

Erstellung und Neuroanatomische Validierung
eines IVETF-angelehnten Protokolls zur
Systematischen Sektion von Equidenhirnen zu neurowissenschaftlichen und
diagnostischen Zwecken

von Maya-Lena Bitschi

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstellung und Neuroanatomische Validierung
eines IVETF-angelehnten Protokolls zur
Systematischen Sektion von Equidenhirnen zu neurowissenschaftlichen und
diagnostischen Zwecken

von Maya-Lena Bitschi
aus Feldkirch
München 2021

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Tierpathologie
Klinische und vergleichende Neuropathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Johann Maierl
Univ.-Prof. Dr. Joris Peters
Prof. Dr. Andrea Fischer
Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

*Meiner Mutter (†),
meiner Familie und
meinen Freunden
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet*

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Literaturgeschichte der Pferdeneurologie	3
2.	Epidemiologischer Überblick und Relevanz neurologischer Krankheiten in der Pferdemedizin	6
2.1.	Neurologische Erkrankungen als Todesursache	6
2.2.	Problematik neurologischer Erkrankungen.....	7
2.3.	Ätiologischer Überblick neurologischer Erkrankungen des Pferdes	8
2.4.	Epidemiologische Unterschiede neurologischer Erkrankungen	10
3.	Neuroanatomische Fingerprints equiner ZNS-Erkrankungen	13
4.	Derzeitige Verfügbarkeit dezidierter Sektionsanleitungen & Zielsetzung der Studie	19
III.	PUBLIKATION	23
IV.	DISKUSSION	41
V.	SCHLUSSBEMERKUNG & AUSBLICK	55
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	57
VII.	SUMMARY	59
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	61
IX.	ANHANG	71
1.	Sektionsvideos	71
2.	Sektionsanleitungen	71
2.1.	Hemisphärische Version (links).....	72
2.2.	Hemisphärische Version (rechts).....	110
2.3.	Bihemisphärische Version	148
3.	Originaldaten/-tabellen	186
X.	DANKSAGUNG	197

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AEP	Acquired Equine Polyneuropathy
AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
BoDV-1	Borna Disease Virus-1
ca.	circa
CA	Cerebellar Abiotrophy
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CVCM	Cervical Vertebral Compressive Myelopathy
EDM	Equine Degenerative Myeloezcephalopathie
EEG	Elektroenzephalographie
EHV-1	Equines Herpesvirus 1
EHM	Equine Herpesvirus Myeloenzephalopathie
EMND	Equine Motor Neuron Disease
EPM	Equine Protozoenmyeloenzephalitis
HEP	Hepatische Enzephalopathie
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IQR	Inter Quartile Range
IVETF	International Veterinary Epilepsy Task Force
LFS	Lavender Foal Syndrome
MRT	Magnetresonanztomographie
n. Chr.	nach Christus
NE	Neonatale Enzephalopathie
NPE	Nigropallidale Enzephalomalazie
OAAM	Okzipito-atlanto-axiale Malformation
OLWFS	Overo Lethal White Foal Syndrome
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNE	Polyneuritis Equi
PNS	Peripheres Nervensystem
RESPE	Réseau d'épidémio-surveillance en pathologie equine
TBEV	Tick-borne Encephalitis Virus
TC-MEP	Transkranielle Magnetisch Evozierte Potenziale
v. a.	vor allem

v. Chr.	vor Christus
VETAMIN-D	
bzw.	
DAMNIT-V	V: vaskulär
	E: entzündlich
	T: traumatisch
	A: Anomalie
	M: Metabolisch/toxisch
	I: idiopathisch
	N: neoplastisch
	D: degenerativ
WNV	West Nile Virus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. „Von der Hirnwüthigkeit, Unsinnigkeit Dollen Coller, zu Latein Phrenitis genannt“ von Winter 1678 (WINTER, 1678). Quelle: Geschichte der Tiermedizin (VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003)

Abbildung 2. „Von der hinfallenden Sucht“ von Winter 1678 (WINTER, 1678). Quelle: Geschichte der Tiermedizin (VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003)

Abbildung 3. Todesursachen laut einer in Frankreich durchgeführten, retrospektiven Versicherungsstudie mit Daten aus dem Jahre 1995 (LEBLOND et al., 2000)

Abbildung 4. Ätiologische Kategorisierung neurologischer Erkrankungen laut retrospektiv beurteilter Fallakten von 450 Pferden in Australien 1993 (TYLER et al., 1993)

Abbildung 5. Ätiologische Kategorisierung neurologischer Erkrankungen in 4319 postmortal untersuchten Pferden in Frankreich 1986 bis 2006 (LAUGIER et al., 2009)

Abbildung 6. Box und Whisker Plot zur Darstellung der Hirnvolumina innerhalb der untersuchten Kohorte (n=22) mit einer Spanne von 250 bis 795 cm³ bei einem Median von 625 cm³ (IQR: 395 bis 745).

Abbildung 7. Vorschlag zur geometrisch-anatomischen Unterteilung großer und kleiner Pferdehirne nach sagittaler (links) und transversaler (rechts) Sektion. Sagittale Proben (links) werden in der horizontalen Achse unterteilt in R: rostral, RI: rostral intermediär (bei großen Gehirnen), CI: caudal intermediär (bei großen Gehirnen) oder I: intermediär (nur bei kleinen Gehirnen) und C: caudal. Transversale Proben (rechts) werden in der horizontalen Achse unterteilt in M: median (bei bihemisphäralen Schnitten), PM: paramedian, IL: intermediolateral (bei großen Gehirnen) und L: lateral. Sowohl Sagittal- als auch Transversalschnitte werden in der vertikalen Achse unterteilt in D: dorsal, DI: dorsal intermediär (bei großen Gehirnen), Ä: äquatorial, VI: ventral intermediär (bei großen Gehirnen) und V: ventral. Die rote Markierung dient der Kennzeichnung der ventralen Oberfläche und soll an jedem Schnitt für die Histologie ventral angebracht werden, um dem Pathologen/der Pathologin am Mikroskop die Orientierung zu erleichtern.

I. EINLEITUNG

Mit der Domestikation des Pferdes rund 3500 Jahre v. Chr. ist das Hauspferd (*Equus caballus*) zu einem wichtigen Begleiter des Menschen geworden und hat sich von seinem früheren Einsatz im Krieg, der Kavallerie und der Landwirtschaft zum heutigen Sport-, Freizeit- und Therapiepartner entwickelt.

Durch sein gyrenzephales und voluminöses Gehirn, seine ausgeprägten kognitiven Fähigkeiten und sein vorhersehbares Verhalten in einer kontrollierten Umgebung, eignet sich das Pferd außerdem als Modell für ethologische, neuroanatomische und neurowissenschaftliche Forschungen.

Die Verfügbarkeit standardisierter neurologischer und neurophysiologischer Untersuchungsalgorithmen zusammen mit der Bereitschaft des Pferdes, kontrollierte Aufgaben zu meistern, runden seine Eignung als natürliches und vor allem auch langlebige Tiermodell ab.

Grundvoraussetzung für das Verständnis der Pathobiologie neurologischer Erkrankungen und der Translation von Erkenntnissen auf andere Spezies, ist allerdings das Erkennen der Lokalisation, der Verteilung und der funktionellen sowie topographischen Beziehung von Hirnpathologien.

Bis heute finden sich die Kenntnisse über die equine Neuroanatomie und -pathologie hauptsächlich in topographisch-anatomischer Literatur und Einzelfallberichten über spezifische Syndrome, die sich auf umschriebene Hirnbereiche konzentrieren.

Durch das große Volumen des equinen Gehirns gestaltet sich die Erkennung von fokalen und diskreten Läsionen vor allem in der neuropathologischen Aufarbeitung anspruchsvoll und die Untersuchung zusammenhängender Bereiche ist aus technischen und finanziellen Gründen herausfordernd.

Daher verlangt die Erkennung und Zuordnung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), mehr noch als bei Kleintieren, eine gezielte Herangehensweise bei der Beprobung, die zusätzlich zu „generellen Kandidatenregionen“, die symptomatogenen Zonen und letztlich alle großen Funktionskreise miterfasst.

Den meisten publizierten Studien und Fallberichten ist eine Hirnsektion in Transversalschnitten mit semisystematischer oder willkürlicher Beprobung einzelner Areale des Frontallappens, Dieenzephalons und Rautenhirns zu entnehmen.

Eine symptomatogene Zuordnung beschränkt sich dabei auf die Grobzuordnung: Vorderhirn, Hirnstamm, Kleinhirn.

Die anschließende Histologie gibt im Folgenden spärlich über die exakte Lokalisation der Entnahmestelle Auskunft, selbst wenn die mikroskopischen Läsionen korrekt erkannt und interpretiert wurden.

Das Fehlen standardisierter Vorgaben zur Hirnsektion und Beprobung führt folglich zur erschwerten Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Resultaten zwischen Untersuchern und Investigationen. Dadurch gehen wertvolle Informationen und Materialien der verstorbenen Individuen für aktuelle und zukünftige Studien unersetzlich verloren oder müssen als unklar repräsentativ erachtet werden.

Ziel dieser Studie war es daher, ein Protokoll für die systematische Feinsektion des equinen Gehirns zu erstellen, die jedem Pathologen „im Feld“ die Möglichkeit gibt, auch ohne spezifische neuroanatomische Vorkenntnisse, neurologische Erkrankungen mit hoher Wahrscheinlichkeit im ersten Untersuchungsgang sowie im Bedarfsfall durch zusätzlich angeforderte Schnitte abzuklären und durch die Ergebnisse und das archivierte Material nachhaltig zum Erkenntnisgewinn bei Hirnerkrankungen des Pferdes beizutragen.

Durch die künftige Zusammenlegung von systematischen bildgebenden sowie histologischen Daten, wäre außerdem die Möglichkeit zur Erstellung multimodaler Gehirnatlanten geboten, die das topographische, funktionelle und histologische Verständnis der equinen Neuroanatomie und -pathologie weiter voranbringen sollten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Literaturgeschichte der Pferdeneurologie

Wie kein anderes Tier nimmt das Pferd in der Historie der Tiermedizin einen besonderen Stellenwert ein. In erster eigenständiger veterinärmedizinischer Fachliteratur, welche mit ihren Quellen bis in die Spätantike zurückreicht, setzte man sich nahezu exklusiv mit den Krankheiten der Pferde und Maultiere auseinander (SCHÄFFER, 1985; VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003). Durch die zunehmende Bedeutung jener Equiden erwuchs der eigene Berufsstand der Pferde- und Maultierärzte, der sogenannten „Hippiater“ und „Mulomedici“ (SCHÄFFER, 1985; VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003).

Erste Schriften über Tierkrankheiten wurden verfasst und in nachchristlichen Jahrhunderten zu Sammelwerken wie der *Hippiatrika*, dem *Corpus Hippiatricorum Graecorum*, der *Ars veterinaria*, der *Mulomedicina Chironis* und der *Ars veterinaria sive Mulomedicina* zusammengetragen (SCHÄFFER, 1985; VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003). Jene Kompilationen spiegelten den Stand der Equidenheilkunde in der Spätantike wider und umfassten in unterschiedlichem Umfang alle wesentlichen Bereiche der Maultier- und Pferdeheilkunde, ohne dass das equine Nervensystem mit seinen Erkrankungen darin ausdrückliche Erwähnung fand (SCHÄFFER, 1985; VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003).

Bis zur Anerkennung der Anatomie als Grundlage medizinischen Wissens in der Veterinärmedizin, beruhte die Beschreibung neurologischer Krankheiten des Pferdes auf reiner Empirie (VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003). Aus dem 17. Jahrhundert sind Interpretationen wie „Von der Hirnwüthigkeit, Unsinnigkeit Dollen Coller, zu Latein Phrenitis genannt“ für Pferde mit Dummkoller dokumentiert, die „So man sie lauffen liesse, so stosseten sie den Kopff an einer Wand entzwey“ (siehe Abbildung 1) oder es ist „Von der hinfallenden Sucht“ die Rede, die als „Krampf des Hirns [...] den ganz Leib darnieder wirft“ (siehe Abbildung 2) und vermutlich die Epilepsie des Pferdes beschreiben sollte (WINTER, 1678; VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003).

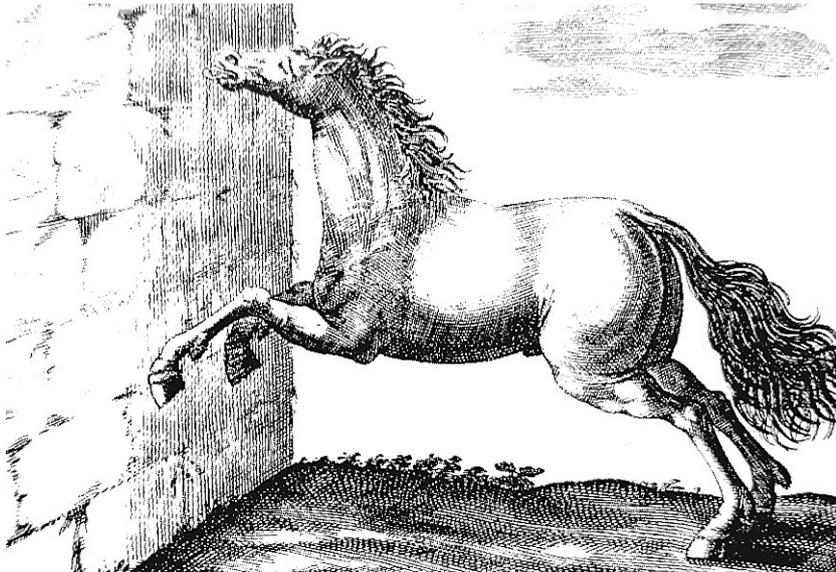


Abbildung 1. „Von der Hirnwüthigkeit, Unsinnigkeit Dollen Coller, zu Latein Phrenitis genannt“ von Winter 1678 (WINTER, 1678). Quelle: Geschichte der Tiermedizin (VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003)

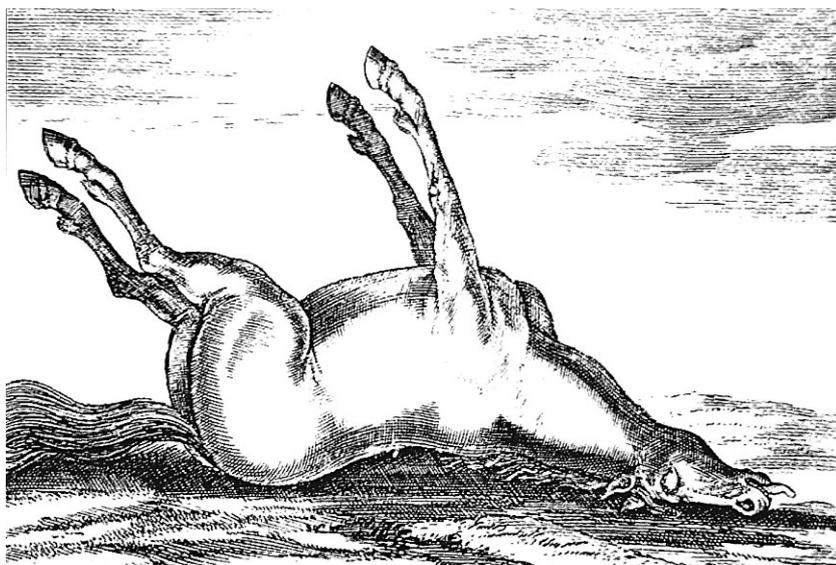


Abbildung 2. „Von der hinfallenden Sucht“ von Winter 1678 (WINTER, 1678). Quelle: Geschichte der Tiermedizin (VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003)

Eine neuroanatomische Grundlage bekam die Pferdemedizin erst mit Carlo Ruini, der in seinem 1598 veröffentlichten Werk *Dell'Anotomia [sic] et dell'Infermità del Cavallo* neben Untersuchungen über Osteologie, Myologie, Splanchnologie sowie Gefäßlehre auch die Nervenlehre des Pferdes mit zahlreichen Illustrationen behandelte (RUINI, 1598; BEICHELE, 1979; VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003). Dennoch wurde weder die Veterinärmedizin der damaligen Zeit, noch der nachfolgenden 150 Jahre durch seine Arbeit beeinflusst, da die

Dringlichkeit der Umstellung der Tierheilkunde vom Empirismus auf die Anatomie und Physiologie als grundlegende Disziplinen noch unerkant blieb (VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003).

In der Humanmedizin hingegen etablierte sich die Anatomie bereits im Spätmittelalter als Grundlagenfach in der Lehre angehender Ärzte (VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003). Erstes neuroanatomischen Wissen stammte dabei aus vorchristlicher Zeit, unter anderem von Alkmaion von Kroton, Aristoteles, Herophilus von Chalkedon als „Vater der Neuroanatomie“ und Erasistratos von Keos (COLE, 1949; VON STADEN und CHALCEDONIUS, 1989; PORTER, 2000; VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003).

Die griechischen Gelehrten, Anatomen und Ärzte erlangten ihre Kenntnisse sowohl durch das Studium an Tieren als auch an Menschen im Zuge von Experimenten, Autopsien und vermutlich auch Vivisektionen (VON STADEN und CHALCEDONIUS, 1989; PORTER, 2000; VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003).

Erst nach Beschluss der Stallmeisterzeit im 18. Jahrhundert wurde die Relevanz anatomischer Kenntnisse auch in der Tiermedizin erkannt und von Philippe-Etienne Lafosse das Werk *Cours d'hippiatrique ou Traité complet de la médecine des chevaux* veröffentlicht, womit er als Begründer der wissenschaftlichen Tieranatomie gilt (LAFOSSE, 1772; SCHRADER, 1863; VON DEN DRIESCH und PETERS, 2003).

Weitestgehend blieb die Geschichte der Tiermedizin bis über die Etablierung erster Tierarzneischulen im 18. Jahrhundert hinaus geprägt von der Geschichte der Pferdemedizin (SCHÄFFER, 1985). Anatomischer Unterricht, Demonstrationen sowie Präparier- und Sektionsübungen wurden in erster Linie an Pferden gelehrt (KOCH, 1965b; WERNICKE, 2004, 2005), anatomische Sammlungen wurden angelegt (KOCH, 1965a; SCHRÖDER, 1990; KÜHN, 1994) und später mit anatomischen und pathologisch-anatomischen Präparaten als Grundlage für vergleichende Untersuchungen ergänzt (GURLT, 1860; WERNICKE, 2005).

