommenen Myokards im Kontroll-Kollektiv sowie Mikroskopierung des gesamten verfügbaren Myokardschnittes konnten keine erhöhten Apoptoseraten im SIDS-Kollektiv festgestellt werden. Im Gegenteil, der Anteil der apoptotischen Fälle war im Kontroll-Kollektiv sogar höher. Bei über 90 % unauffälligen Präparaten ist der Nachweis von apoptotischen Zellen insgesamt allerdings sehr gering. Dabei zeigt sich auch in Übereinstimmung mit bisherigen Studienergebnissen, dass apoptotische Zellen fokal in Clustern in Nachbarschaft zu völlig unauffälligem Myokardgewebe vorliegen (Narula et al., 1996; Zorc-Pleskovic et al., 2006). Die Ausbreitung

variiert dabei von wenigen einzelnen Zellen bis zu flächendeckenden, mehrere Quadratmillimeter umfassenden apoptotischen Bereichen. Auch spezifische Merkmale oder Risikofaktoren, die mit dem Auftreten von apoptotischen Zellen assoziiert werden können, bzw. eine bevorzugte Lokalisation apoptotischer Zellen im Herzen konnte in dem Studien-Kollektiv nicht identifiziert werden (siehe Kapitel 4.4.2 und 4.4.3).

Da die Ergebnisse der TUNEL-Methode zudem völlig unabhängig von den Ergebnissen der immunhistochemischen Methoden, der Krankengeschichte oder der konventionellen Diagnostik sind (siehe Kapitel 4.5.3), kann im Hinblick auf die genannte Untersuchungsthese für das vorliegende SIDS-Kollektiv festgehalten werden, dass die apoptotischen Zellen, außer im Fall Nr. 4 und Fall Nr. 8, nicht durch eine Myokarditis entstanden sind.

### **5.8.2 Methodenkritik**

Die TUNEL-Methode selbst ist nach kurzer Einarbeitung einfach und sicher durchzuführen. Dabei müssen allerdings bestimmte Fehlerquellen berücksichtigt werden: Vermeidung bzw. Erkennung von Enzymdefekten durch zeitnahes Auftauen und Mitführen einer Positivkontrolle in jedem Färbevorgang, Vermeidung von Enzymverwechslung durch Mitführen einer Negativkontrolle, Verwendung von DNase-freiem Wasser, um eine artifizielle Spaltung der Kardiomyozyten-DNA im Färbeablauf und folglich die Produktion von falsch-positiven Ergebnissen zu vermeiden (siehe auch Kapitel 2.5.2).

Folgende praktische Probleme sind während der Durchführung und Auswertung aufgefallen: Die TUNEL-Methode ist durch die Enzymlösungen sehr kostenintensiv, aber auch zeitaufwendig in der Anfertigung. Aufgrund der Zusammenstellung des Kits und der notwendigen Verarbeitungsgeschwindigkeit der Enzyme konnten lediglich 8 von insgesamt 587 Myokardproben pro Färbedurchlauf von etwa 4,5 Stunden angefärbt werden. Außerdem fiel nach den ersten Durchläufen auf, dass die Färbungen nach einem Zeitintervall von einigen Wochen verblassen und nur durch Neufärbung reproduzierbar sind. Daher wurde streng darauf geachtet, die Schnitte innerhalb von 24-72 Stunden nach Färbung lichtmikroskopisch auf apoptotische Zellen zu untersuchen und auszuzählen, um ein zeitabhängiges Verblassen und damit die Erhebung von falsch-negativen Ergebnissen zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurden die apoptotischen Zellen, analog zur immunhistochemischen Methode, in Quadratmillimetern gezählt. Durch die hohe Anzahl von unauffälligen Präparaten bei gleichzeitig aber sehr hoher Anzahl apoptotischer Zellen pro Quadratmillimeter, ist der Mittelwert pro Quadratmillimeter auch in dieser Färbung als Vergleichsparameter ungeeignet. Insbesondere die tatsächliche Verteilung von apoptotischen Zellen spiegelt sich im Mittelwert nicht wider. Der Median, aber auch der Vergleich der positiven Präparate zeigt schließlich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen Anzahl der positiven Fälle, Zellzahlverteilung und Anzahl der apoptotischen Zellen im Vergleich beider Kollektive gibt. Im Myokarditis-Fall Nr. 4 zeigt sich eine eindeutige Apoptose. In diesem, aber auch im Fall Nr. 8, kann die TUNEL-Methode die Ergebnisse der bisherigen Verfahren bestätigen.

Es ist bekannt, dass die TUNEL-Methode zum Nachweis von Apoptose gewissen Einschränkungen unterliegt. Beispielsweise wurde, insbesondere früher, eine eingeschränkte Spezifität kritisiert, da unter Umständen auch nekrotische Zellen dargestellt werden: „[TUNEL] fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death“ (Grasl-Kraupp et al., 1995). Durch verbesserte Kenntnisse und Anpassung der Materialaufbereitung und Färbetechnik (Labat-Moleur et al., 1998; Negoescu et al., 1998) wird die TUNEL-Methode heute allerdings auch zum spezifischen Nachweis von Apoptose akzeptiert, insbesondere wegen ihrer Einfachheit. In dem vorliegenden SIDS-Kollektiv mit der Fragestellung nach dem Vorliegen einer Myokarditis wäre allerdings auch ein etwaiger Nachweis von Nekrose zu vernachlässigen, da Nekrose ebenfalls ein Myokarditiskriterium darstellt und weitere Herzerkrankungen, die mit Nekrose einhergehen, wie z.B. ein Myokardinfarkt, im Säuglingsalter als Raritäten anzusehen sind.

Letztlich kann festgehalten werden, dass die TUNEL-Methode bzw. der Nachweis von Apoptose zur weiteren Diagnosebestätigung in begründeten Verdachtsfällen auf das Vorliegen einer Myokarditis sinnvoll ist, wie im Fall Nr. 4. Als Such- und Entscheidungsmethode für das Vorliegen einer Myokarditis in einem unauffälligen Standardkollektiv, wie im vorliegenden SIDS-Kollektiv, in Kombination mit unauffälligen konventionellen und immunhistochemischen Ergebnissen, ist sie dagegen ungeeignet, vor allem aufgrund der fehlenden Signifikanz der Ergebnisse und der kosten- und zeitaufwendigen Anfertigung.



