

**Der plötzliche Säuglingstod:
Immunhistochemische Untersuchung der Expression
von Hitzeschockproteinen 27 und 70 in verschiedenen
Organsystemen**

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

Sarah Führung

aus Münster

2017

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Burkhard Madea
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Glen Kristiansen

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.11.2016

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

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	8
2.	Einleitung	9
2.1	Der plötzliche Säuglingstod	9
2.1.1	Definition	9
2.1.2	Epidemiologie	12
2.1.3	Risikofaktoren	14
2.1.4	Ätiologie und Pathophysiologie	15
2.1.4.1	Die Hirnstamm-Hypothese	15
2.1.4.2	Hypothese der infektiösen Genese	16
2.1.4.3	Hyperthermie-Hypothese	18
2.1.4.4	Die „Triple-Risk-Hypothese“	19
2.1.4.5	Genetische Faktoren	20
2.2	Hitzeschockproteine	22
2.2.1	Die Funktion von Chaperonen	22
2.2.2	Vorkommen und Expression von Hitzeschockproteinen	22
2.2.3	Hsp27	25
2.2.4	Hsp70	26
2.3	Grundlagen der Immunhistochemie	27
2.4	Zielsetzung dieser Arbeit	29
3.	Material und Methoden	31
3.1	Kollektiv SIDS-Fälle	31

3.2	Kollektiv Kontroll-Fälle	31
3.3	Immunhistochemische Färbung	32
3.3.1	Vorbereitung der Gewebeproben	32
3.3.2	Antigendemaskierung	33
3.3.3	Färbung nach der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode	33
3.4	Mikroskopische Auswertung	34
4.	Ergebnisse	38
4.1	SIDS-Kollektiv allgemein	38
4.2	Kontrollkollektiv allgemein	41
4.3	Ergebnisse Hsp27	41
4.3.1	SIDS-Kollektiv	41
4.3.1.1	Lunge	41
4.3.1.2	Niere	43
4.3.1.3	Herz	44
4.3.2	Kontrollkollektiv	45
4.3.2.1	Lunge	45
4.3.2.2	Niere	46
4.3.2.3	Herz	47
4.4	Ergebnisse Hsp70	48
4.4.1	SIDS-Kollektiv	48
4.4.2	Kontrollkollektiv	50
5.	Diskussion	51

5.1	Allgemeines	51
5.2	Geschlecht	51
5.3	Alter	51
5.4	Jahreszeit	52
5.5	Liegeposition bei Auffindung	52
5.6	Hyperthermie	53
6.	Zusammenfassung	58
7.	Anhang	59
7.1	Immunhistochemisches Färbeprotokoll	59
7.2	Arbeitsanleitung Immunhistochemie	59
7.3	Verwendete Materialien	61
7.4	Verwendete Substanzen	61
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	63
9.	Literaturverzeichnis	66
10.	Danksagung	77

1. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTT-Gen	Serotonin-Transporter-Gen
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
C	Kohlenstoff
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eds.	Editores, Herausgeber
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alia, und andere
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSF	Hitzeschockfaktor
Hsp	Hitzeschockprotein
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, Ausgabe 10
kDa	Kilodalton
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin
N	Stickstoff
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
QTc-Zeit	frequenzkorrigierte QT-Zeit
sHsp	small heat shock proteins, kleine Hitzeschockproteine
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome, plötzlicher Säuglingstod
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USID	unclassified sudden infant death, unklassifizierter plötzlicher Säuglingstod

2. Einleitung

2.1 Der plötzliche Säuglingstod

2.1.1 Definition

Der Begriff des plötzlichen Säuglingstodes (SIDS) wurde erstmals 1969 auf der zweiten internationalen Konferenz zu Ursachen des plötzlichen Todes bei Säuglingen in Seattle verwendet. Er wurde dort definiert als ein überraschender und unerwarteter Tod im Säuglings- oder Kleinkindalter aus scheinbar vollkommener Gesundheit heraus, für den, auch nach gründlichen postmortalen Untersuchungen, keine adäquate Ursache nachgewiesen werden kann (Beckwith, 1970). Im Jahr 1989 wurde diese Definition präzisiert, der plötzliche Säuglingstod ist seither definitionsgemäß auf Todesfälle innerhalb des ersten Lebensjahres beschränkt und neben einer kompletten Autopsie dürfen nun auch die genaue Untersuchung der Auffindesituation und der klinischen Vorgeschichte keinen Nachweis einer adäquaten Todesursache bieten (Willinger et al., 1991). Definitionsgemäß handelt es sich bei dem Begriff demnach um eine Ausschlussdiagnose.

Anhand wachsender Daten aus verschiedenen Forschungsarbeiten, wurde die Definition des plötzlichen Säuglingstodes im Jahr 2004 erneut überarbeitet. Ein Expertengremium aus Pädiatern, Rechtsmedizinern und Pathologen entwickelte die sogenannte „San Diego Klassifikation“ (Krous et al., 2004). Dabei wurde die allgemeine Definition des plötzlichen Säuglingstodes weitestgehend beibehalten und lediglich dahingehend ergänzt, dass der Todeseintritt während des Schlafs erfolgen muss. Anhand verschiedener Variablen bezogen auf die Krankengeschichte, Todesumstände und Autopsieergebnisse, erfolgt zudem die spezifische Einteilung eines jeden Falles in die Subkategorien IA, IB, II oder USID. (vgl. Tab. 1). Die Kategorie USID steht dabei für den unklassifizierten plötzlichen Säuglingstod und umfasst die Fälle, in denen die Kriterien für die Kategorie I und II nicht erfüllt werden oder keine Autopsie stattgefunden hat.

Tab. 1: Einteilung der SIDS-Fälle in Untergruppen gemäß der San Diego Klassifikation anhand von Informationen zu Krankengeschichte, Todesumständen und Autopsieergebnissen (modifiziert nach Bajanowski et al. 2006; Krous et al., 2004)

	Krankengeschichte	Todesumstände	Autopsie
Allgemeine SIDS-Definition	<ul style="list-style-type: none"> – Plötzlicher, unerwarteter Tod – Alter <1 Jahr – Todeseintritt während des Schlafs – Tod durch Vorgeschichte ungeklärt 	Tod durch Untersuchung der Umstände nicht erklärbar	Nach kompletter Autopsie weiterhin ungeklärt
Subklassifikationen			
Kategorie IA	<ol style="list-style-type: none"> 1. älter als 21 Tage, jünger als 9 Monate 2. unauffällige Krankengeschichte 3. Reifgeborenes (>37 Wochen) 4. normales Wachstum und Entwicklung 5. kein ähnlicher Tod bei Geschwistern, nahen Verwandten oder Kindern in Obhut derselben Betreuungsperson 	<ul style="list-style-type: none"> – Untersuchung der Auffindesituation gab keine Erklärung – Sichere Schlafumgebung, kein Hinweis auf einen Unfall 	<ol style="list-style-type: none"> 1. keine letalen pathologischen Funde 2. kein ungeklärtes Trauma, Misshandlung, Vernachlässigung oder unabsichtliche Verletzungen 3. kein bedeutender „Thymusstress“ (Thymusgewicht <15 g und/oder mittel- bis schwergradig ausgeprägte Depletion kortikaler Lymphozyten) 4. Toxikologie, Mikrobiologie, Radiologie, Glaskörperchemie und metabolisches Screening negativ

	Krankengeschichte	Todesumstände	Autopsie
Kategorie IB	Kriterien 1.-5. Der Kategorie IA erfüllt	Keine Untersuchung der Auffindesituation erfolgt	Kriterien 1.-4. Der Kategorie IA erfüllt 5. eine oder mehrere der folgenden Untersuchungen sind nicht erfolgt: Toxikologie, Mikrobiologie, Radiologie, Glaskörperchemie und metabolisches Screening
Kategorie II	Unterschiede zu Kriterien der Kategorie I: 6. Alter 0-21 Tage und 270-365 Tage 7. neonatale/perinatale Zustände, die zum Todeszeitpunkt nicht mehr bestanden 8. ähnliche Todesfälle bei Geschwistern, nahen Verwandten oder Kindern in Obhut derselben Betreuungsperson ohne Verdacht auf Kindstötung oder genetische Defekte	Mechanische Asphyxie oder Erstickten durch Überliegen nicht sicher ausgeschlossen	1.-5. und 6. ungewöhnliches Wachstum und Entwicklung, die wahrscheinlich nicht zum Todeseintritt beigetragen haben 7. deutlich ausgeprägte entzündliche Veränderungen oder Abweichungen, die den Todeseintritt nicht ausreichend erklären
USID (unclassified sudden infant death)	Kriterien für Kategorie I oder II nicht erfüllt	Alternative Diagnosen für einen natürlichen oder nicht natürlichen Tod sind nicht auszuschließen	Keine stattgehabte Autopsie

2.1.2 Epidemiologie

In Deutschland starben im Jahr 2002 von 719.250 Lebendgeborenen 1.529 Säuglinge im Alter vom 8. bis 364. Lebenstag, darunter 334 (21,8 %) mit der Diagnose eines plötzlichen Säuglingstodes. Im vergleichbaren Zeitraum starben im Jahr 2012 von 673.544 Lebendgeborenen 1.026 Säuglinge, darunter waren 127 Fälle (12,4 %) mit der Todesursache plötzlicher Säuglingstod (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2014). Damit ist die Inzidenz innerhalb dieser zehn Jahre zwar deutlich von 0,46/1.000 auf 0,19/1.000 gesunken, der plötzliche Säuglingstod stellt aber bei scheinbar gesunden Kindern weiterhin die häufigste Todesursache in der Postneonatalperiode dar (s. Abb.1).

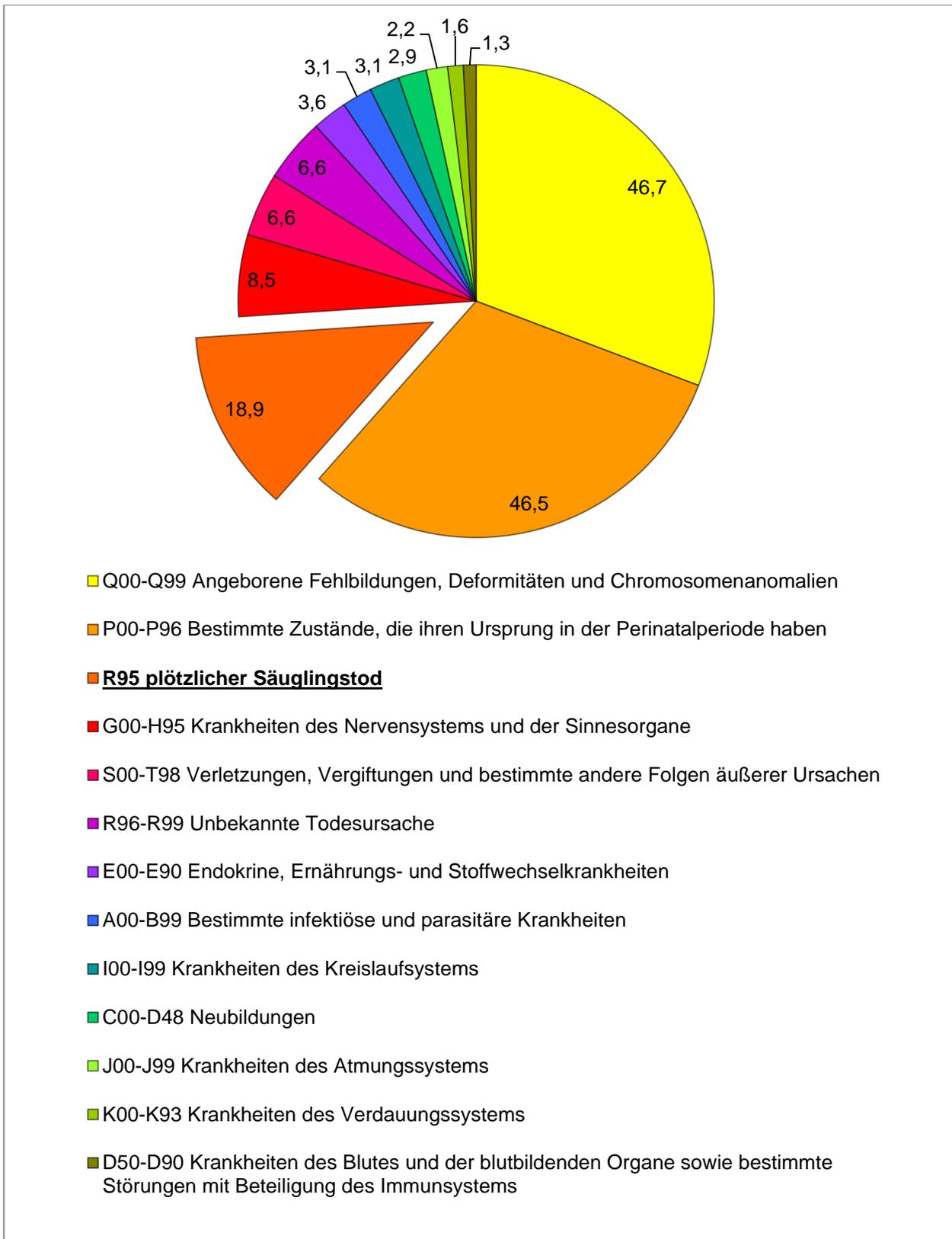


Abb. 1: Säuglingssterbefälle zwischen dem 8. und 364. Lebenstag je 100.000 Lebendgeborene in Deutschland im Jahr 2012 unter Angabe der Todesursache nach ICD-10 (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2014)

2.1.3 Risikofaktoren

Der plötzliche Säuglingstod tritt typischerweise während des Schlafens ein. In der Altersverteilung zeigt sich ein deutlicher Häufigkeitsgipfel zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat und der Anteil männlicher überwiegt mit etwa 60 % eindeutig gegenüber den weiblichen Säuglingen (Byard, 2010; Kleemann und Bajanowski, 2004; Hunt und Hauck, 2006; Vennemann et al., 2005). Der inzwischen wohl bekannteste modifizierbare Risikofaktor ist das Platzieren des Kindes in Bauchlage während des Schlafens (Gilbert et al., 2005; Li et al., 2003) oder die Bauchlage allgemein, da sich Säuglinge entsprechend des Entwicklungsstandes auch eigenständig in Bauchlage verbringen können. In einigen Ländern wurden in den Neunzigerjahren nationale Aufklärungskampagnen durchgeführt, wie beispielsweise die „back to sleep“ Kampagne in England, die einen Rückgang dieser Schlafposition nach sich zog und zu einer deutlichen Reduktion in der Säuglingssterblichkeit führten (Wigfield und Fleming, 1995). In Deutschland wurde eine ähnliche Kampagne 1991 lediglich in Nordrhein-Westfalen durchgeführt, die aber auch überregionale Effekte erzielte. So sank diese Lagepräferenz in Deutschland von 38 % im Jahr 1991 auf 9 % im Jahr 1995 und darauffolgend tatsächlich ebenso die Inzidenz des plötzlichen Säuglingstodes (Schlaud et al., 1999).

In Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit ist als weiterer Risikofaktor besonders die übermäßige Wärmezufuhr während des Schlafs, die zu thermischem Stress führen kann, von Interesse. In einigen Studien wurde gezeigt, dass Kinder die am plötzlichen Säuglingstod starben, während des Schlafs deutlich häufiger zusätzlicher Wärme ausgesetzt waren. Diese entstand entweder durch eine der Umgebungstemperatur nicht angemessene Menge Bettzeug oder durch eine höhere Zimmertemperatur durch exzessives Heizen (Byard, 2010; Gilbert et al., 1992; Kleemann und Bajanowski, 2004; Ponsoby et al., 1992; Stanton, 1984).

In Studien aus aller Welt wurden zahlreiche weitere Risikofaktoren für den plötzlichen Säuglingstod gefunden, die in Tabelle 2 aufgeführt sind.

Tab. 2: Maternale und kindliche Risikofaktoren für den plötzlichen Säuglingstod (modifiziert nach Althoff, 1973; Byard, 2010; Hunt und Hauck, 2006; Kleemann und Bajonowski, 2004; McGarvey et al., 2006; Mitchell et al., 1997; Vennemann et al., 2005)

Maternale, pränatale Risikofaktoren	Kindliche, postnatale Risikofaktoren
<ul style="list-style-type: none">– Rauchen während der Schwangerschaft– Alkohol-, Drogenabusus während der Schwangerschaft– Unzureichende pränatale Versorgung– Alter < 20 Jahre– Niedriger sozioökonomischer Status– Geringer Bildungsstand– Kurzer zeitlicher Abstand zwischen Schwangerschaften– Mutter lebt allein	<ul style="list-style-type: none">– Männliches Geschlecht– Frühgeburt– Stillen < 2 Wochen– Bauchlage während des Schlafens– Überwärmung/thermischer Stress– Schlafen im selben Bett mit einem Erwachsenen– Schlafen im eigenen Zimmer– Kürzlich durchgemachter fieberhafter Infekt– Weiche Schlafunterlage, weiches Bettzeug– Exposition gegenüber Zigarettenrauch

2.1.4 Ätiologie und Pathophysiologie

Die genaue Ätiologie des plötzlichen Säuglingstodes konnte trotz unzähliger Studien zum Thema bis heute nicht geklärt werden. Es wurden mit der Zeit zahlreiche Theorien entwickelt, von denen hier nur einige der aktuelleren aufgegriffen werden.

2.1.4.1 Die Hirnstamm-Hypothese

Bereits 1987 waren Hunt und Brouillette der Ansicht, dass der plötzliche Säuglingstod am ehesten mit einer Hirnstamm-Anomalie zusammenhängt, die die Neuroregulation der kardiorespiratorischen Kontrolle beeinflusst. In den folgenden Jahrzehnten wurden in mehreren Studien an Opfern des plötzlichen Säuglingstodes diverse Anomalien, bezogen auf die Morphologie der Hirnstammkerne und verschiedenen Neurotransmitter-Systeme, gefunden (Kinney et al., 1995; Kopp et al., 1993; Ozawa und Takashima, 2002; Panigrahy et al., 1997). Die meisten Forschergruppen konzentrieren sich inzwi-

schen auf den Neurotransmitter Serotonin (5-HT) und die damit zusammenhängenden Leitungsbahnen im Hirnstamm, da diese eine wichtige Rolle in der autonomen Regulation von Atmung, Schlaf und Aufwachreaktion spielen.

Kinney et al. (2009) gingen davon aus, dass sich bei Fällen von plötzlichem Säuglingstod das medulläre 5-HT-System bereits pränatal nicht korrekt entwickelt und somit postnatal keine adäquaten Reaktionen auf lebensbedrohliche Stressoren während des kindlichen Schlafs möglich sind. Die dabei vorliegenden exogenen Stressoren (Hyperthermie, Hypoxie, Asphyxie etc.) sind dabei im Einzelnen bei intakter Hirnstammfunktion nicht letal, können aber durch die fehlerhafte Hirnstammreaktion zum Tode führen. Des Weiteren behaupteten sie, dass primäre medulläre 5-HT-Defekte bereits Tage bis Wochen vor dem letalen Ereignis zu subklinischen homöostatischen Dysfunktionen und wiederholten Hypoxien führen können, die dann wiederum sekundäre Hirnschäden und systemisch-hypoxische Schäden vor dem Tod zur Folge haben.

2.1.4.2 Hypothese der infektiösen Genese

In der Literatur wird die kürzlich durchgemachte fieberhafte Infektion, meist der oberen Atemwege, regelmäßig als Risikofaktor für den plötzlichen Säuglingstod genannt (Hunt und Hauck, 2006; Saternus, 2007; Werne und Garrow, 1953). In den Neunzigerjahren wurden mehrere Studien der Universität Oslo veröffentlicht, in denen der Zusammenhang zwischen dem plötzlichen Säuglingstod und bakteriellen Infektionen vertieft wurde. Vege et al. verglichen 1994 die Hypoxanthin-Level im Glaskörper bei Fällen von plötzlichem Säuglingstod mit infektionsbedingten und gewaltsamen Todesfällen. Dabei konnte zwischen den SIDS-Fällen und den infektionsbedingten Todesfällen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, im Verhältnis zu den gewaltsamen Todesfällen waren die Level aber signifikant erhöht. Ein Jahr später wies das Forscherteam um Vege (1995) an einem ähnlichen Kollektiv nach, dass das Level von Interleukin-6 im Liquor von SIDS-Fällen zwar niedriger ist als bei infektionsbedingten Todesfällen, aber signifikant höher als bei gewaltsamen Todesfällen. Des Weiteren zeigten sich im Gewebe der oberen Atemwege und des Gastrointestinaltraktes von SIDS-Opfern Anzeichen gesteigerter Immunstimulation verglichen mit gewaltsamen Todesfällen (Stoltenberg et al., 1992; Thrane et al., 1994). Die Osloer Forscher schlossen daraus, dass hinter dem plötzlichen Säuglingstod möglicherweise eine Überreaktion des Immunsystems auf eine

prinzipiell relativ harmlose Infektion steckt, die letal endet und dem Mechanismus des infektionsbedingten Todes zumindest ähnlich ist (Vege und Rognum, 1999).

Die höhere Inzidenz in den Wintermonaten (Byard, 2010; Kleemann und Bajanowski, 2004; Jorch et al., 1994) und die häufig vorzufindenden Hinweise für eine Infektion im Rahmen der Obduktion (Kleemann und Bajanowski, 2004) oder anamnestisch im Gespräch mit den Eltern erhoben (Gilbert et al., 1992), legen den Zusammenhang des plötzlichen Säuglingstodes mit einer infektiösen Genese nahe. In verschiedenen Arbeiten wurden daher Fälle des plötzlichen Kindstodes auf vorangegangene Virusinfekte untersucht.

Besonders respiratorische Virusinfektionen stehen in zahlreichen Untersuchungen im Fokus. So stellten Zink et al. (1987) in serologischen Tests an plötzlichen Säuglingstodesfällen eine, gegenüber den Kontrollen, signifikant höhere Anzahl an Influenza-A-Infektionen fest. Ferris et al. (1973) führten histologische Untersuchungen in 51 Säuglingstodesfällen durch und wiesen dabei, neben den histologischen Zeichen einer lymphozytären Bronchiolitis, in 13 Fällen respiratorische Viren (Respiratory Syncytial Virus, Influenza-A-Virus, Parainfluenza-Virus, Rhinovirus, Adenovirus) mittels Immunfluoreszenzverfahren nach. Ein ähnliches Ergebnis berichten auch An et al. (1993), die das Verfahren der in-situ-Hybridisation benutzten, um respiratorische Viren im Lungengewebe nachzuweisen. Sie fanden positive Ergebnisse in 24,4 % der plötzlichen Säuglingstodesfälle, während in der Kontrollgruppe nur 3,3 % positiv waren.

Eine aktuellen Studie von Doberentz et al. (2016) kann diese Ergebnisse nicht stützen. 75 Fälle des plötzlichen Säuglingstodes und 10 Kontrollfälle wurden histologisch aufgearbeitet und auf charakteristische Befunde einer interstitiellen viralen pulmonalen Entzündung untersucht. Ergänzend wurde eine immunhistochemische Untersuchung bezogen auf die Expression von CD45R0 (Marker für aktivierte T-Lymphozyten), CD68 (Marker für Monozyten und Makrophagen) sowie LCA (Marker für Leukozyten) durchgeführt. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Studien- und Kontrollkollektiv.