Erst durch technische Errungenschaften und die Kombination aus Makro- und Mikroskopie im 19. Jahrhundert gewann die Sektion als Fundament für die Erfassung und Charakterisierung von Krankheitsbildern an Bedeutung und die moderne Pathologie entwickelte sich zur Hauptquelle wissenschaftlich-medizinischer Erkenntnisse (DIALLO-DANEBROCK et al., 2019).

Zum Studium des Pferdegehirns wurden erste systematische Ansätze angestellt und mittels Transversal- (im Originaltext frontal genannt) und Horizontal-Schnitten morphologische sowie makro- und mikroskopische Untersuchungen vorgenommen, die der besseren Vergleichbarkeit anatomisch-pathologischer Gegebenheiten als Grundlage experimentell-physiologischer Forschung dienen sollten (DEXLER, 1899).

Histologisch-diagnostische Studien wurden zudem von Ernst Joest und Kurt Degen durchgeführt, welche die heute noch als pathognomonisch geltenden Kerneinschlüsse (Joest-Degensche-Einschlusskörperchen) in Neuronen des Hippocampus von an Borna erkrankten Pferden entdeckten (JOEST, 1911).

Bis heute konnte sich die Pferdeneurologie zu einem eigenständigen Fachgebiet entwickeln, ohne dass die Anatomie an Bedeutung für das grundlegende Verständnis von Physiologie und Pathologie verlor. Nichtsdestotrotz beruht das Wissen über die equine Neuroanatomie und -pathologie nach wie vor hauptsächlich auf topographischer Literatur (MCFADYEAN, 1884; YOSHIKAWA, 1968; SISSON et al., 1975; NICKEL et al., 2004; MASTY, 2007) und deskriptiven Einzelstudien oder Fallberichten über spezifische Erkrankungen in definierten Hirnarealen (JOEST, 1911; SISÓ et al., 2003; FINNO et al., 2011; RECH und BARROS, 2015; VALBERG et al., 2015; FINNO et al., 2016).

Eine Systematik zur Beurteilung anatomisch-pathologischer Gegebenheiten im Pferdegehirn wurde schlussendlich erst durch die zunehmende Implementierung moderner bildgebender Verfahren erforderlich (STUCKENSCHNEIDER et al., 2014; JOHNSON et al., 2019; SCHMIDT et al., 2019).

2. Epidemiologischer Überblick und Relevanz neurologischer Krankheiten in der Pferdemedizin

2.1. Neurologische Erkrankungen als Todesursache

Postmortale Studien machen neurologische Erkrankungen für 12,6% (LAUGIER et al., 2009) bis 15,8% (BAKER und ELLIS, 1981) der Todesfälle in der Pferdemedizin verantwortlich. Sie bergen daher weltweit erhebliche gesundheitliche und wirtschaftliche Konsequenzen in der Pferdeindustrie (PELLEGRINI-MASINI und LIVESEY, 2006; LECOLLINET et al., 2019) und sind laut einer in Frankreich durchgeführten retrospektiven Versicherungsstudie nach Zwischenfällen beim Abfohlen, gefolgt von Koliken, Bewegungsstörungen und kardiovaskulären Erkrankung als fünft häufigste Todesursache anzusehen (LEBLOND et al., 2000; LAUGIER et al., 2009) (siehe Abbildung 3).

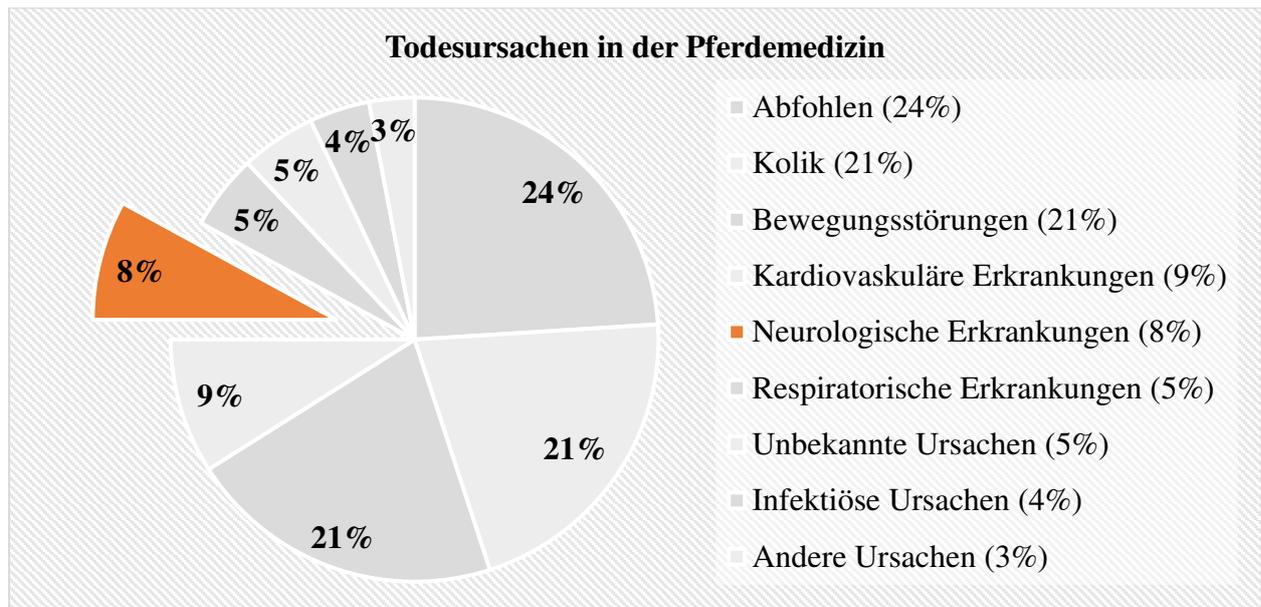


Abbildung 3. Todesursachen laut einer in Frankreich durchgeführten, retrospektiven Versicherungsstudie mit Daten aus dem Jahre 1995 (LEBLOND et al., 2000)

2.2. Problematik neurologischer Erkrankungen

Schwere neurologische Erkrankungen bringen dabei eine hohe Begleitmorbidität und Letalität mit sich. Aber selbst leichte neurologische Defizite können große Auswirkungen auf geforderte Leistungen erlangen und führen oft zu langen Rekonvaleszenzphasen. Dazu stellen neurologisch beeinträchtigte, inkoordinierte Pferde nicht nur für sich selbst eine Gefahr dar, sondern setzen auch Besitzer, Tierärzte sowie Pfleger in der Handhabung potenziell erheblichen Risiken aus (PELLEGRINI-MASINI und LIVESEY, 2006; LECOLLINET et al., 2019).

Aufgrund des beschränkten Regenerationsvermögens des Nervensystems, kann sich der Krankheitsverlauf zudem langwierig gestalten, endet fatal oder resultiert aus tierschutzrechtlichen, handhabungstechnischen oder wirtschaftlichen Gründen in einer Euthanasie (KANEENE et al., 1997; PELLEGRINI-MASINI und LIVESEY, 2006; LAUGIER et al., 2009; RECH und BARROS, 2015).

Relevanz und Art der neurologischen Erkrankung unterscheiden sich dabei prinzipiell geografisch. Durch die zunehmende interkontinentale Verschiffung von Pferden sind aber auch endemisch auftretende Erkrankungen zum internationalen Problem geworden und vor allem dann schwer in den Griff zu bekommen, wenn Lokalisationen gewechselt werden und sich Vektoren unkontrolliert ausbreiten können. Während freizeitmäßig genutzte Tiere ihren Herkunftsort zum Teil niemals verlassen, kommen sportlich oder züchterisch genutzte Tiere international zum Einsatz und werden weltweit im- und exportiert (MAYHEW, 1996; DOMINGUEZ et al., 2016).

Dabei sind insbesondere solche Krankheiten gefürchtet, welche nicht nur für Einzeltiere, sondern für ganze Tiergruppen eine Bedrohung darstellen. Umwelt-bedingte Pathogene und Toxine sowie Infektionserkrankungen spielen unterdessen eine zentrale Rolle. Daraus ergibt sich die große Bedeutung der Erhebung epidemiologischer Parameter für die ätiologische Abklärung von Erkrankungen, die das Signalement, die Haltungs- und Nutzungsform zusammen mit der medizinischen Vorgeschichte, das regionale Krankheitsvorkommen, geographische Gegebenheiten, kürzliche Reisegeschichten, weitere erkrankte Tiere im Bestand und den Impfstatus betroffener Pferde in die Bewertung der Relevanz miteinfließen lassen (GOEHRING, 2007; LECOLLINET et al., 2019). Nationale Überwachungssysteme wie die RESPE (Réseau d'épidémiologie-surveillance en pathologie équine) (RESPE) in Frankreich oder die EQUINELLA (EQUINELLA) in der Schweiz können dabei mit aktuellen epidemiologischen Daten unterstützend wirken (LECOLLINET et al., 2019).

2.3. Ätiologischer Überblick neurologischer Erkrankungen des Pferdes

Pathologisch-epidemiologische Studien sind im Bereich der Pferdeneurologie, insbesondere im Vergleich zu anderen Spezies, eher spärlich gesät und zeigen zum Teil bedeutende Unterschiede in der Erkrankungsprävalenz bezogen auf Region und Signalement der Tiere auf. Zudem variieren sie in der Methodik der Datenerhebung von intravitaler bis postmortaler Diagnostik und sind durch die uneinheitliche Einteilung in verschiedene ätiologische Kategorien nur schwer miteinander vergleichbar. Trotzdem soll ein Versuch unternommen werden:

Laut einer in Australien durchgeführten retrospektiven Fallakten-Studie von Tyler et al. aus dem Jahre 1993 (TYLER et al., 1993) ist ein Großteil der neurologischen Erkrankungen mit 26,4% auf Traumata zurückzuführen, von denen rund 50% das Rückenmark, 40% das Gehirn oder die Kopfnerven und 10% die peripheren Nerven betreffen. Malformationen als Ursache neurologischer Erkrankungen sind in dieser Studie hingegen mit einer Prävalenz von 19,8% vertreten, wobei 93% aus Halswirbelsäulenmalformationen und 7% aus kongenitalen Defekten bei Fohlen resultieren. Entzündungen und Infektionen des ZNS sind mit 6,7% eher selten und zeigen sich am häufigsten in Form von Meningitiden (37%). Neonatale neurologische sowie toxisch/metabolische Erkrankungen scheinen mit einer Prävalenz von jeweils 6,2% und 6% auf. Die restlichen neurologischen Erkrankungen (35%) umfassen mit absteigender Häufigkeit idiopathische Erkrankungen (am häufigsten die idiopathische laryngeale Hemiplegie), andere nicht näher definierte neurologische Erkrankungen, Neoplasien sowie degenerative Erkrankungen (siehe Abbildung 4).

Wann immer möglich, resultierten die Diagnosen in dieser australischen Studie aus dem neurologischen Untersuchungsgang und erforderlichenfalls zusätzlichen Diagnostika wie der Rhinolaryngoskopie, der Radio- und Myelographie, der Ophthalmoskopie oder der Analyse von Cerebrospinalflüssigkeit (CSF). Die Verifizierung der intravital gestellten Diagnose gelang jedoch in vielen Fällen erst durch die Nekropsie und histopathologische Untersuchung (TYLER et al., 1993).

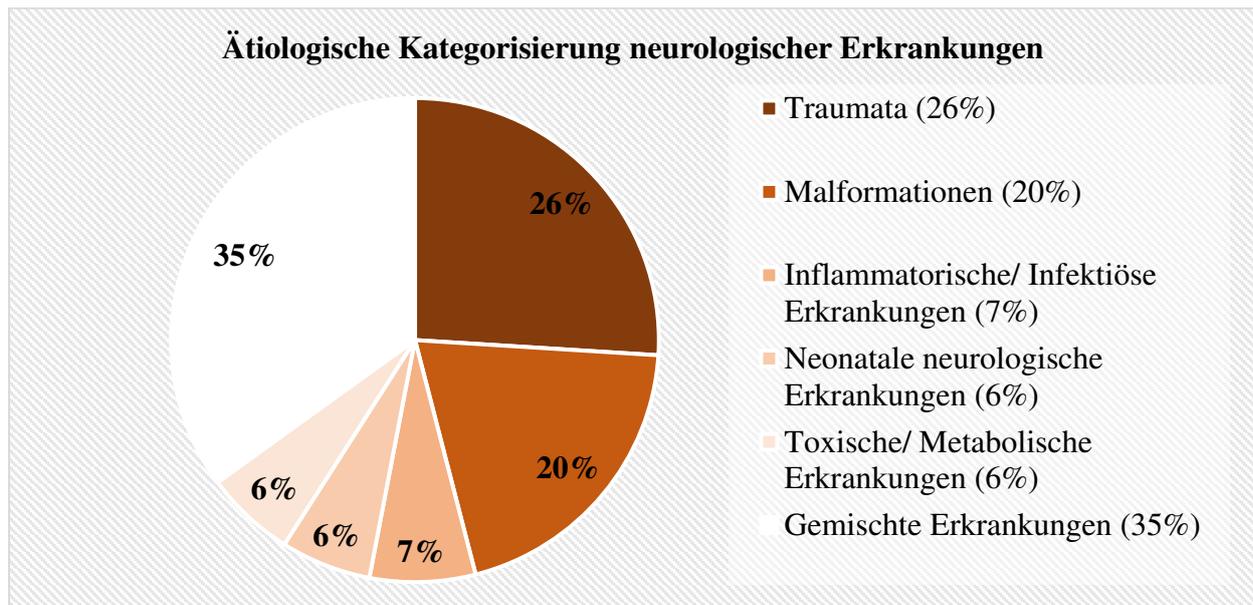


Abbildung 4. Ätiologische Kategorisierung neurologischer Erkrankungen laut retrospektiv beurteilter Fallakten von 450 Pferden in Australien 1993 (TYLER et al., 1993)

Eine aktuellere, 2009 in Frankreich durchgeführte Nekropsie-Studie von Laugier et al. (LAUGIER et al., 2009) verzeichnet eine ähnliche Häufigkeit neurologischer Erkrankungen traumatischen (34,4% vs. 26,4%) und malformativen (19,7% vs. 19,8%) Ursprungs. Laut dieser Studie sind Traumata der Wirbelsäule (74,3%) und des Schädels (25,7%) sogar hauptursächlich an den neurologischen Erkrankungen des Pferdes beteiligt. Dabei spielen sowohl Frakturen wie auch Luxationen, medulläre Kompressionen aufgrund von Hämatomen und Ödemen sowie Gehirnerschütterungen eine zentrale Rolle. In der Gruppe der Malformationen des Nervensystems, des Schädels und der Wirbelsäule (19,7%), nimmt dabei die zervikale vertebrale kompressive Myelopathie (CVCM) mit 15,3% den größten ätiologischen Anteil ein. Entzündungen und Infektionen des ZNS treten in dieser Studie hingegen vergleichsweise häufiger auf (16% vs. 6,7%), wobei auch hier ätiologisch hauptsächlich bakterielle Meningoenzephalomyelitiden und Meningitiden (11,4%) zu nennen sind. Vermutlich kommt dieser Unterschied durch die höhere Anzahl von Fohlen in der Studie zustande, die häufig als Komplikation einer Septikämie unter

bakteriellen ZNS-Infektionen leiden. Auch toxisch/metabolische (17% vs. 6%) sowie neonatal neurologische Erkrankungen (11,4% vs. 6,2%) kommen in dieser Studie wesentlich häufiger vor (siehe Abbildung 5), was vermutlich darin zu begründen ist, dass zum einen die Grass Sickness oder Equine Dysautonomie in Regionen des europäischen Festlandes enzootisch ist, während sie beispielsweise im Klimaraum Australien kaum beschrieben ist (STEWART, 1977; BAKER und ELLIS, 1981; LAUGIER et al., 2009; WYLIE und PROUDMAN, 2009) und zum anderen die hepatische Enzephalopathie (HEP) im Studienzeitraum von Laugier et al. in Frankreich womöglich enzootisch auftrat (ZIENTARA et al., 1994; LAUGIER et al., 2009). Die höhere Anzahl neonataler neurologischer Erkrankungen resultieren vermutlich daher, dass mehr Fohlen in die Studie inkludiert waren und das neonatale Fehlanpassungssyndrom bekannterweise vermehrt in Regionen auftritt, wo Vollblüter gezüchtet werden (MAYHEW, 1989; LAUGIER et al., 2009).