## 6. Fazit und Ausblick

Eine akute Myokarditis ist eine mögliche Ursache plötzlicher Todesfälle, insbesondere bei jungen Erwachsenen (Basso, 2001 et al.; Doolan et al., 2004). Diese Tatsache, aber auch starke anamnestische und wissenschaftliche Hinweise auf eine infektiologische Ursache des Plötzlichen Kindstods haben in den letzten Jahrzehnten dazu geführt, dass sich zahlreiche Studien mit der Frage nach einer Myokarditis als zugrundeliegende Todesursache beschäftigt haben.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, **ob es eine erhöhte Infiltration im SIDS-Kollektiv gibt, und ob daraus auf das Vorliegen einer meist viralen Myokarditis geschlossen werden kann, die dann als Haupttodesursache in Fällen des Plötzlichen Kindstods anzunehmen ist.** Ein repräsentatives SIDS-Kollektiv wurde mit den heute üblichen Standardmethoden auf Anzeichen einer Myokarditis untersucht. Im SIDS-Kollektiv wurde eine erhöhte Infiltration gegenüber dem Kontroll-Kollektiv nur in der Leukozytenfärbung festgestellt, in allen anderen angewandten Methoden zeigte sich kein Unterschied zum Kontroll-Kollektiv. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass dieser statistische Unterschied der Leukozytenfärbung zwischen den Kollektiven bei insgesamt niedrigen Zellzahlen nicht klinisch relevant ist. Nur aufgrund des mathematischen Unterschiedes kann nicht auf das Vorliegen einer Myokarditis geschlossen werden. Vor allem kann nicht aufgrund fehlender Erkenntnisse über das Ausmaß einer letalen Infiltration eine letale Myokarditis als Haupttodesursache festgelegt werden.

Unter Berücksichtigung aller Methoden, konnte abschließend für zwei Fälle eine Myokarditis nach den DALLAS-Kriterien festgestellt werden, zwei weitere Fälle sind nach Auswertung aller angewandten Methoden zumindest als „Myokarditis verdächtig“ anzusehen. Die Myokarditis-Inzidenz in dem vorliegenden SIDS-Kollektiv liegt damit bei 2,17 % bis maximal 4,35 %. Damit zeigt sich ebenfalls, dass eine Myokarditis nicht die Haupttodesursache des Plötzlichen Kindstods ist und die Inzidenz eher akzidentiell ist (siehe auch Beckwith, 1973; DeSa, 1985; Krous et al., 2009; Noren et al., 1977; Weber et al., 2008). Die hohen Myokarditis-Inzidenzen jüngerer Untersuchungen von 15-30 % innerhalb eines SIDS-Kollektivs können nicht bestätigt werden (Dettmeyer et al., 1999; 2004; 2009; Dettmeyer 2004; Rambaud et al., 1992; Rasten-Almquist et al., 2002; Shatz et al., 1997).

Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob **die Herleitung und Anwendung der bekannten Grenzwerte für eine Myokarditis im SIDS-Kollektiv richtig und sinnvoll ist, bzw. ob ab einer kritischen Anzahl von Entzündungszellen auf das Vorliegen einer letalen Myokarditis geschlossen werden kann.** Diese Frage muss abschließend eindeutig verneint werden. Erstens sind die älteren Grenzwerte weder für Säuglinge noch für postmortales Gewebe entwickelt worden, so dass die Übertragung dieser Grenzwerte auf Säuglingsmyokard, insbesondere durch fehlende physiologische Kenntnisse einer als normal anzusehenden Infiltration in diesem Alter, unklar ist. In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals durch eine ausreichend umfangreiche Untersuchung der myokardialen Infiltration Zellzahlen ermittelt werden, die als physiologisch für ein unauffälliges Säuglingsmyokard anzusehen sind (siehe Kapitel 5.6.2.2). Zweitens konnte gezeigt werden, dass die für ein SIDS-Kollektiv geltenden Grenzwerte von Entzündungszellen im Myokard nicht nachvollziehbar festgelegt wurden (Rognum et al., 2003) oder auf selbst ermittelten Grenzwerten ohne statistische Grundlage basieren (Dettmeyer et al. 2004). Letztlich zeigt sich auch in der Diskussion um die Interpretation der nachgewiesenen signifikanten Erhöhung von Leukozyten im SIDS-Kollektiv, dass von einem absoluten Wert keine Aussage über die klinische Relevanz getroffen werden kann und dass der bislang verwendete Mittelwert absolut ungeeignet ist, um eine Aussage über die tatsächliche Infiltration zu machen. Besonders starke Schwankungen von Probeentnahmestelle zu Probeentnahmestelle sowie von mm<sup>2</sup> zu mm<sup>2</sup> bleiben unberücksichtigt. Die Grenzwertbildung ohne repräsentative Untersuchung eines altersgleichen Myokarditis-Kollektivs und ohne umfangreiche Flächenauswertung ist nicht valide. Es kann nicht alleine auf Basis der gemittelten Infiltration pro Fall auf das Vorliegen einer letalen Myokarditis geschlossen werden.

Außerdem wurde erstmals auch das Vorkommen myokardialer Apoptose in Fällen des Plötzlichen Kindstods mit der Frage untersucht, ob **es im SIDS-Kollektiv erhöhte Apoptoseraten gibt, als Hinweis darauf, dass eine Myokarditis als wesentlicher, zum Tode führender Pathomechanismus anzunehmen ist.** Auch diese Frage muss eindeutig verneint werden und zeigt in Übereinstimmung mit den anderen Methoden, dass die Diagnose Myokarditis für das SIDS-Kollektiv nicht als Haupttodesursache anzunehmen ist. Die Apoptoseraten sind in beiden Kollektiven annähernd gleich bei einem hohen Anteil von unauffälligen Myokardproben (>90 %).

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit kritisch diskutiert, ob **die gewählten Methoden zur Diagnostik einer Myokarditis zielführend und sinnvoll sind.**

Zunächst zeigt sich eindrucksvoll, dass durch die neue Zählmethode, die einen schnellen und guten Überblick über das gesamte Präparat gibt, verbunden mit einer massiven Steigerung der untersuchten Fläche pro Herz um den Faktor 17 im Vergleich zu den bisherigen postmortalen Studien eine deutlich höhere Repräsentativität der Ergebnisse erzielt wird. Damit wird der postmortale Flächenvorteil gegenüber einer Endomyokardbiopsie besser genutzt und zusätzlich eine studienübergreifende Vergleichbarkeit der Ergebnisse erzielt.

Weiterhin kann festgehalten werden, dass die DALLAS-Kriterien postmortal zur Beurteilung konventioneller Präparate trotz aller Kritik nicht vernachlässigt oder ignoriert werden dürfen, zumal gezeigt wurde, dass einige Kritikpunkte für die postmortale Beurteilung nicht mehr zutreffen (siehe Kapitel 5.3 und 5.5). Insbesondere in Fällen des Plötzlichen Kindstods kann davon ausgegangen werden, dass bei einer letalen Myokarditis auch konventionell-histologisch bereits strukturelle Veränderungen im Sinne einer Myokarditis sichtbar sind und nicht in allen Fällen von einer „diagnostischen Lücke“ bzw. einer rhythmogenen Todesursache ausgegangen werden kann.