Einen weiteren Schwerpunkt in der Erforschung einer möglichen Beteiligung viraler Infektionen am plötzlichen Säuglingstod, bildet der Zusammenhang mit viralen Myokarditi-

den. In einer Studie an 65 plötzlichen Säuglingstodesfällen und 11 Kontrollfällen untersuchten Dettmeyer et al. (2004) Gewebeproben mittels *PCR* auf Myokarditis-assoziierte Viren (Enteroviren, Adenoviren, Parvovirus B19, Epstein-Barr-Virus). Dabei konnten in 26 Fällen des plötzlichen Säuglingstodes Viren detektiert werden, während die Kontrollfälle gänzlich negativ waren. In einer ähnlichen Studie konnte mittels *real-time-PCR* ein signifikanter Unterschied von Epstein-Barr-Virus-DNA und Humanes-Herpervirus-6-DNA zwischen plötzlichen Säuglingstodesfällen und Kontrollen festgestellt werden (Alvarez-Lafuente et al., 2008).

Demgegenüber steht eine Studie von Krous et al. (2009), in der in keinem von 24 plötzlichen Säuglingstodesfällen der Nachweis eines viralen Genoms (Enteroviren und Adenoviren) gelang.

Insgesamt gibt es bis dato keine übereinstimmenden Forschungsergebnisse, die die Beteiligung einer viralen Myokarditis an der Pathogenese des plötzlichen Säuglingstodes eindeutig belegen (Madea und Drexler, 2012).

2.1.4.3 Hyperthermie-Hypothese

Bereits bei früheren Untersuchungen der Auffindesituation von SIDS-Fällen wurde festgestellt, dass viele der Kinder auffällig dick zugedeckt oder verschwitzt waren; bei postmortalen Messungen konnten häufig Körpertemperaturen über 38 °C festgestellt werden (Stanton, 1984; Sunderland und Emery, 1981). Viele Forscher nahmen dies zum Anlass, sich mit Hyperthermie und deren Auswirkungen auf den plötzlichen Säuglingstod zu befassen. Fleming et al. (1990) identifizierten in einer Fall-Kontroll-Studie neben der Bauchlage auch die Überwärmung als unabhängigen Risikofaktor für den plötzlichen Säuglingstod und in einer Studie von Gilbert et al. (1992) ergab sich ein besonders hohes relatives Risiko bei einer Kombination aus viraler Infektion und übermäßig dicker Bedeckung während des Schlafs.

In zwei Tierexperimenten an neugeborenen Ratten (Serdarevich und Fewell, 1999) und Mäusen (Kahraman und Thach, 2004) stellten die Forscher fest, dass eine Erhöhung der Körperkerntemperatur alleine keine höhere Letalität mit sich brachte. Allerdings wirkte sie sich bei Tieren, die zusätzlich einer Hypoxie ausgesetzt wurden, negativ auf die Fähigkeit der Selbstwiederbelebung aus. Diese Kombination bewirkte bei den Tieren

eine Steigerung der Herzfrequenz, verkürzte die Dauer der Schnappatmung und führte zu einer Abnahme der Anzahl der Atemzüge. Die Wissenschaftler schlossen daraus, dass eine erhöhte Körperkerntemperatur in Kombination mit Apnoephasen während des Schlafs zumindest einem Teil der SIDS-Fälle zugrunde liegen könnte. Demnach würde die apnoeinduzierte Hypoxie nicht durch physiologische Reaktionen wie Luft schnappen oder Aufwachen terminiert, sondern aufgrund des thermischen Stresses letal enden (Kahraman und Thach, 2004).

2.1.4.4 Die „Triple-Risk-Hypothese“

Das sogenannte „*Triple Risk Model*“, welches erstmals von Wedgwood (1972) erwähnt wurde, wird heute von den meisten Wissenschaftlern als wahrscheinlichste Hypothese zur Ätiologie des plötzlichen Säuglingstodes anerkannt. Es handelt sich dabei um ein multifaktorielles Modell, demzufolge diejenigen Kinder dem plötzlichen Säuglingstod zum Opfer fallen, die eine grundlegende Vulnerabilität aufweisen und zudem während einer kritischen Entwicklungsphase bestimmten exogenen Stressoren ausgesetzt sind. Das Konzept wurde 1993 von Rognum und Saugstad aufgegriffen, die das „*fatal triangle*“ (Abb. 2) entwarfen und damit zusätzlichen Wert auf die mukosale Immunität legten. Filiano und Kinney (1994) orientierten sich ebenfalls an Wedgwoods Definition, legten sich allerdings darauf fest, dass der Ursprung der generellen Vulnerabilität pränatal zu finden ist. Auch wenn sie sich in den Details geringfügig unterscheiden, haben die jeweiligen „Triple Risk“ Theorien doch gemeinsam, dass sie mehrere der oben bereits genannten Hypothesen zusammenfassen. Dabei fallen unter die exogenen Stressoren die epidemiologisch erhobenen Risikofaktoren wie Bauchlage, Infekt, Hyperthermie, etc. Orientiert an der typischen Altersverteilung des plötzlichen Säuglingstodes mit deutlicher Häufung zwischen dem 2. und 4. Lebensmonat, wird dieser Zeitraum als kritische Entwicklungsphase angesehen, wobei bisher nicht befriedigend geklärt ist, woraus sich diese Vulnerabilität genau ergibt (Guntheroth und Spiers, 2002). Uneinigkeit besteht außerdem darüber, wie genau die grundlegende Vulnerabilität zu definieren ist. Filiano und Kinney, (1994) sehen deren Ursprung pränatal in den bereits beschriebenen Hirnstammanomalien, während Guntheroth und Spiers (2002) der Meinung sind, dass die Vulnerabilität erst postnatal entsteht.

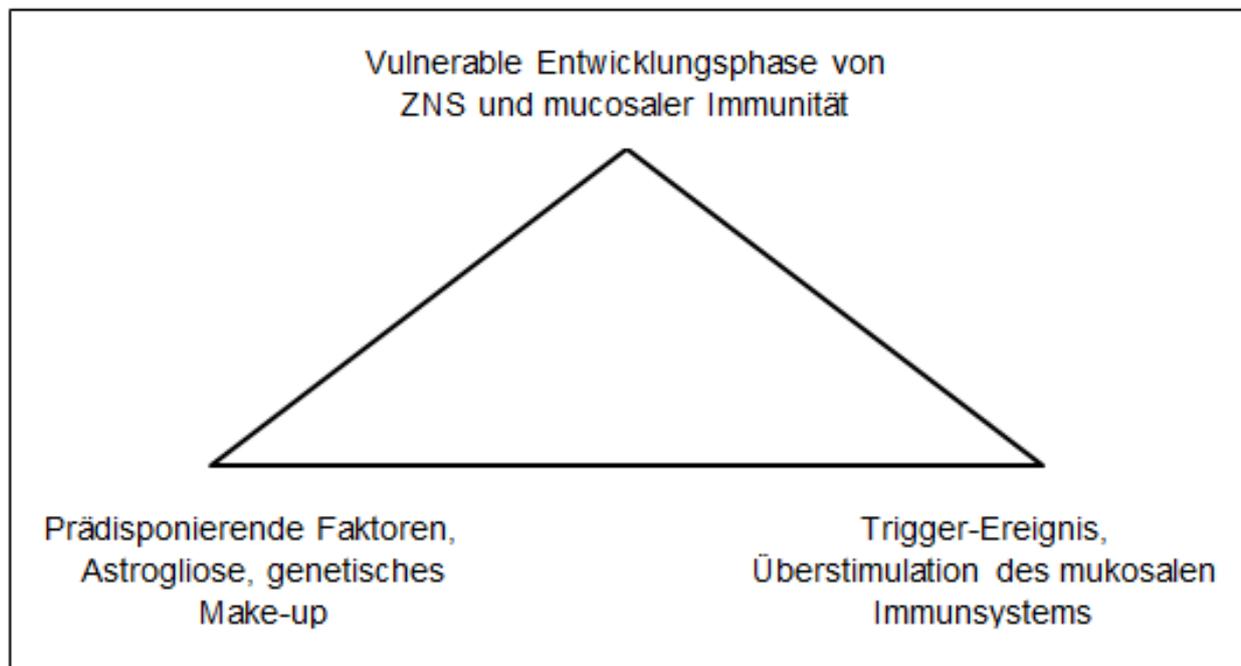


Abb. 2: Schematische Darstellung der Hypothese des „fatal triangle“ beim plötzlichen Säuglingstod (modifiziert nach Rognum und Saugstad, 1993)

2.1.4.5 Genetische Faktoren

Entsprechend der „Triple-Risk-Hypothese“ erscheint es sinnvoll, Fälle des plötzlichen Säuglingstodes auf gemeinsame genetische Veränderungen zu untersuchen, um somit mögliche prädisponierende Faktoren zu identifizieren. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben daher ihre Studienkollektive auf verschiedene genetische Anomalien untersucht. Aufgrund der oben angedeuteten Vielzahl verschiedener Hypothesen zur Pathophysiologie des plötzlichen Säuglingstodes und der wahrscheinlich multifaktoriellen Genese, erweist es sich allerdings als schwierig eine eindeutige Aussage zur Relevanz einzelner genetischer Faktoren im Hinblick auf das Eintreten des plötzlichen Säuglingstodes zu treffen. Weitgehend übereinstimmende Ergebnisse unterschiedlicher Forschergruppen finden sich nur in wenigen Fällen (Courts und Madea, 2010).

Wie bereits im Rahmen der Hirnstamm-Hypothese erläutert, zeigen zahlreiche Studien eine Korrelation zwischen dem plötzlichen Säuglingstod und genetischen Polymorphismen in der Regulator-Region des 5-HTT-Gens. Durch fehlerhafte Reaktionen auf lebensbedrohliche Stressoren im Schlaf, könnte eine genetische Aberration der Serotonin-

Regulation somit an der Pathogenese des plötzlichen Säuglingstodes beteiligt sein (Kinney et al., 2009; Opdal et al., 2008; Weese-Mayer et al., 2003).

Des Weiteren scheint es einen Zusammenhang des plötzlichen Säuglingstodes mit Veränderungen in der mitochondrialen DNA zu geben (Hofmann et al., 1997). Durch Einzelnukleotid-Polymorphismen entstehen fehlerhafte Genprodukte im Rahmen der Energieerzeugung in den Mitochondrien und es kommt zu monogenen Mitochondriopathien verschiedener Organe. Allerdings kennt man bis zum heutigen Zeitpunkt keine spezifische Mutation der mitochondrialen DNA, welche eindeutig mit dem plötzlichen Säuglingstod assoziiert werden kann (Courts und Madea, 2010).

Ebenfalls durch zahlreiche Studien belegt, ist eine mögliche Korrelation des plötzlichen Säuglingstodes mit dem sogenannten Long-QT-Syndrom. Schwartz et al. (1998) fanden in einer groß angelegten, prospektiven Studie heraus, dass bei 50 % der plötzlichen Säuglingstodesfälle bereits in der ersten Woche nach der Geburt ein verlängertes QTc-Intervall im EKG vorgelegen hatte. Zudem war das Risiko für den plötzlichen Säuglingstod durch eine verlängerte QTc-Zeit (>440 ms), in der ersten Lebenswoche, um den Faktor 41 erhöht. Das Long-QT-Syndrom basiert auf verschiedenen genetischen Mutationen, die eine Fehlfunktion kardialer Ionenkanäle bewirken. Mit Hinblick auf den plötzlichen Säuglingstod wurde bereits in mehreren Studien eine Assoziation mit Mutationen im SCN5A-Gen nachgewiesen (Ackerman et al., 2001; Millat et al., 2009; Schwartz et al., 2000), was auf eine Korrelation dieser beiden Krankheiten hinweist.

Im Hinblick auf die, in dieser Arbeit thematisierten, Hitzeschockproteine sind die Ergebnisse von Courts et al. (2013) interessant. Die Arbeitsgruppe untersuchte in einer Fall-Kontroll-Studie die DNA von 133 Opfern des plötzlichen Kindstodes auf eine pathogene Einzelnukeotidvariante im kodierenden Gen für Hitzeschockprotein 60. Im Vergleich mit einem Kontrollkollektiv zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Genvariante und dem plötzlichen Säuglingstod. Die Autoren schlossen daraus, dass die durch die Genveränderung bedingte Beeinträchtigung der Hitzeschockreaktion, zumindest in einem Teil der Fälle, an der Pathogenese des plötzlichen Säuglingstodes beteiligt sein könnte.

2.2 Hitzeschockproteine

2.2.1 Die Funktion von Chaperonen

Jedes Protein besitzt eine natürliche dreidimensionale Faltstruktur, die durch die jeweilige Abfolge der Aminosäuren in seiner Polypeptidkette vorgegeben ist. Molekulare Chaperone sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, die anderen Proteinen helfen, ihre korrekte Konformation bei der Faltung einzunehmen und Fehlfaltungen zu vermeiden (Alberts et al., 2011).

Der Begriff wurde 1978 von Laskey et al. eingeführt um die Funktion von Nukleoplasmin zu beschreiben, einem nukleären Protein, welches die fehlerhafte Interaktion zwischen Histonen und DNA verhindert. Mit der Zeit wurde der Gebrauch der Bezeichnung auf weitere Proteine ausgeweitet. Die heute geläufige Definition nach Hendrick und Hartl (1993) beschreibt ein molekulares Chaperon als „ein Protein, welches vorübergehend an eine instabile Konformation eines anderen Proteins bindet und es stabilisiert und durch reguliertes Binden und Lösen dessen korrektes Schicksal in vivo unterstützt: sei es Faltung (im Anschluss an die de novo Synthese, Transit durch eine Membran, oder stressinduzierte Denaturierung), Oligomerisierung, Interaktion mit anderen zellulären Komponenten, Wechsel zwischen aktiven und inaktiven Konformationen, intrazellulärer Transport oder proteolytische Degradation, entweder selbstständig oder mit der Hilfe von Kofaktoren“ (übersetzt aus dem Englischen).

In Situationen also, in denen Proteine ungefaltet als flexible Proteinketten vorliegen, binden molekulare Chaperone vorübergehend an hydrophobe Abschnitte dieser Polypeptidketten und unterstützen somit die korrekte Faltung oder Renaturierung des Proteins. Gleichzeitig wird auf diesem Weg die Bildung von Proteinaggregaten durch intermolekulare Interaktion im gedrängten intrazellulären Milieu verhindert (Agashe und Hartl, 2000). Zu den Chaperonen gehören die Chaperonine und die Hitzeschockproteine.

2.2.2 Vorkommen und Expression von Hitzeschockproteinen

Hitzeschockproteine sind eine inhomogene Gruppe von Proteinen, die ubiquitär in allen Organismen vom Bakterium bis zum Menschen vorkommen und in praktisch jedem zellulären Kompartiment nachweisbar sind (Lindquist und Craig, 1988). Sie wurden in der

Literatur erstmals von Ritossa (1962) beschrieben, der in einem Experiment Zellen der Fruchtfliege *Drosophila busckii* Hitze mittels Inkubator aussetzte und feststellte, dass dadurch in den Speicheldrüsenzellen der Fliegenlarven ein charakteristisches „Puff-Muster“ in den Chromosomen induziert wird.

Hitzeschockproteine sind auch im normothermen Zustand in den meisten Zellen zu finden. Ihren Namen verdanken sie der Tatsache, dass ihre Synthese in der Zelle stark ansteigt, sobald der Organismus Temperaturen ausgesetzt ist, die höher sind als seine normale Umgebungstemperatur (Lindquist und Craig, 1988). Diese Temperaturgrenzen sind dementsprechend zwischen den verschiedenen Organismen sehr unterschiedlich. Leider finden sich kaum Arbeiten, die die exakten Temperaturschwellenwerte und die jeweils nötige Expositionsdauer benennen, die bei unterschiedlichen Organismen zu einer Hitzeschockproteinexpression führen. Daniels et al. (1984) untersuchten die Reaktion von *Halobacterium volcanii* auf einen definierten Hitzeschock. Es handelt sich dabei um ein thermophiles Bakterium, dessen optimale Wachstumstemperatur bei etwa 45 °C liegt. Zwar war mittels einer Gelelektrophorese auch bei der Kontrolltemperatur von 37 °C eine geringe Expression der Hitzeschockproteine zu verzeichnen, es zeigte sich aber eine maximale Induktion bei etwa 60 °C. Auch die Dauer der Hitzeeinwirkung schien eine Auswirkung auf die Induktion der Hitzeschockproteine zu haben, mit einem maximal gemessenen Ergebnis nach 75 Minuten bei 60 °C. Anderson et al. führten 1988 eine ähnliche Studie in Bezug auf Säugetiere durch. Zellkulturen, bestehend aus immortalisierten Ovarialzellen des chinesischen Streifenhamsters wurden, ausgehend von 37 °C, erhitzt und das Ausmaß der Induktion von Hitzeschockproteinen mittels Gelelektrophorese festgehalten. Es fand sich hier eine maximale Expression von Hsp70 nach 10-minütigem Erhitzen der Zellen auf 45 °C.

Neben der Hyperthermie wurden in zahlreichen Studien mittlerweile weitere Stressoren gefunden, die ebenfalls zur gesteigerten Expression von Hitzeschockproteinen führen. Dementsprechend untersuchten Preuss et al. (2008) das Nierengewebe von 100 Fällen mit der Todesursache Unterkühlung immunhistochemisch auf die Expression von Hsp70. Im Vergleich mit einer Kontrollgruppe von Fällen ohne Hypothermie fand sich in der mikroskopischen Auswertung eine stärker ausgeprägte Expression von Hsp70.

Dass auch eine vorübergehende kardiale Ischämie eine Induktion von Hitzeschockproteinen bewirkt, wurde durch Knowlton et al. (1991) bestätigt. Sie erzeugten an einem in-vivo Kaninchenmodell eine myokardiale Ischämie durch Okklusion einer Koronararterie und erfassten die Expression von Hsp70 mittels *Northern Blot*. Im ischämischen Gewebe zeigte sich hier ein deutlicher Anstieg der Expression im Vergleich zu nicht ischämischem Gewebe desselben Herzens.

Der Effekt einer Hypoxie auf die Hitzeschockproteinexpression wurde von Patel et al. (1995) untersucht. Diese Gruppe setzte Hepatomzellen niedrigen Sauerstoffkonzentrationen aus und bestimmte anschließend die Expression von Hsp70 mittels *Northern Blot*. Auch hier zeigte sich eine deutlich gesteigerte Hitzeschockproteinexpression innerhalb von drei Stunden nach der induzierten Hypoxie.

Durch die oben genannten und zahlreiche weitere physiologischen Reize wird in eukaryotischen Zellen der sogenannte Hitzeschockfaktor (HSF) aktiviert. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der in der nicht gestressten Zelle im Zytoplasma und Nukleus als Monomer ohne DNA-Bindeaktivität vorliegt. Als Reaktion auf die oben genannten Stressoren fügen sich die HSF zu Trimeren zusammen und akkumulieren im Zellkern, wo sie an Hitzeschock-Gen-Promoter-Regionen der DNA binden und dadurch die Produktion von Hitzeschockproteinen induzieren. Diese Reaktion auf Reizzustände erfolgt so schnell, dass sie bereits nach wenigen Minuten nachgewiesen werden kann (Morimoto, 1993).

Die Hitzeschockproteine werden entsprechend ihrer molekularen Masse in verschiedene Familien eingeteilt, die jeweils mit bestimmten intrazellulären Lokalisationen und protektiven Funktionen innerhalb der Zelle assoziiert werden (Madden et al., 2008).

Tab. 3: Einteilung der verschiedenen Hitzeschockproteinklassen entsprechend ihrer Hauptfunktion und Lokalisation in der Zelle (nach Madden et al., 2008)

Hsp-Familie	Zelluläre Lokalisation	Hauptfunktion
Hsp27	Zytosol und Nukleus	Mikrofilament-Stabilisierung
Hsp60	Mitochondrien	Proteinprotektion und Reparatur
Hsp70 Familie		
Hsp72	Zytosol und Nukleus	Proteinfaltung und Zytoprotektion
Hsp73	Zytosol und Nukleus	Proteintranslokation
Hsp75	Mitochondrien	Proteintranslokation
Hsp78	Endoplasm. Reticulum	Zytoprotektion und Proteintranslokation
Hsp90	Zytosol, Nukleus, endoplasm. Reticulum	Proteintranslokation und Rezeptorregulation
Hsp100-104	Zytosol	Proteinfaltung

2.2.3 Hsp27

Hsp27 gehört mit einer Masse von etwa 27 kDa zur Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine (sHsp) die charakteristische Gemeinsamkeiten im strukturellen Aufbau teilen. sHsp besitzen eine geringe molekulare Masse von 12-43 kDa. Sie weisen an ihrem C-terminalen Ende eine konservierte α -Kristallin-Domäne auf und formieren sich zu großen Oligomeren, bestehend aus mehreren Untereinheiten mit einer Gesamtgröße von 300-800 kDa (Behlke et al., 1991; Haslbeck et al., 2005).

Bereits unter normalen Bedingungen sind sHsp im Zytosol der meisten Zellen vorzufinden. Werden die Zellen dann einem Hitzeschock ausgesetzt, steigt die Produktion stark an, sodass sHsp in ihrer maximalen Konzentration bis zu 1 % der gesamten zellulären Proteine ausmachen (et et al., 1993). Haslbeck et al. (2004) zeigten in einem Experiment an *Saccharomyces cerevisiae*, dass bei einem Hitzeschock von 43 °C bis zu ein Drittel der gesamten zytosolischen Proteine der Hefe an sHsp gebunden vorliegen können.

Die kleinen Hitzeschockproteine arbeiten ATP-unabhängig, sie erkennen Proteine, die sich durch Stress entfaltet haben, binden deren hydrophobe Anteile und schützen sie damit vor Aggregation (Jakob et al., 1993; Lee et al., 1997). Wahrscheinlich sind sHsp nicht direkt an der Proteinfaltung beteiligt, sondern halten durch die Bindung ungefalteter Proteine ein Reservoir für die Renaturierung bereit, die dann von größeren Hitzeschockproteinen, wie etwa Hsp70, ATP-abhängig unterstützt wird (Haslbeck et al., 2005).

2.2.4 Hsp70

Die Hsp70-Familie ist eine der am besten erforschten Hitzeschockproteinklassen. Die Proteine dieser Klasse sind zwischen 70 und 78 kDa groß und machen bis zu 2 % der gesamten zellulären Proteine aus (Katschinski, 2004). Jeder Organismus weist eine unterschiedliche Anzahl verschiedener Proteine der Hsp70 Familie auf. Beim Menschen sind bisher mindestens acht bekannt (Daugaard et al., 2007). Sie sind auch im Normalzustand in den meisten Kompartimenten der eukaryotischen Zelle zu finden und werden unter Stress vermehrt gebildet (Beck et al., 2000). Die Hsp70 sind an der Faltung neu synthetisierter, sowie an der Korrektur falsch gefalteter und teilweise denaturierter Proteine beteiligt. Zudem sind sie wahrscheinlich Teil der Translokation von Proteinen durch Zellmembranen in die Organellen und der Auflösung von Proteinaggregaten (Beissinger und Buchner, 1998; Chirico et al., 1988; Hartl, 1996; Hayes und Dice, 1996; Liang und MacRae, 1997).

Ein Großteil der Hsp70 sind im Zytosol und Nukleus lokalisiert, mit Ausnahme von Hsp75 und Hsp78, die in den Mitochondrien, respektive im endoplasmatischen Retikulum vorzufinden sind (Madden et al., 2008). Sie liegen als Monomere vor und haben zwei funktionelle Domänen, eine N-terminale-ATPase-Domäne und eine C-terminale-Peptid-Binde-Domäne (Katschinski, 2004). Bindet ATP an die N-terminale-ATPase-Domäne, wird an der C-terminalen-Domäne ein Spalt geöffnet, an den kurze, hydrophobe Peptide als Substrat gebunden werden können. Sobald das ATP zu ADP hydrolysiert wird, schließt sich der Spalt und fixiert das Substrat im Hitzeschockprotein. Wird das ADP mithilfe von Kofaktoren wiederum durch ATP ersetzt, erfolgt die Freigabe des Substrates und die Faltung des Proteins ist wieder möglich (Agashe und Hartl, 2000).