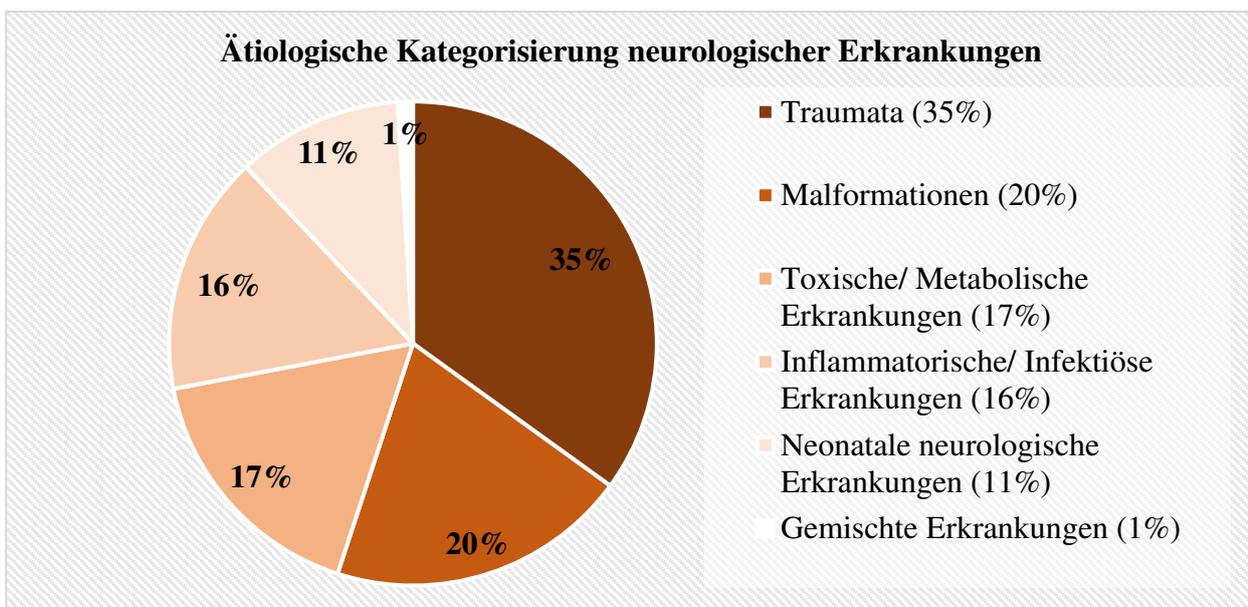


Abbildung 5. Ätiologische Kategorisierung neurologischer Erkrankungen in 4319 postmortal untersuchten Pferden in Frankreich 1986 bis 2006 (LAUGIER et al., 2009)

2.4. Epidemiologische Unterschiede neurologischer Erkrankungen

Auch in weiteren Umwelt-assoziierten Erkrankungen zeigen sich die regionalen Unterschiede deutlich. Der toxisch bedingte Hahnentritt (Australian Stringhalt), der auf die Ingestion von *Hypochaeris radicata* zurückzuführen ist sowie die nigropallidale Enzephalomalazie (NPE), die aus der anhaltenden Aufnahme großer Mengen *Rhaponticum repens* oder *Centaurea solstitialis* resultiert, kommen beispielsweise nur in Regionen vor, wo Pferde in Kontakt mit den beschriebenen Giftpflanzen treten können (CORDY, 1954; SCHULTZE et al., 2009; CHANG et

al., 2012; ELLIOTT und MCCOWAN, 2012; RECH und BARROS, 2015). Die Acquired Equine Polyneuropathy (AEP) tritt währenddessen ätiologisch ungeklärt mit einer eindeutigen geografischen Häufung in nordischen Ländern auf (HANCHE-OLSEN et al., 2017).

Überdies kommen überregional sporadische neurologische Erkrankungen des Pferdes wie die Equine Motor Neuron Disease (EMND) sowie die Equine Degenerative Myeloenzephalopathie (EDM) vor. Während die EDM anscheinend in Europa epidemiologisch keine große Rolle spielt, hat sie in Amerika neben der equinen Protozoenmyeloenzephalitis (EPM) und CVCM eine große differentialdiagnostische Bedeutung bei Pferden mit spinaler Ataxie (MAYHEW et al., 1978b; NAPPERT et al., 1989; GANDINI et al., 2004; LAUGIER et al., 2009).

Gegenüber genannten Erkrankungen, die sich auf den veterinärmedizinischen Bereich beschränken, sind neurotrope virale Erkrankungen des Pferdes gleichzeitig wichtige menschliche Krankheitserreger und haben nicht nur auf die Pferdepopulation drastische Auswirkungen. In Europa sind vor Allem das Vektor-assoziierte West Nile Virus (WNV), das Borna Disease Virus-1 (BoDV-1), das Tick-borne encephalitis virus (TBEV) und das Tollwut-Virus als Infektionen mit zoonotischem Potenzial zu nennen (RUSHTON et al., 2013; KUMAR et al., 2018; LECOLLINET et al., 2019; LIESCHE et al., 2019).

Für die Überwachung und Kontrolle entsprechender menschlicher Viruserkrankungen kann das Pferd somit als Bio-Indikator dienen und ist für die regionale Identifizierung zoonotischer Viren von entscheidender Bedeutung (RUSHTON et al., 2013; KUMAR et al., 2018; LIESCHE et al., 2019).

Während sich das WNV seit seiner Isolation 1937 in Uganda durch die Verbreitung der Mücken als Überträger global ausgebreitet hat (DAVID und ABRAHAM, 2016), ist die Bornasche Krankheit des Pferdes durch den wenig wandernden Vektor (Feldspitzmaus) regional beschränkt geblieben und somit nur in bestimmten Teilen Deutschlands sowie in Österreich, Liechtenstein und der Schweiz endemisch (DÜRRWALD und LUDWIG, 1997; KINNUNEN et al., 2013).

In gewissen Regionen Deutschlands und Österreichs ist zudem das TBEV in der Pferdepopulation weit verbreitet, das als wichtigstes humanes durch Zecken übertragenes Pathogen in Europa und Asien gilt (KLAUS et al., 2013; RUSHTON et al., 2013). Das Tollwutvirus, als einer der bedeutendsten globalen zoonotischen Erreger, konnte in Westeuropa hingegen durch erfolgreiche Impfkampagnen nahezu ausgerottet werden (LECOLLINET et al., 2019).

Aus wirtschaftlicher Sicht zählt in Europa das Equine Herpesvirus-1 (EHV-1) zu den bedeutendsten Pferdepathogenen, das neben respiratorischen Erkrankungen und Spätaborten auch die Equine Herpesvirus-assoziierte Myeloenzephalopathie (EHM) verursachen kann

(GOEHRING und VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, 2001; GOEHRING et al., 2011; DUNOWSKA, 2014; LECOLLINET et al., 2019).

Je nach Region sind aus züchterischer Perspektive zudem auch genetisch bedingte Erkrankungen relevant, zu denen das Overo Lethal White Foal Syndrome (OLWFS) (MCCABE et al., 1990), das Lavender Foal Syndrome (LFS) (BUGNO-PONIEWIERSKA et al., 2019), die equine zerebelläre Abiotrophie (CA) (DEBOWES et al., 1987; SCOTT et al., 2018; BUGNO-PONIEWIERSKA et al., 2019), die okzipitoatlantoaxiale Malformation (OAAM) (WATSON und MAYHEW, 1986) und der Hydrozephalus des Friesen gehören (SIPMA et al., 2013; EDWARDS und FINNO, 2020). Auch bei der EDM scheint eine genetische Komponente zur Ätiopathogenese beizutragen (MAYHEW et al., 1987; BLYTHE et al., 1991; BURNS und FINNO, 2018). Da sie aber anhand der klinischen Symptomatik nicht von anderen neurologischen Erkrankungen wie der CVCM, EPM oder EHM unterscheidbar ist und keine genetischen Tests zur Verfügung stehen, bleibt die tatsächliche epidemiologische Bedeutung dieser Erkrankung unklar und beruht auf dem Ausschluss genannter Differentialdiagnosen (BURNS und FINNO, 2018). Während für die Differenzierung von EDM, EPM und EHM ein Nachweis von Antikörpern in Cerebrospinalflüssigkeit und Serum sowie molekulare Tests und die Viruskultur hilfreich sein können (GRANSTROM et al., 1993; LUNN et al., 2009; BURNS und FINNO, 2018), gelingt die definitive Unterscheidung zwischen EDM und CVCM nur durch die postmortale histologische Untersuchung von Hirnstamm und Rückenmark (BURNS und FINNO, 2018).

Da viele Pferde mit neurologischer Symptomatik jedoch nicht der postmortalen Untersuchung zugeführt werden, ist es unmöglich die wahre Prävalenz von EDM zu bewerten (BURNS und FINNO, 2018).

Zudem wird durch die mangelnde Systematik postmortaler neuroanatomischer Untersuchungstechniken und den erst in den letzten Jahrzehnten aufkommenden und zunehmenden bildgebenden Verfahren in der Pferdemedizin, die Erforschung betroffener Kandidatenregionen und die Charakterisierung equiner neurologischer Erkrankungen in dem ohnehin kleinen zur Verfügung stehenden Patientengut zusätzlich erschwert. Somit wird das tatsächliche Vorkommen vieler equiner neurologischer Erkrankungen möglicherweise ebenso regional wie überregional über- als auch unterbewertet.

3. Neuroanatomische Fingerprints equiner ZNS-Erkrankungen

Das Kernstück jeder neurologischen Diagnose basiert auf dem topographischen Verteilungsmuster der betroffenen Areale, der sogenannten Neurolokalisation (LUNN und MAYHEW, 1989; REED, 2008). Diese ergibt sich zum einen aus der Überprüfung neurologischer Funktionen sowie abnormer Verhaltensweisen und zum anderen aus der anatomischen Zuordnung durch Bildgebung und Neuropathologie. In Abwesenheit einer anatomischen Charakterisierung erlaubt jedoch selbst die Histologie oft nur inkomplette Interpretationen und ist folglich abhängig von der Nachvollziehbarkeit der Probenherkunft.

Steht die Lokalisation einer ZNS-Erkrankung fest, kann anhand von Signalement, Anamnese sowie zusätzlicher Laborbefunde das in der Tierneurologie verbreitete „VETAMIN-D“-Schema bzw. analog das im amerikanischen Raum bekannte „DAMNIT-V“-Schema für die ätiopathogenetische Aufarbeitung und differentialdiagnostische Abklärung herangezogen werden. Das Akronym beinhaltet eine Liste der wichtigsten acht ätiologischen Untergruppen (FISCHER, 2013) und umfasst somit vaskuläre, entzündliche, traumatische, auf Anomalien basierende, metabolisch/toxische, idiopathische bzw. immun-medierte, neoplastische und degenerative Erkrankungen (FISCHER, 2013). Dabei weisen zahlreiche Krankheiten vorhersehbare regionale Prädispositionen und Verteilungsmuster auf.

Vaskuläre Erkrankungen sind beispielsweise meist scharf abgegrenzt den Versorgungsterritorien zugeordnet, die auf den Verzweigungen des arteriellen Gefäßbaums und der tributären Versorgungsgebiete beruhen. Primäre vaskuläre Insulte spielen beim Pferd allerdings insgesamt eine untergeordnete Rolle und betreffen meist das Rückenmark im Rahmen fokaler fibrocartilaginärer Embolien (TAYLOR et al., 1977; SEBASTIAN und GILES, 2004; WALLING et al., 2011) und anästhetischer Lagerungskomplikationen (YOVICH et al., 1986; LERCHE et al., 1993; TRIM, 1997) oder resultieren aus Perfusionsstörungen des Gehirns, welche im Rahmen einer Geburtsstörung auftreten und wie bei der neonatalen Enzephalopathie (NE) zu einer globalen zerebralen Ischämie führen können (TORIBIO, 2019).

Wesentlich häufiger sind die Blutgefäße selbst von entzündlichen Veränderungen betroffen wie zum Beispiel im Rahmen vaskulitischer Verlaufsformen von EHV-1-Infektionen, die in einer Herpesvirus-assoziierten Myeloenzephalopathie (EHM) resultieren können (KOHN und FENNER, 1987; GOEHRING et al., 2011; HOLZ et al., 2019).

Diese Veränderungen sind auf Basis der hämatogenen virämischen Einsaat multifokal verteilt und zeichnen sich nicht so sehr durch Infarkte als durch unscharf begrenzte Blutungen in Hirnstamm und Rückenmark aus. Im Zuge der unterschiedlichen Gefäßdichten sind die Läsionen insbesondere in der grauen Substanz zu suchen (RECH und BARROS, 2015; HOLZ et al., 2019).

Ähnlich rückenmarksbetont und asymmetrisch verteilt sind die vaskulären Komplikationen der im amerikanischen Raum anzutreffenden equinen Protozoenmyeloenzephalitis (EPM). Die Protozoen-induzierten hämorrhagisch-nekrotischen Herde erstrecken sich dabei in unterschiedlicher Größe entlang der gesamten Neuraxis, sind hauptsächlich jedoch in der zervikalen und lumbalen Intumeszenz des Rückenmarks zu finden (DUBEY et al., 2001; RECH und BARROS, 2015).

Dem vaskulitischen Muster nicht unähnlich verhält es sich mit weiteren hämatogen herangetragenen Infektionen des ZNS, die in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu durchbrechen. Hierzu zählen beispielsweise Infektionen mit anderen Apicomplexa wie Toxoplasma (BEECH und DODD, 1974) und den wichtigen equinen Toga- und Flaviviren.

In unseren Breitengraden fällt unter letzteres vor allem die mitteleuropäische Zeckenzephalitis = Tick-borne Enzephalitis (TBE) (RUSHTON et al., 2013; SALAT und RUZEK, 2020), die histopathologisch durch vaskuläre und perivaskuläre Infiltrate in grauer >> weisser Substanz aller Hirnregionen gekennzeichnet ist (WALDVOGEL, 1981) sowie die West-Nile-Virus-assoziierte Enzephalomyelitis, die sich in Form von Blutungen in der grauen Substanz von Hirnstamm und Rückenmark zeigt (CANTILE et al., 2001; RECH und BARROS, 2015).

Im Gegensatz zu den hämatogenen Infektionen, erlangen die neurogenen Borna- und Tollwutviren ihren ZNS-Zugang durch den retrograden axonalen Transport aus der Peripherie. Sie betreffen daher relativ symmetrisch ihre primären Zielsysteme anstelle eines zufallsverstreuten Musters. Selbes gilt für neurotrope und oft gut umschriebene bakterielle Erkrankungen, wie der Listeriose (RÜTTEN et al., 2006).

Charakteristisch für die Bornavirus-Infektion sind dabei mit gewissen Phasenunterschieden Läsionen der grauen Substanz von Riechkolben, Hippocampus und anderen limbischen Arealen sowie der Basalkerne und des Hirnstamms. Trotz der weiten Distribution sind sowohl die höchste Viruslast als auch pathognomonische Joest-Degensche Einschlusskörperchen in den Pyramidenzellen des Hippocampus zu suchen (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984; GOSZTONYI et al., 1993).

Auch bei der Tollwutvirus-Infektion können in rund der Hälfte der Fälle pathognomonische Negri-Körperchen nachgewiesen werden, die sich vorwiegend in Neuronen des Rückenmarks und ebenfalls im Hippocampus finden lassen (BOONE et al., 2010; STEIN et al., 2010). Die rabiden Läsionen der spinalen Tollwutmanifestation verteilen sich zudem entlang des gesamten Rückenmarks und treten gehäuft in lumbalen Segmenten und der lumbalen Intumeszenz auf (HAMIR et al., 1992; BASSUINO et al., 2016).

Natürlich erfordert heutzutage eine (rechts-)sichere Bestätigung bzw. der Ausschluss dieser zoonotischen und anderer Infektionen, die Zuhilfenahme direkter und indirekter Screeningmethoden, welche unter anderem die Erregerisolation, Polymerasekettenreaktion (PCR), Immunhistochemie (IHC), In situ-Hybridisierung, Immunfluoreszenz (IF) sowie Serologie umfassen (RECH und BARROS, 2015; LECOLLINET et al., 2019).

Die Sicherheit dieser Verfahren basiert allerdings ebenfalls und vor allem bei niedrigen Erregermengen auf der richtigen Blindbeprobung aus den Prädilektionszonen, während die Serologie im Zuge individueller Immunreaktionen, Kreuzreaktionen sowie Seroprävalenzen variierender klinischer Relevanz zum Teil schwer interpretierbare Ergebnisse liefern kann.

Durch die gezielte Untersuchung von Kandidatenregionen kann die Pathologie somit weitere Verfahren kostensensibel vorselektieren und gegebenenfalls zu gut abgesicherten Wahrscheinlichkeitsdiagnosen auf Basis regionaler pathognomonischer Befunde kommen.

Anders als genannte, selten äußerlich erkennbare Krankheiten, erlauben Traumata und Fehlbildungen (Anomalien) vielfach eine makroskopische Organdiagnose. Insbesondere wenn Schädelknochen, Viszerokranium (z.B. Orbita) und Wirbelsäule miteinbezogen sind, kann die Diagnosefindung somit bereits im Zuge der Adspektion und Palpation stattfinden, während bildgebende Verfahren unterstützend wirken können.

Die kongenitale okzipitoatlantoaxiale Malformation (OAAM) sowie der Hydrozephalus des Friesen fallen dabei bereits klinisch durch Hypermobilität (WILSON et al., 1985) und kraniale Auftreibung auf (SIPMA et al., 2013), können durch bildgebende Verfahren und genetische Untersuchungen im Verdacht bestätigt und in weiterer Folge durch die Nekropsie verifiziert werden (MAYHEW et al., 1978a; SIPMA et al., 2013).

Ähnlich einfach kann sich die Diagnostik im Falle eines Schädel-Hirntraumas gestalten, das in Form von Frakturen und Einblutungen erkennbar wird (LAUGIER et al., 2009).

Andererseits sind bei unklaren perakuten Todesfällen unbedingt Prädilektionsstellen aufzusuchen, um sogenannte *Sliding Contusion Injuries* oder *Coup* und *Contrecoup* Blutungen in dem riesigen Pferdehirn aufzufinden und korrekt zuordnen zu können (ROONEY, 1970; FINNIE, 2014; MORGAN et al., 2021).

Ihr histologisches Bild unterscheidet sich bei hoher Auflösung dabei nicht von anderen mikro- und mesovaskulären Blutungen. Daher kann deren histologisches Auffinden auch nur dann richtig interpretiert werden, wenn die neuroanatomische Herkunft des Schnittes rekonstruierbar ist. Gleiches gilt für die Erkennung traumainduzierter axonaler Schwellungen im Zuge diffuser Axonschädigungen (NOUT, 2008; FINNIE, 2014).

Eine sehr bedächtige neuroanatomische Beprobung ist darüber hinaus zur Differenzierung von Ataxiesyndromen, wie der langsam fortschreitenden Kompression (CVCM) sowie der degenerativen Myeloenzephalopathie (EDM) erforderlich, die teilweise gleiche histologische Merkmale bei sehr unterschiedlicher Lokalisation und Verteilung aufweisen. Beispielsweise basiert der Beweis der klinischen Relevanz einer zervikalen Wirbelsäulenmalformation mit vermuteter Instabilität und Rückenmarkskompression, auf der histopathologischen Diagnose einer Myelopathie. Dabei sind bestenfalls auf das zervikale Rückenmark beschränkte, malazische und hämorrhagische Läsionen zu erkennen (TROSTLE et al., 1993; SUMMERS et al., 1995b), aber oft eben auch nur verstreute Axonuntergänge nachweisbar.

Die Abgrenzung zu äquihistologischen Erkrankungen der Rückenmarksbahnen ergibt sich insbesondere in dem sich über die Längsachse verändernden topographischen Läsionsmuster im Epizentrum, sowie proximal und distal der Läsion (DE LAHUNTA et al., 2014b). Im Gegensatz zur zervikalen Myelopathie erstreckt sich die axonale Degeneration im Falle der EDM vom Hirnstamm über das zervikothorakale Rückenmark mit Schwerpunkt in letztgenannter Lokalisation (RECH und BARROS, 2015).