Die immunhistochemischen Methoden sind Standard in der Myokarditis-Diagnostik und Verlaufskontrolle und eignen sich in begründeten Verdachtsfällen auf das Vorliegen einer Myokarditis gut, um die Diagnose zu bestätigen, insbesondere auch im Rahmen der Endomyokardbiopsie von lebenden Patienten. Myokardiale Infiltrate können früher und einfacher diagnostiziert werden als im konventionellen Präparat. Als Suchmethode für das Vorliegen einer Myokarditis in einem unauffälligen Kollektiv ohne Hinweis auf Myokarditis-Anzeichen stellt sich allerdings die Frage, wie die immunhistochemischen Ergebnisse sinnvoll interpretiert und analysiert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass durch die beschriebenen Mängel in der Quantifizierung und der statistischen Methoden, der Nichtanwendbarkeit von Grenzwerten sowie durch die fehlende Kenntnis physiologischer Infiltrate, die Interpretation der Ergebnisse unklar ist. Die Aussagekraft der immunhistochemischen Methoden als Suchmethode in einem unauffälligen Kollektiv ist daher begrenzt. Letztlich können und dürfen die Ergebnisse der Immunhistochemie nicht unabhängig von den anamnestischen, konventionell-histologischen und den molekularbiologischen Untersuchungen interpretiert werden.

Abschließend hat die Durchführung der TUNEL-Methode ebenfalls gezeigt, dass diese zur weiteren Diagnosebestätigung in begründeten Verdachtsfällen auf das Vorliegen einer Myokarditis sinnvoll ist. Als Such- und Entscheidungsmethode für das Vorliegen einer Myokarditis in einem unauffälligen Standardkollektiv, wie im vorliegenden SIDS-Kollektiv, ist der sinnvolle Einsatz fraglich, da sie zu keinem verwertbaren signifikanten Ergebnis führt und sehr kosten- und zeitaufwendig ist.

In jedem einzelnen SIDS-Fall ist zu prüfen, ob eine den Tod hinreichend erklärende Todesursache gefunden werden kann. Eine Myokarditis als Todesursache konnte zwar nicht als Haupttodesursache im vorliegenden Kollektiv diagnostiziert werden, dennoch muss sie in jedem einzelnen Fall ausgeschlossen werden. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass es durchaus noch Schwächen und Kritikpunkte in den heute üblichen Standardmethoden gibt. Es wäre empfehlenswert, anstelle eines Grenzwertkonzeptes in einer weiteren Untersuchung die durchschnittliche Infiltration in altersgleichen Myokarditis-Fällen zu ermitteln, um Referenzwerte zu erhalten, auf deren Basis die Einordnung eines einzelnen Falles möglich ist. Sinnvoll ist dies allerdings nur, wenn auch die postmortal zur Verfügung stehende Myokardfläche umfangreich ausgewertet wird, wie zum Beispiel mit der Zählmethode in der vorliegenden Arbeit und die Anzahl der Fälle ausreichend groß ist. Zur Realisierung dieser Referenzwerte wäre allerdings eine institutsübergreifende Kooperation notwendig, um eine repräsentativ große Gruppe Myokarditis-Fällen in diesem Alter zu erreichen.

## 7. Zusammenfassung

Die Erforschung möglicher Ursachen des Plötzlichen Kindstods ist trotz sinkender Fallzahlen von großem wissenschaftlichem Interesse. Aufgrund bestimmter epidemiologischer Auffälligkeiten wird auch eine infektiologische Todesursache diskutiert, z.B. eine virale Myokarditis.

In älteren, meist rein histologischen Untersuchungen wurde dabei relativ selten eine Myokarditis im SIDS-Kollektiv oder bei älteren verstorbenen Kindern nachgewiesen (0-2%). In jüngeren Studien werden jedoch teilweise Inzidenzen von mehr als 20% angegeben, vor allem basierend auf immunhistochemischen und molekularbiologischen Diagnoseverfahren. Diese Diskrepanz wird allerdings nicht nur durch die gewählten Methoden, sondern auch durch das Fehlen von standardisierten Myokarditis-Kriterien für die neueren Verfahren erklärt. Teilweise werden immunhistochemische Grenzwerte für eine Myokarditis willkürlich festgelegt oder unauffällige konventionell-histologische Befunde vernachlässigt, teilweise wird der alleinige myokardiale Virusnachweis als pathognomonisch für eine Myokarditis interpretiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob in Fällen des Plötzlichen Kindstods eine erhöhte zelluläre Infiltration sowie apoptotische Zellen nachzuweisen sind, so dass eine Myokarditis als Haupttodesursache für dieses Phänomen anzunehmen ist. Gleichzeitig wurde dabei hinterfragt, ob die Anwendung der Standardmethoden für die Diagnose einer Myokarditis mit ihren jeweilig geltenden Kriterien bzw. Grenzwerten auch für postmortales Gewebe sinnvoll ist.

Dazu wurde ein repräsentatives SIDS-Kollektiv sowie ein altersgleiches Kontroll-Kollektiv mit den heute üblichen Verfahren, d.h. konventionell-histologisch und immunhistochemisch auf Infiltrate untersucht. Außerdem wurde mit der TUNEL-Methode erstmals auch das Vorkommen von apoptotischen Zellen im SIDS-Kollektiv erforscht. Im Vergleich zu den bisherigen postmortalen Studien in Fällen des Plötzlichen Kindstods wurde zudem zum ersten Mal überhaupt eine ausreichend große Fläche an Myokard quantitativ und qualitativ ausgewertet.

Aus der umfangreichen Quantifizierung ergeben sich keine klinisch relevanten Unterschiede der Zellzahlen im Vergleich beider Kollektive. Dabei werden insgesamt niedrige Zellzahlen für beide Kollektive ermittelt mit nur vereinzelt zellreichen Fällen. Auch der Nachweis einer erhöhten Apoptoserate im SIDS-Kollektiv gelang nicht. Letztlich können unter Berücksichtigung der anam-

nestischen, konventionell-histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse zwei Fälle eindeutig als Myokarditis und zwei weitere zumindest als Myokarditisverdächtig betrachtet werden. Damit liegt die Myokarditis-Inzidenz im SIDS-Kollektiv bei 2,17-4,35 %. Es ergibt sich also kein Anhalt dafür, dass eine Myokarditis einen wesentlichen zum Tode führenden Pathomechanismus bei als SIDS deklarierten Todesfällen darstellt.

In der Arbeit zeigt sich abschließend, dass die klassische konventionell-histologische Diagnose einer Myokarditis zwar durch die immunhistochemische Qualifizierung und Quantifizierung interstitieller Entzündungszellen ergänzt, allerdings nicht ersetzt werden darf. Zum Einen weil bekannte Nachteile der klassischen-konventionellen Diagnostik zwar in der Endomyokardbiopsie gelten, postmortal aber nur eine untergeordnete Rolle spielen. Zum Anderen weil die bislang in der Literatur empfohlenen immunhistochemischen Myokarditis-Grenzwerte, basierend auf der mittleren Infiltration pro Fall, nicht valide sind, was dazu führt, dass die Analyse und Interpretation der quantitativen Ergebnisse losgelöst von anderen Methoden willkürlich bzw. unsicher ist.