2.3 Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie stellt heutzutage ein wichtiges diagnostisches Instrument der Medizin, sowohl im Rahmen von Routineuntersuchungen, als auch in der wissenschaftlichen Forschung dar. Den Grundstein für diese Methode legten Coons und seine Kollegen (1941) mit einer Arbeit, in der sie die Identifizierung zellulärer Antigene mittels direkter Immunfluoreszenz beschrieben. Bis heute wurden zahlreiche weitere direkte und indirekte Verfahren entwickelt, um Antigene in Gewebeproben mit spezifischen, markierten Antikörpern mikroskopisch sichtbar zu machen.

Bei der direkten Methode wird ein primärer Antikörper mit einem Marker konjugiert, auf das Gewebe aufgebracht und stellt so ein promptes Signal unter dem Mikroskop dar. Diese Methode ist zwar schnell durchzuführen, aber nicht sehr spezifisch und wird nur noch selten durchgeführt (Ramos-Vara, 2005). Um eine höhere Sensitivität zu erreichen, wurde das indirekte Nachweisverfahren von Coons et al. (1955) entwickelt, das mindestens zwei Schritte umfasst. In einem ersten Schritt wird ein nicht markierter Primärantikörper angewandt, im zweiten Schritt kommt ein markierter Sekundärantikörper hinzu, der spezifisch an den Primärantikörper bindet. Da meist mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden und zudem an jeden Sekundärantikörper mehrere Markermoleküle gebunden sein können, führt die Erweiterung des Verfahrens um diesem Extraschritt zu einer Signalamplifikation und damit auch bei relativ geringen Antigen-Konzentrationen zu einem starken Signal (Renshaw, 2006).

Eine weit verbreitete indirekte Methode ist die sogenannte Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode. Hier wird der Sekundärantikörper biotinyliert und als drittes Reagenz ein zuvor vorbereiteter Komplex aus Avidin und markiertem Biotin hinzugefügt. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein. Es besitzt vier Bindungsstellen und eine hohe Affinität für das Vitamin Biotin. Bei der Mischung von Avidin und markiertem Biotin muss im Mengenverhältnis darauf geachtet werden, dass einige Bindungsstellen des Avidin frei bleiben, damit hier eine Bindung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper eingegangen werden kann. So können an jeden Sekundärantikörper zahlreiche Markermoleküle indirekt gebunden werden (Ramos-Vara, 2005). Da Avidin einen isoelektrischen Punkt von 10 hat und dazu neigt, nichtspezifisch an negativ geladene und Lectin-ähnliche Komponenten zu binden, können bei der Färbung unerwünschte falsch positive

Signale entstehen. Um dies zu vermeiden und die Sensitivität zu steigern, verwendet man heute häufig die Labeled-Streptavidin-Biotin (LSAB) Methode. Streptavidin wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen, es hat einen neutralen isoelektrischen Punkt und bindet nicht an Lectin, somit erzeugt es weniger falsch positive Signale.

Bei der LSAB-Methode wird ebenfalls ein biotinylierter Sekundärantikörper eingesetzt, dieser stellt die Verbindung zwischen dem Primärantikörper und einem Strept-avidin-Peroxidase-Komplex dar, welcher als Marker fungiert (Ramos-Vara, 2005).

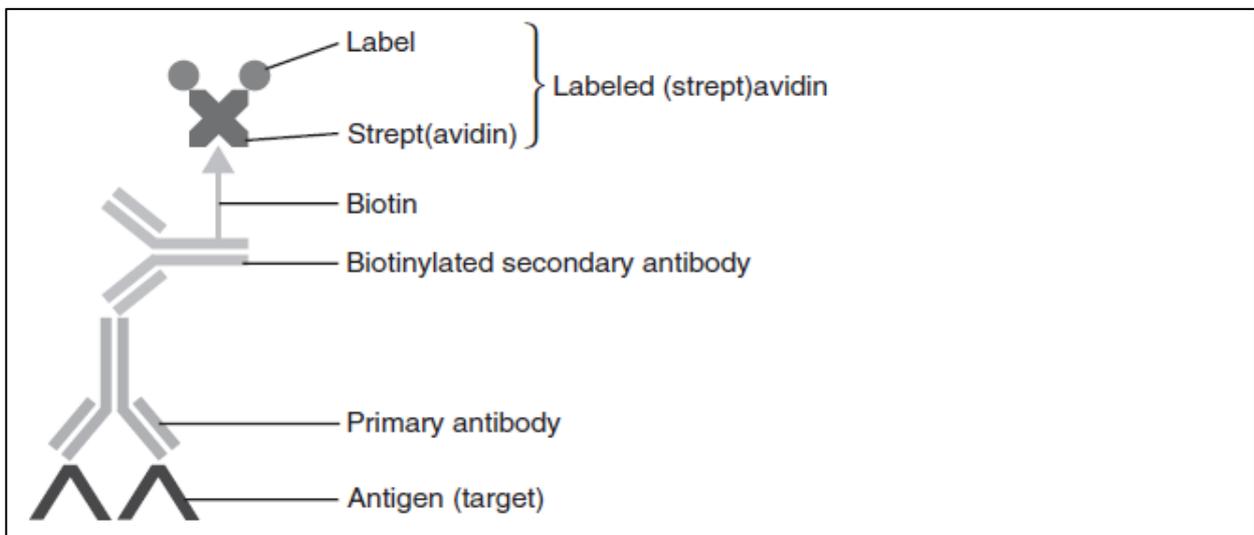


Abb. 3: Schematische Darstellung der Labeled-Streptavidin-Biotin (LSAB) Methode (Renshaw, 2006)

Die immunhistochemische Untersuchung von Hitzeschockproteinen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, findet besonders häufig im Rahmen der Tumordiagnostik statt und ist als solche ein gut etabliertes Verfahren. Beispielsweise ist der immunhistochemische Nachweis von Hsp27 ein geeignetes Instrument bei der Diagnose eines höhergradigen Zervixkarzinoms (Tozawa-Ono et al., 2012). Des Weiteren kann das Ausmaß der Hsp27-Expression, gemeinsam mit weiteren klinischen und pathologischen Variablen, dazu beitragen die Überlebenswahrscheinlichkeit beim Aderhautmelanom vorherzusagen (Jmor et al., 2012).

In einer Studie von Isomoto et al. (2003) zeigte sich eine vermehrte Expression von Hsp70 im Tumorgewebe von Magenkarzinomen im Vergleich mit umliegendem gesun-

den Gewebe. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in einer Studie von Milićević et al. (2007) an Gewebeproben von kolorektalen Adenokarzinomen. Die Autoren schließen daraus, dass eine Überexpression von Hsp70 im malignen Gewebe mit einer Tumorprogression assoziiert ist.

2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Hintergrund der vorliegenden Arbeit war die Frage, ob sich der immunhistochemische Nachweis von Hitzeschockproteinen in postmortal sichergestelltem Gewebe als Diagnosekriterium für den plötzlichen Säuglingstod verwenden lässt. Es gibt zwar bereits zahlreichen Studien zum plötzlichen Säuglingstod, bisher konnten aber noch keine relevanten diagnostischen Marker postmortalen Untersuchungen gefunden werden.

Da die Überwärmung, durch mehrere Studien belegt (s. Tabelle 4), als Risikofaktor für den plötzlichen Säuglingstod anerkannt wurde, schien es interessant zu prüfen, ob die Hitzeschockproteinexpression als mögliches histopathologisches Korrelat in einem SIDS-Kollektiv entsprechend höher ist als in einem Kontrollkollektiv.

Tab.4: Überblick der wichtigsten veröffentlichten Forschungsarbeiten zum Thema plötzlicher Säuglingstod und Hyperthermie mit Angabe von Untersuchungsmethoden, Fallzahlen und Ergebnissen

Autor	Untersuchungsmethode	Fallzahl	Ergebnisse
Pfeifer (1980)	Postmortale Messung der rektalen Temperatur	138	Nachweis einer Hyperthermie in 82,6 % der Fälle
Sunderland, Emery (1981)	Postmortale Messung der rektalen Temperatur	24	In 10 Fällen Temperatur über 38 °C und in 5 Fällen über 40 °C
Stanton (1984)	Postmortale Untersuchung auf folgende Faktoren: - Schwitzen - hohe Umgebungstemperatur - Zeichen einer Infektion - warme Bekleidung/Bedeckung	34	Lediglich in 2 Fällen fand sich keiner der genannten 4 Faktoren

Autor	Untersuchungsmethode	Fallzahl	Ergebnisse
Stanton (1984)	Postmortale Messung der rektalen Temperatur	15	In 40 % der Fälle rektale Temperatur über 37 °C
Fleming et al. (1990)	Postmortal geführte Befragung der Eltern, u. a. bezüglich: - Schlafposition - Menge und Beschaffenheit des Bettzeugs (tog-value) - Heizverhalten	67	Überwärmung erweist sich als unabhängiger Risikofaktor für SIDS
Gilbert et al. (1992)	Mikrobiologische Untersuchung verschiedener Körperflüssigkeiten auf Viren und Bakterien Postmortal geführte Befragung der Eltern, u. a. bezüglich: - Zeichen einer Infektion - Schlafposition - Menge und Beschaffenheit des Bettzeugs (tog-value)	95	Die Kombination aus einer viralen Infektion und der dicken Umhüllung mit Bettzeug erhöht das Risiko für den plötzlichen Säuglingstod
Ponsonby et al. (1992)	Untersuchung der thermischen Umgebung (Wetter, Raumtemperatur, Heizung, etc.) Postmortal geführte Befragung der Eltern Ausführlicher Fragebogen zur häuslichen Situation und den Schlafgewohnheiten des Kindes	41	Überwärmung erweist sich als unabhängiger Risikofaktor für SIDS
Kleemann et al. (1996)	Postmortal geführte Befragung der Eltern, u. a. bezüglich: - Schwitzen - Auffindesituation bzgl. Bedeckung/Bekleidung	140	Signifikante Assoziation zwischen den Anzeichen einer präterminalen Hyperthermie und dem Risiko für den plötzlichen Säuglingstod

3. Material und Methoden

3.1 Kollektiv SIDS-Fälle

Das Studienkollektiv bestand aus 120 Fällen mit der Todesursache eines plötzlichen Säuglingstodes, die über die Jahre 1997 bis 2013 am Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn gerichtlich obduziert wurden. Bei den Obduktionen, sowie nachfolgenden histologischen, mikrobiologischen und toxikologischen Untersuchungen, konnten sämtliche konkurrierenden Todesursachen ausgeschlossen werden. Gemäß der San Diego Klassifikation von 2004 (Krous et al., 2004) waren die meisten Fälle der Subkategorie IB zuzuordnen, da routinemäßig keine chemische Untersuchung der Glaskörperflüssigkeit erfolgte. Es wurde jeweils Organgewebe entnommen und in Formaldehyd asserviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das entsprechende Gewebe von Herz, Lunge und Niere immunhistochemisch auf die Expression von Hsp27 und Hsp70 untersucht. Diese Organe hatten sich, in einer Untersuchung von Doberentz et al. (2014) an Verbrennungsopfern, als sensibel im Hinblick auf die Hitzeschockproteinexpression bei starker Wärmeeinwirkung erwiesen.

Da nicht mehr alle Organproben vollständig im Archiv vorhanden waren, beläuft sich die Anzahl der Gewebeproben der Lungen auf 98, der Herzen auf 102 und der Nieren auf 91 Exemplare.

Die Obduktionsprotokolle, sowie gegebenenfalls vorliegende polizeiliche Unterlagen, wurden auf Begleitumstände des Todes, insbesondere auf Hinweise bezüglich einer Überwärmung bzw. Temperaturerhöhung der Kinder bei Todeseintritt untersucht.

3.2 Kollektiv Kontroll-Fälle

Als Kontrollkollektiv wurden 29 Todesfälle von Kindern aus den Jahren 1996 bis 2013 untersucht, bei denen durch die gerichtliche Obduktion am Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn eine nicht natürliche Todesursache festgestellt werden konnte (s. Tabelle 5). Die Organe dieser Fälle wurden ebenfalls immunhistochemisch auf die Expression von Hsp27 und Hsp70 untersucht. Es lagen hier Gewebeproben von 24 Lungen, 26 Herzen und 26 Nieren vor.

Tab. 5: Auflistung der Fälle des Kontrollkollektivs entsprechend der Todesursache

Todesursache	Anzahl
Infektion	7
Trauma	6
Missbildung	6
Ersticken	5
Ertrinken	2
Gasembolie	1
Geburtskomplikation	1
Hirnödem	1

3.3 Immunhistochemische Färbung

3.3.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Bei jeder Obduktion wurden die Organe Herz, Lunge und Niere entnommen und entsprechende Gewebeanteile asserviert. Als Fixativ wurde dazu im Institut der Rechtsmedizin Bonn seit 1996 neutral phosphat-gepuffertes Formaldehyd (8-10 %) verwendet. Die Dauer der Fixierung lag sowohl in der Studiengruppe als auch in der Kontrollgruppe zwischen wenigen Wochen und mehreren Jahren.

Für die aktuelle Untersuchung der Gewebe wurden diese zunächst zu kleinen Blöcken geschnitten und dann im Autotechnikon (Firma Shandon, Modell: Citadel 1000) schrittweise mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Im Anschluss erfolgte die Einbettung der Gewebeschnitte in Paraffin. Von den entstandenen Gewebsblöcken wurden am Mikrotom jeweils mehrere 2-4 µm dünne Schnitte angefertigt und auf herkömmliche Objektträger übertragen. Die anschließende Trocknung der Präparate erfolgte über 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C.

Zur Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die getrockneten Präparate zunächst zweimal für 10 Minuten in Xylol getaucht, anschließend in eine Ethanolreihe mit abstei-

gender Konzentration gegeben (2 x 10 Min in 100 %, 2 x 3 Min in 96 %, 1 x 3 Min in 70 %, 1 x 3 Min in 50 %), sowie zum Schluss einmal in TRIS-Puffer gespült.

3.3.2 Antigendemaskierung

Die Fixierung in Formaldehyd bewirkt in den Geweben eine Quervernetzung von Proteinen, welche die Antigenbindung bei der Färbung mit Antikörpern verhindert und somit keine aussagekräftigen Ergebnisse zulässt. Bevor die immunhistochemische Färbung begonnen werden kann, muss also auf eine Methode zurückgegriffen werden, mit der sich die entstandenen Hydroxymethylenbrücken wieder aufspalten lassen. Dazu haben sich mit der Zeit zwei verschiedene Verfahren etabliert. Entweder erfolgt die Vorbehandlung der Schnitte durch Inkubation in einem proteolytischen Enzym bei 37 °C oder durch Erhitzen der Präparate in einer Pufferlösung, zum Beispiel mit einer Mikrowelle (Renshaw, 2006).

In dieser Arbeit wurde letzteres Verfahren zur Antigendemaskierung genutzt. Die entparaffinierten Schnitte wurden in Plastikküvetten gestellt und dreimal für jeweils 10 Minuten in Citratpuffer (pH 6) bei 900 Watt in einer konventionellen Mikrowelle erhitzt. Dabei verdampfende Flüssigkeit wurde regelmäßig nachgefüllt, sodass die Objektträger ständig mit Pufferlösung benetzt waren. Nach 20-minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte nochmals in TRIS-Puffer gespült.

3.3.3 Färbung nach der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode

Die Immunhistochemische Färbung erfolgte auf Grundlage der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (s. Kapitel 2.3). Dazu wurden die Präparate zunächst mit einem jeweils spezifischen Primärantikörper (monoklonale Maus-Antikörper) für die Hitzeschockproteine 27 und 70 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst die Zugabe eines biotinylierten Sekundärantikörpers, darauffolgend wurde der markierte Streptavidin-Komplex appliziert. Im Anschluss an die erforderliche Einwirkzeit erfolgte die Anfärbung mittels Chromogen-Substrat. Eine detaillierte Färbeanleitung findet sich in Kapitel 7.2. Als Kontrast zur immunhistochemischen Färbung der Hitzeschockproteine erfolgte die Kernfärbung der Präparate mit Hämalaun. Dieser basische Farbstoff führt zu einer zartblauen Anfärbung der Zellkerne und bietet somit einen Hintergrund für die immunhistochemischen Signale. Abschließend wurden die Schnitte mit Deckgläsern versehen.

Um mögliche Fehler bei der Färbung auszuschließen bzw. erkennbar zu machen, wurden bei jedem Färbevorgang eine Positivkontrolle, sowie jeweils eine Negativkontrolle für den Primär- und den Sekundärantikörper mitgeführt.

3.4 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbeergebnisse erfolgte mikroskopisch als semiquantitatives Verfahren. Obwohl die semiquantitative Auswertung der quantitativen in ihrer Genauigkeit unterlegen ist, ist sie doch geeignet die Fragestellung dieser Arbeit zu beantworten und bietet mögliche Ansatzpunkte für eventuell folgende Studien zum Thema.

Die lichtmikroskopische Beurteilung der Präparate erfolgte bei 400-facher Vergrößerung. Dabei wurden die Präparate mäanderförmig gesichtet, die Färbeergebnisse von jeweils 30 Gesichtsfeldern semiquantitativ erfasst und zu einem Ergebnis pro Präparat und Organteilstruktur zusammengefasst. Waren pro Fall mehrere Präparate eines Organs vorhanden so wurden diese zu einem Gesamtergebnis zusammengefügt.

Die Gradeinteilung der positiven Ergebnisse erfolgte in Anlehnung an Preuss et al. (2008) nach der Ausprägung der Farbreaktion und dem prozentualen Anteil der angefärbten Zellen in Verhältnis zur jeweiligen Gesamtzellzahl in vier Grade (s. Tab. 6). Dazu wurden für jedes Gesichtsfeld die rot markierten Zellen einer Organstruktur erfasst und ins Verhältnis zu der Gesamtzellzahl dieser Struktur gesetzt. Nach Auswertung der 30 Gesichtsfelder wurde ein Mittelwert bestimmt, welcher als Endergebnis für die jeweilige Organstruktur festgehalten wurde.

Dabei entsprach Grad 0 einem negativen Ergebnis bei der immunhistochemischen Färbung, bei der keine Anfärbung von Zellstrukturen zu verzeichnen war. Grad 1 entsprach einer schwachen Farbreaktion bei der weniger als 30 % der jeweiligen Organstruktur positive Signale zeigte. Konnten zwischen 30 und 60 % der Zellen einer Struktur als positiv gewertet werden, erfolgte die Zuteilung zu Grad 2. Eine intensive Anfärbung von Zellstrukturen mit einem Anteil von über 60 % entsprach Grad 3.

Tabelle 7 zeigt welche Organstrukturen auf zellulärer Ebene in der mikroskopischen Auswertung jeweils separat beurteilt wurden.

Die Abbildungen 4 bis 7 stellen jeweils beispielhaft das mikroskopische Bild der Teilstrukturen, entsprechend der jeweiligen Graduierung, dar.

Tab. 6: Gradeinteilung der mikroskopischen Auswertung nach der Intensität der Farbreaktion und dem prozentualen Anteil der angefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl

Grad	Farbreaktion	Befund (semiquantitativ)
0	keine	0 % positiv
1	schwach	> 0 % bis 29,99 %
2	moderat	30 % bis 59,99 %
3	intensiv	60 % bis 100 %

Tab. 7: Auflistung der zellulären Strukturen, die im Rahmen dieser Arbeit mikroskopisch ausgewertet wurden

Organ	Zelluläre Strukturen
Herz	Myozyten Fibrozyten Gefäße
Lunge	Bronchien Respiratorisches Epithel Gefäße Alveolarsepten Peribronchiale Drüsen Peribronchiales Bindegewebe
Niere	Glomeruli Tubuli Gefäße Bindegewebe