Ähnliche längenassoziierte axonale Erkrankungen sind sonst in erster Linie aus dem peripheren Nervensystem wie bei der laryngealen Hemiplegie bekannt, die sich aus den unterschiedlichen Längenverhältnissen der Nervi laryngei recurrentes ergibt (DRAPER und PIERCY, 2018). Pathohistologisch ist eine distale Axonopathie mit resultierender Demyelinisierung des betroffenen Nerven nachweisbar (CAHILL und GOULDEN, 1987; HAHN et al., 2008; CLERCQ et al., 2018).

Ebenfalls auf bestimmte Areale des Rückenmarks und des Hirnstammes konzentriert, allerdings ohne eigentlichen Längengradienten, sind die Nervenzellveränderungen bei der equinen Motoneurondegeneration (EMND). Bei dieser schweren, zum Teil durch Vitamin E-Mangel provozierten ZNS-Erkrankung, sind die Veränderungen spiegelsymmetrisch auf beiden Seiten des spinalen Ventralhorns sowie in motorischen Kerngebieten des Hirnstammes zu finden (SUMMERS et al., 1995a; RECH und BARROS, 2015).

Auch weitere Systemerkrankungen auf Basis metabolischer, toxischer oder neurodegenerativer Missstände betreffen meist selektiv vulnerable Regionen auf eine bilateral symmetrische Weise. In - für den/die Diagnostiker/-in - idealer Weise zeichnen sich diese bereits makroskopisch durch bilaterale, abgegrenzte und über eine Rückenmarks- oder Hirnscheibendicke reichende Nekrosezonen ab. Beispielsweise wäre dies bei der nigropallidalen Enzephalomalazie (NPE) nach Intoxikation mit Nekrosen in Substantia nigra und Globus pallidus der Fall (CORDY, 1954; FOWLER, 1965; YOUNG et al., 1970b, 1970a; RECH und BARROS, 2015).

Uni- oder bilateral, aber niemals symmetrisch, stellt sich auch die Fütterungs-assoziierte Leukoenzephalomalazie dar, bei der die Erweichung (Malazie) vorwiegend die subkortikale telenzephal (Enzephalon), weisse (Leuko) Substanz im Centrum semiovale und der Corona radiata betrifft (ROONEY, 1970; RECH und BARROS, 2015).

Die bilateralen und lokal zugeordneten Läsionen erlauben bereits ohne Giftnachweis makroskopisch eine ätiologische Diagnose und damit Sofortmaßnahmen zum Schutz anderer Tiere. Histologisch gelingt die Interpretation wiederum nur, wenn die Herkunft des Gewebestückes in Hinblick auf die Hirnanatomie und enthaltene Kerngebiete eindeutig nachvollzogen werden kann. Insbesondere nach Zusendung von Material, das von anderen Personen gewonnen wurde und ganz generell bei Entnahme sehr kleiner Proben, kann diese notwendige Orientierung für den Pathologen/ die Pathologin jedoch schwierig sein.

Noch schwieriger gestaltet sich die Situation bei Krankheiten, die makroskopische Läsionen vermissen lassen. Hier dienen gegebenenfalls nur die Klinik, Befunde aus der Bildgebung und pan-repräsentative systematische Beprobungen als Hilfe.

Insbesondere unter solchen Umständen sollte die zu untersuchende Person auf die klinische Neurolokalisation und neurologische Kardinalsymptome achten. Doch selbst bei einer korrekten symptomatogenen Zuordnung einer Erkrankung müssen sowohl Größe als auch Komplexität der funktionellen Systeme bei der Probennahme berücksichtigt werden.

Beispielsweise fallen Araberfohlen mit hereditärer zerebellärer kortikaler Degeneration mit Kleinhirnsymptomatik auf, längst bevor die sogenannte Abiotrophie in der Magnetresonanztomographie (MRT) sichtbar ist. Die definitive Diagnose des Syndroms obliegt in diesen Phasen der Histologie (PONGRATZ et al., 2010; CAVALLERI et al., 2013). Allerdings ist der kaudale Kleinhirnlappen signifikant weniger betroffen und kann in der Frühphase der klinischen Erkrankung gänzlich normal wirken (TURNER-BEATTY et al., 1985; MACKAY, 2008).

Einerseits ist dieser Gradient ein Charakteristikum der genetischen Kleinhirn-degeneration im Vergleich zu beispielsweise toxischen Purkinjezelluntergängen, und damit diagnostisch relevant. Andererseits müssen diese möglichen Verteilungsschwankungen innerhalb einer Systemerkrankung in den Entnahmeprotokollen für eine zuverlässige histologische Hirnuntersuchung abgebildet sein.

Die möglichen Variablen in der Läsionsdistribution müssen auch in der Tiefenebene berücksichtigt werden. Dies gilt insbesondere bei denjenigen Krankheiten, die sich bevorzugt am Übergang von weißer zu grauer Substanz abspielen. Beim hepatoenzephalen Syndrom sind die histologischen Veränderungen beispielsweise meist in Astrozyten (Alzheimer Typ 2) genau dieses

Grenzgebiets im zerebralen Kortex und den Basalkernen nachweisbar (VANDEVELDE et al., 2012; RECH und BARROS, 2015). Um den Verdacht auf eine Intoxikation, der bereits im Vorfeld durch etwaige chemisch-toxikologische Untersuchungen entstanden ist, zu erhärten, müssen genannte Regionen in der postmortalen Untersuchung somit unbedingt identifiziert werden.

Auch den idiopathischen bzw. immun-vermittelten neurologischen Erkrankungen des Pferdes würde man eine symmetrische Ausprägung entsprechend der Ausstattung mit Zielantigenen unterstellen. Dem ist allerdings nicht so. Bestes Beispiel hierfür ist die Polyneuritis equi (PNE), welche durch eine ungleichmäßige Verdickung der extraduralen sakralen und kaudalen Spinalwurzeln (Cauda equina), aber unter Umständen auch nur durch Kopfnerven- und periphere Einzelnervenausfälle, gekennzeichnet ist (SUMMERS, 1995a; FURR, 2008; DE LAHUNTA et al., 2014a). Das Bild der Mononeuropathie multiplex findet sich aber vereinzelt auch bei anderen Erkrankungen des peripheren Nervens mit Immunkomponente, wie der Acquired Equine Polyneuropathy (AEP), die ohne proximodistale Gradienten und asymmetrischer Läsionsverteilung mit dem Verlust von myelinisierten Nervenfasern und einer axonalen Atrophie einhergeht (HANCHE-OLSEN et al., 2017).

Die äußerst seltenen, immun-medierten Hirnerkrankungen des Pferdes, wie die granulomatöse Meningoenzephalitis, können dagegen fokal oder multifokal, großflächig und invasiv auftreten (SUMMERS, 1995b; PETERS et al., 2003). Makroskopisch unterscheiden sie sich dabei nicht von der Leukoenzephalomalazie oder ZNS-Tumoren.

Primäre ZNS-Tumoren kommen bei Pferden im Vergleich zu anderen Spezies sehr selten vor und können nur durch die systematische postmortale Beprobung, welche symptomatogene Zonen und möglicherweise assoziierte Hirnnerven miterfasst, erkannt und differenziert werden (PARADIS, 1998).

Viel häufiger als primäre Tumoren treten hingegen raumfordernden Prozesse in Form von Hypophysenadenomen oder Cholesteringranulomen im Plexus choroideus auf (JACKSON et al., 1994; PARADIS, 1998), die durch ihre fokale Lokalisation leicht auffindbar sind.

Die sekundären Tumoren (= Metastasen) verhalten sich in ihrem Verteilungsmuster hingegen, entsprechend ihrer hämatogenen Einsaat, multifokal asymmetrisch. Solide Tumormetastasen (z.B. des malignen Melanoms) bleiben allerdings zumeist in den sogenannten Wasserscheidenbereichen der grauen Substanz hängen und wachsen gut umschrieben, egal wie bösartig der Primärtumor war (COVINGTON et al., 2008; METCALFE et al., 2013).

Metastasierende Rundzelltumoren, wie Lymphome überschreiten dagegen gerne die Bluthirnschranke und invadieren angiozentrisch das Neuroparenchym, wo immer ihnen das möglich ist (PARADIS, 1998; ADOLF et al., 2001). Sie können darüber hinaus auch diffus die

Meningealräume bevölkern und damit eine Meningitis vortäuschen (LESTER et al., 1992; PARADIS, 1998). Eine Diagnose und Differenzierung ist nur mikroskopisch möglich.

Die zum Teil selektiven neuroanatomischen Prädilektionszonen wie auch die Verteilungsmuster inklusive Seitenverteilung von Läsionen im equinen ZNS lassen oft entscheidende ätiologische Rückschlüsse zu und machen die Notwendigkeit einer systematischen Beprobung relevanter Kandidatenregionen deutlich. Dabei ist die Kenntnis über die Herkunft der beprobten Hirnregion sowohl für die verlässliche Abklärung von Differentialdiagnosen als auch für die Vergleichbarkeit verschiedener interkontinentaler Gewebstudien zur epidemiologischen und ätiopathogenetischen Forschung von entscheidender Bedeutung.

4. Derzeitige Verfügbarkeit dezidierter Sektionsanleitungen & Zielsetzung der Studie

Insbesondere Erkrankungen, welche makroskopische Läsionen vermissen lassen oder solche mit asymmetrischer, diffuser oder multifokaler Distribution, sind postmortal nur durch eine systematische Blindbeprobung aller relevanten Subsysteme des Gehirns nachweisbar.

Die Differenzierung von Krankheiten mit überschneidenden histologischen Merkmalen bei unterschiedlicher Lokalisation gelingt dabei nur, wenn die topographische Zuordnung der jeweiligen Hirnprobe für den untersuchenden Pathologen am Mikroskop eindeutig nachvollzogen werden kann.

Gleichzeitig sind fokale Läsionen nur nachweisbar, wenn betroffene Regionen in der Sektion auch aufgefunden werden können.

Ergebnisse aus intravital durchgeführten neurophysiologischen Tests (Elektroenzephalographie (EEG), transkranielle magnetisch-evozierte Potenziale (TC-MEP)) und intra- oder „supravital“ durchgeführten bildgebenden Verfahren, können für zuschneidende Praktiker/-innen und Pathologen/-innen dabei als Leitschiene wirken.

Durch die Diskrepanz zwischen Neuroimaging und postmortaler Neuroanatomie in Bezug auf Probengröße, Maßstab und Auflösung, fällt die Orientierung am voluminösen Pferdegehirn ohne die Zuhilfenahme vordefinierter externer Orientierungspunkte allerdings schwer (ANNESE, 2012; NITZSCHE et al., 2015; JOHNSON et al., 2019), insbesondere wenn keine detaillierten dreidimensionalen neuroanatomischen Kenntnisse vorliegen.

Zur mutmaßlichen Vollständigkeit der Beprobung trägt indessen eine systematische Untersuchung von Kandidatenregionen definierter Vulnerabilität, symptomatogener Zonen und aller größeren Funktionskreise des Hirns bei.

Im gleichen Zug hat jedoch jede noch so präzise ausgewählte Gewebsprobe des Hirnes nur in dem Maße Aussagekraft, wie Artefakte durch die Entnahme, Fixierung, Gewebsverarbeitung, Einbettung, Mikrotomie sowie Färbe- und Einbettverfahren verhindert oder reduziert werden können (TAQI et al., 2018).

Die Histologie ist nämlich nur insofern in der Lage, Krankheiten und Ätiologien aufzuklären, als die betroffenen Bereiche auch repräsentativ auf den postmortal entnommenen Proben und den daraus hergestellten Schnitten unter Erhalt der Zellstruktur abgebildet sind.

Für die pathologische Praxis ist deshalb ein robustes Sektionsprotokoll erforderlich, dass sowohl verlässlich und reproduzierbar als auch schnell und praktikabel ist und von Personen mit heterogenem neuroanatomischem Wissen und variierender Geschicklichkeit eingesetzt werden kann.

In bisher publizierten Studien wird bei Verdacht auf eine neurologische Erkrankung simpel der Wunsch nach einer an die Routine-Sektion angeschlossenen Untersuchung der Wirbelsäule, des Schädels und des Nervensystems geäußert (ROONEY, 1970; LAUGIER et al., 2009; TAPPREST und LAUGIER, 2012). Zur vollständigen Aufarbeitung sollen dabei Gehirn, Rückenmark, Ganglien sowie periphere Nerven und Muskeln einer wenig definierten Untersuchung unterzogen werden (RECH und BARROS, 2015).

Während wenigstens die Entnahme von Gehirn und Rückenmark und deren makroskopische Beurteilung in Sektionsanleitungen in Grundzügen beschrieben sind (MCFADYEAN, 1884; ROONEY, 1970; FRANK et al., 2015), umfassen Anweisungen zur makroskopischen Hirnsektion lediglich die monoplanare (koronale im Originaltext) Lamellierung zu diagnostischen Zwecken oder die multiplanare Dissektion zu anatomisch-topographischen Lehrzwecken (MCFADYEAN, 1884; ROONEY, 1970).

Neuroanatomische Eingrenzungen zu Untersuchungsgebieten finden sich lediglich als Einzelbeschreibungen bei bestimmten Krankheiten und Syndromen, wie für das Kleinhirndach beim Shivering-Syndrom (VALBERG et al., 2015), den Hippocampus bei der Bornaschen Krankheit (JOEST, 1911) sowie definierten Bahnen und Kerngebieten in Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark bei der degenerativen Myeloenzephalopathie (EDM) und anderen Arten der neuroxanalen Dystrophie (SISÓ et al., 2003; FINNO et al., 2011; FINNO et al., 2016).

Mit Ausnahme der Transversaldarstellung zur Erleichterung der topographischen Zuordnung der Rückenmarksbahnen, finden sich kaum Angaben zur geeigneten Schnittführung. Das gilt insbesondere für Strukturen mit komplexer dreidimensionaler Ausrichtung, wie dem

Hippocampus. Hier sind keinerlei konkrete Angaben zu Unterschieden in der Längsachse geschweige denn Hilfestellungen zur perpendikulären Schnittführung für das Pferd verfügbar. Gerade bei großen asymmetrisch gyrenzephalen Gehirnen, wie dem der Equiden, stellt der Anisotropismus eine große Herausforderung dar. Da viele Gehirnregionen zudem ein komplexes Konnektom sowie eine dreidimensionale Zytoarchitektur aufweisen, sind monoplanare Ansätze, die auf empirischen Transversal-, Sagittal-, oder Horizontalschnitten basieren, zur Darstellung dieser Strukturen wenig geeignet (MCFADYEAN, 1884; DEXLER, 1899; MATIASEK et al., 2015).

In Ermangelung speziesspezifischer Vorgaben, wurde in dieser Doktorarbeit daher ein Protokoll erarbeitet, das eine systematische und repräsentative Beprobung des Equidenhirns in geeigneten Winkeln und Schnittlinien, unter Berücksichtigung der dreidimensionalen Organisation wichtiger Kandidatenregionen sowie der Grenzen der wichtigsten Gefäßterritorien berücksichtigt. Das Protokoll hatte zum Ziel, bei „blinder“ Durchführung eine optimale histologische Darstellung und Beurteilbarkeit der Gewebsarchitektur in Bezug auf Dicke/Volumenverhältnisse, Zellularität und Schichtung zu ermöglichen.

Es orientiert sich dabei am Konsensbericht der International Veterinary Epilepsy Task Force (IVETF) zur Beprobung epileptischer Hunde- und Katzengehirne (MATIASEK et al., 2015), unter Berücksichtigung pferdespezifischer neuroanatomischer Gegebenheiten. Durch die Zuhilfenahme externer Orientierungspunkte und mit Hilfe von geometrischen Instruktionen, soll die Neurolokalisierung von allerlei Hirnläsionen somit auch für Personen, die nicht in der Neuropathologie tätig sind, erleichtert und replizierbar gemacht werden. Damit soll sowohl die Aufarbeitung equiner neurologischer Erkrankungen im Feld verbessert, wie auch der Vergleich neuropathologischer Befunde zwischen verschiedenen veterinärpathologischen Einrichtungen ermöglicht werden.

III. PUBLIKATION

A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain - Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts

Maya-Lena Bitschi¹, Zoltán Bagó², Marco Rosati¹, Sven Reese³, Lutz S. Goehring⁴, Kaspar Matiasek¹

¹Section of Clinical and Comparative Neuropathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

²Austrian Agency for Health and Food Safety Ltd. (AGES), Institute for Veterinary Disease Control, Mödling, Austria

³Department of Veterinary Sciences, Institute of Anatomy, Histology & Embryology, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

⁴Division of Medicine and Reproduction, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Equine Hospital, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

Frontiers in Neuroanatomy, veröffentlicht

Frontiers in Neuroanatomy 2020 December; Volume 14: Article 614929

doi: 10.3389/fnana.2020.614929



A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain—Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts

Maya-Lena Bitschi¹, Zoltán Bagó², Marco Rosati¹, Sven Reese³, Lutz S. Goehring⁴ and Kaspar Matiasek^{1*}

¹ Section of Clinical and Comparative Neuropathology, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany, ² Austrian Agency for Health and Food Safety Ltd. (AGES), Institute for Veterinary Disease Control, Mödling, Austria, ³ Department of Veterinary Sciences, Institute of Anatomy, Histology & Embryology, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany, ⁴ Division of Medicine and Reproduction, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Equine Hospital, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Paul Manger,
University of the Witwatersrand,
South Africa

Reviewed by:

Nina Patzke,
Hokkaido University, Japan
Adhil Bhagwandin,
University of Cape Town, South Africa

*Correspondence:

Kaspar Matiasek
kaspar.matiasek@neuropathologie.de

Received: 07 October 2020

Accepted: 25 November 2020

Published: 18 December 2020

Citation:

Bitschi M-L, Bagó Z, Rosati M, Reese S, Goehring LS and Matiasek K (2020) A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain—Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts. *Front. Neuroanat.* 14:614929. doi: 10.3389/fnana.2020.614929

Introduction of new imaging modalities for the equine brain have refocused attention on the horse as a natural model for ethological, neuroanatomical, and neuroscientific investigations. As opposed to imaging studies, strategies for equine neurodissection still lack a structured approach, standardization and reproducibility. In contrast to other species, where adapted protocols for sampling have been published, no comparable guideline is currently available for equids. Hence, we developed a species-specific slice protocol for whole brain vs. hemispheric dissection and tested its applicability and practicability in the field, as well as its neuroanatomical accuracy and reproducibility. Dissection steps are concisely described and depicted by schematic illustrations, photographs and instructional videos. Care was taken to show the brain in relation to the raters' hands, cutting devices and bench surface. Guidance is based on a minimum of external anatomical landmarks followed by geometric instructions that led to procurement of 14 targeted slabs. The protocol was performed on 55 formalin-fixed brains by three groups of investigators with different neuroanatomical skills. Validation of brain dissection outcomes addressed the aptitude of slabs for neuroanatomical studies as opposed to simplified routine diagnostic purposes. Across all raters, as much as 95.2% of slabs were appropriate for neuroanatomical studies, and 100% of slabs qualified for a routine diagnostic setting. Neither autolysis nor subfixation significantly affected neuroanatomical accuracy score, while a significant negative effect was observed with brain extraction artifacts. Procedure times ranged from 14 to 66 min and reached a mean duration of 23.25 ± 7.93 min in the last of five trials in inexperienced raters vs. 16 ± 2.83 min in experts, while acceleration of the dissection did not negatively impact neuroanatomical accuracy. This protocol, derived analogously to the consensus report of the International Veterinary Epilepsy Task Force in dogs and cats, allows for systematic, quick and easy dissection of the equine brain, even for inexperienced investigators. Obtained slabs

feature virtually all functional subcompartments at suitable planes for both diagnostic and neuroscientific investigations and complement the data obtained from imaging studies. The instructive protocol and brain dissection videos are available in **Supplementary Material**.