## 8. Literaturverzeichnis

Abbate A, Sinagra G, Bussani R, Hoke NN, Merlo M, Varma A, Toldo S, Salloum FN, Biondi-Zoccai GG, Vetrovec GW, Crea F, Silvestri F, Baldi A. Apoptosis in patients with acute myocarditis. *Am J Cardiol* 2009; 104: 995-1000

Adams KF, Lindenfeld JA et al. HFSA 2006 Comprehensive Heart Failure Practice Guide. *Journal of Cardiac Failure* 2006; 12: 1-122

Adelson L, Kinney ER. Sudden and unexpected death in infancy and childhood. *Pediatrics* 1956; 17: 663-699

Adler CP. Morphologische Grundlagen der Herzhypertrophie und des Herzwachstums. *Med Welt* 1972; 23: 477-482

Ali N, Ferrans VJ, Roberts WC, Massuni RA. Clinical evaluation of transvenous catheter technique for endomyocardial biopsy. *Chest* 1973; 63: 399-402

Alter P, Jobmann M, Meyer E, Pankuweit S, Maisch B. Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy: does enterovirus genome persistence protect from apoptosis? An endomyocardial biopsy study. *Cardiovasc Pathol* 2001; 10: 229-234

Althoff H. Erweiterte Sektions- und Untersuchungsmethoden der Nasen-Rachenregion zum Nachweis pathomorphologischer Befunde bei plötzlichen Kindstodesfällen. *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1977; 79: 205-215

Althoff H. Methodik und Ergebnisse postmortaler Nasen-Rachen-Untersuchungen bei Todesfällen im Säuglingsalter, speziell bei plötzlichen Kindstodesfällen. *Pathologe* 1986; 7: 207-212

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

Anderson HR, Cook DG. Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax* 1997; 52: 1003-1009

Angelini A, Calzolari V, Calabrese F, Boffa GM, Maddalena F, Chioin R, Thiene G. Myocarditis mimicking acute myocardial infarction: role of endomyocardial biopsy in the differential diagnosis. *Heart* 2000; 84: 245-250

Aoki Y. Histopathological findings of the lung and trachea in sudden infant death syndrome: review of 105 cases autopsied at Dade County Medical Examiner Department. *Nihon Hoigaku Zasshi* 1994; 48: 141-149

Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol* 1987; 18: 619-624

Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ Jr, Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathological definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987; 1: 3-14

AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften). S2 Leitlinie „Myokarditis“. AWMF-Leitlinien-Register Nr. 023/025. Letzte Überprüfung April 2009

Baandrup U, Olsen EGJ. Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having cardiomyopathy. *Br Heart J* 1981; 45: 475-486

Bajanowski T, Wiegand P, Cecchi R, Prink-Akerblom P, Adrian T, Jorch G, Brinkmann B. Detection and significance of adenoviruses in cases of sudden infant death. *Virchows Arch* 1996; 428: 113-118

Basso C, Corrado D, Rossi L, Thiene G. Ventricular preexcitation in children and young adults: atrial myocarditis as a possible trigger of sudden death. *Circulation* 2001; 103: 269-275

Baughman KL. Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. *Circulation* 2006; 113: 593-595

Beal S, Porter C. Sudden infant death syndrome related to climate. *Acta Paediatr Scand* 1991; 80: 278-287

Beckwith JB. Discussion of terminology and definition of sudden infant death syndrome. In: Bergman AB, Beckwith JB, Ray CG, eds., *Sudden Infant Death Syndrome: Proceedings of the Second International Conference on Causes of Sudden Death in Infants*. Seattle: University of Washington Press, 1970: 14-22

Beckwith JB. The sudden infant death syndrome. *Curr Probl Pediatr* 1973; 3: 1-36

Beckwith, JB. Defining the sudden infant death syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157: 286-290

Beltrami AP, Urbanek K, Kajustra J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami A, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1750-1757

Billingham ME. The diagnostic criteria of myocarditis by endomyocardial biopsy. *Heart Vessels Suppl* 1985; 1: 133-137

Blair PS, Fleming PJ, Bensley D, Smith I, Bacon C, Taylor E, Berry J, Golding J, Tripp J, Confidential Enquiry into Stillbirths and Deaths Regional Coordinators and Researchers. Smoking and the sudden infant death syndrome: results from 1993-5 case-control study for confidential inquiry into stillbirths and deaths in infancy. *BMJ* 1996; 313: 195-198

Blair PS, Fleming PJ, Smith IJ, Platt MW, Young J, Pam N, Berry PJ, Golding J, and the CESDI SUDI research group. Babies sleeping with parents: case-control study of factors influencing the risk of the sudden infant death syndrome. *BMJ* 1999; 319: 1457-1462



Bowles NE, Olsen EGJ, Richardson PJ, Archard LC. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1986; 1: 1120-1123

Bowles NE, Ni J, Kearney D, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction: evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 466-472

Bulterys MG, Greenland S, Kraus JF. Chronic fetal hypoxia and sudden infant death syndrome: interaction between maternal smoking and low hematocrit during pregnancy. *Pediatrics* 1990; 86: 535-540

Burch GE, Sun SC, Chu KC, Sohal RS, Colcolough HL. Interstitial and coxsackievirus B myocarditis in infants and children. A comparative histologic and immunofluorescent study of 50 autopsied hearts. *JAMA* 1968; 203: 1-8

Byard RW, Krous HF. Sudden infant death syndrome: overview and update. *Pediatr Dev Pathol* 2003; 6: 112-127

Carpenter RG, Gardner A. Variations in unexpected infant death rates relating to age, sex and season. *Studies on Medical and Population Subjects* 1982; 45: 23-31

Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254

Casali MB, Lazzaro A, Gentile G, Blandino A, Ronchi E, Zoja R. Forensic grading of myocarditis: an experimental contribution to the distinction between lethal myocarditis and incidental myocarditis. *Forensic Sci Int* 2012; 223: 78-86

Cecchi R, Bajanowski T, Kahl B, Wiegand P. CMV-DNA detection in parenchymatous organs in cases of SIDS. *Int J Legal Med* 1995; 107: 291-295

Chavez CJ, Ostrea EM, Stryker JC, Smialek Z. Sudden infant death syndrome among infants of drug-dependent mothers. *J Pediatr* 1979; 95: 407-409

Chimenti C, Pieroni M, Maseri A, Frustaci A. Histologic findings in patients with clinical and instrumental diagnosis of sporadic arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *JACC* 2004; 43: 2305-2313