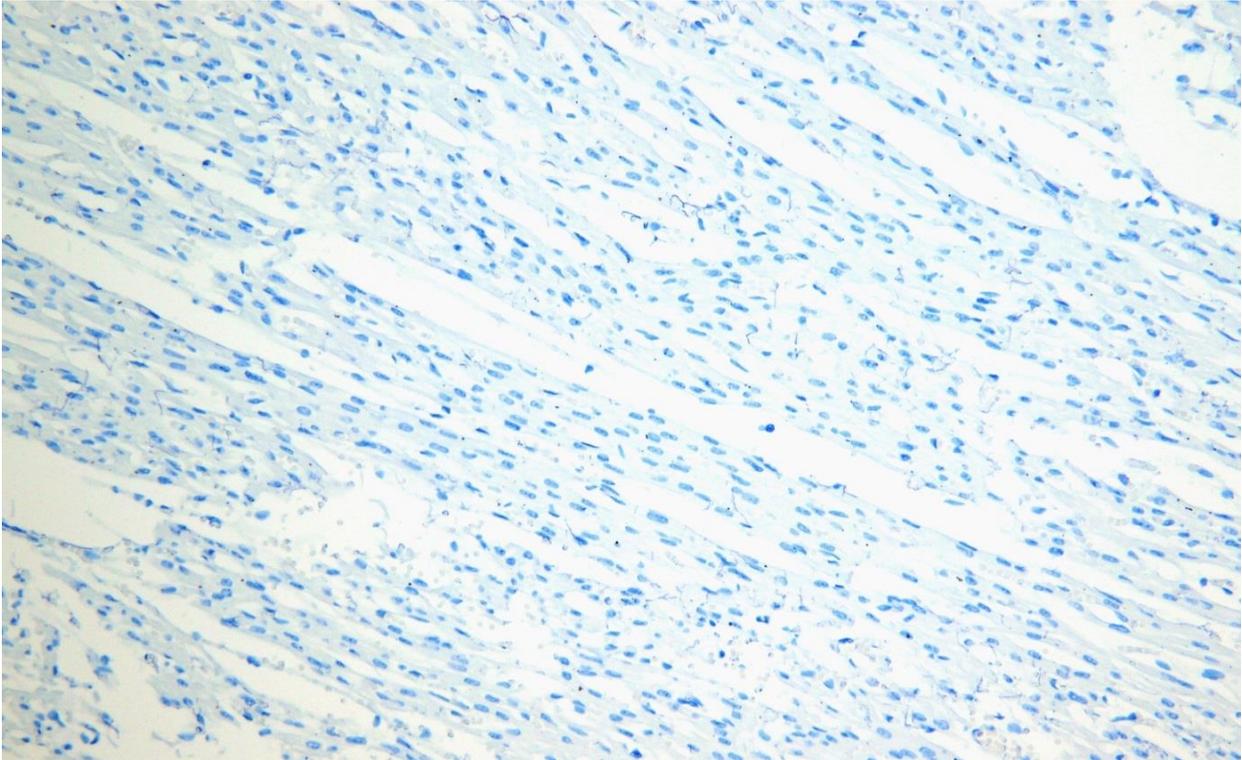


Abb. 4: Herz, Hsp70, 200-fache Vergrößerung – Myozyten Grad 0, keine Anfärbung

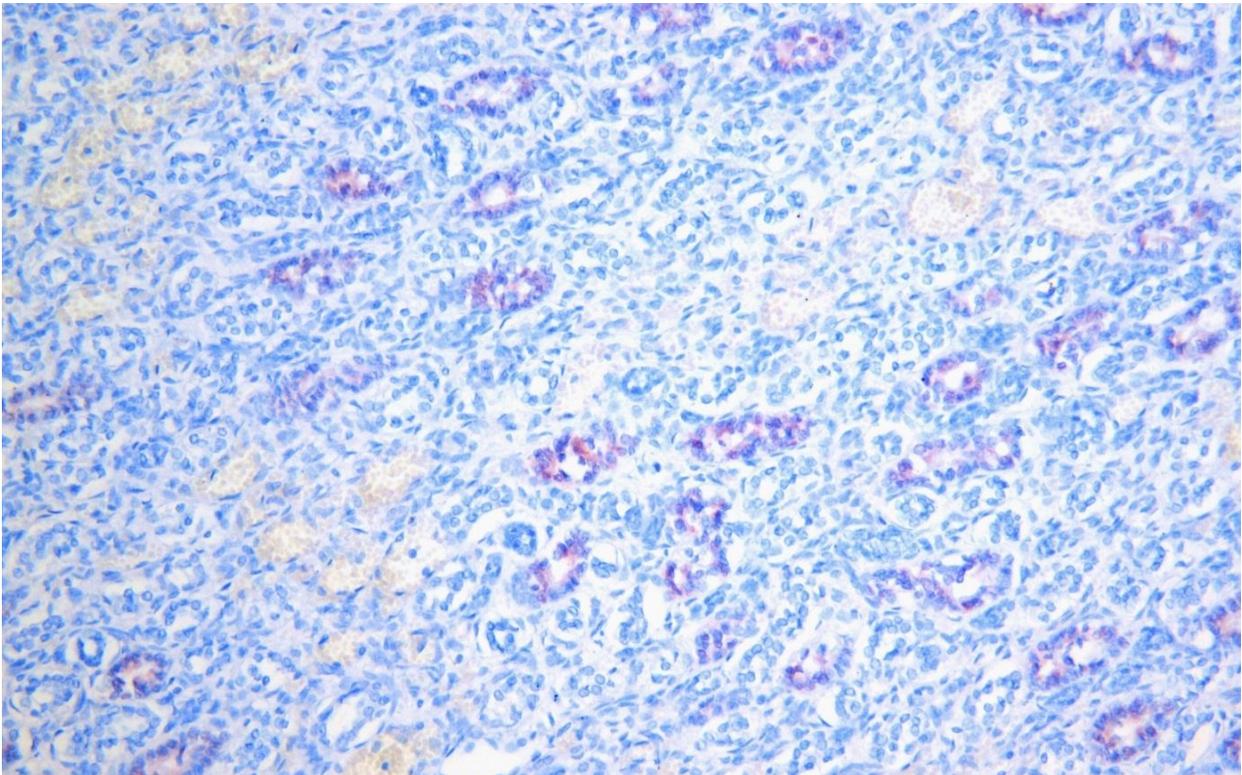


Abb. 5: Niere, Hsp27, 200-fache Vergrößerung – Tubuli Grad 1 positiv

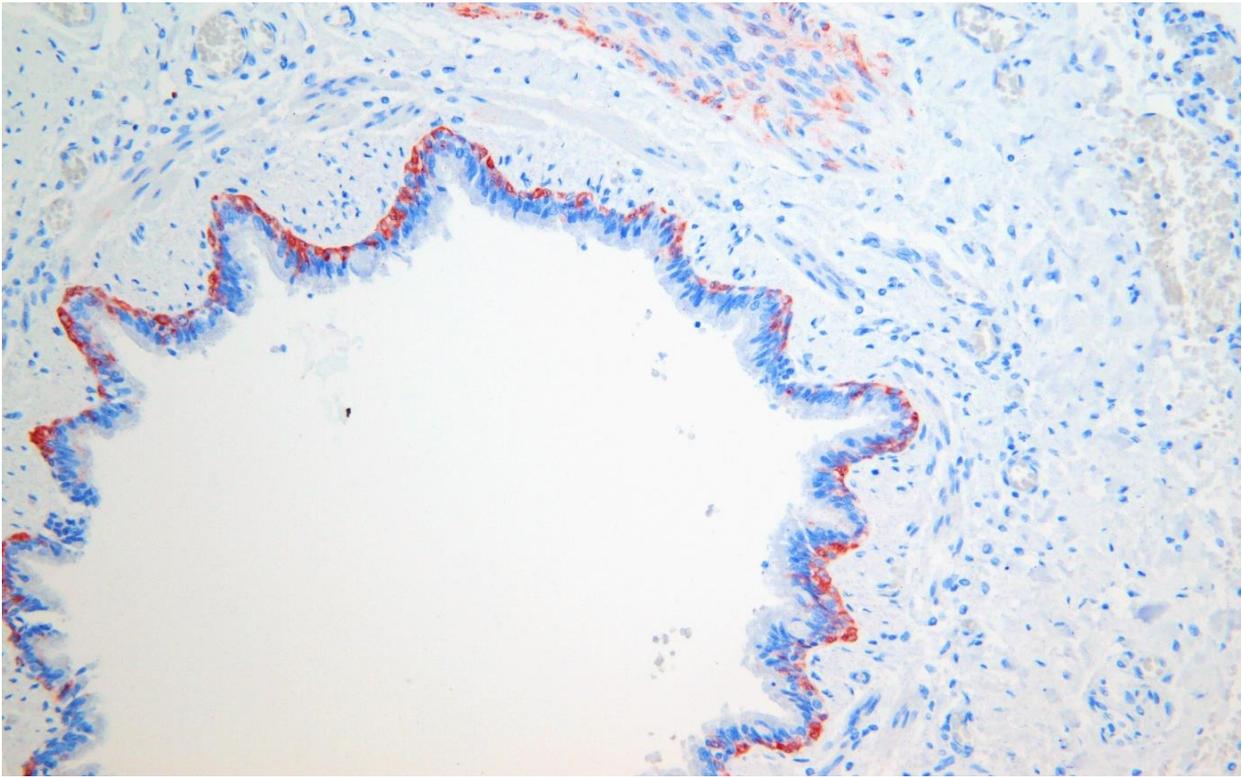


Abb. 6: Lunge, Hsp27, 200-fache Vergrößerung – respiratorisches Epithel Grad 2 positiv

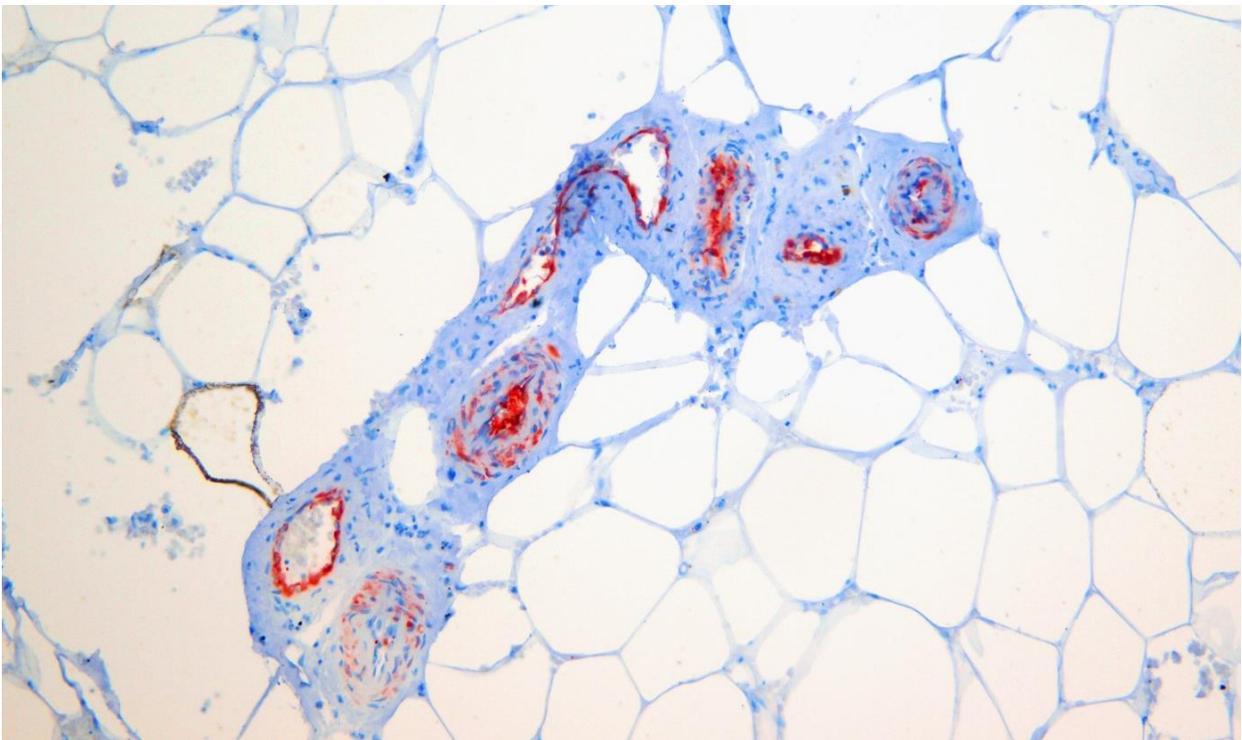


Abb. 7: Positivkontrolle, Unterhautfettgewebe, Hsp27, 200-fache Vergrößerung – Gefäße Grad 3 positiv

4. Ergebnisse

4.1 SIDS-Kollektiv allgemein

Das Studienkollektiv bestand aus 120 obduzierten plötzlichen Säuglingstodesfällen aus den Jahren 1997 bis 2013 (s. Abb. 8).

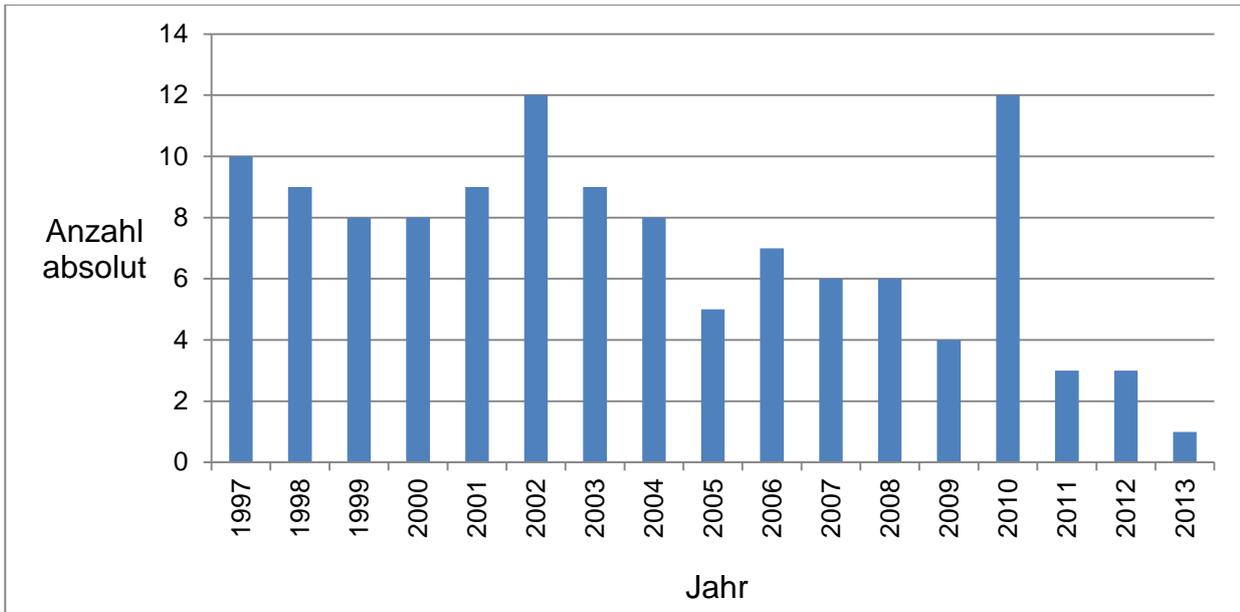


Abb. 8: Anzahl der obduzierten SIDS-Fälle pro Jahr (1997-2013) am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn

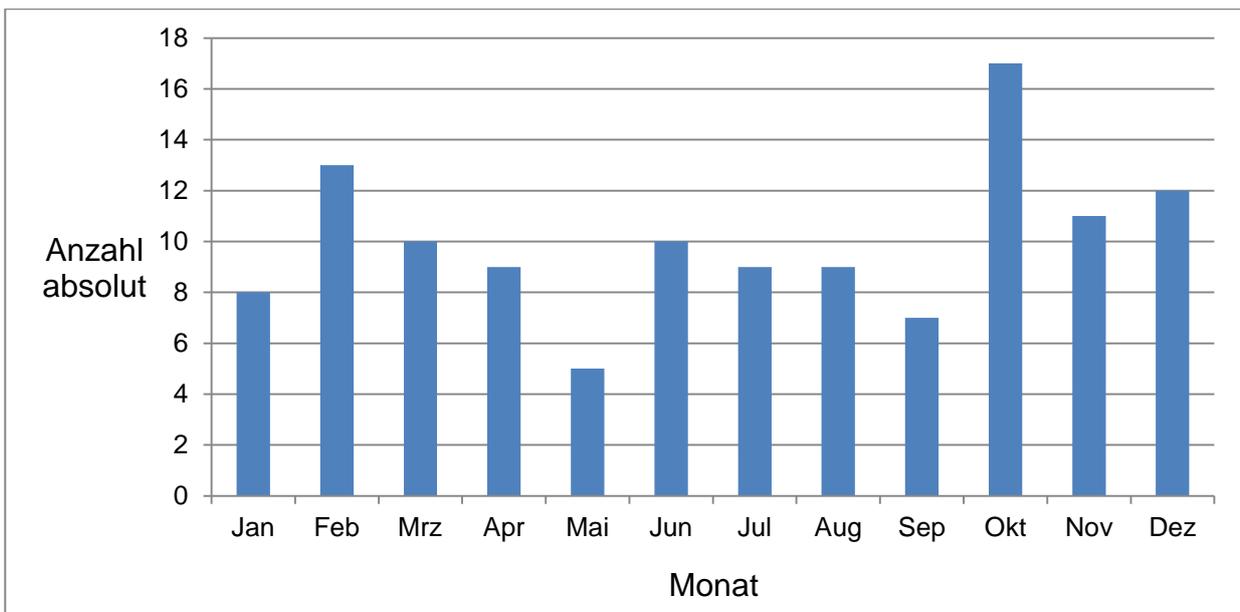


Abb. 9: Verteilung der 120 obduzierten SIDS-Fälle entsprechend der Jahreszeit, dargestellt als Anzahl der Fälle bezogen auf den jeweiligen Monat

Die Abbildung 9 zeigt die Anzahl der obduzierten Fälle von plötzlichem Säuglingstod bezogen auf den jeweiligen Monat, wobei ein eindeutiges Maximum der Todesfälle in den Herbst- und Wintermonaten erkennbar ist.

Das Studienkollektiv setzte sich aus 46 weiblichen und 74 männlichen Säuglingen zusammen. Das durchschnittliche Lebensalter zum Todeszeitpunkt betrug 125 Tage, mit einem Minimum von 7 und einem Maximum von 344 Tagen. Den Abbildungen 10 bis 12 ist zu entnehmen, dass der plötzliche Säuglingstod unabhängig vom Geschlecht gehäuft zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat auftrat.

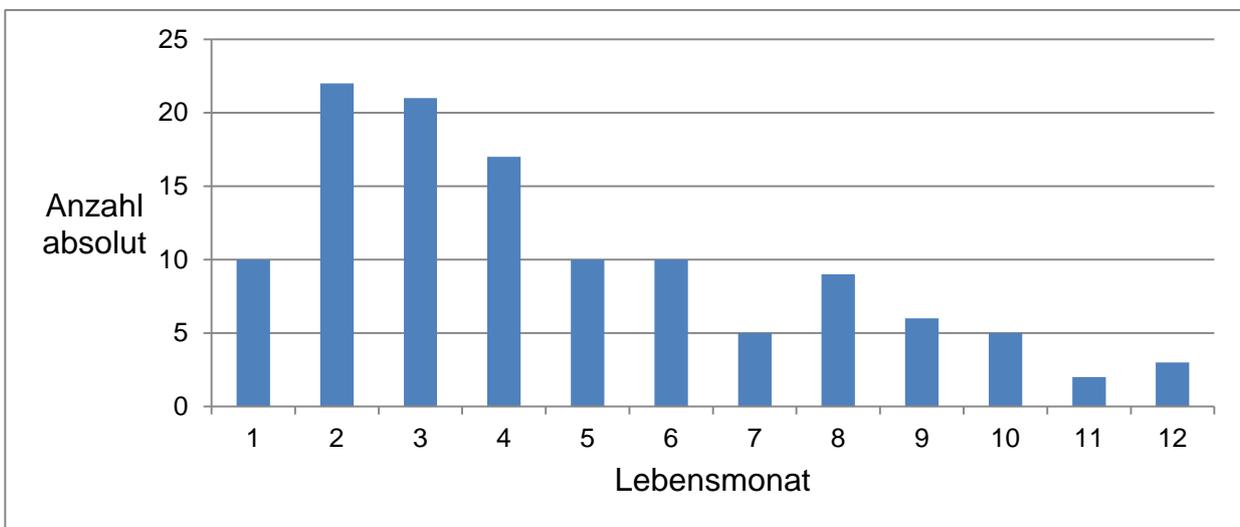


Abb. 10: Altersverteilung des gesamten Studienkollektivs zum Zeitpunkt des Todes, dargestellt in Monaten

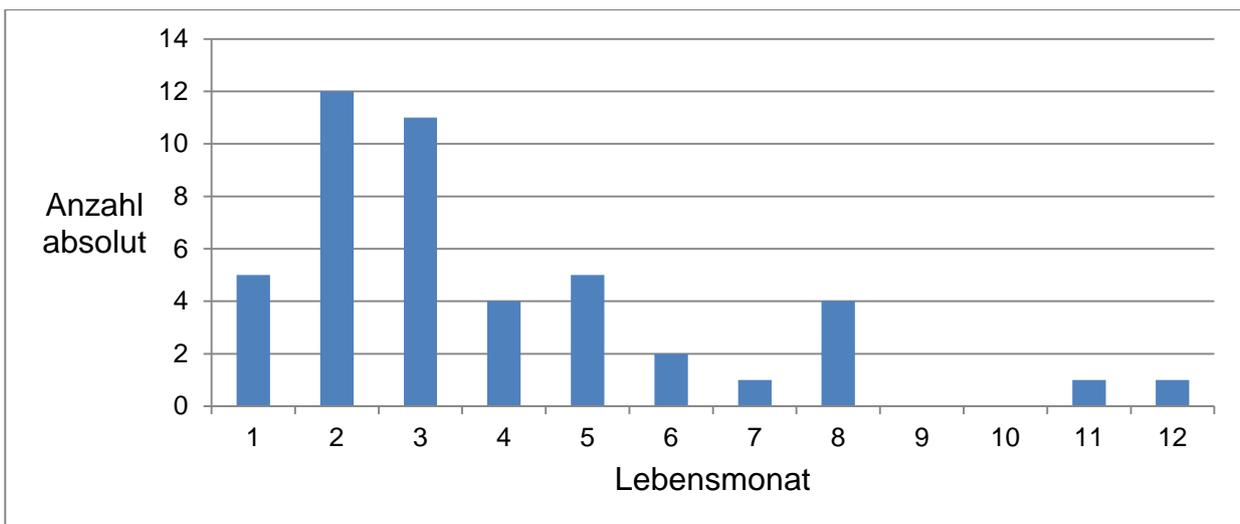


Abb. 11: Altersverteilung der 46 weiblichen SIDS-Opfer zum Zeitpunkt des Todes, dargestellt in Monaten

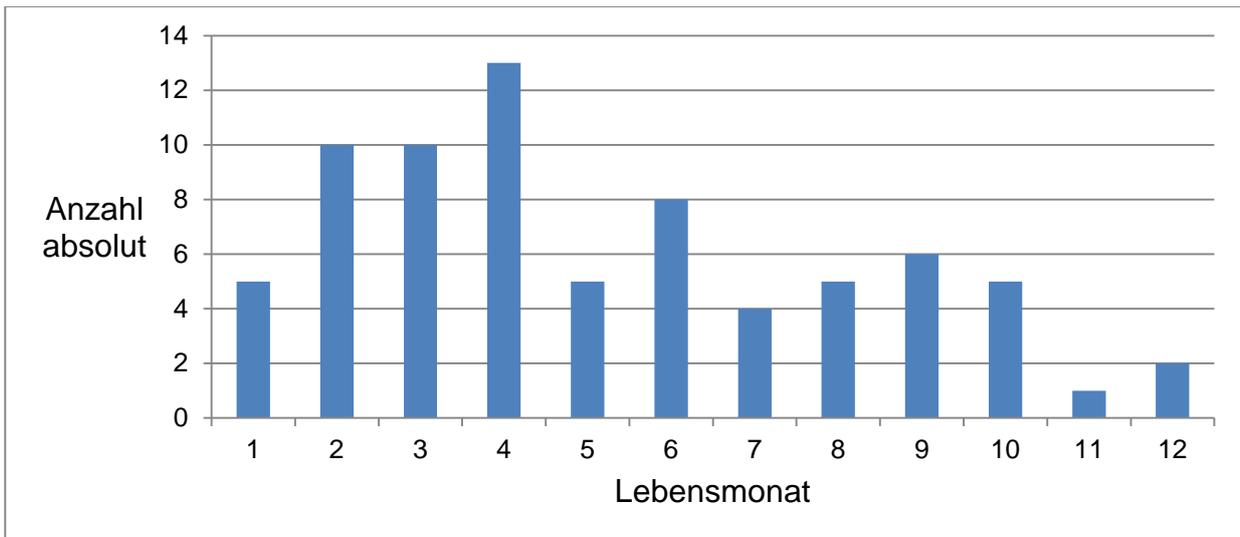


Abb. 12: Altersverteilung der 74 männlichen SIDS-Opfer zum Zeitpunkt des Todes, dargestellt in Monaten

Hinweise zu Begleitumständen des Todes und zur Auffindesituation der Kinder wurden den jeweiligen Obduktionsprotokollen sowie gegebenenfalls vorliegenden polizeilichen Unterlagen entnommen. Darin war in 49 Fällen eine Positionierung des Kindes in Bauchlage beschrieben, in 27 Fällen ist eine Rücken- oder Seitenlage angegeben, in den übrigen 44 Fällen gab es keine Angaben zur Schlafposition des Kindes.

Bei 16 Fällen von plötzlichem Säuglingstod handelte es sich um ehemals frühgeborene Kinder. Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind die Aufzeichnungen im Hinblick auf den Risikofaktor „prämortale Hitzeeinwirkung“. In 11 Fällen war eine übermäßige Wärmezufuhr durch vollständige Bedeckung mit einem Federbett dokumentiert. In 29 Fällen soll zum Todeszeitpunkt ein viraler oder bakterieller Infekt vorgelegen haben.

In 80 Fällen fand sich in den Protokollen keine detaillierte Beschreibung der Auffindesituation, weshalb keine Einschätzung der prämortalen Hitzeeinwirkung vorgenommen werden konnte.

4.2 Kontrollkollektiv allgemein

Das Kontrollkollektiv bestand aus 29 Todesfällen von Kindern aus den Jahren 1996 bis 2013, denen verschiedene nicht natürliche Todesursachen zugrunde lagen. Das Kollektiv setzte sich aus 16 männlichen und 13 weiblichen Individuen zusammen. Das minimale Alter lag bei 4, das maximale bei 3541 Tagen mit einem Mittelwert von 876 Tagen (s. Abb. 13).