Keywords: neuroanatomy, neuropathology, guideline, central nervous system, equine, horse, necropsy, brain atlas

INTRODUCTION

With domestication dating back to ~3,500 BC, the domestic horse (*Equus caballus*) has become a close companion to human beings through farm work, war, sports, and leisure. With its complex gyrified (Zilles et al., 2013; Cozzi et al., 2014) and voluminous brain, its distinct cognitive skills and predictive behavior in a controlled environment (Brubaker and Udell, 2016; Roberts et al., 2017), its accessibility for neurological examination and neurophysiological testing (Pickles, 2019; Rijckaert et al., 2019), its compliance to perform controlled exercise and its long lifespan, the horse has regained attention as a natural model for ethological, neuroanatomic, and neuroscientific studies (Cozzi et al., 2014; Roberts et al., 2017; Johnson et al., 2019).

Murine disease models, surely, are most prevalent (Ehret et al., 2017) due to their easy handling, rapid reproduction, and genetic and environmental standardizability in a laboratory setting. However, regenerative capacities of the central nervous system between rodents and larger mammalian species differ significantly, and rodents' relatively short lifespans barely allow for modeling of longevity-associated phenomena, such as in neurodegeneration (Morton and Howland, 2013). Moreover, the rodent brain and skull architecture barely reflects human neuroanatomy from a topofunctional point of view (Morton and Howland, 2013; Potschka et al., 2013). Small brain volumes render certain interventional and diagnostic maneuvers, such as collection of cerebrospinal fluid (CSF) (Lim et al., 2018) and electroencephalography (EEG) (Potschka et al., 2013), more difficult and increase procedure-related morbidities.

Beyond these considerations, horses share a susceptibility as accidental hosts for multiple anthrozoönotic pathogens that affect the nervous system, such as Hendra and Nipah virus (HeV, NiV), West Nile virus (WNV), Japanese encephalitis virus (JEV), Ilheus virus (ILHV), St. Louis encephalitis virus (SLEV), Powassan virus (POWV), tick borne encephalitis virus (TBEV), Western equine encephalitis virus (WEEV), Eastern equine encephalitis virus (EEEV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), Rabies virus (RV), and Borna disease virus-1 (BoDV-1) (Richt et al., 2000; Furr and Reed, 2007c; Carrera et al., 2018; Kumar et al., 2018; Barba et al., 2019; Liesche et al., 2019). Therefore, the horse serves as an indicator species for regional risk of infection and sometimes mirrors similar brain pathologies upon contagion as human patients (David and Abraham, 2016; Kumar et al., 2018; Liesche et al., 2019; Niller et al., 2020).

To understand the pathobiology of neurological diseases and to translate assumptions across species, it is a prerequisite to accurately identify the localization, distribution, and functional and topographic relationship of brain pathologies in the

respective species (Nitzsche et al., 2015). To date, the specifics of equine neuroanatomy are featured primarily in topographical literature (Yoshikawa, 1968; Sisson et al., 1975; Nickel et al., 2004; Furr and Reed, 2007b) and studies on specific syndromes describing well-confined brain areas, such as the cerebellar roof and tracts in shivers (Valberg et al., 2015), the hippocampus in BoDV-1 (Joest, 1911) and the cerebellum, brain stem and spinal tracts in case of equine degenerative myeloencephalopathy (EDM) and other types of neuroaxonal dystrophy (Siso et al., 2003; Finno et al., 2011, 2016).

With the implementation of advanced neuroimaging methodologies, neuroanatomy in the field of equine neurology has become relevant for clinicians again, and our functional understanding has steadily increased (Manso-Diaz et al., 2015; Pease et al., 2017). Therefore, imaging has already enabled and supported important clinical-diagnostic (Audigie et al., 2004; Cavalleri et al., 2013; Holmes, 2014), neuroanatomical (Chaffin et al., 1997; Johnson et al., 2019; Schmidt et al., 2019) and neurodevelopmental (Scola et al., 2018) studies in this species. As in other generic groups, magnetic resonance imaging (MRI) scans in particular have proven to be the most sensitive intravital imaging modality (Hecht and Adams, 2010; Holmes, 2014).

Brain imaging templates and atlases rendered via MRI, including diffusion-weighted-imaging (DWI) and fluid-attenuated-inversion-recovery (FLAIR) sequences, have enabled unprecedented mapping and measurement of white matter (WM), gray matter (GM), CSF, and subcortical brain structures (Stuckenschneider et al., 2014; Johnson et al., 2019). The neuroanatomical resemblance has been nicely demonstrated in comparison to tissue studies (Stuckenschneider et al., 2014; Kimberlin et al., 2016; Johnson et al., 2019; Schmidt et al., 2019).

Therefore, researchers can be adequately guided to target affected areas on postmortem follow-up (Stuckenschneider et al., 2014; Schmidt et al., 2019). In spite of this, clinical scanners might provide evidence of brain lesion in only 30% of neurological cases (Manso-Diaz et al., 2015). In particular, failure is likely to occur in slowly progressing neurodegenerative diseases that are accompanied by sparse signal changes and poor contrast enhancement, such as cerebellar cortical degeneration in Arabian horses, which remains unseen until brain atrophy causes increased subarachnoid space (Cavalleri et al., 2013).

While macroanatomical changes coming along with blood brain barrier disruption or critical fluid shifts may easily be diagnosed by medical imaging, subtle tissue changes must await histopathology for definitive diagnosis (Annese, 2012; Cavalleri et al., 2013).

Histological examination, on the other hand, can shed light on a disorder only if the affected area is presented on the slide and

cells have been sufficiently preserved. Thus, histology contends with a high risk of sampling bias and artifact (Annese, 2012; Taqi et al., 2018), while MRI studies seemingly provide a gap-free view of the in depth composition of an entire tissue. Prelocalization by MRI could possibly allow postmortem visualization of the lesion or area of interest if predefined external landmarks are preserved, a Cartesian coordinate system (x; y; z) (Nitzsche et al., 2015; Johnson et al., 2019) may be applied, that implements postmortem deformation and shrinkage by fixation, and if the inclination of the blade is guided by a dissection aid adaptable to the geometry of the individual brain. These prerequisites cannot be easily met in a diagnostic lab with personnel heterogeneous in their neuroanatomical skills and dexterity with concomitant time pressure due to high caseloads.

In this study, we aim to provide a freely available, robust, practicable and transferable guide for systematic trimming and sampling of fixed equine brain tissue. This protocol allows sampling of virtually all major functional circuits, vascular territories and pathoclastic¹ target areas even without specific neuroanatomical knowledge by the applicant. The introduced protocol takes advantage of experiences from the consensus report of the International Veterinary Epilepsy Task Force (IVETF) for sampling epileptic dog and cat brains (Matiasek et al., 2015) after adaptation to equine species-specific methods. Thorough neuronavigation is warranted by referring to simple anatomical landmarks supplemented by geometric instructions for blade localization and the plane of section.

By this guidance, brain regions affected by neurological diseases or foci of scientific interest are expected to be reliably and reproducibly traced and provided for histological inspection in a suitable plane, corresponding to the three-dimensional histoarchitecture of specific key areas such as hippocampus. Notably, a detailed knowledge of included areas by the pathologist in the field is not necessary. The rater can be guided remotely to sample the target area simply by referring to the specific slab number.

Moreover, based on this systematic approach, both, population average-based histological data and imaging data could complement each other for the creation of multimodal equine brain atlases and still preserving the optimal slice orientation for histology and histomorphometry.

MATERIALS AND METHODS

Case Selection

The investigation enrolled a cohort of 55 individuals, including mares, geldings and stallions, of various breeds delivered for postmortem examination to the Institute of Veterinary Pathology, LMU, Munich, and the Austrian Agency for Health and Food Safety Ltd. (AGES), Mödling, for causes unrelated to the purpose of this study. Cases were non-selectively collected in a sequential manner if the entire brain tissue was available for examination and if physical preservation allowed for appropriate histoprocessing. Cases were excluded if preservation of the brain

¹According to Oscar and Cécile Vogts' concept of selective vulnerability of different brain regions.

was inadequate or if gross lesions interfered with application of all steps of the dissection protocol in both hemispheres.

The study did not lead to a different approach nor to procurement of other or larger volumes of tissue compared to routine autopsy. As the requested diagnostic examinations could be sufficiently performed on the sampled material, the procedures were exempt from Institutional Animal Care and Use Committee review as confirmed by the Ethics Commission of the Centre for Veterinary Clinical Medicine of the LMU Munich (AZ 199-04-02-2020).

Equipment

The equipment used in this study is the standard equipment ubiquitously available in pathological facilities and is listed in **Supplementary Table 1 (Data Sheet 1)**. Instruments used for conducting the protocol are depicted in **Figure 1**.

Gross Procedures

After measurement (≤ 100 kg) or calculation (>100 kg) of the dead body weight (DBW), carcasses underwent routine dissection for post-mortem examination (Rooney, 1971; Frank et al., 2015). Following superficial dissection and evisceration, the central nervous system was removed. Thereby, an extensive craniectomy-durotomy-encephalotomy approach was chosen after separation of the head by decapitation at the atlanto-occipital articulation. The exposed brain was evaluated for evidence of autolysis graded as follows: 0: fresh, 1: no macroscopic evidence of autolysis, 2: mild autolysis or 3: moderate autolysis. Marked autolysis (grade 4) and decomposition (grade 5) were considered exclusion criteria. Adult brains were immediately immersed in 10% neutral-buffered formalin [after Lillie (Lillie, 1954)], while those of fetuses and neonates were fixed in zinc formalin [modified by the authors MLB, MR and KM after Fortier and Hould (Fortier and Hould, 2013)]. The tissue to fixative ratio was strictly held at 1:10 (Furr and Reed, 2007a). Brains were left in the fixatives at room temperature for at least 7 days (for details of formulation see **Supplementary Table 2, Data Sheet 1**).

Just before further processing, brains were removed from the fixative, and excess was allowed to drip-off and was wiped-off using paper towels before the whole brain weight (BW) and brain volume (BV) were recorded. The latter was calculated based on water displacement in a standardized setting. Handling and transport of all specimens corresponded to institutional biosecurity recommendations, and brain dissection was performed at a ventilated pathology bench.

Development and Introduction of the Protocol

The dissection protocol was elaborated based on collective institutional experiences in equine neuropathology and standardized in analogy to the International Veterinary Epilepsy Task Force (IVETF) guideline for dissection of canine and feline brains (Matiasek et al., 2015). Procedures were adapted to anatomical specificities of the equine brain, such as gyration, brain ratios, orientation and angulation of specific structures and regions (e.g., hippocampus)

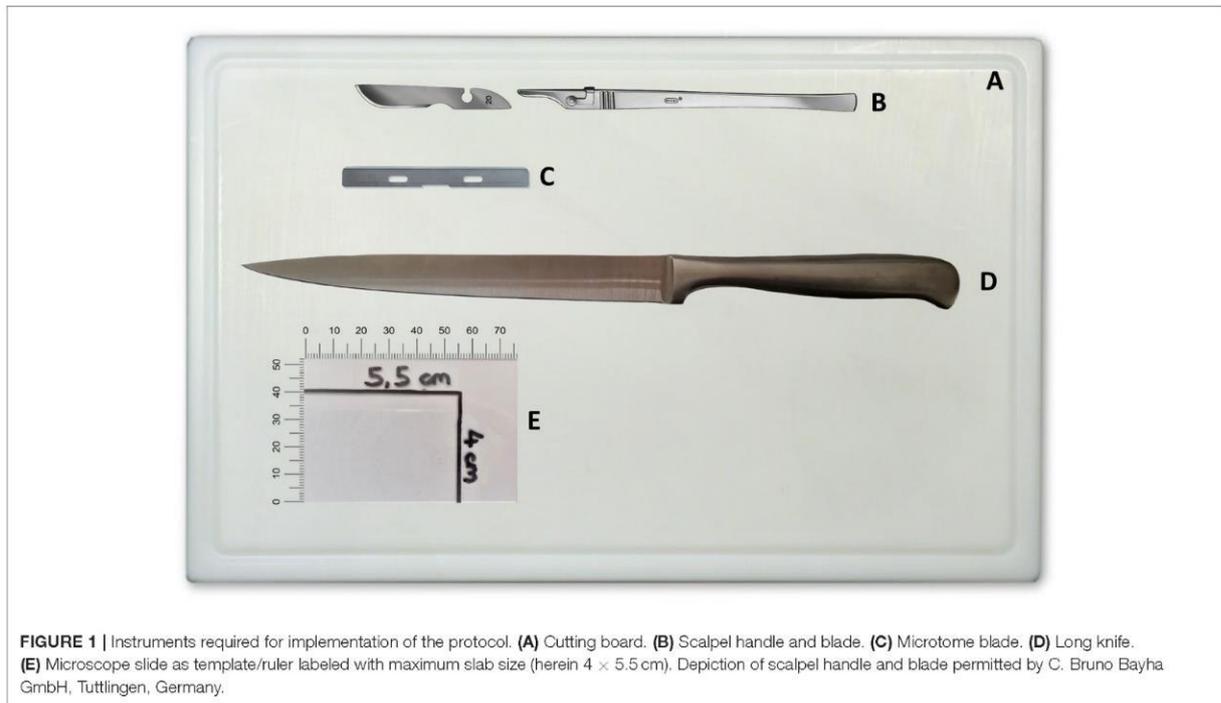


FIGURE 1 | Instruments required for implementation of the protocol. **(A)** Cutting board. **(B)** Scalpel handle and blade. **(C)** Microtome blade. **(D)** Long knife. **(E)** Microscope slide as template/ruler labeled with maximum slab size (herein 4 × 5.5 cm). Depiction of scalpel handle and blade permitted by C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Germany.

(Yoshikawa, 1968; Sisson et al., 1975; Nickel et al., 2004; Furr and Reed, 2007b). Thereby, perpendicular depiction of anatomical structures was heeded. The objective was to provide a robust and easy-to-perform protocol, even for inexperienced raters, to ensure reproducible and adequate sampling of virtually all functional subcompartments of the equine brain for both subsequent diagnostic (neuropathological) and neuroscientific investigations.

To facilitate the application, anatomic images and videos were created from six equine subjects in advance of the study. The dissection protocol is introduced in detail in the supplemental attachments (**Data Sheets 3–5; Supplementary Videos 1–3**).

Introduction of the Participants

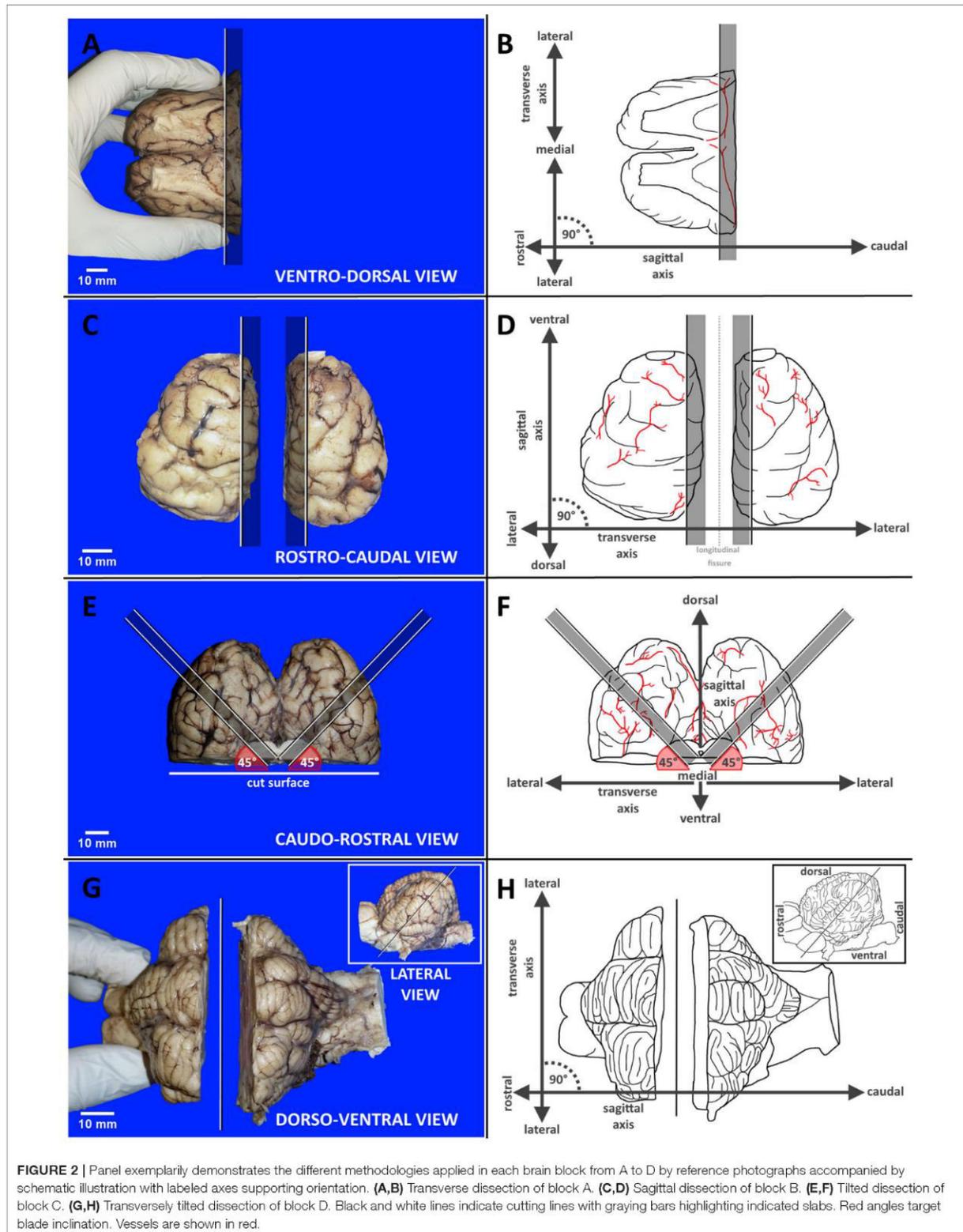
Applicability and aptitude of the protocol *in praxi* were tested in three groups of raters ($n = 11$; all right handed), ranging from undergraduate students (group I; $n = 4$) to personnel with either basic (group II, $n = 5$) or profound (group III, $n = 2$) experience in macroanatomy of the equine brain. All participants were introduced to the approach immediately before conduction of the procedure at the bench. Instruction was assisted by illustrated booklets (**Data Sheets 3–5**) and instructional videos (**Supplementary Videos 1–3**).