Chow LH, Radio SJ, Sears TD, McManus BM. Insensitivity of right ventricular endomyocardial biopsy in the diagnosis of myocarditis. *JACC* 1989; 14: 915-920

Coe JJ, Hartman EE. Sudden unexpected death in infancy. *J Pediatr* 1960; 56: 786-794

Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130

Cooper LT. Myocarditis. *N Engl J Med* 2009; 360: 1526-1538

Corradi D, Vaglio A, Maestri R, Legname V, Leonardi G, Bartoloni G, Buzio C. Eosinophilic myocarditis in a patient with idiopathic hypereosinophilic syndrome: insights into mechanisms of myocardial cell death. *Hum Pathol* 2004; 35: 1160-1163

Cruchten Van S, Broeck Van den W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 214-223

Cunningham KS, Veinot JP, Butany J. An approach to endomyocardial biopsy interpretation. *J Clin Pathol* 2006; 59: 121-129

De Jonge GA, Engelberts AC, Koomen-Liefting AJ, Kostense PJ. Cot death and prone sleeping position in The Netherlands. *BMJ* 1989; 298: 722

De Jonge GA, Burgmeijer RJ, Engelberts AC, Hoogenboezem J, Kostense PJ, Sprij AJ. Sleeping position for infants and cot death in The Netherlands 1985-91. *Arch Dis Child* 1993; 69: 660-663

Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J* 2008; 29: 2073-2082

DeSa DJ. Isolated myocarditis in the first year. *Arch Dis Child* 1985; 60: 484-485

Dettmeyer R, Schlamann M, Madea B. Immunohistochemical techniques improve the diagnosis of myocarditis in cases of suspected sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* 1999; 105: 83-94

Dettmeyer R, Baasner A, Schlamann M, Haag C, Madea B. Coxsackie B3 myocarditis in 4 cases of suspected sudden infant death syndrome: diagnosis by immunohistochemical and molecular-pathologic investigations. *Pathol Res Pract* 2002; 198: 689-696

Dettmeyer R. Plötzlicher Kindstod. Neue Aspekte zur Bedeutung der virusbedingten Herzmuskelentzündung. Aachen: Shaker Verlag, 2004

Dettmeyer R, Baasner A, Schlamann M, Padosch SA, Haag C, Kandolf R, Madea B. Role of virus-induced myocardial affections in sudden infant death syndrome: a prospective postmortem study. *Pediatr Res* 2004; 55: 947-952

Dettmeyer R, Müller J, Poster S, Madea B. PCR-based diagnosis of cytomegaloviruses in paraffin-embedded heart tissue in cases of suspected sudden infant death syndrome (SIDS). *International Congress Series* 2006a; 1288: 771-773

Dettmeyer R, Strehler M, Winkelmann S, Madea B. Myokarditis. *Rechtsmedizin* 2006b; 16: 138-142

Dettmeyer R, Baasner A, Haag C, Bruch S, Schlamann M. Immunohistochemical and molecular-pathological diagnosis of myocarditis in cases of suspected sudden infant death syndrome (SIDS) - a multicenter study. *Leg Med (Tokyo)* 2009; 11: 124-127

Doolan A, Langlois N, Semsarian C. Causes of sudden cardiac death in young Australians. *Med J Aust* 2004; 180: 110-112

Douglas AS, Allan TM, Helms PJ. Seasonality and the sudden infant death during 1987-9 and 1991-3 in Australia and Britain. *BMJ* 1996; 312: 1381-1383

Douglas AS, Helms PJ, Jolliffe IT. Seasonality of sudden infant death syndrome in mainland Britain and Ireland 1985-95. *Arch Dis Child* 1998; 79: 269-270

Drexler JF, Marmagen S, Oswald S, Eschbach M, Rimpel L, Blömker D, Guddat S, Doberentz E, Drosten C, Madea B. Virusätiologie des Sudden Infant Death Syndrom? Vortrag, 21. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin – Region Nord, Bonn 01.-02 Juni 2012 (a)

Drexler JF, Marmagen S, Oswald S, Eschbach M, Rimpel L, Blömker D, Guddat S, Doberentz E, Drosten C, Madea B. Virusätiologie des Sudden Infant Death Syndrom? Poster, 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Freiburg 18.-22. September 2012 (b)

Dwyer T, Ponsonby A, Blizzard L, Newman NM, Cochrane JA. The contribution of changes in the prevalence of prone sleeping position to the decline in sudden infant death syndrome in Tasmania. *JAMA* 1995; 273: 783-789

Edwards WD, Holmes DR Jr., Reeder GS. Diagnosis of active lymphocytic myocarditis by endomyocardial biopsy: quantitative criteria for light microscopy. *Mayo Clin Proc* 1982; 57: 419-425

Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 2001; 40: 275-284

Esfandiarei M, McManus BM. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 127-155

Essery SD, Raza MW, Zorgani A, MacKenzie DA, James VS, Weir DM, Busuttill A, Hallam N, Blackwell C. The protective effect of immunisation against diphtheria, pertussis and tetanus (DPT) in relation to sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25: 183-192

Fairley CK, Ryan M, Wall PG, Weinberg J. The organisms reported to cause infective myocarditis and pericarditis in England and Wales. *J Infect* 1996; 32: 223-225

Fleischer M, Warmuth H, Backwinkel KP, Thermann H. Feinstrukturell-morphometrische Befunde an der Kammerwand des nicht belasteten menschlichen linken Ventrikels junger und alter Patienten. *Virch Arch* 1978; 380: 123-133

Fleming PJ, Blair PS, Bacon C, Bensley D, Smith I, Taylor E, Berry J, Golding J, Tripp J, Confidential Enquiry into Stillbirths and Deaths Regional Coordinators and Researchers. Environment of infants during sleep and risk of the sudden infant death syndrome: results of 1993-5 case-control study for confidential inquiry into stillbirths and deaths in infancy. *BMJ* 1996; 313: 191-195

Fleming PJ, Blair PS, Pollard K, Platt MW, Leach C, Smith I, Berry PJ, Golding J, the CESDI SUDI Research Team. Pacifier use and sudden infant death syndrome: results from the CESDI/SUDI case control study. *Arch Dis Child* 1999, 81: 112-116

Foley DA, Edwards WD. Quantitation of leukocytes in endomyocardial tissue from 100 normal human hearts at autopsy. Implications for diagnosis of myocarditis from biopsy specimens of living patients. *Am J Cardiovasc Pathol* 1988; 2: 145-149

Forcada P, Beigelman R, Milei J. Inapparent myocarditis and sudden death in pediatrics. Diagnosis by immunohistochemical staining. *Int J Cardiol* 1996; 56: 93-97

Ford RP, Taylor BJ, Mitchel EA, Enright SA, Stewart AW, Becroft DM, Scragg R, Hasall IB, Barry DM, Allen EM, Roberts AP. Breastfeeding and the risk of sudden infant death syndrome. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 885-890