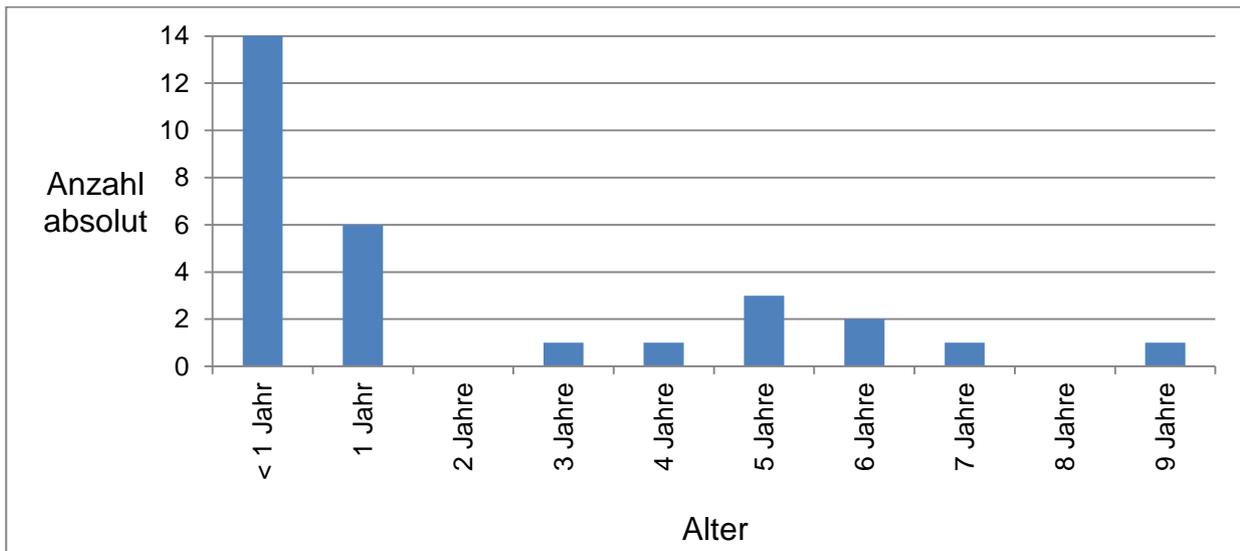


Abb. 13: Altersverteilung des Kontrollkollektivs zum Zeitpunkt des Todes, dargestellt in Jahren

4.3 Ergebnisse Hsp27

4.3.1 SIDS-Kollektiv

Für die immunhistochemische Untersuchung stand Lungengewebe in 98 Fällen, Herzgewebe in 102 Fällen und Nierengewebe in 91 Fällen zur Verfügung. Die mikroskopische Auswertung der, in jedem Färbevorgang mitgeführten, Positiv- und Negativkontrollen zeigte stets unauffällige Ergebnisse (s. Abb. 7). Die Kernfärbung mittels Hämalaun war in allen Fällen ohne Auffälligkeiten.

4.3.1.1 Lunge

Bei der immunhistochemischen Färbung des Lungengewebes konnten in den Bronchioli, Alveolarsepten, peribronchialen Drüsen und dem peribronchialen Bindegewebe keine

positiven Signale beobachtet werden. Im respiratorischen Epithel zeigten sich in 16 Fällen (16,3 %) positive Signale entsprechend Grad 1, in 9 Fällen (9,2 %) entsprechend Grad 2 und in einem Fall (1,0 %) entsprechend Grad 3. Die Gefäße zeigten in 12 Fällen (12,2 %) positive Signale entsprechend Grad 1, in 4 Fällen (4,1 %) entsprechend Grad 2 und in 3 Fällen (3,1 %) entsprechend Grad 3.

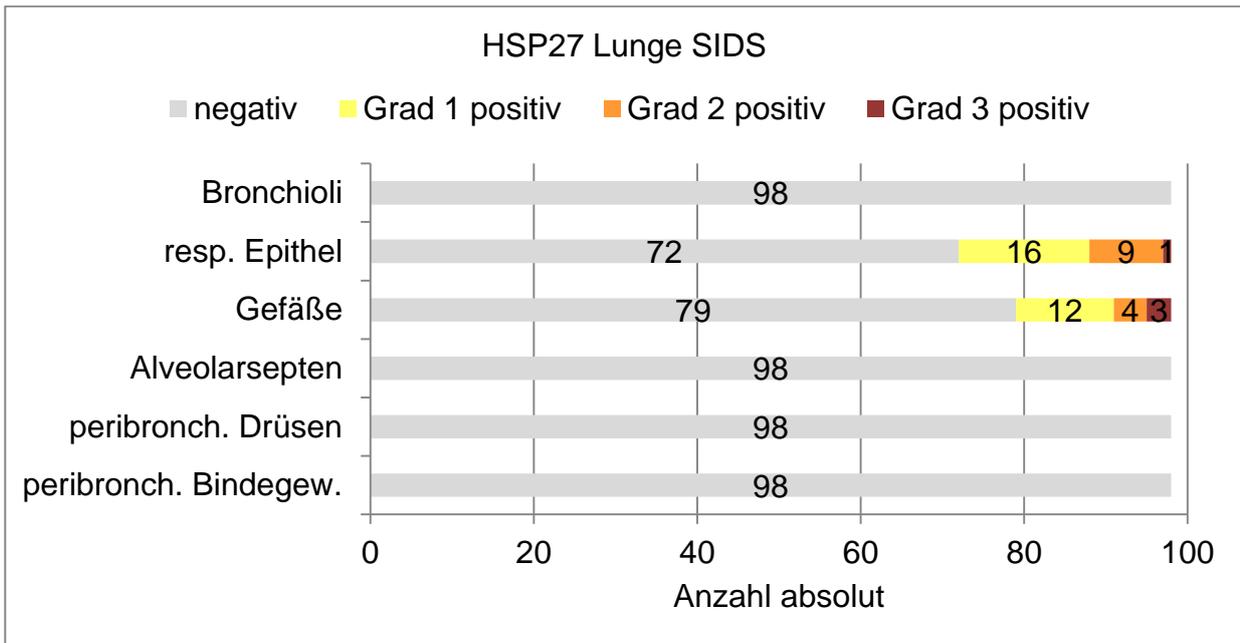


Abb. 14: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 in der Lunge (SIDS-Kollektiv)

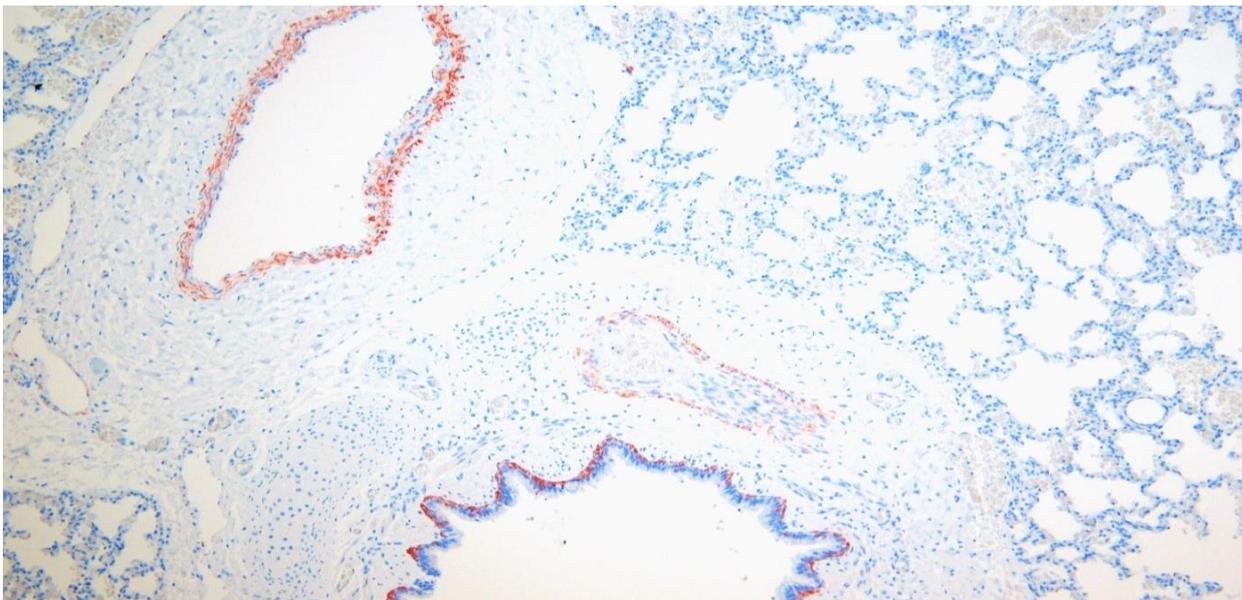


Abb.15: SIDS-Kollektiv, Lunge, Hsp27, 100-fache Vergrößerung – respiratorisches Epithel Grad 2 positiv, Gefäße Grad 3 positiv

4.3.1.2 Niere

Die Färbung des Nierengewebes zeigte bei der mikroskopischen Untersuchung keinerlei positive Signale in den Zellen der Glomeruli, Gefäße und im Bindegewebe. Lediglich in einem Fall (1,1 %) zeigten sich im Tubulusepithel positive Signale entsprechend Grad 2.

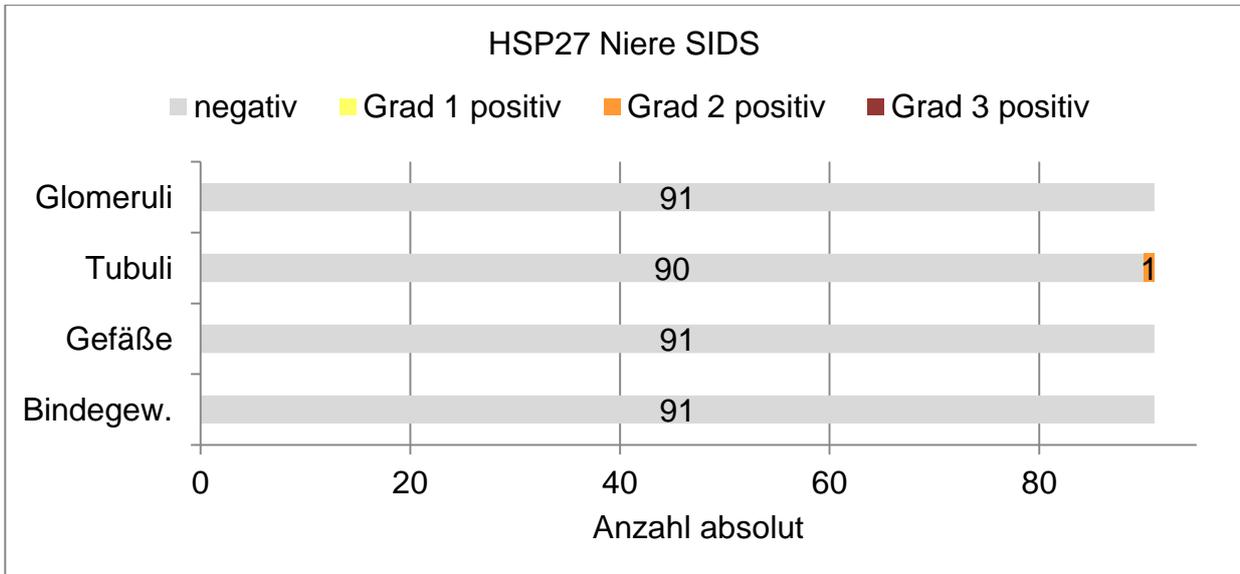


Abb. 16: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 in der Niere (SIDS-Kollektiv)

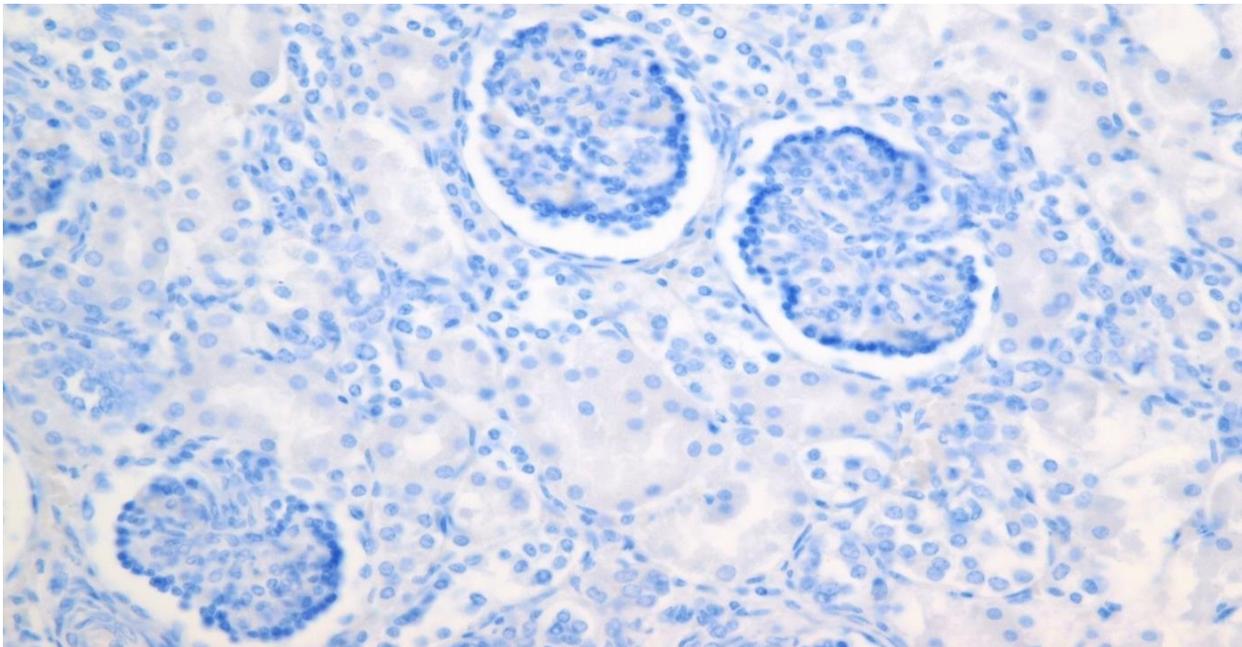


Abb. 17: SIDS-Kollektiv, Niere, Hsp27, 400-fache Vergrößerung - Glomeruli und Tubuli Grad 0, keine Anfärbung

4.3.1.3 Herz

Bei der mikroskopischen Untersuchung des Herzgewebes zeigten sich nach der immunhistochemischen Färbung weder in Myozyten, Fibrozyten noch Gefäßen positiven Signale. Sämtliche Präparate waren komplett negativ.

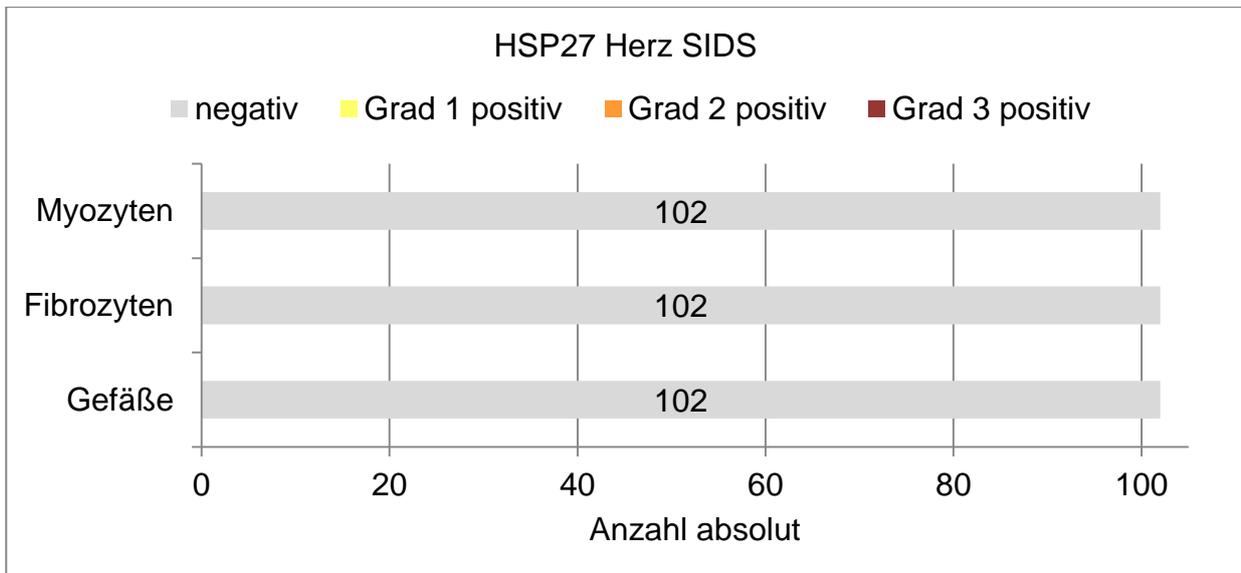


Abb. 18: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 im Herzen (SIDS-Kollektiv)

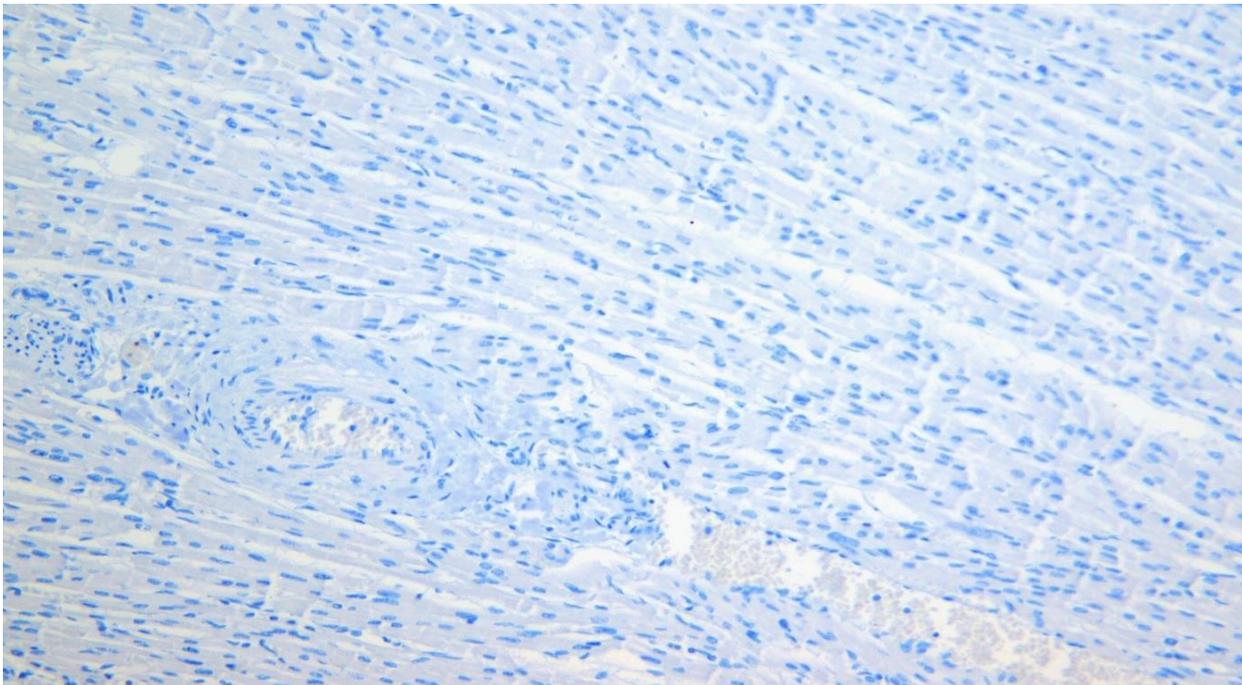


Abb. 19: SIDS-Kollektiv, Herz, Hsp27, 200-fache Vergrößerung - Myozyten und Gefäße Grad 0, keine Anfärbung

4.3.2 Kontrollkollektiv

Für die immunhistochemische Untersuchung stand Lungengewebe in 24 Fällen, Herzgewebe in 26 Fällen und Nierengewebe in 26 Fällen zur Verfügung. Die mikroskopische Auswertung der, in jedem Färbvorgang mitgeführten, Positiv- und Negativkontrollen zeigte stets unauffällige Ergebnisse. Die Kernfärbung mittels Hämalaun war in allen Fällen ohne Auffälligkeiten.

4.3.2.1 Lunge

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung des Lungengewebes waren keine positiven Signale in Zellen der Bronchioli, Alveolarsepten, peribronchialen Drüsen und im peribronchialen Bindegewebe zu beobachten. Das respiratorische Epithel zeigte in zwei Fällen (8,3 %) positive Signale entsprechend Grad 2. Die Gefäße ergaben in 4 Fällen (16,7 %) positive Signale gemäß Grad 1 und in 3 Fällen (12,5 %) gemäß Grad 2.