First, the investigators were familiarized with the geometric planes and orientations, primary external neuroanatomical landmarks and the equipment required for dissection. Each dissection step was concisely described and depicted by photographs showing the respective region of the brain in relation to the raters' hands and cutting devices. The

methodology applied in each brain block is exemplarily illustrated in **Figure 2**. Essential steps and caveats were listed stepwise in a table and were accompanied by schematic illustrations of important landmarks. Wherever possible, the nomenclature of the current *Nomina Anatomica Veterinaria* was applied (Nav, 2017). Steps were numbered in the order of their recommended performance, from 1 to 21. Orientation of the cuts was either transverse (TS), sagittal (SAG), laterally tilted (TILT) or transversely tilted (TS-TILT). Positioning and inclination of the blade and direction of the cuts were illustrated using color-labeled anatomical landmarks, while subsequent cuts were explained in simple geometrical terms wherever possible. For simplification of tissue handling, the brains were initially divided into 4 blocks by plain transverse sections. Precise instructions on how to handle and prepare the brain slabs were based on this 4-block-concept. If sliced according to the landmarks, slice to slice distance (equaling thickness of the brain slabs) varied slightly according to the individual brain volumes and dimensions of the hemispheres (see Discussion).

Implementation of the Protocol

Due to the restricted number of donated brains, the order of procedures was fixed as follows: Each participant performed dissections of 5 brains (trial 1–5), comprising 3 bihemispheric (1st, 4th, and 5th brain) and 2 hemispheric (2nd and 3rd brain, each left and right hemisphere) approaches. Raters were requested to start their first attempt no later than 30 min after self-instruction in the prescribed order and at a pace of their convenience. They were free to reconsult the script during



the procedure whenever needed. Participants were observed by the instructor without active interference. Total procedure time (TPT) in minutes, defined as time lapse between first positioning of the blade to the harvest of the last slab, was recorded for each rater. This time only encompassed orientation and hands-on performance. The time needed for macroscopic tissue examination and completion of a questionnaire was excluded from procedure time. For the questionnaire, raters were offered the immediate possibility to mention shortcomings in the comprehensibility and conduction of the protocol and to provide recommendations for further improvement. Moreover, assessment of each unit (block A to D) regarding identifiability of landmarks (1: easy; 2: fair; 3: moderate; 4: not possible) and subjective difficulties in implementation (1: easy; 2: fair; 3: moderate; 4: difficult) were recorded.

Complementary Parameters

On gross examination, state, preservation and macroscopic changes of the fixed brains were recorded by the instructor. This also included the degree of fixation (1: complete; 2: partial, centrally delayed; 3: poor overall). Measures for artificial damage and lesions were graded as follows: 1: no macroscopic alterations; 2: negligible alterations (e.g., incision marks originating from encephalotomy), 3: moderate alterations (e.g., partial avulsion of regions and structures) and 4: severe alterations (e.g., full avulsion of regions and structures).

Histoprocessing

Depending on the stage of fixation, a standardized panel of 14 brain slabs was post-fixed in the same types of fixative listed above for further 3–7 days. Specimens were subsequently sent for automatic tissue processing and paraffin embedding. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks were then cut in 5–7 μm slice thickness using a rotary microtome. Slides were stained with routine hematoxylin and eosin (H&E) and other neurohistological stains as diagnostically required.

Brain Slab Validation

The outcome of brain dissections was evaluated by the study leads with respect to neuroanatomical matching and quality of the slides. Evaluation addressed the aptitude for neuroanatomical studies as opposed to simplified routine diagnostic purposes. Analysts were blinded for rater and trial when reading slabs and slides. Neuroanatomical accuracy with respect to levels, structures and orientation of the slide was assessed by matching 36 anatomical and histological landmarks (criteria are listed in Table 1). For each item, sampling accuracy was semiquantitatively scored as either full match (1), partially featured (0.5) or not evident at all (0). Subsequently, whole slab accuracy for detailed neuroanatomical studies was graded as excellent (>80% of landmarks fully featured on the slide), sufficient (70–80% of landmarks fully featured on the slide) or insufficient (<70% of landmarks fully featured on the slide). For visual depiction, verification criteria were further classified in 3 colors: green if 93.1–100% of criteria reached score 1, yellow if 87.3–93% of criteria reached score 1 and red if <87% of criteria reached score 1. Slabs were considered problematic if

the relative mean score per slab was <90% within one of the groups. The dissection mode of the 1st slab was categorized in 3 groups: (1) if mainly hippocampus was presented on the slab, (2) if amygdala was the dominant structure of the ventral aspect of the slab, (3) if both structures were available or (4) if none of the criteria were present due to pre-existing tissue artifacts, obliquity or asymmetry of dissection. Apart from the inclusion of marker areas and landmarks, accuracy was further evaluated by assessment of (1) slide symmetry of right vs. left hemisphere and (2) achievement of prescribed cutting angles. Classification of symmetry was considered as either good (1), moderate (0.5) or not present (0) and deviation from prescribed cutting angle as either correct (1), mild deviation (0.5) or severe deviation (0). Slabs per group were considered problematic if < 70% of slabs reached a score of 1.

Statistical Analysis

Analyses were performed using IBM SPSS Statistics and GGraph commercial software (Version 26; IBM Corp., Armonk, New York, USA) and were based on uni- and bivariate statistics. Data for each correlation was analyzed for normality using a Shapiro-Wilk test or Kolmogorov-Smirnov test. Independence was evaluated by Chi-squared test. Correlations were performed using a Pearson correlation for normally distributed parametric data and a Kendall's rank (Kendall-Tau-b) correlation coefficient, as well as Mann-Whitney *U*-test, for non-normally distributed non-parametric data. Somers' D was used as a measure of agreement between pairs of ordinal variables. For identification of significant findings, data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's *post-hoc* test to identify pairs with significant differences. Comparison of related samples was performed by Wilcoxon test. The extent of variability in relation to the mean of the population was assessed by the coefficient of variation. As most values were not normally distributed, data are presented as the mean \pm SD (standard deviation) or median and interquartile range (IQR, 25th and 75th percentiles). Percentages describe discrete data. For visual depiction of non-parametric data, box and whisker plots were used. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Demographics

The investigated cohort included 17 mares (30.9%), 26 geldings (47.3%), and 12 stallions (21.8%) aged between 2 months ante partum (abortion) and 25 years. Seven individuals were adults of unknown age. Breeds encompassed Warmbloods ($n = 37$, 67.3%), Ponies ($n = 9$, 16.4%), Thoroughbreds ($n = 3$, 5.5%), Arabian horses ($n = 2$, 3.6%), and Draft horses ($n = 2$, 3.6%). Two animals ($n = 2$, 3.6%) belonged to other equine species. Tissue preservation was graded as fresh ($n = 15$, 29.1%), without macroscopic evidence of autolysis ($n = 20$, 36.4%), mild autolysis ($n = 15$, 27.3%), and moderate autolysis ($n = 4$, 7.3%). Details regarding the cases are shown in **Supplementary Table 3 (Data Sheet 2)**.

Weight and volume measurements were available for 22 cases ($n = 22$, 40%). The median dead body weight (DBW) was 275 kg

TABLE 1 | Demonstrates the 36 macro- and microscopic verification criteria regarding all 14 slabs for evaluation of neuroanatomical accuracy.

Block	Slab	Criterion	Anatomical and histological landmarks
A	1	C1	Hippocampal (syn. fornical) commissure
A	1	C2	Hippocampal temporoventral body (TVB)
A	1	C3	Piriform cortex and amygdaloid nucleus
A	1	C4	Rostral cerebral crus (crurocapsular transition)
A	1	C5	Mammillary bodies
A	2	C6	Parietooccipital cingulate gyrus
A	2	C7	Rostral (anterior) ventral nucleus
A	2	C8	Tail of caudate nucleus
A	2	C9	Optic tract (postchiasmatic segment)
A	3	C10	Accumbens nucleus
A	3	C11	Body of caudate nucleus
A	3	C12	Globus pallidus
A	3	C13	Putamen
A	3	C14	Internal capsule (rostral part)
B	4	C15	Subcortical white matter of marginal gyrus and of precruciate cingulate gyrus
B	5	C16	Perpendicular section of rostral composite gyrus
B	5	C17	Betz cells (microscopic) of frontal motor cortex
C	6	C18	Lateral geniculate nucleus
C	6	C19	Hippocampal temporoventral body (TVB)
C	7	C20	Occipital vertex of hippocampus
C	7	C21	Occipital apex of parahippocampal gyrus
C	8	C22	Subcortical white matter of marginal gyrus (occipital part) and of cingulate gyrus (cinguloparahippocampal transition)
C	8	C23	Occipital alveus of hippocampus
C	8	C24	Splenial sulcus
D	9	C25	Rostral colliculi
D	9	C26	Intercrural fossa
D	10	C27	Caudal and middle cerebellar peduncles
D	10	C28	Transverse fibers of pons
D	10	C29	Lingula of vermis
D	10	C30	Cerebellar roof nuclei (syn. deep cerebellar nuclei)
D	11	C31	Medial plane of rostral vermis
D	12	C32	Decussation of pyramis
D	13	C33	Cuneate and gracile nuclei
D	13	C34	Vagal and hypoglossal nuclei
D	14	C35	Mid sagittal uvula
D	14	C36	Area postrema

($n = 22$, IQR: 43.7–512.5), while median drip-off weight of whole brains post fixation (BW) was 558 g ($n = 22$, IQR: 353–665.3), and median brain volume (BV) was 625 cm³ ($n = 22$, IQR: 395–745). Based on these data, the relationship between BW and DBW was evaluated and presented in a non-linear, logarithmic fashion (Figure 3). Respective details of individual cases are shown in Supplementary Table 4 (Data Sheet 2).

Dissection Outcome

Application of the bihemispheric protocol delivered 14 brain slabs of 4 main brain blocks: slabs No. 1 through 3 out of

block A, No. 4 and 5 out of block B, No. 6 through 8 out of block C, and No. 9 through 14 out of block D (Figure 4). In contrast, hemispheric dissection delivered 28 slabs in total (14 per hemisphere).

Conduction Time

Total procedure time (TPT) throughout trials and groups ranged between 14 and 55 min (median 25, IQR: 18–40) for bihemispheric ($n = 33$) and 25–66 min (median 35, IQR: 29.5–40.25) for sequential hemispheric ($n = 22$) dissections. There was no significant difference in TPT between bihemispheric and hemispheric approaches within the individual skill groups [group I (Mann-Whitney- U , $p = 0.296$); group II (Mann-Whitney- U , $p = 0.060$); group III (Mann-Whitney- U , $p = 0.386$)]. In contrast, throughout all raters, dissection of the whole brain went significantly faster (Figure 5A; Mann-Whitney- U , $p < 0.05$). The time difference between cutting of left and right hemisphere throughout groups was significant (Wilcoxon-test, $p < 0.001$), with the right hemisphere being tailored faster than the left. In accordance with individual experiences, median TPT throughout the trials was 37 min in group I (IQR: 25–51.5), 30 min in group II (IQR: 20.5–38), and 25 min in group III (IQR: 17.3–35). TPT trended down with increasing skill of the investigator (Figure 5B; Kendall-Tau- $b = -0.286$, $p < 0.05$; One-way ANOVA, $p < 0.05$). However, an effect of neuroanatomical skill on velocity of trimming was significant between groups III and I (*post-hoc* Dunnett- $T = -12.350$, $p < 0.05$) and groups II and I (*post-hoc* Dunnett- $T = -8.130$, $p < 0.05$), where experienced raters performed faster than less experienced raters. All raters, independent of their onset skill, level became faster upon repetition of the protocol in consecutive sessions (Figure 5C; Kendall-Tau- $b = -0.663$, $p < 0.001$). Relative saving in TPT between the first (range 32–55 min, median 40, IQR: 38–55) and the last trial (range 14–35 min, median 18, IQR: 15–21) was 25.45 min on average, independent of the time span between the trials. Notably, acceleration across raters did not negatively impact anatomical accuracy (Pearson = -0.332 , $p < 0.05$). For details of individual TPTs, see Supplementary Table 5 (Data Sheet 2).

Brain Slab Accuracy

Across all raters, neuroanatomical accuracy score per brain was never below 60 out of 72 (maximum) points. Median accuracy throughout trials and raters was 68 points (IQR: 64.5–70.5). Inexperienced raters in group I achieved median scores of 65.5 points (IQR: 63.6–68.9), more experienced raters in group II achieved median scores of 68 points (IQR: 64.8–69.5), and experienced investigators in group III scored a median of 71.8 points (IQR: 68.8–72). Total median scores throughout trials and groups were 68.5 (IQR: 64.25–70.5) for bihemispheric and 68 (IQR: 64.6–70.5) for sequential hemispheric dissections. Therefore, differences in scoring between bihemispheric and hemispheric dissections did not reach a level of significance (Figure 6A; Mann-Whitney- U , $p = 0.776$). Neuroanatomical accuracy scores were not significantly different between left and right hemisphere (Wilcoxon-test, $p = 0.832$). However, scores were significantly higher in groups with higher levels

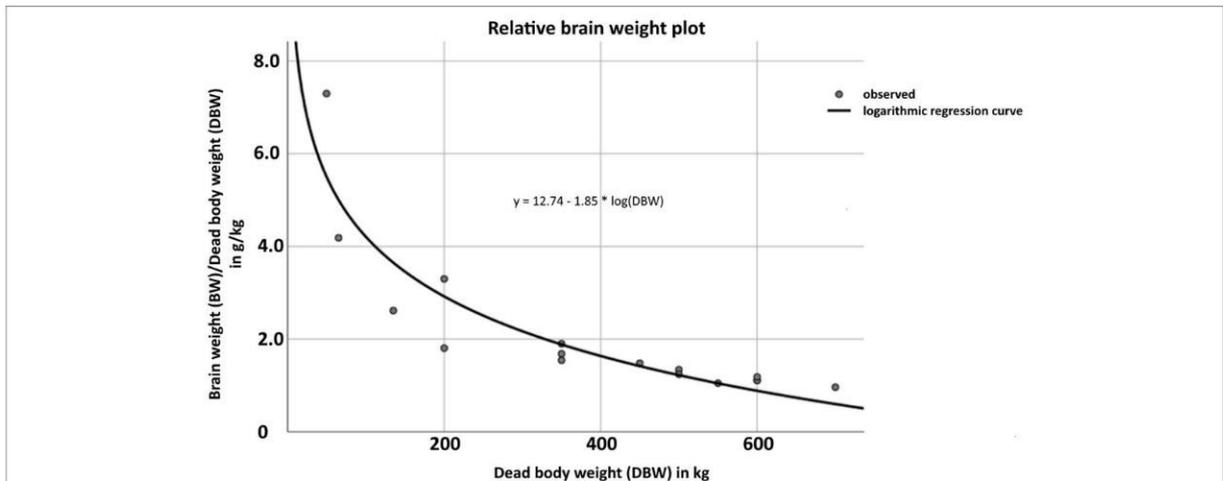


FIGURE 3 | Demonstration of the logarithmic, non-linear relationship (logarithmic regression curve) between dead body weight (DBW) in kg (x-axis) and brain weight (BW) post fixation in g (y-axis) according to the formula $y = 12.74 - 1.85 * \log(DBW)$. Details of individual cases are shown in **Supplementary Table 4 (Data Sheet 2)**.