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501

Gewies A. Introduction to apoptosis. *Apo Review, Cell death* 2003; 1-26

Gilbert RE, Fleming PJ, Azaz Y, Rudd PT. Signs of illness preceding sudden unexpected death in infants. *BMJ* 1990; 300: 1237-1239

Gilbert R, Rudd P, Berry PJ, Fleming PJ, Hall E, White DG, Oreffo VO, James P, Evans JA. Combined effect of infection and heavy wrapping on the risk of sudden unexpected infant death. *Arch Dis Child* 1992; 67: 171-177

Goldberg J, Hornung R, Yamashita T, Wehrmacher W. Age at death and risk factors in sudden infant death syndrome. *Aust Paediatr J* 1986; 22: 21-28

Goldwater PN. Sterile site infection at autopsy in sudden unexpected deaths in infancy. *Arch Dis Child* 2009; 94: 303-307

Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; 21: 1465-1468

Gschwend JE. Apoptose: Grundlagen und Bedeutung des programmierten Zelltodes für das Prostatakarzinom. *Urologe* 1996; 35: 390-399

Guntheroth WG, Lohmann R, Spiers PS. A seasonal association between SIDS deaths and kindergarten absences. *Public Health Rep* 1992; 107: 319-323

Haglund B, Cnattingius S. Cigarette smoking as a risk factor for sudden infant death syndrome: a population-based study. *Am J Public Health* 1990; 80: 29-32

Harrison LM, Morris JA, Telford DR, Brown SM, Jones K. Sleeping position in infants over 6 months of age: implications for theories of sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999a; 25: 29-35

Harrison LM, Morris JA, Telford DR, Brown SM, Jones K. The nasopharyngeal bacterial flora in infancy: effects of age, gender, season, viral upper respiratory tract infection and sleeping position. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999b; 25: 19-28

Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 1235-1245

Hauck FR, Herman SM, Donovan M, Iyasu S, Moore CM, Donoghue E, Kirschner RH, Willinger M. Sleep environment and the risk of sudden infant death syndrome in an urban population: the Chicago Infant Mortality Study. *Pediatrics* 2003; 111: 1207-1214

Heusch A, Kühl U, Rammos S, Krogmann ON, Schultheiss HP, Bourgeois M. Complete AV-block in two children with immunohistological proven myocarditis. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 633-636

Hoffman HJ, Damus K, Hillman L, Krongrad E. Risk Factors for SIDS. Results of the National Institute of Child Health and Human Development SIDS Cooperative Epidemiological Study. *Ann NY Acad Sci* 1988; 533: 13-30

Hort W. Pathologie des Endokard, der Kranzarterien und des Myokard. Berlin – Heidelberg: Springer, 1999

Hutcheson R. DTP vaccination and sudden infant death-Tennessee. *MMWR* 1979; 28: 131-132

Jorch G, Fischer D, Beyer U. Prävention des plötzlichen Säuglingstodes. *Monatsschr Kinderheilkd* 2003; 151: 514-519

Johnstone JM, Lawy HS. Role of infection in cot deaths. *BMJ* 1966; 1: 706-709

Kandall SR, Gaines J. Maternal substance use and subsequent sudden infant death syndrome (SIDS) in offspring. *Neurotoxicol Teratol* 1991; 13: 235-240

Kandolf R, Klingel K, Zell R, Canu A, Fortmüller U, Hohenadl C, Albrecht M, Reimann BY, Franz WM, Heim A, Raab U, McPhee F. Molecular mechanisms in the pathogenesis of enteroviral heart disease: acute and persistent infections. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 153-158

Kariks J. Cardiac lesions in sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* 1988; 39: 211-225

Keeling PJ, Jeffery S, Caforio ALP, Taylor R, Bottazzo GF, Davies MJ, McKenna WJ. Similar prevalence of enteroviral genome within the myocardium from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and controls by the polymerase chain reaction. *Heart* 1992; 68: 554-559

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Bf J Cancer* 1972; 26: 239-257

Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, Tracy S. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol* 2001; 11: 355-368

Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bültmann B, Müller T, Lindinger A, Böhm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118: 639-648

Kitulwatta ID, Kim PJ, Pollanen MS. Sudden death related myocarditis: a study of 56 cases. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 6: 13-19

Kleemann WJ, Schlaud M, Poets CF, Rothämel T, Tröger HD. Hyperthermia in sudden infant death. *Int J Legal Med* 1996; 109: 139-142

Klein RM, Vester EG, Brehm MU, Dees H, Picard F, Niederacher D, Beckmann MW, Strauer BE. Entzündung des Myokards als Arrhythmietrigger. *Z Kardiologie* 2000; 89: III24-III35

Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 314-318

Klingel K, Selinka HC, Huber M, Sauter M, Leube M, Kandolf R. Molecular pathology and structural features of enteroviral replication. Toward understanding of the pathogenesis of viral heart disease. *Herz* 2000; 25: 216-220

Klingel K, Sauter M, Bock CT, Szalay G, Schnorr JJ, Kandolf R. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193: 101-107

Konno S, Sakakibara S. Endo-Myocardial Biopsy. *Dis Chest* 1963; 44: 345-350

Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG, Mitchell EA. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 2004; 114: 234-238

Krous HF, Ferandos C, Masoumi H, Arnold J, Haas EA, Stanley C, Grossfeld PD. Myocardial inflammation, cellular death, and viral detection in sudden infant death caused by SIDS, suffocation or myocarditis. *Pediatr Res* 2009; 66: 17-21

Kühl U, Pauschinger M, Schultheiss HP. Neue Konzepte zur Diagnostik der entzündlichen Herzmuskelentzündung. *Dtsch med Wschr* 1997; 122: 690-698

Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108: 945-950

Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005a; 111: 887-893

Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005b; 112: 1965-1970

Kytö V, Saraste A, Saukko P, Henn V, Pulkki K, Vuorinen T, Voipio-Pulkki LM. Apoptotic cardiomyocyte death in fatal myocarditis. *Am J Cardiol* 2004; 94: 746-750

Kytö V, Vuorinen T, Saukko P, Lautenschlager I, Lignitz E, Saraste A, Voipio-Pulkki LM. Cytomegalovirus infection of the heart is common in patients with fatal myocarditis. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 683-688

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *JHC* 1998; 46: 327-334

Li DK, Willinger M, Petitti DB, Odouli R, Liu L, Hoffmann HJ. Use of a dummy (pacifier) during sleep and risk of sudden infant death syndrome (SIDS): population based case-control study. *BMJ* 2006; 332: 18-22

Lieberman EB, Herskowitz A, Rose NR, Baughman KL. A clinicopathologic description of myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 191-196

Linzbach AJ. Über das Längenwachstum der Herzmuskelfasern und ihrer Kerne in Beziehung zur Herzdilatation. *Virch Arch* 1956; 328: 165-181

Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 2001; 104: 1076-1082

Madea B. Sudden death, especially in infancy – improvement of diagnoses by biochemistry, immunohistochemistry and molecular pathology. *Leg Med* 2009; 11: 36-42

Madea B, Drexler JF. Virusätiologie des Sudden Infant Death Syndrome. In: Darai G, Handermann M, Sonntag HG, Zöller H, Hrsg., *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*. Berlin – Heidelberg: Springer, 2012: 931-962

Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation* 2006; 113: 876-890

Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, Meinhardt G, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Fritz P, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: a comparison to histology and molecular pathology. *Circulation* 2004; 109: 1250-1258

Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippon J, Bock CT, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation* 2006; 114: 1581-1590

Maisch B, Portig I, Ristic A, Hufnagel G, Pankuweit S. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. *Herz* 2000; 25: 200-209

- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3–15
- Malloy MH, Kleinman JC, Land GH, Schramm WF. The association of maternal smoking with age and cause of infant death. *Am J Epidemiol* 1988; 128: 46-55
- Martin AB, Webber S, Fricker FJ, Jaffe R, Demmler G, Kearney D, Zhang YH, Bodurtha J, Gelb B, Ni J. Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation* 1994; 90: 330-339
- Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 120-129
- Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J* 1994; 72: 561–566
- McAllister HF, Klementowicz PT, Andrews C, Fisher JD, Feld M, Furman S. Lyme carditis: an important cause of reversible heart block. *Ann Intern Med* 1989; 110: 339-345
- McCarthy RE, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Hare JM, Baughman KL. Long-Term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med* 2000; 342: 690-695
- McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Gauntt CJ, Klingel KE, Beisel KW, Kandolf R. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 159-169
- McManus BM, Liu PP, Kandolf R. Toxic, infectious and inflammatory cardiomyopathies. In: McManus BM, Hrsg., *Atlas of cardiovascular pathology for the clinician*. Springer, 2008: 169-191
- Micklem K, Rigney E, Cordell J, Simmons D, Stross P, Turley H, Seed B, Mason D. A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 1989; 73; 6-11
- Mitchell EA, Taylor BJ, Ford RP, Stewart AW, Becroft DM, Thompson JM, Scragg R, Hassall IB, Barry DM, Allen EM. Dummies and the sudden infant death syndrome. *Arch Dis Child* 1993; 68: 501-504
- Mitchell EA, Stewart AW, Clements MS. Immunisation and the sudden infant death syndrome. New Zealand Cot Death Study group. *Arch Dis Child* 1995, 73: 498-501
- Mitchell EA, Scragg L, Clements M. Soft cot mattresses and the sudden infant death syndrome. *NZ Med J* 1996; 109: 206-207
- Mitchell EA, Tuohy PG, Brunt JM, Thompson JMD, Clements MS, Stewart AW, Ford RPK, Taylor BJ. Risk factors for sudden infant death syndrome following the prevention campaign in New Zealand: a prospective study. *Pediatrics* 1997; 100: 835-840



Mitchell EA, Thach BT, Thompson JMD, Williams S. Changing infants' sleep position increases risk of sudden infant death syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999; 153: 1136-1141

Mitchell EA, Thompson JM, Becroft DM, Bajanowski T, Brinkmann B, Happe A, Jorch G, Blair PS, Sauerland C, Vennemann MM. Head covering and the risk for SIDS: findings from the New Zealand and German SIDS case-control studies. *Pediatrics* 2008; 121: 478-483

Molony N, Blackwell CC, Busuttill A. The effect of prone posture on nasal temperature in children in relation to induction staphylococcal toxins implicated in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25: 109-113

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

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182-1189

Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 1998; 52: 252-258

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

Noren GR, Staley NA, Bandt CM, Kaplan EL. Occurrence of myocarditis in sudden death in children. *J Forensic Sci* 1977; 22: 188-196

Noutsias M, Pauschinger M, Schulheiss HP, Kühl U. Advances in the immunohistological cardiomyopathy of inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J Suppl* 2002; 4: I54-I62

O'Brien V. Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* 1998; 79: 1833-1845

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Eng J Med* 1997; 336: 1131-1141

Oswald ES. Myokardiale Infiltration im Fällen des Plötzlichen Kindstod, unveröffentlichte Dissertation, Institut für Rechtsmedizin Bonn 2013

Oyen N, Haglund B, Skjaerven R, Irgens LM. Maternal smoking, birthweight and gestational age in sudden infant death syndrome (SIDS) babies and their surviving siblings. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1997; 11: 84-95

Pankuweit S, Jobmann M, Crombach M, Portig I, Alter P, Kruse T, Hufnagel G, Maisch B. Zelluntergang bei entzündlichen Herzerkrankungen - Apoptose oder Nekrose? *Herz* 1999; 24: 211-218

Pankuweit S, Maisch B. Das Herz bei viralen Infektionen. *Internist* 2010; 51: 836-843

Pattison CP, Marshall BJ. Proposed link between *Helicobacter pylori* and sudden infant death syndrome. *Med Hypotheses* 1997; 49: 365-369

Pearce JL, Luke RK, Bettelheim KA. Extraintestinal *Escherichia coli* isolations from SIDS cases and other cases of sudden death in Victoria, Australia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25: 137-144

Peterson DR, van Belle G, Chinn NM. Sudden infant death syndrome and maternal age: etiologic implications. *JAMA* 1982; 247: 2250-2252

Peterson JA, Patton S, Hamosh M. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infection. *Biol Neonate* 1998; 74: 143-162

Rambaud C, Cieuta C, Canioni D, Rouzioux C, Lavaud J, Hubert P, Brousse N, Rudler M, Chéron G. Cot death and myocarditis. *Cardiol Young* 1992; 2: 266-271

Rasten-Almquist P, Eksborg S, Rajs J. Myocarditis and sudden infant death syndrome. *APMIS* 2002; 110: 469-480

Raza MW, Essery SD, Elton RA, Weir DM, Busuttill A, Blackwell C. Exposure to cigarette smoke, a major risk factor for sudden infant death syndrome: effects of cigarette smoke on inflammatory responses to viral infection and bacterial toxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25: 145-154

Raza MW, Blackwell CC. Sudden infant death syndrome, virus infections and cytokines. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25: 85-96

Rintahaka PJ, Hirvonen J. The epidemiology of sudden infant death syndrome in Finland in 1969-1980. *Forensic Sci Int* 1986; 30: 219-233

Rognum TO, Arnestad M, Bajanowski T, Banner J, Blair P, Borthne A, Byard RW, Gaustad P, Gregersen M, Groggaard J, Holter E, Isaksen CV, Jorgensen JV, Krous HF, de Lange C, Moore I, Morland J, Opdal SH, Rasten-Almquist P, Schlaud M, Sidebotham P, Skullerud K, Stoltenburg-Didinger G, Stray-Pedersen A, Sveum L, Vege A. State of the art conference on the stratification of SUDI. Consensus on diagnostic criteria for the exclusion of SIDS. *Nordisk Rettsmedisin* 2003; 3/4: 49-88

Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 320-323

Saraste A, Arola A, Vuorinen T, Kytö V, Kallajoki M, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM, Hyypiä T. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2003; 12: 255-262

Scheers NJ, Dayton CM, Kemp JS. Sudden infant death with external airways covered: Case-comparison study of 206 deaths in the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998; 152: 540-547

Scheid MP, Triglia D. Further description of the Ly-5 System. *Immunogenetics* 1979; 9: 423-433

Schlaud M, Kleemann WJ, Poets CF, Sens B. Smoking during pregnancy and poor antenatal care: two major preventable risk factors for sudden infant death syndrome. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 959-965

Schlaud, M, Poethko-Müller C, Kuhnert R, Hecker H. Studie über Todesfälle bei Kindern im 2- bis 24. Lebensmonat (TOKEN-Studie). Nach Robert Koch Institut 2012: [http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Studien/Weitere\\_Studien/TOKEN\\_Studie/Studyreport.pdf?blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Studien/Weitere_Studien/TOKEN_Studie/Studyreport.pdf?blob=publicationFile) (Zugriffsdatum 01.02.2013)

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

Scragg R, Mitchell EA, Taylor BJ, Stewart AW, Ford RPK, Thompson JMD, Allen EM, Becroft DMO, on behalf of the New Zealand Cot Death Study Group. Bed sharing, smoking, and alcohol in the sudden infant death syndrome. *BMJ*, 1993; 307: 1312-1318

Scragg R, Mitchell EA. Side sleeping position and bed sharing in the sudden infant death syndrome. *Ann Med* 1998; 30: 345-349

Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, Ferrans VJ, Fenoglio JJ, Edwards WD, Tsai CC, Saffitz JE, Isner J, Furner S. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation* 1987; 75: 401-405

Shatz A, Hiss J, Arensburg B. Myocarditis misdiagnosed as sudden infant death syndrome (SIDS). *Med Sci Law* 1997; 37: 16-18

Smith SH, Brown MH, Rowe D, Callard RE, Beverley PC. Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL1. *Immunology* 1986; 58: 63-70

Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010: Todesursachenstatistik und Geburten pro Jahr. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online> (Zugriffsdatum 01.11.2010)

Steele R, Langworth JT. The relationship of antenatal and postnatal factors to sudden unexpected death in infancy. *Can Med Assoc J* 1966; 94: 1165-1171

Strauer BE, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Figulla HR, Schwartzkopff B, Brehm M, Schultheiss HP. Update 2001. Myokarditis-Kardiomyopathie. *Med Klin* 2001; 96: 608-625

Tappin D, Ecob R, Brooke H. Bedsharing, roomsharing, and sudden infant death syndrome in Scotland: a case-control study. *J Pediatr* 2005; 147: 32-37

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

Vege A, Rognum TO. Sudden infant death syndrome, infection and inflammatory responses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 42: 3-10

Vennemann MM, Höffgen M, Bajanowski T, Hense HW, Mitchell EA. Do immunisations reduce the risk for SIDS? A meta-analysis. *Vaccine* 2007; 25: 4875-4879

Vennemann MM, Bajanowski T, Brinkmann B, Jorch G, Yücesan K, Sauerland C, Mitchell EA and the GESID Study group. Does breastfeeding reduce the risk of sudden infant death syndrome? *Pediatrics* 2009; 123: 406-410

Weber MA, Ashworth MT, Risdon RA, Malone M, Burch M, Sebire NJ. Clinicopathological features of paediatric deaths due to myocarditis: an autopsy series. *Arch Dis Child* 2008; 93: 594-598

Wennergren G, Alm B, Oyen N, Helweg-Larsen K, Milerad J, Skjaerven R, Norvenius SG, Lagercantz H, Wennborg M, Daltveit AK, Markestad T, Irgens LM. The decline in the incidence of SIDS in Scandinavia and its relation to risk-intervention campaigns. *Acta Paediatr* 1997; 86: 963-968

Williams AL, Uren EC, Bretherton L. Respiratory viruses and sudden infant death. *BMJ* 1984; 288: 1491-1493

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: 677-684

Wilson CA, Taylor BJ, Laing RM, Williams SM, Mitchell EA. Clothing and bedding and its relevance to sudden infant death syndrome: further results from the New Zealand Cot Death Study. *J Paediatr Child Health* 1994; 30: 506-512

Wisborg K, Kesmodel U, Henriksen TB, Olsen SF, Secher NJ. A prospective study of smoking during pregnancy and SIDS. *Arch Dis Child* 2000; 83: 203-206

Woodruff JF. Viral Myocarditis. A review. *Am J Pathol* 1980; 101: 425-484

Zink P, Drescher J, Verhagen W, Flik J, Milbradt H. Serological evidence of recent influenza virus A (H3N2) infections in forensic cases of the sudden infant death syndrome (SIDS). *Arch Virol* 1987; 93: 223-232

Zorc-Pleskovic R, Alibegović A, Zorc M, Milutinović A, Radovanović N, Petrović D. Apoptosis in cardiomyocytes in myocarditis. *Folia Biol Praha* 2006; 52: 6-9

Zotter H, Kerbl R, Kurz R, Müller W. Pacifier use and sudden infant death syndrome: should health professionals recommend pacifier use based on present knowledge? *Wien Klin Wochenschr* 2002; 30: 791-794

## 9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Madea zunächst für die Überlassung des Themas. Besonderes danken möchte ich ihm zudem für die engagierte, konstruktive Betreuung während der gesamten Zeit und für die unkomplizierte Bereitstellung sämtlicher Materialien und benötigter Hilfestellungen in allen Phasen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Dirk Boeker für die freundliche Einarbeitung in die Färbetechnik der TUNEL-Methode sowie Herrn Dr. med. Lars Hagemeyer für die Einarbeitung in die Grundlagen der immunhistochemischen Mikroskopietechnik.

Ein besonderer Dank gilt Frau Sylvia Oswald für die kooperative und immer freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Archivierung und Zusammenstellung des Kollektivs sowie für die Bereitstellung ihrer noch unveröffentlichten Ergebnisse.

Außerdem bedanke ich mich bei Andera Ohlert, Erika Feider und Nicole Dingmann für die liebevolle und kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Meinen Eltern Helga und Heiner Marmagen danke ich für ihren steten Rückhalt, ihre Unterstützung jeder Art und ihr Vertrauen in mich. Damit haben sie mir das Studium der Humanmedizin sowie diese Promotion überhaupt erst möglich gemacht.

Abschließend danke ich meinem Mann Georg und meinem Sohn Felix für ihre Unterstützung, Liebe und Geduld in der Zeit der Promotion.