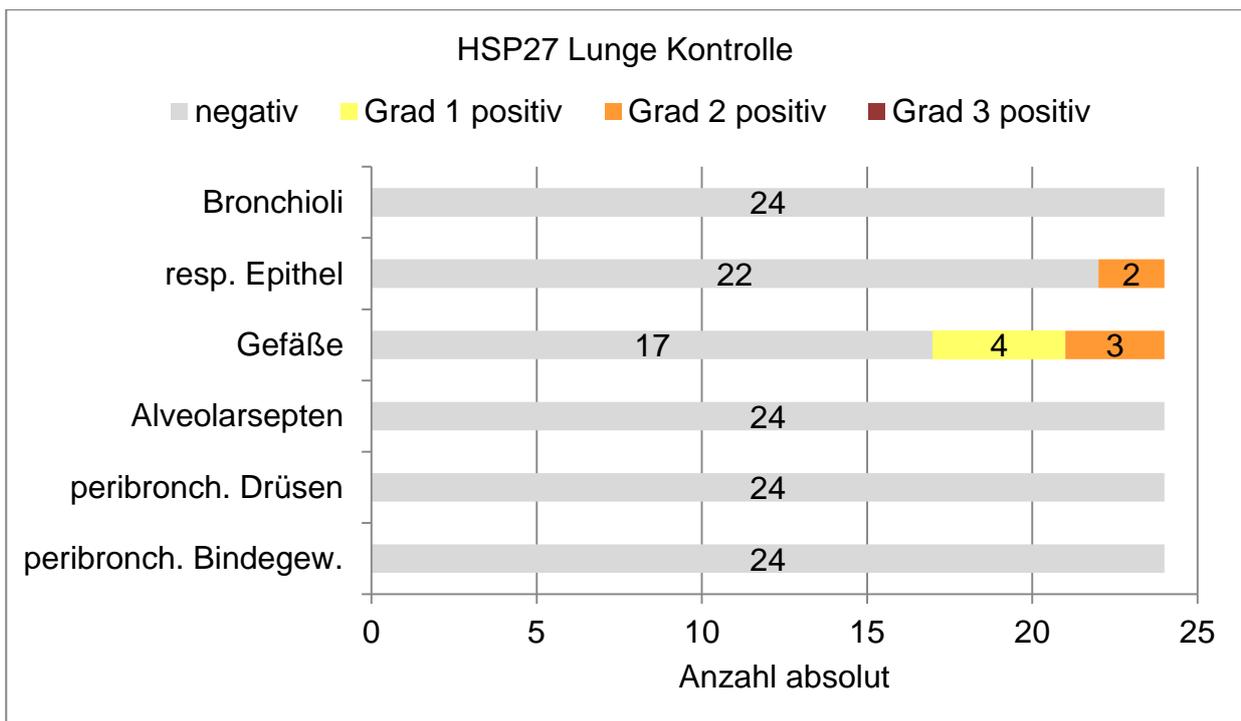


Abb. 20: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 in der Lunge (Kontrollkollektiv)

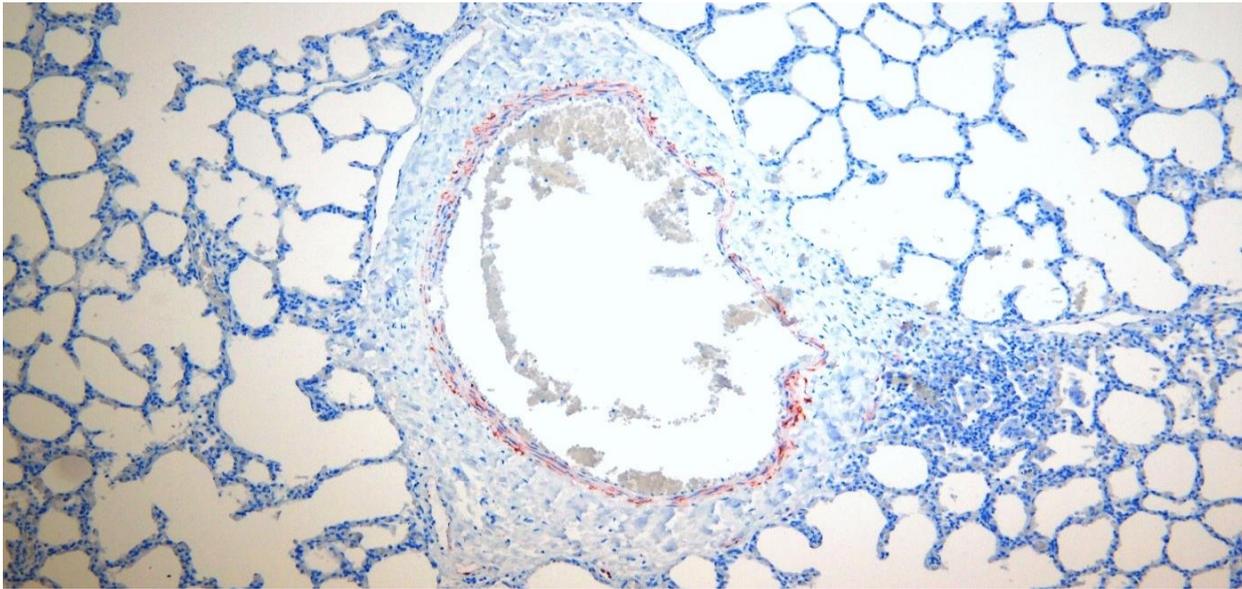


Abb. 21: Kontrollkollektiv, Lunge, Hsp27, 100-fache Vergrößerung - Gefäße Grad 1 positiv

4.3.2.2 Niere

Die Färbung des Nierengewebes zeigte bei der mikroskopischen Untersuchung keinerlei positive Signale in den Zellen der Glomeruli und im Bindegewebe. Das Tubulusepithel zeigte in zwei Fällen (7,7 %) positive Signale entsprechend Grad 1. Die Gefäße waren in einem Fall (3,9 %) positiv gemäß Grad 1 zu werten.

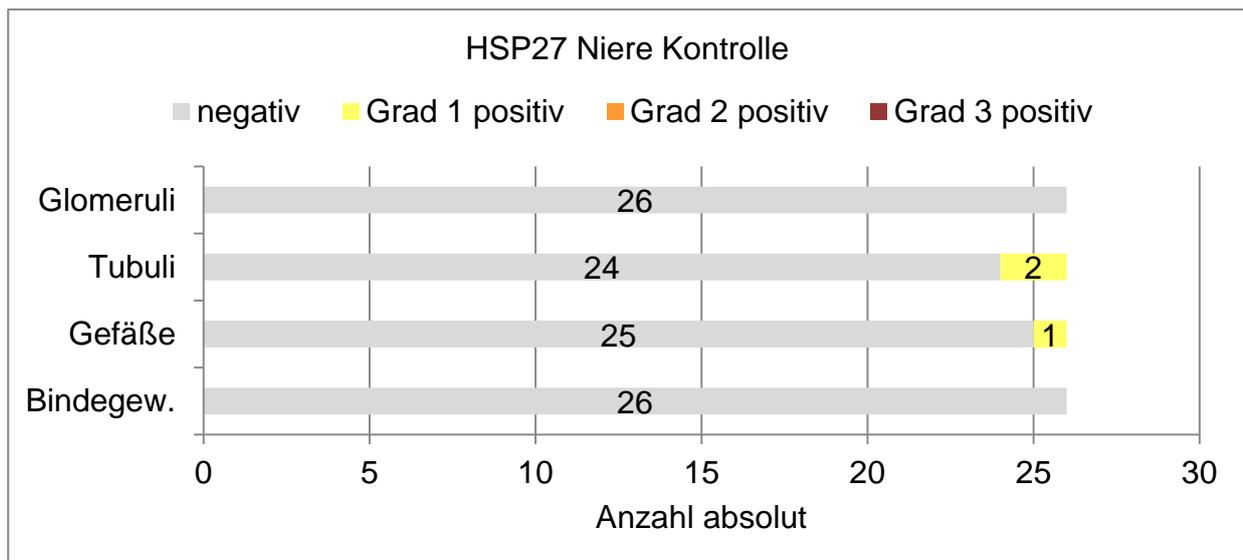


Abb. 22: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 in der Niere (Kontrollkollektiv)

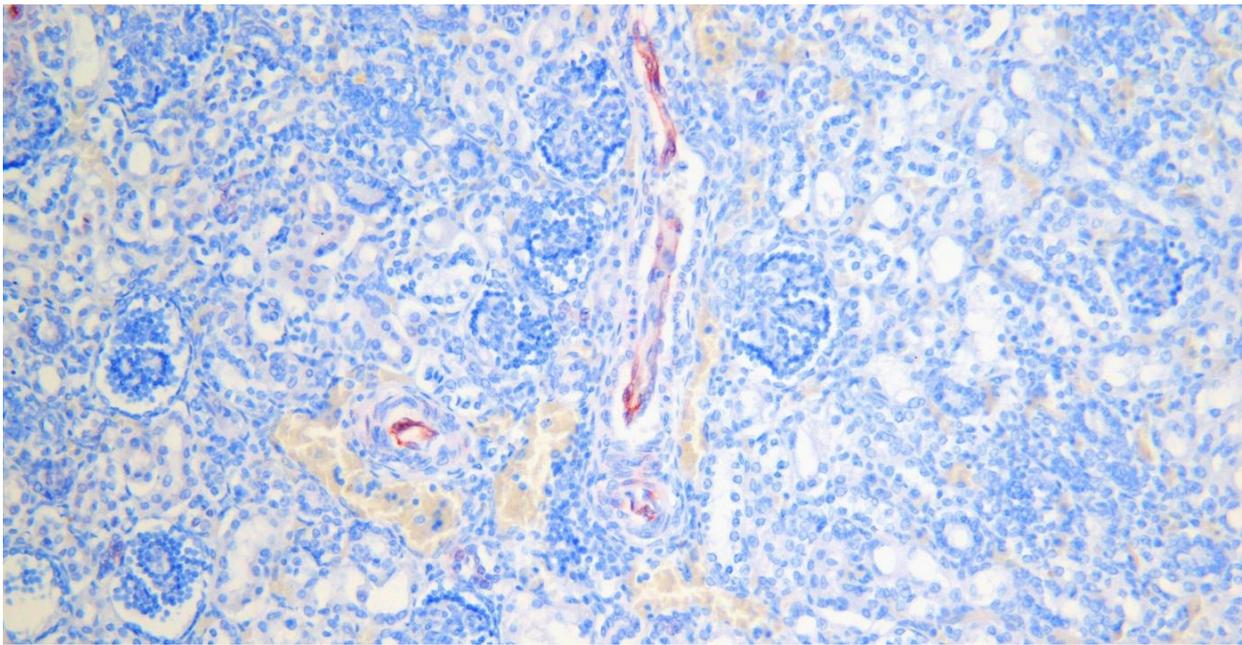


Abb. 23: Kontrollkollektiv, Niere, Hsp27, 200-fache Vergrößerung - Gefäße Grad 1 positiv

4.3.2.3 Herz

Die mikroskopische Untersuchung des Herzgewebes zeigte keine positiven Signale in Myozyten und Fibrozyten. Lediglich in einem Fall (3,9 %) waren in den Gefäßzellen positive Signale gemäß Grad 2 zu beobachten.

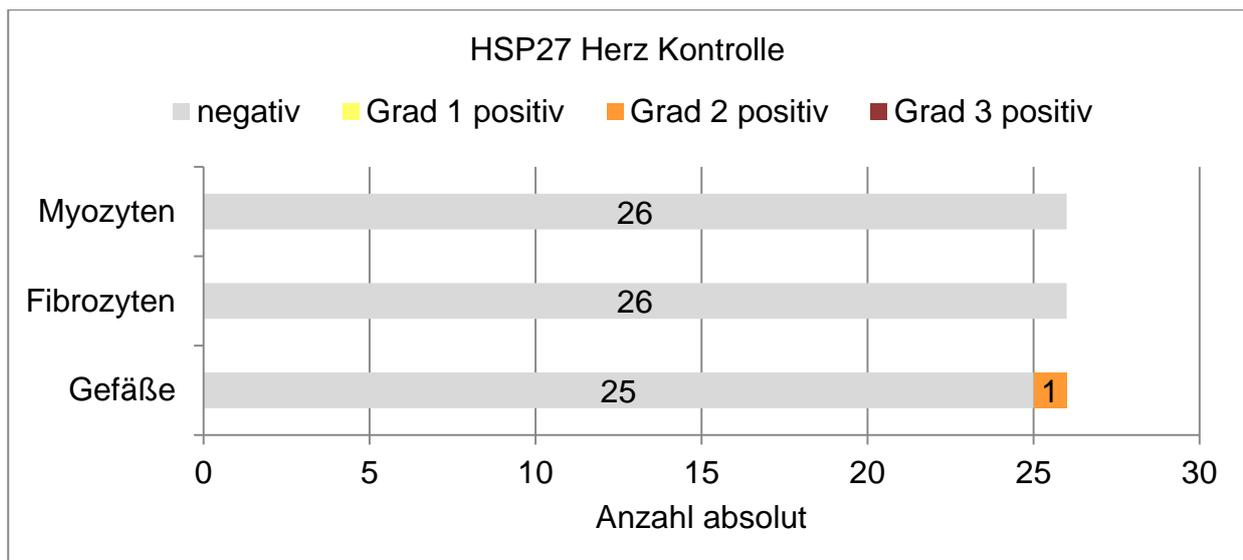


Abb. 24: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 im Herzen (Kontrollkollektiv)

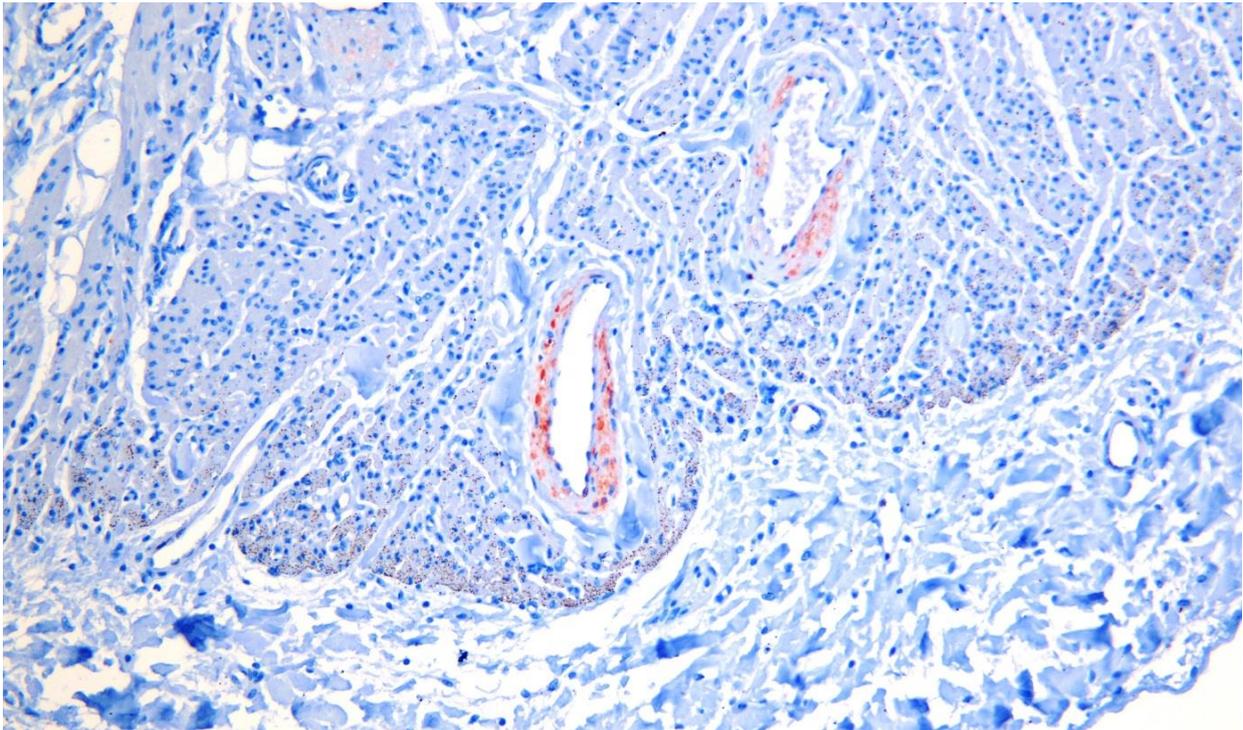


Abb. 25: Kontrollkollektiv, Herz, Hsp27, 200-fache Vergrößerung - Gefäße Grad 2 positiv

4.4 Ergebnisse Hsp70

4.4.1 SIDS-Kollektiv

Für die immunhistochemische Untersuchung stand Lungengewebe in 98 Fällen, Herzgewebe in 102 Fällen und Nierengewebe in 91 Fällen zur Verfügung. Die mikroskopische Auswertung der, in jedem Färbegang mitgeführten, Positiv- und Negativkontrollen zeigte stets unauffällige Ergebnisse. Die Kernfärbung mittels Hämalaun war in allen Fällen ohne Auffälligkeiten.

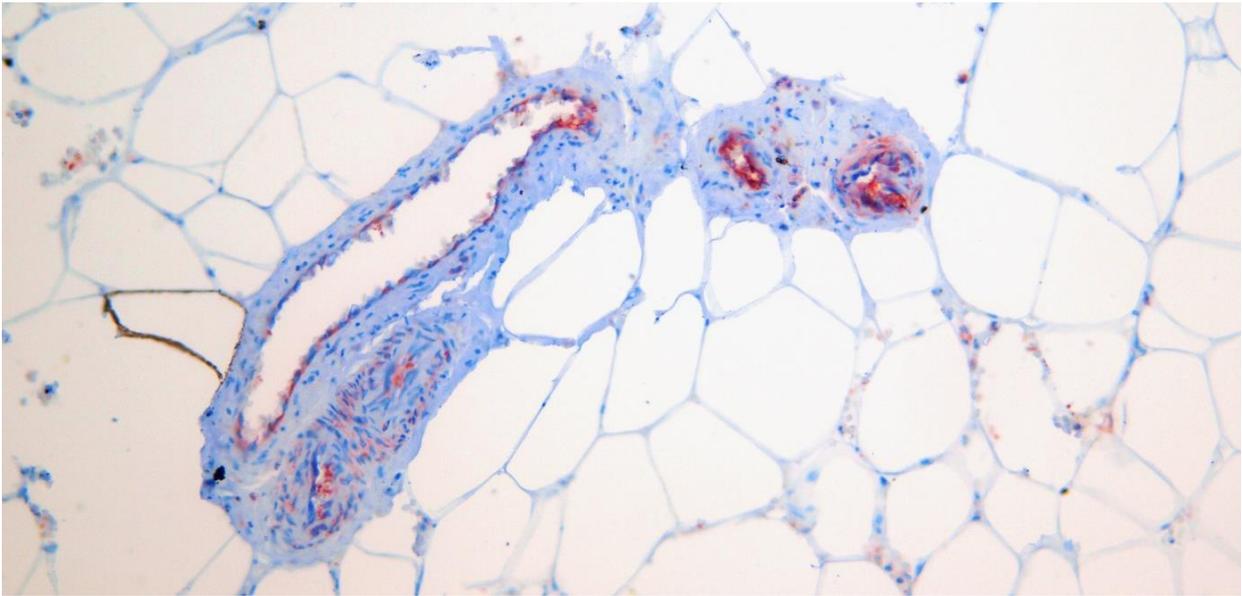


Abb. 26: Positivkontrolle, Unterhautfettgewebe, Hsp70, 200-fache Vergrößerung – Gefäße Grad 2 positiv

Die immunhistochemische Färbung von HSP70 mittels spezifischen Antikörpers zeigte in der mikroskopischen Auswertung in keinem der Präparate positive Signale. Sowohl das Lungen- als auch das Nieren- und Herzgewebe waren zu 100 % negativ im Hinblick auf die Hsp70-Expression.

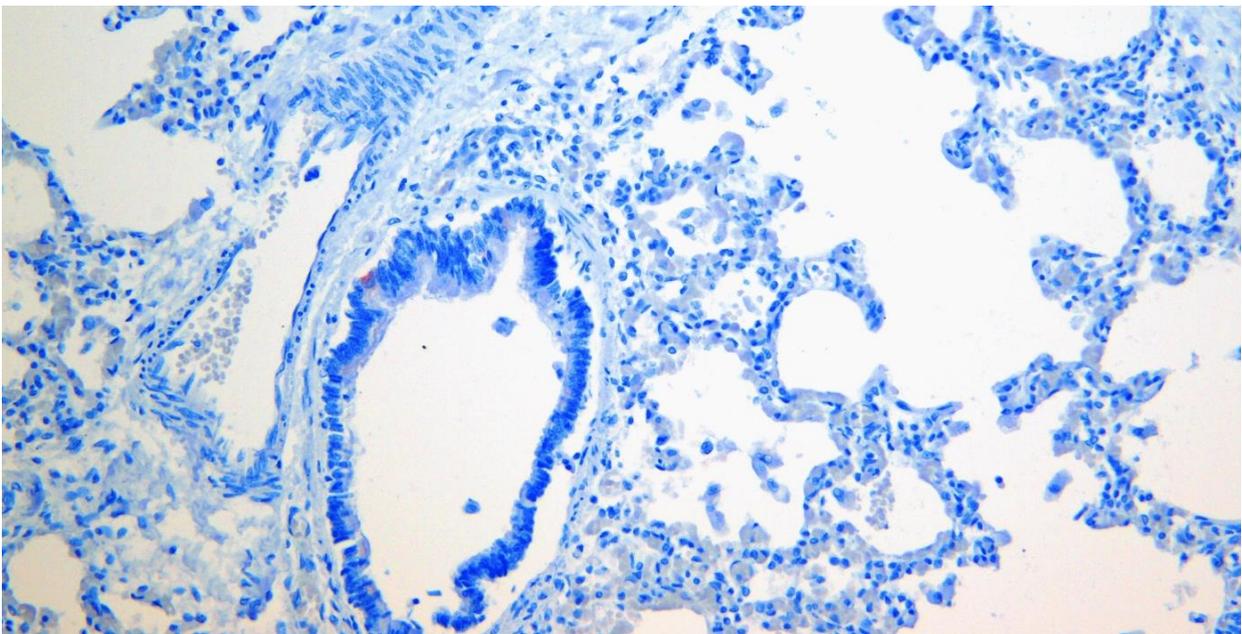


Abb. 27: SIDS-Kollektiv, Lunge, Hsp70, 200-fache Vergrößerung - Alveolarsepten, Gefäße und respiratorisches Epithel Grad 0, keine Anfärbung

4.4.2 Kontrollkollektiv

Für die immunhistochemische Untersuchung stand Lungengewebe in 24 Fällen, Herzgewebe in 26 Fällen und Nierengewebe in 26 Fällen zur Verfügung. Die mikroskopische Auswertung der, in jedem Färbvorgang mitgeführten, Positiv- und Negativkontrollen zeigte stets unauffällige Ergebnisse. Die Kernfärbung mittels Hämalaun war in allen Fällen ohne Auffälligkeiten.

Auch im Kontrollkollektiv konnten keinerlei positive Signale nach der immunhistochemischen Färbung beobachtet werden. Die Präparate waren in ihrer Gesamtheit ebenfalls negativ.

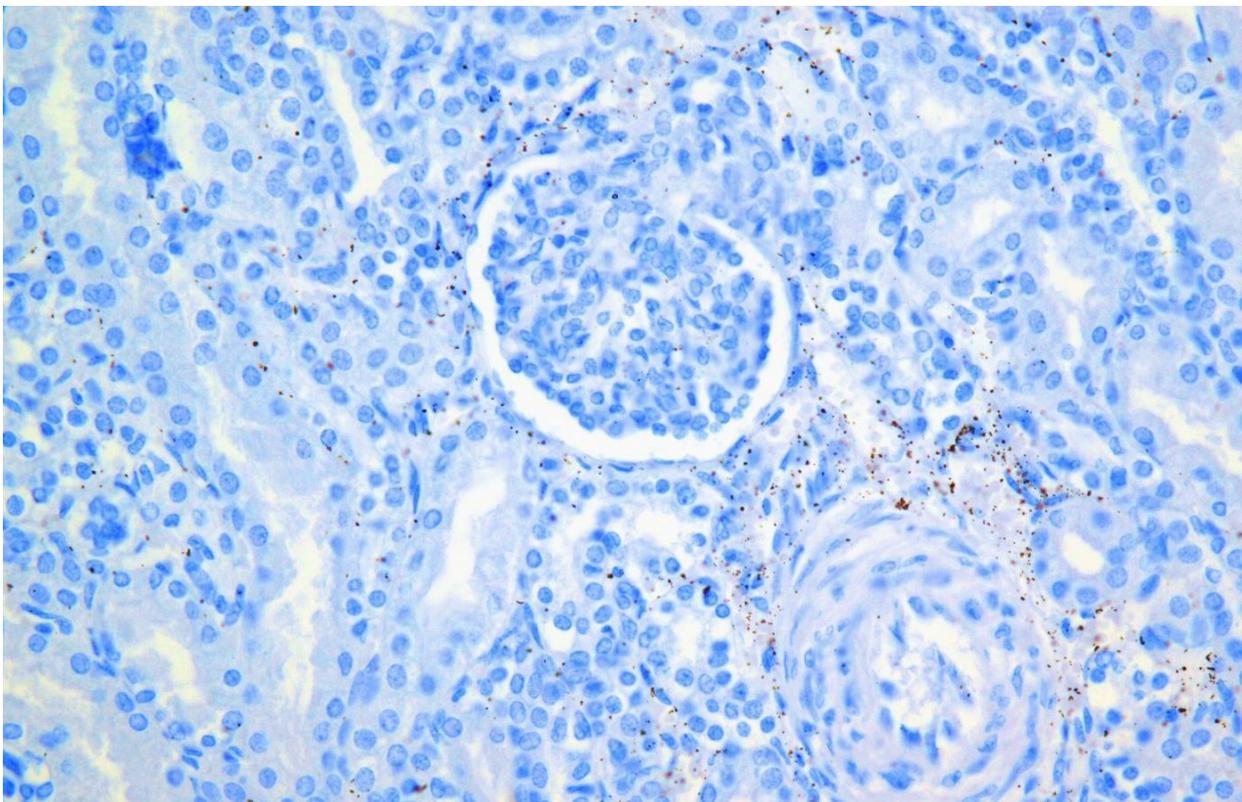


Abb. 28: Kontrollkollektiv, Niere, Hsp70, 400-fache Vergrößerung - Glomeruli, Tubulusepithel und Gefäße Grad 0, kein Anfärbung

5. Diskussion

5.1 Allgemeines

Die Untersuchung der Todesumstände im Rahmen des plötzlichen Säuglingstodes erweist sich als spannendes Forschungsthema und weit gefächertes Gebiet. Zwar ist der Begriff bereits seit 1969 definiert (Beckwith, 1970), die genaue Pathophysiologie des plötzlichen Säuglingstodes ist aber bis heute nicht bekannt. Es existieren unzählige Forschungsarbeiten, die gewisse Gemeinsamkeiten aufweisen und auf Risikofaktoren für den plötzlichen Säuglingstod schließen lassen (Gilbert et al., 2005; Hunt und Hauck, 2006; Li et al., 2003; Ponsonby et al., 1992; Stanton, 1984).