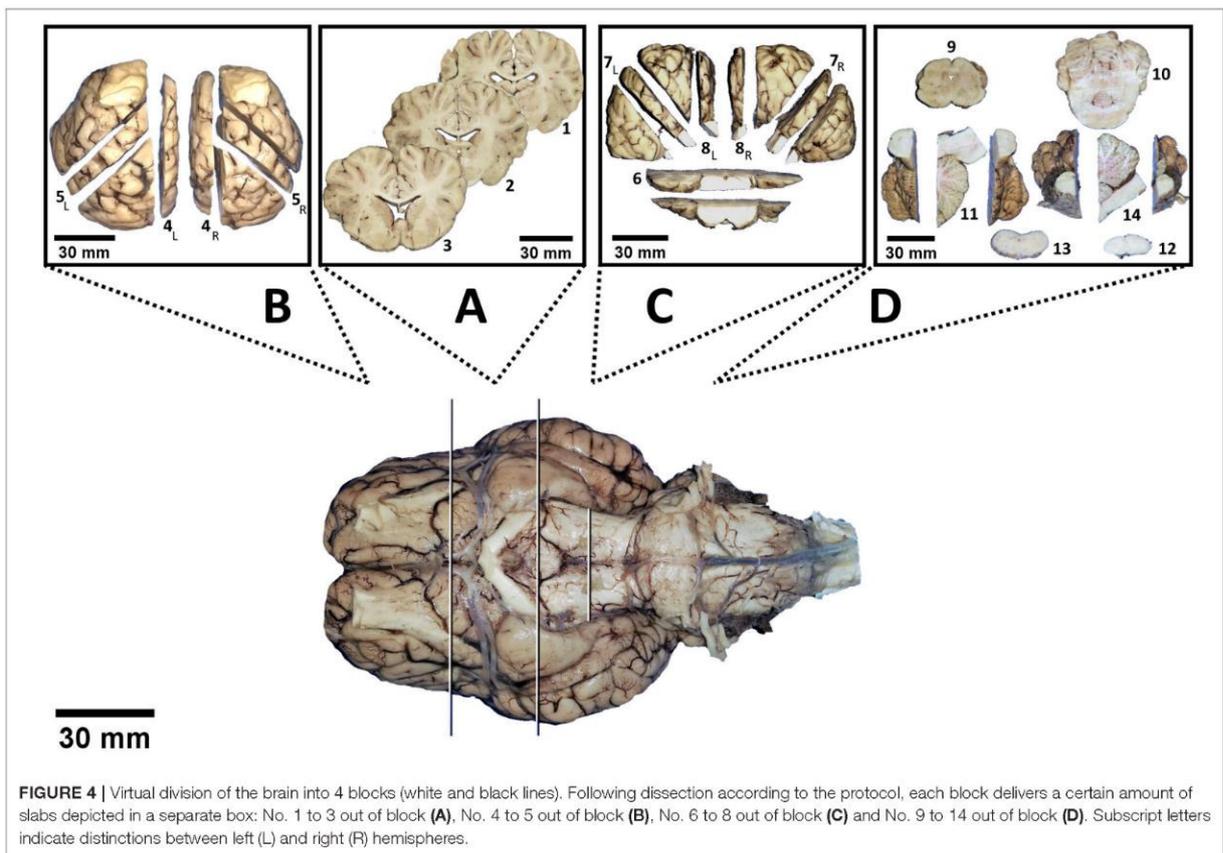
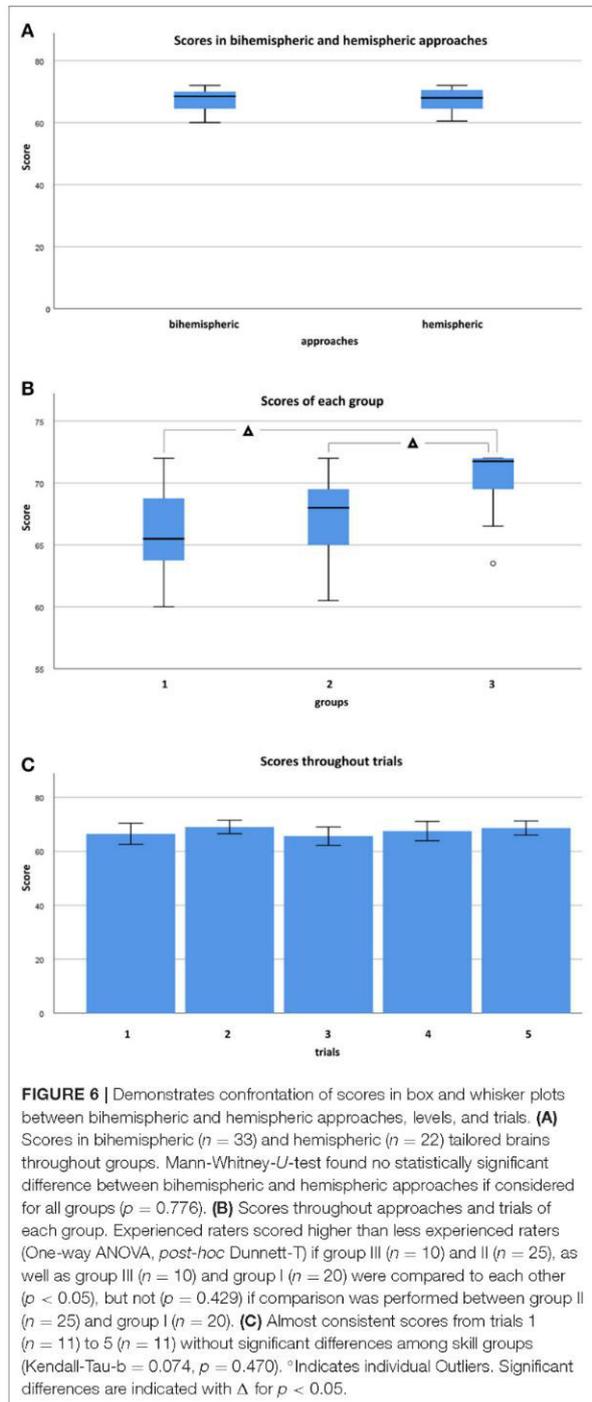
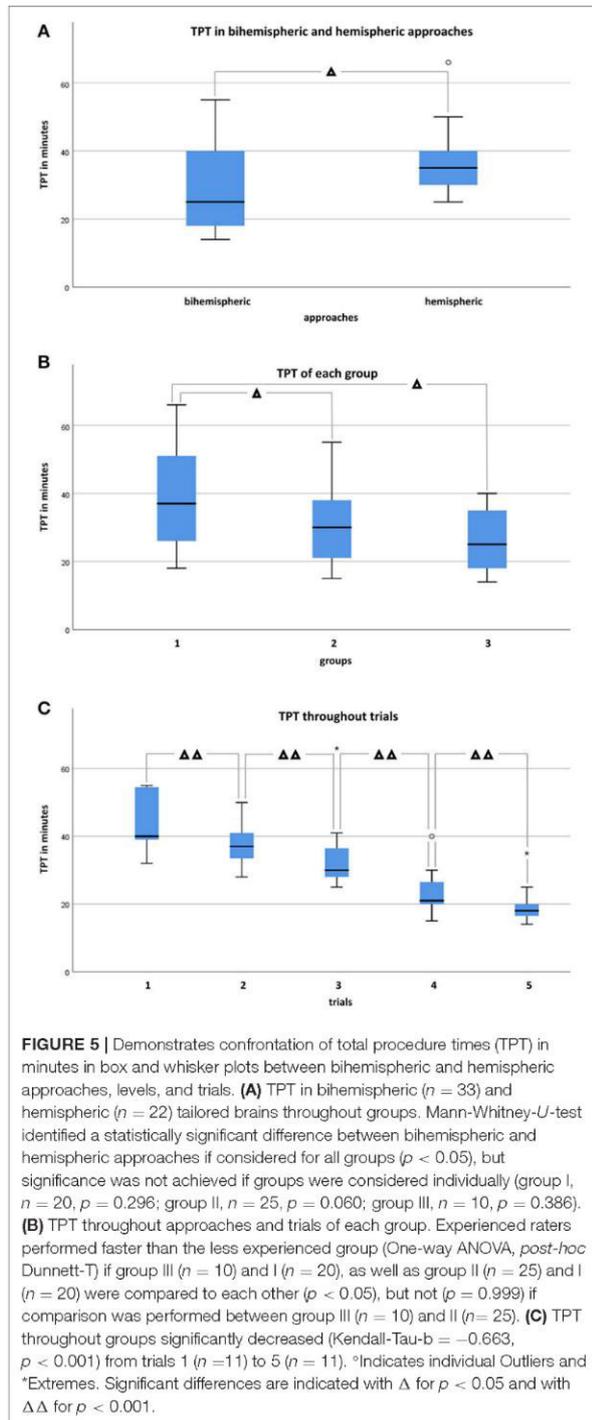


FIGURE 4 | Virtual division of the brain into 4 blocks (white and black lines). Following dissection according to the protocol, each block delivers a certain amount of slabs depicted in a separate box: No. 1 to 3 out of block (A), No. 4 to 5 out of block (B), No. 6 to 8 out of block (C) and No. 9 to 14 out of block (D). Subscript letters indicate distinctions between left (L) and right (R) hemispheres.



of neuroanatomical skill (Kendall-Tau-b = 0.328 , $p < 0.05$). If groups were compared to each other (One-way ANOVA, $p < 0.05$), scores were significantly higher in group III vs. II

(*post-hoc* Dunnett-T = 2.93 , $p < 0.05$) and in group III vs. I (*post-hoc* Dunnett-T = 4.00 , $p < 0.05$), but not in group II vs. I (*post-hoc* Dunnett-t = 1.07 , $p = 0.429$) participants (**Figure 6B**).

Increasing experience with the protocol from the first (trial 1) to the last (trial 5) dissected brain had no significant influence on attained scores throughout different skill groups (Figure 6C; Kendall-Tau-b = 0.074, $p = 0.470$).

Intrarater scores ranged from 0 to 8.67%. The variation coefficient was not significantly dependent on the skill group (Kendall-Tau-b = -0.306, $p = 0.234$). For details of individual scores, see Supplementary Table 6 (Data Sheet 2).

If sorted for slabs, 680/770 (88.3%) were considered excellent, 53/770 (6.9%) sufficient, and 37/770 (4.8%) failed to show the minimum panel of anatomical structures at the cut surface (Figure 7; Supplementary Table 7, Data Sheet 2). Concerning each individual group, slabs 1, 7, 8, 12, and 13 in group I, slabs 1, 2, and 7 in group II and slab 6 in group III remained under a mean relative score of 90% and were therefore considered the most problematic in the respective groups (Figure 8). Ranges of scores for each slab per group in absolute and relative numbers are shown in Supplementary Table 8 (Data Sheet 2).

Regarding the dissection mode of the 1st slab, on left hemispheric slabs, the hippocampal type was the most frequent form [21/55 (38.2%)], followed by the amygdaloid type [20/55 (36.4%)] and hybrid type [10/55 (18.2%)]. On right hemispheric slabs, the predominant form was the amygdaloid type [23/55 (41.8%)], followed by the hybrid type [18/55 (32.7%)] and hippocampal type [10/55 (18.2%)]. Whereas, in hemispheric approaches [22/55 (40%)], hippocampal, amygdaloid, and hybrid type were equally represented, in bihemispheric approaches [33/55 (60%)], the amygdaloid type was the most frequent form [31/66 (47%)], followed by the hippocampal type [19/66 (28.8%)] and hybrid type [16/66 (24.2%)]. In 4 brains (18.2%) of hemispheric approaches, none of the criteria were present.

Throughout groups, symmetry was assessed in 704 of 770 slabs. Resembling sagittal midline slabs, slab no. 11 and 14 were excluded from this analysis. Symmetry did not significantly differ between bihemispheric and hemispheric dissection (Chi-Square = 0.394, $p = 0.821$). There was a weak correlation between higher levels of neuroanatomical skill and grade of symmetry (Kendall-Tau-b = 0.082, $p < 0.05$) and a moderate correlation between symmetry and higher neuroanatomical scores (Kendall-Tau-b = 0.143, $p < 0.001$). Increasing experience with the protocol from the first trial (1) to the last trial (5) had no significant influence on symmetry of slabs in any of the groups (Kendall-Tau-b = 0.027, $p = 0.431$). Symmetry was graded as good in 78.4% (552/704) of slabs, as moderate in 20.9% (147/704) and as not present in 0.7% (5/704) of slabs (Figure 9; Supplementary Table 9, Data Sheet 2). Concerning each individual group, most problematic slabs regarding symmetry were slabs 4, 7, and 8 in group I, slabs 1, 2, and 7 in group II and slab 7 in group III (Supplementary Table 10, Data Sheet 2).

Deviation did not significantly differ between bihemispheric and hemispheric dissection (Chi-Square = 2.17, $p = 0.338$). Correct inclination mildly correlated with neuroanatomical skill (Kendall-Tau-b = 0.088, $p < 0.05$) and strongly correlated with higher scores (Kendall-Tau-b = 0.497, $p < 0.001$). Increasing experience with the protocol from the first trial (1) to the last trial (5) had no significant influence on deviation from correct angle throughout skill groups (Kendall-Tau-b = 0.056). Throughout all groups, cutting angle was correct in 82.2% (633/770), mildly deviated in 8.6% (66/770), and severely deviated in 9.2% (71/770) of slabs (Figure 10; Supplementary Table 11, Data Sheet 2). Concerning each individual group, most

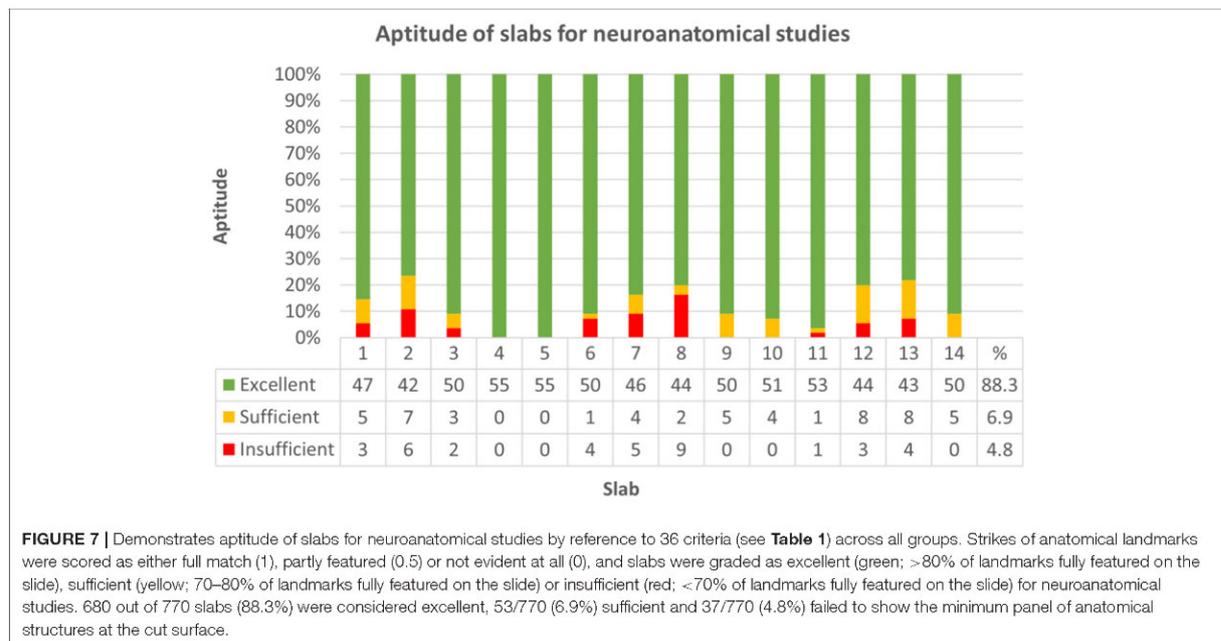


FIGURE 7 | Demonstrates aptitude of slabs for neuroanatomical studies by reference to 36 criteria (see Table 1) across all groups. Strikes of anatomical landmarks were scored as either full match (1), partly featured (0.5) or not evident at all (0), and slabs were graded as excellent (green; >80% of landmarks fully featured on the slide), sufficient (yellow; 70–80% of landmarks fully featured on the slide) or insufficient (red; <70% of landmarks fully featured on the slide) for neuroanatomical studies. 680 out of 770 slabs (88.3%) were considered excellent, 53/770 (6.9%) sufficient and 37/770 (4.8%) failed to show the minimum panel of anatomical structures at the cut surface.

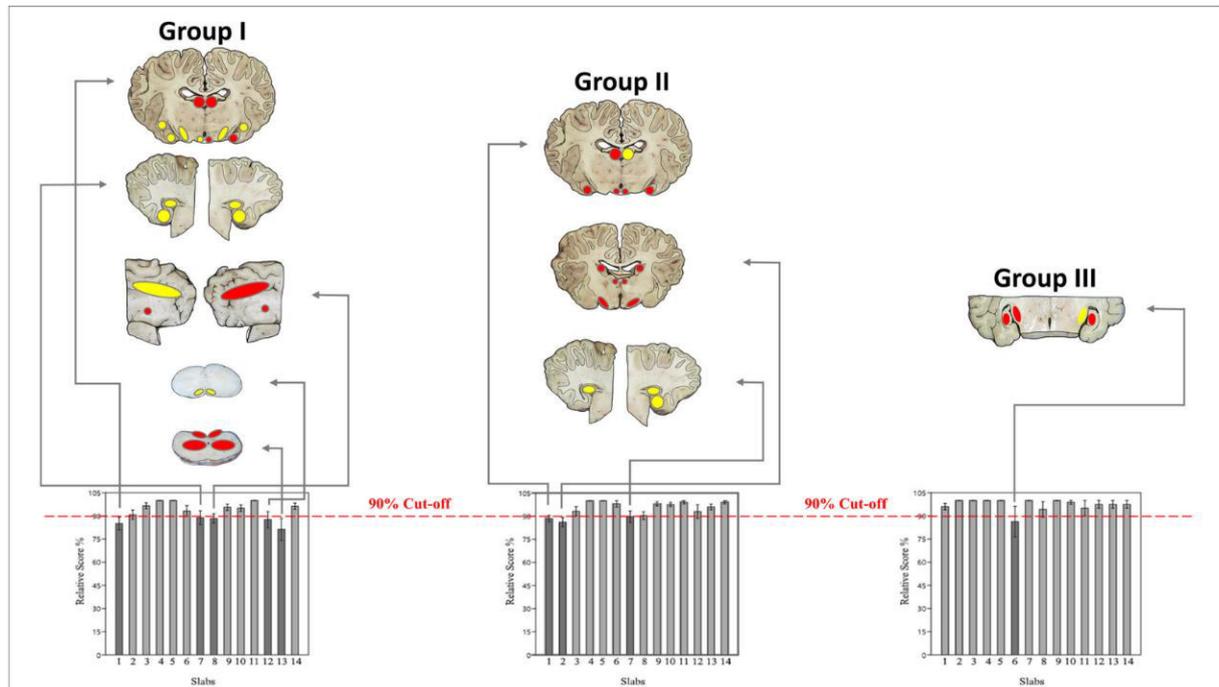


FIGURE 8 | Demonstrates the most problematic slabs per group with a mean relative score <90% (dark gray). Matching of macroscopic and microscopic verification criteria for evaluation of slabs for neuroanatomical accuracy (**Table 1**) were classified in 3 colors: green if 93.1–100% of criteria were scored with 1 (slabs not shown), yellow if 87.3–93% of criteria were scored with 1 and red if <87% of criteria were scored with 1. Concerning each group, the following slabs underscored 90%: slabs 1, 7, 8, 12, and 13 in group I; slabs 1, 2, and 7 in group II; slab 6 in group III.