5.2 Geschlecht

Der Anteil der männlichen Individuen an der Gesamtheit der plötzlichen Säuglingstodfälle wird in der Literatur mit durchschnittlich 60 % angegeben (Brooke et al., 1997; Vennemann et al., 2005). Auch in dieser Arbeit liegt der Anteil männlicher Säuglinge am gesamten Studienkollektiv mit 74 von 120 Fällen bei 61,7 %. Somit stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Studie in diesem Punkt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein.

5.3 Alter

Die Altersverteilung des untersuchten Studienkollektivs entspricht ebenfalls in etwa den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen. Es zeigt sich jeweils ein deutliches Maximum der Todesfälle zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat sowie ein Rückgang der Inzidenz nach dem vollendeten sechsten Lebensmonat (Bajanowski und Poets, 2004; Hunt und Hauck, 2006). Als Ursache für das gehäufte Auftreten des plötzlichen Säuglingstodes in den ersten Lebensmonaten wird die Umstellung reifender neuronaler Funktionen nach der Geburt vermutet. Dabei soll es bei der Anpassung an das postnatale Leben zu einer Störung der Atemfunktion kommen, durch die ein „Rettungsmechanismus“, bei Atemaussetzern mit konsekutivem Anstieg des Kohlendioxidwertes im Blut, ausbleibt und somit zu einem letalen Ausgang führt (Kinney und Thach, 2009).

5.4 Jahreszeit

Des Weiteren zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine saisonale Häufung der plötzlichen Säuglingstodesfälle in den Monaten Oktober bis März, entsprechend der kalten Jahreszeit, die auch von anderen Autoren beobachtet wurde (Bajanowski und Poets, 2004; Douglas et al., 1996). Dabei ist unklar, ob diese Häufung mit der höheren Inzidenz an respiratorischen Infekten in den Wintermonaten zusammenhängt oder ob eventuell eine Angst der Eltern vor Unterkühlung des Kindes, bei sinkender Außentemperatur, dazu führt, dass diese wärmer gekleidet und mit dickeren Decken zugedeckt werden. Denn sowohl eine prämortale Hyperthermie, als auch ein vorangegangener Infekt sind häufig erhobene Nebenbefunde bei Fällen des plötzlichen Säuglingstodes (Hunt und Hauck, 2006; Kinney und Thach, 2009), was den Verdacht nahe legt, dass sie zur Pathophysiologie des plötzlichen Säuglingstodes beitragen.

5.5 Liegeposition bei Auffindung

Im Studienkollektiv wurde bei der Auswertung der vorhandenen Unterlagen auch die Liegeposition der Säuglinge bei Auffindung erfasst. In 49 von 120 Fällen (40,8 %) war dabei eine Positionierung des Kindes in Bauchlage beschrieben, während in 27 Fällen (22,5 %) eine Rücken- oder Seitenlage angegeben war. Der Anteil der in Bauchlage aufgefundenen Kinder entspricht damit nicht ganz dem in der Literatur beschriebenen, welcher von 62 % (Vennemann et al., 2009) über 67 % (Ponsonby et al., 1993) bis zu 81 % (Nelson et al., 1989) reicht. Diese Diskrepanz beruht jedoch möglicherweise auf dem hohen Anteil von 37 % der Fälle des Studienkollektivs der vorliegenden Arbeit, in denen den vorliegenden Unterlagen nicht entnommen werden konnte, in welcher Position der Säugling aufgefunden wurde. Zum einen liegt dies in einer unzureichenden Ermittlungsarbeit und Dokumentation aufgrund von Unwissenheit der Polizei begründet, zum anderen kann gelegentlich im Nachhinein tatsächlich nicht mehr mit hinreichender Sicherheit festgestellt werden, in welcher Position der Säugling gefunden wurde. Dieser Umstand ist am ehesten der psychischen Ausnahmesituation geschuldet, in der sich die Betroffenen, allen voran die Eltern, beim Vorfinden eines toten Säuglings befinden.

Um genauere Daten bezüglich der Position des Kindes bei Todeseintritt sammeln zu können, wäre es demzufolge sinnvoll eine thematische Sensibilisierung der Ermittlungs-

behörden anzustreben. Beispielsweise könnte man ein standardisiertes Protokoll zur Erfassung und Ermittlung wichtiger Fakten bei Auffinden eines toten Säuglings etablieren. Im Rahmen dessen wäre dann auch eine routinemäßige Erfassung der Risikofaktoren, wie der Liegeposition des Kindes, möglich.

5.6 Hyperthermie

Bei der Untersuchung der Protokolle, im Hinblick auf die Auffindesituation der plötzlichen Säuglingstodesfälle, zeigte sich leider, dass diese nur in Ausnahmefällen eine detaillierte Beschreibung des Fundortes beinhalten. Darüber hinaus waren in diesen wenigen Fällen nur sehr rudimentäre Hinweise auf eine möglicherweise erhöhte Umgebungstemperatur enthalten. In 80 von 120 Fällen (67 %) fand sich keine detaillierte Beschreibung der Auffindesituation und somit auch kein Hinweis auf eine möglicherweise erhöhte Umgebungstemperatur. Lediglich in 11 Fällen des Studienkollektivs ergaben sich Anhaltspunkte für den möglichen Einfluss erhöhter Umgebungstemperaturen durch vollständiges Bedecken des Kindes mit einem Federbett oder durch die Angabe, dass das Kind in stark verschwitztem Zustand aufgefunden worden war.

Die Körperkerntemperatur zum Zeitpunkt der Auffindung war lediglich in einem einzigen Fall mit 38,8 °C im Protokoll dokumentiert. In 29 Fällen war ein zum Todeszeitpunkt bestehender viraler oder bakterieller Infekt beschrieben, der mit einer erhöhten Körperkerntemperatur einhergehen könnte. Auch hier lässt sich feststellen, dass es für zukünftige tiefgreifende Untersuchungen zum Thema Hyperthermie beim plötzlichen Säuglingstod sinnvoll wäre ein standardisiertes Protokoll einzuführen, in dem die Auffindesituation möglichst detailliert festgehalten wird und bereits am Fundort routinemäßig eine Erfassung der Körperkerntemperatur und der Umgebungstemperatur erfolgt.

Trotz alledem weisen zahlreiche andere Studien darauf hin, dass die Überwärmung als Risikofaktor für den plötzlichen Säuglingstod anzusehen ist. Auffallend häufig fanden sich bei den untersuchten Fällen erhöhte Raumtemperaturen am Schlafplatz, überdurchschnittlich viel Bettzeug mit dem die Kinder zugedeckt worden waren oder Säuglinge, die sehr warm gekleidet waren (Gilbert et al., 1992; Ponsonby et al., 1992; Stanton, 1984).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass unter der Einwirkung erhöhter Temperaturen die Expression von Hitzeschockproteinen in den Zellen induziert wird, um eine temperaturbedingte Schädigung wichtiger zellulärer Strukturen zu verhindern (Kregel, 2002; Lindquist und Craig, 1988). Wu et al. (1993) führten zu diesem Thema eine Untersuchung an Hepatozyten von Ratten durch. Sie erhitzten die Zellen, ausgehend von 37 °C, und erfassten das Ausmaß der Hitzeschockproteinexpression mittels Gelelektrophorese. Es zeigte sich dabei, dass bei einer normalen Körpertemperatur von 37 °C nur eine sehr gering ausgeprägte Expression von Hsp70 zu erkennen war. Unter Hitzeeinwirkung mit konsekutivem Anstieg der Körpertemperatur auf 40 °C erfolgte eine Induktion der Hitzeschockproteinexpression, welche ihr Maximum bei etwa 42,5 °C erreichte. Durch weiteres Erwärmen der Zellen auf 45 °C kamen die direkten zytotoxischen Effekte der Hitze zum Tragen und die Expression von Hsp70 nahm, ebenso wie die Synthese aller anderen Proteine, rapide ab.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei einem Experiment von Multhoff et al. (1995) an normalen humanen Zellen und Tumorzellen. Die verschiedenen Zellreihen wurden im Wasserbad bei Temperaturen zwischen 41,8 °C und 45 °C inkubiert und das Ausmaß der Hitzeschockproteinexpression mittels Durchflusszytometrie mit der Expression unter Normaltemperatur (37 °C) verglichen. Auch in dieser Studie fand sich bei 37 °C bereits eine gering ausgeprägte Expression von Hsp72 und Hsp73 in allen Zellreihen. Nach Erhitzen der Zellkulturen auf 41,8 °C, konnte eine Steigerung der Hitzeschockproteinexpression auf das bis zu 20-fache des Ausgangswertes gemessen werden. Höhere Temperaturen, über 42 °C, führten zu einem Untergang der normalen humanen Zellen.

Doberentz et al. führten 2014 immunhistochemische Untersuchungen von Hsp27 und 70 an verschiedenen Gewebeproben von Brandopfern durch und verglichen die Ergebnisse mit Proben von Leichen, die keiner prä-mortalen Hitzeeinwirkung ausgesetzt waren. Dabei fanden sie eine deutlich erhöhte Expression beider Proteine in den Gewebeproben der Studiengruppe im Verhältnis zur Kontrollgruppe. Allerdings betragen die Temperaturen, denen ein Brandopfer zum Todeszeitpunkt ausgesetzt ist, bis zu mehrere hundert Grad Celsius.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Studie zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Hitzeschockproteinexpression in der Studiengruppe und in der Kontroll-

gruppe und erlauben somit auch keine Objektivierbarkeit des Risikofaktors Hyperthermie im Rahmen der postmortalen Untersuchungen. Bei nähergehender Betrachtung finden sich verschiedene Ansatzpunkte, die als mögliche Ursache für diese Ergebnisse in Betracht kommen.

Aus den oben genannten Studien von Wu et al. (1993) sowie Multhoff et al. (1995) ergibt sich, dass ein Maximum der Hitzeschockproteinexpression bei einer Körperkerntemperatur zwischen 41,8 °C und 42,5 °C erreicht wird, während Hitzeschockproteine bei normalen Körpertemperaturen um 37 °C nur in geringem Maße in den Zellen vorliegen. Es ist somit fraglich, ob diese hohen Körperkerntemperaturen im Falle des plötzlichen Säuglingstodes überhaupt erreicht werden. Insgesamt erweist es sich als schwierig, die Körperkerntemperatur der Säuglinge zum Todeszeitpunkt festzustellen, da diese meist erst Stunden nach Todeseintritt aufgefunden werden und die Temperatur infolgedessen bereits abgesunken sein kann. Die Studien in denen tatsächlich eine Erfassung der Körpertemperatur bei Auffindung erfolgt ist, weisen zwar in vielen Fällen eine Temperatur über 37 °C auf, diese liegt jedoch nur selten über 40 °C. So maßen Sunderland und Emery (1981) bei 10 von 24 plötzlichen Säuglingstodesfällen eine Temperatur über 38 °C und bei 5 Fällen eine Temperatur von über 40 °C. In einer ähnlichen Untersuchung von Stanton (1984) fand sich bei 4 von 15 Säuglingen eine Temperatur über 37 °C und in 2 Fällen eine Temperatur über 40 °C. Das bedeutet, dass eine relative Überwärmung gegebenenfalls zum Eintreten des plötzlichen Säuglingstodes beitragen könnte, auch wenn sich postmortal kein konsekutiver Anstieg der Hitzeschockproteine nachweisen lässt.

Möglicherweise trägt auch die Auswahl der untersuchten Gewebeproben zu den vorliegenden Ergebnissen bei. Es wurden hier Organe gewählt, die sich nach Doberentz et al. (2014) als sensible Organe mit starker Expression nach entsprechendem Stimulus erwiesen. Zwei Arbeiten (Currie und White, 1983; Flanagan et al., 1995) mit ähnlichem Versuchsaufbau brachten, bezüglich der Reaktion verschiedener Organsysteme auf einen Hitzeschock, unterschiedliche Ergebnisse. In beiden Studien wurden Rattenpopulationen einer passiven Hyperthermie ausgesetzt, anschließend getötet und die Gewebe mittels Gelelektrophorese auf die Expression von Hsp70 untersucht. Während Currie und White (1983) eine Akkumulation von Hsp70 in praktisch allen Organen nach einem

Hitzeschock nachwiesen, zeigte sich in der Studie von Flanagan et al. (1995), dass die Organe im Hitzeschock unterschiedlich schnell auf den Stimulus reagieren und mit einer gesteigerten Produktion von Hitzeschockproteinen beginnen. Die Gruppe wies als Folge eines definierten Hitzeschocks eine deutlich erhöhte Expression von Hsp70 in Leber, Niere und Dünndarm nach, während sich in Gehirn und Skelettmuskulatur keine gesteigerte Expression beobachten lies. Es ist also denkbar, dass sich bei einer größeren Auswahl verschiedener Organgewebsproben möglicherweise andere Ergebnisse ergeben hätten. Für zukünftige Studien müsste dementsprechend bei jeder Diagnose „plötzlicher Säuglingstod“ eine Asservierung weiterer Organproben erfolgen.

Ein weiteres Problem bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit kann das Alter der verwendeten Gewebeproben und die prolongierte Dauer der Fixation in Formaldehyd darstellen. Da die Inzidenz des plötzlichen Säuglingstodes in den vergangenen Jahrzehnten deutlich zurückgegangen ist, musste bei der Zusammenstellung des Studienkollektivs auf Fälle bis ins Jahr 1997 zurückgegriffen werden. Dementsprechend lagerten diese Proben zum Teil über 15 Jahre in Formaldehyd oder als Paraffinblock, bevor die immunhistochemische Färbung durchgeführt wurde. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass sowohl die prolongierte Fixation der Organproben in Formaldehyd als auch die Lagerung der bereits als Paraffinblock verarbeiteten Proben zu einem Verlust der Anfärbbarkeit mit immunhistochemischen Verfahren führen kann (Shin et al., 1997; Wester et al., 2000). Bereits nach wenigen Wochen Lagerung wurde eine signifikante Reduktion sowohl im Ausmaß als auch in der Intensität der Anfärbbarkeit nachgewiesen. Auch wenn sich die besagten Studien nicht explizit mit der immunhistochemischen Färbung von Hitzeschockproteinen auseinandergesetzt haben, so lässt sich doch darauf schließen, dass auch in diesem Fall die lange Lagerung zu einem Verlust der Anfärbbarkeit geführt haben könnte. Es ist daher denkbar, dass sich bei entsprechenden Untersuchungen, die zeitnah im Anschluss an die Probengewinnung durchgeführt werden andere Ergebnisse finden als bei dieser retrospektiven Studie.

Andererseits finden sich bei der Literaturrecherche auch Arbeiten, in denen ebenfalls immunhistochemische Färbungen an Hitzeschockproteinen durchgeführt wurden, die auch nach mehreren Jahren Lagerung noch eine deutliche Anfärbbarkeit zeigen

(Doberentz et al., 2014). In diesem Fall hatten jedoch deutlich höhere Umgebungstemperaturen auf die Opfer eingewirkt.

Es bleibt also unklar, ob die Ergebnisse dieser Studie durch die Limitationen der immunhistochemischen Färbung bedingt sind oder tatsächlich darin begründet liegen, dass der Faktor „Hyperthermie“ keine Rolle in der Pathophysiologie des plötzlichen Säuglingstodes spielt. Fest steht, dass die Hypothese, welche die Hyperthermie als Auslöser des plötzlichen Säuglingstodes ansieht, anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht positiv belegt werden kann.

Bezüglich einer weiteren Untersuchung dieser Fragestellung wäre im Grunde nur eine prospektive Studie sinnvoll, bei der detailliertere Informationen über die Auffindsituation, wie vor allem die Bestimmung der Körperkerntemperatur am Auffindeort, gesammelt werden können. Außerdem wäre es in diesem Rahmen möglich die Gewebeproben direkt nach der Entnahme immunhistochemisch zu untersuchen und damit die prolongierte Lagerung in Formaldehyd oder Paraffin zu umgehen. Aufgrund der erfreulicherweise deutlich gesunkenen Inzidenz des plötzlichen Säuglingstodes, wäre jedoch ein entsprechend langer Zeitraum oder eine flächenhafte Ausweitung einer Studie wünschenswert, um ein repräsentatives Kollektiv ansammeln zu können.

6. Zusammenfassung

Der plötzliche Säuglingstod stellt weiterhin die häufigste Todesursache bei scheinbar gesunden Kindern in der Postneonatalperiode dar. Weil sich bis heute kein diagnostischer Marker gefunden hat, der eindeutig mit dem plötzlichen Säuglingstod assoziiert ist und die genaue Pathophysiologie unbekannt ist, handelt es sich um eine reine Ausschlussdiagnose. Da eine prämortale Hyperthermie in der Literatur als Risikofaktor angegeben wird, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich als Korrelat eine gesteigerte Expression von Hitzeschockproteinen in asservierten Gewebeproben nachweisen lässt.

Im Rahmen dieser Studie wurden 120 Fälle mit der Todesursache „plötzlicher Säuglingstod“ mit einem Kontrollkollektiv, bestehend aus 29 nicht natürlichen Todesfällen von Kindern verglichen. Gewebeproben der Organe Lunge, Herz und Niere wurden im Rahmen eines immunhistochemischen Färbeprotokolls mit Antikörpern gegen Hitzeschockprotein 27 und 70 markiert und anschließend mikroskopisch ausgewertet.

Im Hinblick auf die Risikofaktoren für den plötzlichen Säuglingstod zeigt sich in weiten Teilen eine Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Daten in der Literatur. So entsprechen sowohl die Geschlechter- als auch die Altersverteilung den Daten anderer Studien.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Hitzeschockproteinexpression zwischen Studien- und Kontrollkollektiv. Fraglich ist, ob dieses Ergebnis darin begründet liegt, dass eine prämortale Hyperthermie keinen Beitrag zum Eintreten des plötzlichen Säuglingstodes leistet, oder ob der postmortale immunhistochemische Nachweis der Hitzeschockproteinexpression nicht das geeignete Mittel ist, um eine entsprechende Hyperthermie nachzuweisen.

Abschließend konnte festgestellt werden, dass sich basierend auf dieser Studie der postmortale Nachweis von Hitzeschockprotein 27 und 70 weder als Marker für eine prämortale Hyperthermie noch als Marker für die Diagnose „plötzlicher Säuglingstod“ etablieren lässt. Da aber verschiedene Faktoren Einfluss auf die Expression von Hitzeschockproteinen und auf die Anfärbbarkeit im Rahmen der immunhistochemischen Färbung nehmen, schließen die Ergebnisse einen Einfluss der Hyperthermie auf das Eintreten des plötzlichen Säuglingstodes auch nicht aus.

7. Anhang

7.1 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Gewebe:	Schnitte der Organe: Lunge, Niere, Herz
Fixativ:	Formalin (8-10 %)
Einbettung:	Paraffin
Schnittdicke:	ca. 4 µm
Verdünnung Primärantikörper Hsp27:	1:20
Verdünnung Primärantikörper Hsp70:	1:25
Kontrollschnitte:	(+) Positivkontrolle (-1) Negativkontrolle ohne Primärantikörper (-2) Negativkontrolle ohne Sekundärantikörper

7.2 Arbeitsanleitung Immunhistochemie

Entparaffinierung:

- Xylol (20 Min)
- Absteigende Ethanolreihe: 2 x 100 %, 2 x 96 %, 1 x 70 %, 1 x 50 %
- Spülen in frischem TRIS-Puffer (von Dako 1:10 verdünnt)

Vorbehandlung:

- Kochen des Gewebes in vorgewärmtem Citratpuffer pH 6,0 für 30 Min bei 600 Watt in der Mikrowelle
- 20 Min abkühlen lassen
- Spülen in frischem TRIS-Puffer

Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode:

- Schweineserum (1:5 in TRIS-Puffer verdünnt) zum Abblocken der unspezifischen Eiweiße auftropfen
- 20 Min in feuchter Kammer inkubieren
- Schweineserum abkippen
- Primärantikörper (verdünnt in Antibody Diluent von Dako) auftropfen

- Deckglas auflegen
- Inkubation in feuchter Kammer über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank
- Spülen in frischem TRIS-Puffer
- Objektträger um den Schnitt herum abwischen
- Spezifischen Sekundärantikörper (LSAB-Kit Flasche Nr.1) auftropfen
- Deckglas auflegen
- 30 Min in feuchter Kammer inkubieren
- Spülen in frischem TRIS-Puffer
- Blockingreagenz von Dako zum Abblocken der endogenen Peroxidase (enthält 3 % Peroxidase) auftropfen
- 5 Min in feuchter Kammer inkubieren
- 2 x Spülen in frischem TRIS-Puffer
- Objektträger um den Schnitt herum abwischen
- AB-Complex (LSAB-Kit Flasche Nr. 2) auftropfen
- Deckglas auflegen
- 30 Min in feuchter Kammer inkubieren
- Spülen in frischem TRIS-Puffer
- Anfärbung des Antigen-Antikörper-Komplexes mit AEC-Substrat
- Mikroskopische Kontrollen bis zum Erreichen des optimalen Färbeergebnisses
- Spülen in Aqua dest. zum Stoppen der Färbung

Kernfärbung:

- Anfärben der Kerne mit Hämalaun nach Meyer für 20 Sek
- Spülen in Leitungswasser zum bläuen und Stabilisieren der Kernfärbung für 8 Min
- Eindecken mit Aquatex®

Bei jeder Färbereihe wurden jeweils eine Positivkontrolle, sowie zwei Negativkontrollen mitlaufen gelassen und mögliche Fehler zu vermeiden. Als Positivkontrollen wurden Hautschnitte ohne pathologische Veränderungen verwendet. Als Negativkontrollen dienten Schnitte aus dem untersuchten Kollektiv.

7.3 Verwendete Materialien

- Autotechnikon (Firma Shandon, Modell Citadel 1000)
- Brutschrank (Heraeus Instruments, Gerätetyp B12[®])
- Deckgläser (Firma Engelbrecht, 24x32 mm, Stärke 1)
- Feuchte Kammern (Firma KreaTech Diagnostics)
- Mikroskop (Firma Olympus, Gerätetyp BX40)
- Mikrotom (Modell Jung HN 40[®], Firma Leica, Nussloch)
- Mikrowelle (Firma Bosch)
- Objektträger (Histobond[®], Firma Superior, Marienfeld)
- Pipetten und Pipettenspitzen (Firma Eppendorf Research)

7.4 Verwendete Substanzen

- AEC-Substrat
Firma Dako Nr.K3464: AEC Substrate Chromogen Ready-to-use
- Antibody-Diluent
Firma Dako Nr.S3022: Antibody Diluent with Background Reducing Components
- Aqua dest.
- Aquatex[®]
Firma Merck Nr.1.08562.0050: Aquatex[®]
- Blockingreagenz
Firma Dako REAL Nr.S2023: Peroxidase-Blocking-Solution
- Citratpuffer
Firma Dako Cytomation Nr.S2369: Target Retrieval Solution Citrate pH 6 (x10)
Im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt
- Ethanol
Firma Roth Nr.5054.3: Ethanol $\geq 99,5$ %
Als Ausgangssubstanz für sämtliche Alkohole bzw. Verdünnungen
- Formalin
- Hämaun
FirmaDako Nr.S3309: Mayer's Hematoxylin (Lillies Modification) Histological Staining Reagent

- Paraffin
Firma McCormick Scientific Nr.39502004: Paraplast Plus
- Primärantikörper
Firma Novocastra: Monoclonale Mouse Antibody Hsp27 (NCL-HSP27) sowie
Monoclonale Mouse Antibody Hsp70 (NCL-HSP70)
- Schweineserum
Firma Dako Nr.X0901: Swine Serum normal
- TRIS-Puffer
Firma Dako Nr.S3306: TBST Tris Buffered Saline with Tween 20 (10x Concentrate)
Im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt
- Universal Kit: Dako Nr. K0675, LSAB2 System-HRP-Kit, bestehend aus:
 - Sekundärantikörper (Biotinylated Link), Flasche 1
 - AB-Complex (Streptavidin-HRP), Flasche 2
- Xylol
Firma AppliChem Nr.UN1307: Xylol-Isomerengemisch zur Analyse

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1: Säuglingssterbefälle zwischen dem 8. und 364. Lebenstag je 100.000 Lebendgeborene in Deutschland im Jahr 2012 unter Angabe der Todesursache nach ICD-10	13
Abb. 2: Schematische Darstellung der Hypothese des „ <i>fatal triangle</i> “ beim plötzlichen Säuglingstod	20
Abb. 3: Schematische Darstellung der Labeled-Streptavidin-Biotin (LSAB) Methode	28
Abb. 4: Herz, Hsp70, 200-fache Vergrößerung – Myozyten Grad 0, keine Anfärbung	36
Abb. 5: Niere, Hsp27, 200-fache Vergrößerung – Tubuli Grad 1 positiv	36
Abb. 6: Lunge, Hsp27, 200-fache Vergrößerung – respiratorisches Epithel Grad 2 positiv	37
Abb. 7: Positivkontrolle, Unterhautfettgewebe, Hsp27, 200-fache Vergrößerung – Gefäße Grad 3 positiv	37
Abb. 8: Anzahl der obduzierten SIDS-Fälle pro Jahr (1997-2013) am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn	38
Abb. 9: Verteilung der 120 obduzierten SIDS-Fälle entsprechend der Jahreszeit, dargestellt als Anzahl der Fälle bezogen auf den jeweiligen Monat	38
Abb. 10: Altersverteilung des gesamten Studienkollektivs zum Zeitpunkt des Todes, dargestellt in Monaten	39
Abb. 11: Altersverteilung der 46 weiblichen SIDS-Opfer zum Zeitpunkt des Todes, dargestellt in Monaten	39
Abb. 12: Altersverteilung der 74 männlichen SIDS-Opfer zum Zeitpunkt des Todes, dargestellt in Monaten	40
Abb. 13: Altersverteilung des Kontrollkollektivs zum Zeitpunkt des Todes, dargestellt in Jahren	41
Abb. 14: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 in der Lunge (SIDS-Kollektiv)	42

Abb. 15: SIDS-Kollektiv, Lunge, Hsp27, 100-fache Vergrößerung – respiratorisches Epithel Grad 2 positiv, Gefäße Grad 3 positiv	42
Abb. 16: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 in der Niere (SIDS-Kollektiv).....	43
Abb. 17: SIDS-Kollektiv, Niere, Hsp27, 400-fache Vergrößerung - Glomeruli und Tubuli Grad 0, keine Anfärbung	43
Abb. 18: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 im Herzen (SIDS-Kollektiv).....	44
Abb. 19: SIDS-Kollektiv, Herz, Hsp27, 200-fache Vergrößerung - Myozyten und Gefäße Grad 0, keine Anfärbung	44
Abb. 20: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 in der Lunge (Kontrollkollektiv).....	45
Abb. 21: Kontrollkollektiv, Lunge, Hsp27, 100-fache Vergrößerung - Gefäße Grad 1 positiv	46
Abb. 22: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 in der Niere (Kontrollkollektiv).....	46
Abb. 23: Kontrollkollektiv, Niere, Hsp27, 200-fache Vergrößerung - Gefäße Grad 1 positiv	47
Abb. 24: Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung einzelner zellulärer Strukturen in der immunhistochemischen Färbung von Hsp27 im Herzen (Kontrollkollektiv).....	47
Abb. 25: Kontrollkollektiv, Herz, Hsp27, 200-fache Vergrößerung - Gefäße Grad 2 positiv	48
Abb. 26: Positivkontrolle, Unterhautfettgewebe, Hsp70, 200-fache Vergrößerung – Gefäße Grad 2 positiv	49
Abb. 27: SIDS-Kollektiv, Lunge, Hsp70, 200-fache Vergrößerung - Alveolarsepten, Gefäße und respiratorisches Epithel Grad 0, keine Anfärbung	49
Abb. 28: Kontrollkollektiv, Niere, Hsp70, 400-fache Vergrößerung - Glomeruli, Tubulusepithel und Gefäße Grad 0, kein Anfärbung	50

Tabellen

Tab. 1: Einteilung der SIDS-Fälle in Untergruppen gemäß der San Diego Klassifikation anhand von Informationen zu Krankengeschichte, Todesumständen und Autopsieergebnissen	10
Tab. 2: Maternale und kindliche Risikofaktoren für den plötzlichen Säuglingstod.....	15
Tab. 3: Einteilung der verschiedenen Hitzeschockproteinklassen entsprechend ihrer Hauptfunktion und Lokalisation in der Zelle	25
Tab. 4: Überblick der wichtigsten veröffentlichten Forschungsarbeiten zum Thema plötzlicher Säuglingstod und Hyperthermie mit Angabe von Untersuchungsmethoden, Fallzahlen und Ergebnissen	29
Tab. 5: Auflistung der Fälle des Kontrollkollektivs entsprechend der Todesursache.....	32
Tab. 6: Gradeinteilung der mikroskopischen Auswertung nach der Intensität der Farbreaktion und dem prozentualen Anteil der angefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl.....	35
Tab. 7: Auflistung der zellulären Strukturen, die im Rahmen dieser Arbeit mikroskopisch ausgewertet wurden	35

9. Literaturverzeichnis

Ackerman MJ, Siu BL, Sturner WQ, Tester DJ, Valdivia CR, Makielski JC, Towbin JA. Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *JAMA* 2001; 286: 2264-2269

Agashe VR, Hartl FU. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 15-25

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie der Zelle* 5. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH, 2011

Althoff, H. *Der plötzliche und unerwartete Tod von Säuglingen und Kleinkindern*. Stuttgart: Fischer, 1973

Alvarez-Lafuente R, Aguilera B, Suárez-Mier MA, Morentin B, Vallejo G, Gómez J, Fernández-Rodríguez A. Detection of human herpesvirus-6, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in formalin-fixed tissues from sudden infant death: a study with quantitative real-time PCR. *Forensic Sci Int* 2008; 178: 106-111

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 RL, Herman TS, van Kersen I, Hahn GM. Thermotolerance and heat shock protein induction by slow rates of heating. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 15: 717-725

Bajanowski T, Brinkmann B, Vennemann M. The San Diego definition of SIDS: practical application and comparison with the GeSID classification. *Int J Legal Med* 2006;120: 331-336

Bajanowski T, Poets C. *Der plötzliche Säuglingstod: Epidemiologie, Ätiologie, Pathophysiologie und Differenzialdiagnostik*. *Dtsch Arztebl* 2004; 101: A3185-A3190

Beck FX, Neuhofer W, Müller E. Molecular chaperones in the kidney: distribution, putative roles, and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F203-F215

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

Behlke J, Lutsch G, Gaestel M, Bielka H. Supramolecular structure of the recombinant murine small heat shock protein hsp25. FEBS Lett 1991; 288: 119-122

Beissinger M, Buchner J. How chaperones fold proteins. Biol Chem 1998; 379: 245-259

Brooke H, Gibson A, Tappin D, Brown H. Case-control study of sudden infant death syndrome in Scotland, 1992–5. BMJ 1997; 314: 1516-1520

Byard RW. Sudden infant death syndrome. In: Byard RW, Hrsg. Sudden death in the young. 3rd Edition. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, Sao Paulo, Delhi, Dubai, Tokio, Mexico City: Cambridge University Press, 2010: 555-630

Chirico WJ, Waters MG, Blobel G. 70 K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. Nature 1988; 332: 805-810

Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc Soc Exp Biol Med 1941; 47: 200-202

Coons AH, Leduc EH, Connolly JM. Studies on antibody production. I: A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. J Exp Med 1955; 102: 49-60

Courts C, Grabmüller M, Madea B. Functional single-nucleotide variant of HSPD1 in sudden infant death syndrome. Pediatr Res 2013; 74: 380-383

Courts C, Madea B. Genetics of the sudden infant death syndrome. Forensic Sci Int 2010; 203: 25-33

Currie RW, White FP. Characterization of the synthesis and accumulation of a 71-kilodalton protein induced in rat tissues after hyperthermia. Can J Biochem Cell Biol 1983; 61: 438-446

Daniels CJ, McKee AH, Doolittle WF. Archaeobacterial heat shock proteins. *EMBO J* 1984; 3: 745-749

Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 2007; 581: 3702-3710

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

Doberentz E, Albalooshi Y, Madea B. Immunohistochemische Untersuchungen an Lungengewebe in Fällen des Plötzlichen Kindstodes. *Arch Kriminol* 2016; 237: 47-60

Doberentz E, Gennepfer L, Böker D, Lignitz E, Madea B. Expression of heat shock proteins (hsp) 27 and 70 in various organ systems in cases of death due to fire. *Int J Legal Med* 2014; 128: 967-978

Douglas AS, Allen TM, Helmes PJ. Seasonality and the sudden infant death syndrome during 1987–1989 and 1991–1993 in Australia and Britain. *BMJ* 1996; 312: 1381–1383

Ferris JAJ, Aherne WA, Locke WS, Mc Quillin J, Gardner PS. Sudden and Unexpected Deaths in Infants: Histology and Virology. *Br Med J* 1973; 2: 439-442

Flanagan SW, Ryan AJ, Gisolfi CV, Moseley PL. Tissue-specific HSP70 response in animals undergoing heat stress. *Am J Physiol* 1995; 268: R28-R32

Fleming PJ, Gilbert RE, Azaz Y, Berry PJ, Rudd PT, Stewart A, Hall E. The interaction between bedding and sleeping position in sudden infant death syndrome: a population-based case-control study. *Br Med J* 1990; 301: 85-89

Filiano JJ, Kinney HC. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonate* 1994; 65: 194-197

Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2014: Lebendgeborene, Totgeborene, Gestorbene und Saldo der Lebendgeborenen und Gestorbenen. https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_PROC?_XWD_2/2/XWD_CUBE.DRILL/_XWD_30/D.000/3727 (Zugriffsdatum: 13.10.2014)

Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2014: Säuglingssterbefälle ab 1998. https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_PROC?_XWD_318/3/XWD_CUBE.DRILL/_XWD_346/D.000/3727 (Zugriffsdatum: 13.10.2014)

Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2014: Säuglingssterbefälle, Säuglingssterbefälle je 1.000 Lebendgeborene und durchschnittliches Sterbealter. https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_PROC?_XWD_552/2/XWD_CUBE.DRILL/_XWD_580/D.000/3722 (Zugriffsdatum: 13.10.2014)

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

Gilbert R, Salanti G, Harden M, See S. Infant sleeping position and the sudden infant death syndrome: systematic review of observational studies and historical review of recommendations from 1940 to 2002. *Int J Epidemiol* 2005; 34: 874-887

Guntheroth WG, Spiers PS. The Triple Risk Hypotheses in Sudden Infant Death Syndrome. *Pediatrics* 2002; 110: e64

Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381: 571-580

Haslbeck M, Braun N, Stromer T, Richter B, Model N, Weinkauff S, Buchner J. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 2004; 23: 638-649

Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 842-846

Hayes SA, Dice JF. Roles of molecular chaperones in protein degradation. *J Cell Biol* 1996; 132: 255-258

Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 349-384

Hofmann S, Jaksch M, Bezold R, Mertens S, Aholt S, Paprotta A, Gerbitz KD. Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1835-1846

Hunt CE, Brouillette RT. Sudden infant death syndrome: 1987 perspective. *J Pediatr* 1987; 110: 669-678

Hunt CE, Hauck FR. Sudden Infant Death Syndrome. *CMAJ* 2006; 174: 1861-1869

Isomoto H, Oka M, Yano Y, Kanazawa Y, Soda H, Terada R, Yasutake T, Nakayama T, Shikuwa S, Takeshima F, Uono H, Murata I, Ohtsuka K, Kohno S. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; 198: 219-228

Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 1993; 268: 1517-1520

Jmor F, Kalirai H, Taktak A, Damato B, Coupland SE. HSP-27 protein expression in uveal melanoma: correlation with predicted survival. *Acta Ophthalmol* 2012; 90: 534-539

Jorch G, Schmidt-Troschke S, Bajanowski T, Heinecke A, Findeisen M, Nowak C, Rabe G, Freisleder A, Brinkmann B. Epidemiologische Risikofaktoren des plötzlichen Kindstods. *Monatschr Kinderheilk* 1994; 142: 45-51

Kahraman L, Thach BT. Inhibitory effects of hyperthermia on mechanisms involved in autoresuscitation from hypoxic apnea in mice: a model for thermal stress causing SIDS. *J Appl Physiol* 2004; 97: 669-674

Katschinski DM. On heat and cells and proteins. *News Physiol Sci* 2004; 19: 11-15

Kinney HC, Filiano JJ, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, White WF. Decreased muscarinic receptor binding in the arcuate nucleus in sudden infant death syndrome. *Science* 1995; 269: 1446-1450

Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall RA, Nattie EE. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 517-550

Kinney HC, Thach BT. The Sudden Infant Death Syndrome. *N Engl J Med* 2009; 361: 795-805

Kleemann WJ, Bajanowski T. Plötzlicher Tod im Säuglings- und Kindesalter. In: Brinkmann B, Madea B, Hrsg. *Handbuch gerichtliche Medizin*. Band 1. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2004: 1071-1128

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

Knowlton AA, Brecher P, Apstein CS. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. *J Clin Invest* 1991; 87: 139-147

Kopp N, Chigr F, Denoroy L, Gilly R, Jordan D. Absence of adrenergic neurons in nucleus tractus solitarius in sudden infant death syndrome. *Neuropediatrics* 1993; 24: 25-29

Kregel KC. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 2002; 92: 2177-2186

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

Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 1978; 275: 416-420

Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J* 1997; 16: 659-671

Li DK, Petitti DB, Willinger M, McMahon R, Odouli R, Vu H, Hoffman HJ. Infant Sleeping Position and the Risk of Sudden Infant Death Syndrome in California, 1997-2000. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 446-455

Liang P, MacRae TH. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci* 1997; 110: 1431-1440

Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-637

Madden LA, Sandström ME, Lovell RJ, McNaughton L. Inducible heat shock protein 70 and its role in preconditioning and exercise. *Amino Acids* 2008; 34: 511-516

Madea B, Drexler JF. Virusätiologie des Sudden Infant Death Syndroms. In: Darai G, Handermann M, Sonntag HG, Zöller L, Hrsg. *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. 4. Auflage.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2012: 931-962

McGarvey C, McDonnell M, Hamilton K, O'Regan M, Matthews T. An 8 year study of risk factors for SIDS: bed-sharing versus non-bed-sharing. *Arch Dis Child* 2006; 91: 318-323

Milićević ZT, Petković MZ, Drndarević NC, Pavlović MD, Todorović VN. Expression of heat shock protein 70 (HSP70) in patients with colorectal adenocarcinoma--immunohistochemistry and Western blot analysis. *Neoplasma*. 2007; 54: 37-45

Millat G, Kugener B, Chevalier P, Chahine M, Huang H, Malicier D, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R. Contribution of long-QT syndrome genetic variants in sudden infant death syndrome. *Pediatr Cardiol* 2009; 30: 502-509

Mitchell EA, Tuohy PG, Brunt JM, Thompson JM, Clements MS, Stewart AW, Ford RP, Taylor BJ. Risk Factors for Sudden Infant Death Syndrome Following the Prevention Campaign in New Zealand: A Prospective Study. *Pediatrics* 1997; 100: 835-840

Morimoto RI. Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993; 259: 1409-1410

Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Müller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD. A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer* 1995; 61: 272-279

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

Opdal SH, Vege A, Rognum TO. Serotonin transporter gene variation in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 2008; 97: 861-865

Ozawa Y, Takashima S. Developmental neurotransmitter pathology in the brainstem of sudden infant death syndrome: a review and sleep position. *Forensic Sci Int* 2002; 130 Suppl: 53-59

Panigrahy A, Filiano JJ, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, Krous HF, Rava LA, White WF, Kinney HC. Decreased kainate receptor binding in the arcuate nucleus of the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 1253-1261

Patel B, Khaliq A, Jarvis-Evans J, Boulton M, Arrol S, Mackness M, McLeod D. Hypoxia induces HSP 70 gene expression in human hepatoma (HEP G2) cells. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 36: 907-912

Pfeifer K. Bedeutung der Rektaltemperaturmessung und der Umgebungsuntersuchungen beim plötzlichen Kindestod. *Dtsch Med Wochenschr* 1980; 105: 1065

Ponsonby AL, Dwyer T, Gibbons LE, Cochrane JA, Jones ME, McCall MJ. Thermal environment and sudden infant death syndrome: case-control study. *BMJ* 1992; 304: 277-282

Ponsonby AL, Dwyer T, Gibbons LE, Cochrane JA, Wang YG. Factors potentiating the risk of sudden infant death syndrome associated with the prone position. *N Engl J Med* 1993; 329: 377-382

Preuss J, Dettmeyer R, Poster S, Lignitz E, Madea B. The expression of heat shock protein 70 in kidneys in cases of death due to hypothermia. *Forensic Sci Int* 2008; 176: 248-252

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42: 405-426

Renshaw S. Immunochemical staining techniques. In: Renshaw S ed. *Immunohistochemistry: Methods express*. Bloxham: Scion Publishing Ltd 2006: 45-96

Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18: 571-573

Rognum TO, Saugstad OD. Biochemical and immunological studies in SIDS victims. Clues to the understanding of the death mechanism. *Acta Paediatr* 1993; Suppl. 389: 82-85

Saternus KS. Plötzlicher Kindstod. In: Madea B ed. *Praxis Rechtsmedizin*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2007: 252-256

Schlaud M, Eberhard C, Trumann B, Kleemann WJ, Poets CF, Tietze KW, Schwartz FW. Prevalence and Determinants of Prone Sleeping Position in Infants: Results from Two Cross-Sectional Studies on Risk Factors for SIDS in Germany. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 51-57

Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000; 343: 262-267

Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A, Austoni P, Bosi G, Giorgetti R, Grancini F, Marni ED, Perticone F, Rosti D, Salice P. Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 1998; 338: 1709-1714

Serdarevich C, Fewell JE. Influence of core temperature on autoresuscitation during repeated exposure to hypoxia in normal rat pups. *J Appl Physiol* 1999; 87: 1346-1353

Shin HJ, Kalapurakal SK, Lee JJ, Ro JY, Hong WK, Lee JS. Comparison of p53 immunoreactivity in fresh-cut versus stored slides with and without microwave heating. *Mod Pathol* 1997; 10: 224-230

Stanton AN. Sudden Infant Death. Overheating and Cot Death. *Lancet* 1984; 2: 1199-1201

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

Sunderland R, Emery JL. Febrile convulsions and cot death. *Lancet* 1981; 318: 176-178

Thrane PS, Rognum TO, Brandtzaeg P. Upregulated epithelial expression of HLA-DR and secretory component in salivary glands: reflection of mucosal immunostimulation in sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 1994; 35: 625-628

Tozawa-Ono A, Yoshida A, Yokomachi N, Handa R, Koizumi H, Kiguchi K, Ishizuka B, Suzuki N. Heat shock protein 27 and p16 immunohistochemistry in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Hum Cell* 2012; 25: 24-28

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

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

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

Vennemann MM, Bajanowski T, Brinkmann B, Jorch G, Sauerland C, Mitchell EA. Sleep environment risk factors for sudden infant death syndrome: the German Sudden Infant Death Syndrome Study. *Pediatrics* 2009; 123: 1162-1170

Vennemann MM, Findeisen M, Butterfaß-Bahloul T, Jorch G, Brinkmann B, Köpcke W, Bajanowski T, Mitchell EA. Modifiable risk factors for SIDS in Germany: Results of GeSID. *Acta Paediatr* 2005; 94: 655-660

Wedgwood RJ. Review of USA experience. In: Camps FE, Carpenter RG, Hrsg. *Sudden and Unexpected Death in Infancy (Cot Deaths)*. Bristol, England: Wright, 1972: 28

Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, Marazita ML. Sudden infant death syndrome: association with a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. *Am J Med Genet A* 2003; 117A: 268-274

Werne J, Garrow I. Sudden, apparently unexplained death during infancy: I. Pathological findings in infants found dead. *Am J Pathol* 1953; 29: 633-675

Wester K, Wahlund E, Sundström C, Ranefall P, Bengtsson E, Russell PJ, Ow KT, Malmström PU, Busch C. Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8: 61-70

Wigfield R, Fleming PJ. The prevalence of risk factors for SIDS: impact of an intervention campaign. In: Rognum TO, ed. *Sudden infant death syndrome: new trends in the nineties*. Oslo: Scandinavian University Press, 1995: 124-128

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

Wu B, Gu MJ, Heydari AR, Richardson A. The Effect of Age on the Synthesis of Two Heat Shock Proteins in the HSP70 Family. *J Gerontol* 1993; 48: B50-B56

Zink P, Drescher J, Verhagen W, Flik J, Milbradt H. Serological evidence of recent influenza virus A (H 3 N 2) infections in forensic cases of the sudden infant death syndrome (SIDS). *Arch Virol* 1987; 93: 223-232

10. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Madea, dafür dass er mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit zu diesem interessanten Thema, unter seiner Leitung am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn durchzuführen.

Frau Dr. med. Elke Doberentz danke ich für die tatkräftige und engagierte Unterstützung als meine Betreuerin, sie hat mir immer hilfreich zu Seite gestanden und mich bei der Fertigstellung der Arbeit mit gutem Rat begleitet.

Ich danke außerdem dem Zweitkorrektor für das Interesse an dieser Arbeit sowie für die Zeit und Geduld, die für die Korrektur derselben nötig waren.

Vielen Dank auch an Herrn Dirk Böker, der mir bei allen praktischen Arbeiten in der Immunhistochemie mit viel Geduld beigestanden hat und bei Fragen immer ein offenes Ohr und eine hilfreiche Antwort für mich hatte.

Ich danke Frau Dr. med. Luzia Genneper, die mit ihrer Doktorarbeit „Expression von Hitzeschockprotein (Hsp) 27 und 70 in verschiedenen Organsystemen beim humanen Tod durch/nach Brandeinwirkung“ jenes Färbeprotokoll etabliert hat, welches auch ich in meiner Arbeit verwendet habe. Auch sie konnte mir bei einigen Fragen hilfreich zur Seite stehen.

Zu guter Letzt gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern Petra Führung und Dr. med. Martin Führung, sowie meiner Schwester Lisa Führung. Sie haben mir auch in schwierigen Zeiten immer beigestanden und mir stets neue Motivation gegeben.