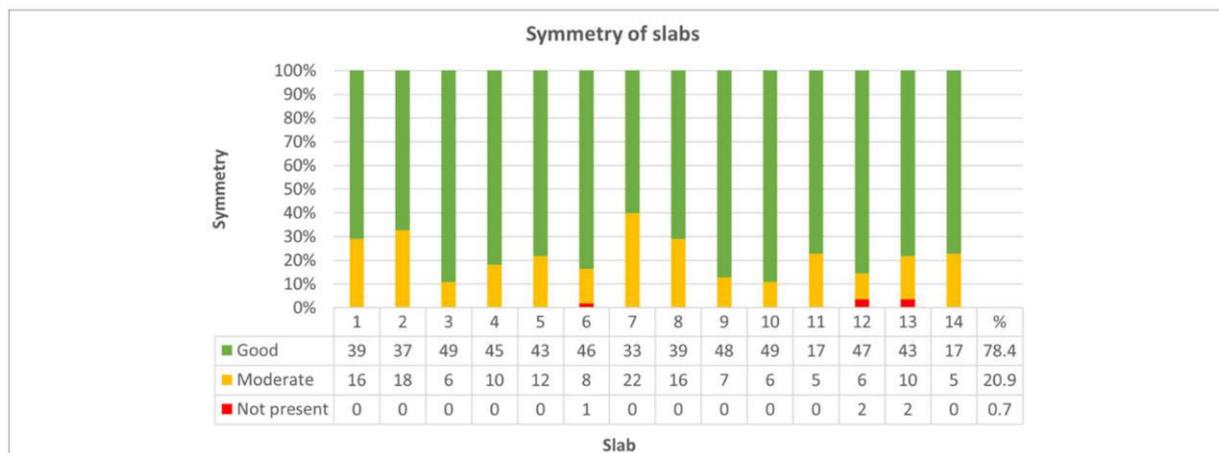
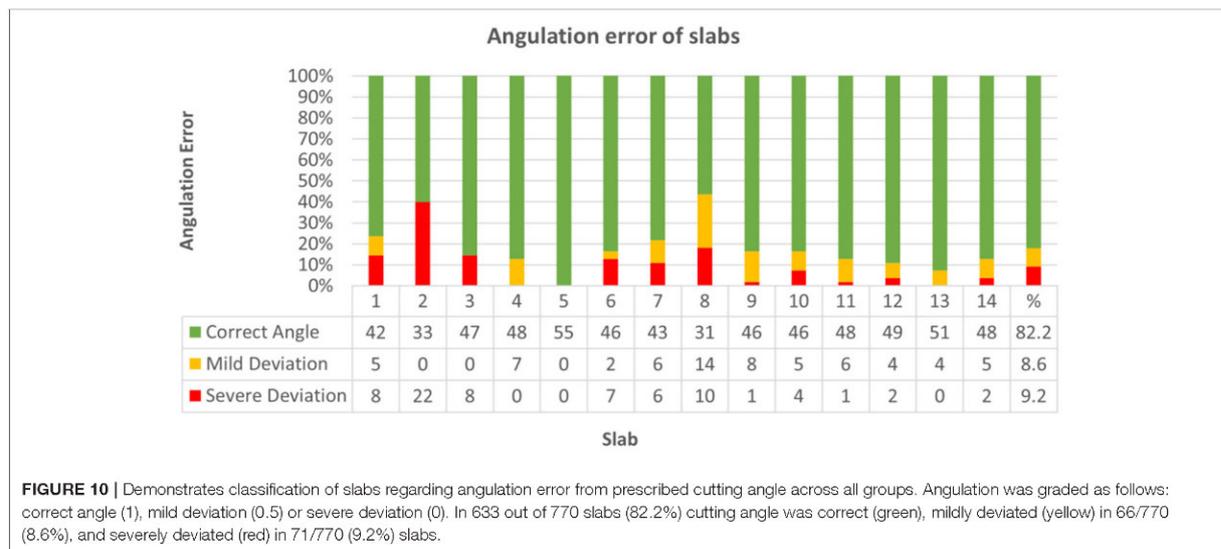


FIGURE 9 | Demonstrates classification of slabs regarding symmetry across all groups. Symmetry was graded as follows: good (1), moderate (0.5) or not present (0). In 552 out of 704 slabs (78.4%) symmetry was good (green), moderate (yellow) in 147/704 (20.9%), and not present (red) in 5/704 (0.7%) of slabs.

problematic slabs regarding deviation from the prescribed cutting angle were slabs 7 and 8 in group I, slabs 2 and 8 in group II and slab 2 in group III (**Supplementary Table 12, Data Sheet 2**).

Effects of Tissue Preservation on Neuroanatomical Accuracy

Regarding tissue preservation, neither autolysis (Kendall-Tau-b = 0.400, $p = 0.192$) nor subfixation



(Kendall-Tau-b = 0.133, $p = 0.435$) impacted neuroanatomical accuracy score significantly. Pre-existing defects of brain tissue attending neurodissection were evident in 34.5% (19/55) of brains, with block D being most prone to artifacts [slabs 9–14; 19/55 (34.5%)] followed by blocks C [slabs 6–8; 13/55 (23.6%)], A [slabs 1–3; 11/55 (20%)] and B [slabs 4–5; 6/55 (11%)] (Figure 11). In general, brain extraction artifacts were seen in 10/20 (50%) brains of group I, 12/25 (48%) of group II, and 3/10 (30%) of group III.

According to expectations, there was a strong correlation between higher grades of damage and lower scores (Kendall-Tau-b = 0.87, $p < 0.05$). Although pre-damage extinguished one or more markers of orientation in any of the blocks, significantly lower scores caused by missing reference points were only observed in block C (Kendall-Tau-b = -0.299, $p < 0.05$), in contrast to blocks A (Kendall-tau-b = -0.198, $p = 0.075$), B (Kendall-tau-b = -0.190, $p = 0.091$) and D (Kendall-tau-b = -0.134, $p = 0.217$). If damage was mild, there was a positive correlation between skill level and neuroanatomical accuracy (Kendall-Tau-b = 0.173, $p < 0.001$). However, advanced brain damage leveled out the positive influence of neuroanatomical skills (moderate damage: Kendall-Tau-b = -0.056, $p = 0.650$; severe damage: Kendall-Tau-b = 0.019, $p = 0.865$; high-grade damage: Kendall-Tau-b = -0.006, $p = 0.955$).

Rater Data Assessment

According to the questionnaire taken by participants following every dissection, identifiability of relevant landmarks was easiest in brains without macroscopic alterations in groups I (70.3%), II (82%), and III (80.7%). However, orientation of the blade was possible in brains even with severe alterations and impossible in none of the altered brains (Figure 12; Supplementary Table 13, Data Sheet 2). Therefore, the method of dissection (bihemispheric vs. hemispheric) was not pivotal for identifiability (Somers' D = 0.034, $p = 0.370$). The lower

the grade of damage, the better the identifiability of landmarks (Somers' D = 0.294, $p < 0.001$); however, the relationship between grade of damage and identifiability of landmarks was significant only in blocks A (Somers' D = 0.330, $p < 0.05$) and D (Somers' D = 0.320, $p < 0.05$). Increasing subjective difficulties with implementation of the protocol were significantly related to increasing grade of tissue damage in groups I (Somers' D = 0.197, $p < 0.05$) and II (Somers' D = 0.141, $p < 0.05$) and therefore decreasing identifiability of landmarks in group I (Somers' D: 0.443, $p < 0.001$) and group II (Somers' D: 0.591, $p < 0.001$), whereas members of group III did not perceive difficulties regarding application of the protocols.

Subjective difficulties did not reflect the neuroanatomical accuracy in groups I and II (group I = Kendall-Tau-b: -0.041, $p = 0.469$; group II = Kendall-Tau-b: -0.087, $p = 0.100$). The comfort levels increased with the training effect in group I (Somers' D: -0.127, $p < 0.05$), but not in group II (Somers' D: -0.096, $p = 0.132$). Subjective difficulties were similar for application of bihemispheric and hemispheric protocols (Somers' D = 0.008, $p = 0.819$).

DISCUSSION

Ambition of the Protocol

Unfortunately, for inexperienced researchers and diagnosticians, no standardized or revised guidelines for systematic and reproducible dissection of the equine brain has been available prior to this study. Empirically, people tend to use transverse sections as traditional planes, which might impede concise evaluation and histomorphometry of regions that are presented in tangential cuts, such as major aspects of the hippocampus and motor cortex or those with peculiar planarity, such as the cerebellar cortex.

Only by consequent use of the same scheme researchers are able to acquire a macroscopical and histological pattern

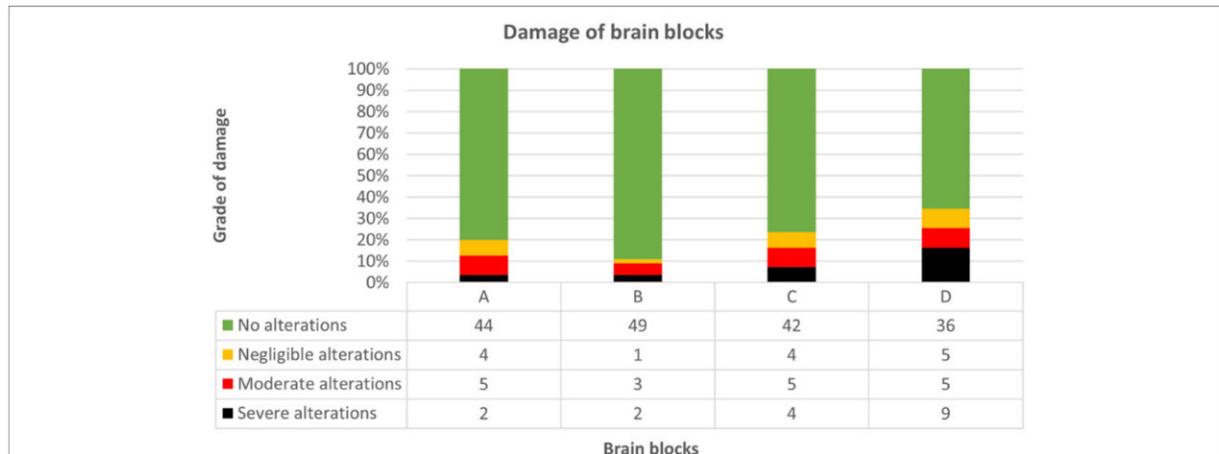


FIGURE 11 | Demonstrates grade of damage concerning each brain block throughout groups. Block D was most prone to artifacts [19/55 (34.5%)], followed by blocks C [13/55 (23.6%)], A [11/55 (20%)] and B [6/55 (11%)]. Pre-existing defects ranged from no (green), to negligible (yellow), moderate (red) and severe (black) alterations (for details see “complementary parameters”).

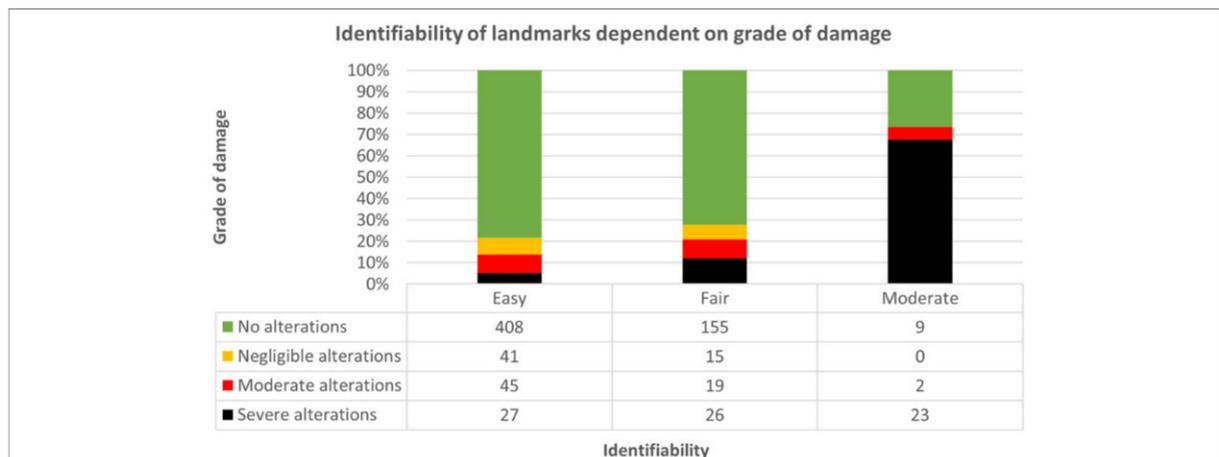


FIGURE 12 | Demonstrates dependence of identifiability of landmarks (1: easy; 2: fair; 3: moderate; 4: not possible) on grade of damage throughout groups and approaches. Identifiability was easiest in slabs without alterations [green; 408/521 (78.3%)], followed by moderate [red; 45/521 (8.6%)], negligible [yellow; 41/521 (7.9%)] and severe [black; 27/521 (5.2%)] alterations.

recognition for normal and abnormal fields. Moreover, only by transferable protocols it is possible to compare architectural and quantitative tissue data of the large gyrified equine brain reliably between different studies and laboratories.

The protocol presented herein has been elaborated to facilitate macroscopic evaluation and procurement of standardized target areas in equids. This study proved that by application of this protocol, investigators can sample virtually every functional subsystem of the equine brain at optimal angles independent of their neuroanatomical skills. Hence, the landmarks for orientation of sections have been kept as simple as possible.

Study Design

To facilitate handling throughout the different modes of encephalotomy and tissue availability, the protocol presented herein was developed for bihemispheric and hemispheric (left & right) dissection (see **Data Sheets 3–5** and **Supplementary Videos 1–3**). All steps are illustrated in a video instruction of 14 min (bihemispheric) and 10 min (hemispheric, each) duration (see **Supplementary Videos 1–3**). Equipped with these aids, the examiners who volunteered for this study all felt prepared to proceed to the hands-on experiments.

Time Requirement for Implementation

After no more than 5 repeats, all raters throughout experience levels were able to sample all major brain areas in ~20 min or less. On average, they saved 26 min from the first to the fifth dissected brain. With more samples treated the same way, investigators will be able to decrease their performance time to that of the videos or even below. It remains to be seen, however, whether this only reflects the time to cut the brain in this standardized manner, while thorough macroscopic examination of the entire brain and of the slabs requires time on its own. Most notably, procedural acceleration had no negative effects on the neuroanatomical accuracy of sampling across all raters and therefore reflects quickly increasing experience and straightforward practicability.

Surprisingly, although all investigators were right-handed, an anticipated faster and more accurate dissection of the left hemisphere due to easier handling was absent. Dissection of the right hemisphere was performed significantly faster upon steady sampling quality. This time difference could not be explained by brain asymmetry due to right forebrain predominance in equids as previously reported (Larose et al., 2006; Austin and Rogers, 2007; Farmer et al., 2010, 2018; Johnson et al., 2019).

Instead, this unexpected outcome was likely due to predefined chronology of the study protocol, in which the dissection of the left hemisphere always preceded that of the right. A sequential order was required, as restricted availability of donated brains rendered a randomized order less feasible.

Diagnostic Validity

Aptitude of slabs for routine diagnostics in this study was 100%, as clinically relevant areas were always present on either the front or back side of the slab of either the left or right hemisphere. Missing macroscopic lesions down to a diameter of 3–5 mm for post-mortem routine diagnostic workup is therefore very unlikely. However, without consideration of preliminary reports accompanying the submission form, brain pathologies with histological changes might be missed if the protocol is followed without actively seeking anticipated lesions. Hence, reasonable sampling under consideration of potentially affected brain regions, optimally accompanied by *in vivo* or *ex vivo* imaging studies (Stuckenschneider et al., 2014; Johnson et al., 2019; Schmidt et al., 2019), comprises the extension of standard sampling with additional homo- and heterotopic slabs. The diagnostic outcome of involved cases is beyond the scope of this study.

Neuroanatomical Accuracy

Working down the checklist of selected anatomical hot spots, neuroanatomical accuracy was excellent in 88.3% of slabs and incomplete in only 4.8%, where <70% of landmarks were fully featured on the slide. As might be expected, experienced raters achieved the highest neuroanatomical scores with a median of 71.8 points (IQR: 68.8–72). However, following the protocol, people with no or limited experience still obtained excellent results with a median of 65.5 (IQR: 63.6–68.9) and 68 (IQR: 64.8–69.5), respectively. Therefore, the performance of beginners and those with some previous encounters only differed insignificantly.

Influencing Factors

Among external factors, only pre-damage had a clear impact on neuroanatomical accuracy by obscuring external landmarks. Neither postmortem changes nor incomplete fixation diminished the neuroanatomical outcome in any of the groups, even though the candidates themselves felt subjectively uncomfortable in these situations, and histological preservation might be compromised.

Fixation

To avoid the latter, penetration of fixative into tissue of these large animals may be accelerated (Furr and Reed, 2007a) by *ad hoc* dissection into the three blocks plus transverse section of the mid cerebellum (cut No. 1-TS–5-TS) in the necropsy hall or, even better, after superficial fixation for 24–48 h, to prevent cusping of gray matter at the cut surface. In fetuses and neonates with higher water content, brain tissue becomes easier to handle and cut when using zinc formalin for fixation (personal communication with Steffen Albrecht²) (Fortier and Hould, 2013).

Heterogeneity of Investigated Material

Coincidentally, the inexperienced group I dealt the most with brains with disruptive changes, so their anatomical performance may even be underestimated. Unfortunately, the limited number of donated brains precluded a systematic evaluation of damage scores equally distributed throughout the groups. In the same vein, the study mirrored the field situation regarding variability of brain sizes. For that reason, prescriptions of slice thickness must take into consideration the distances between landmarks. Hence, the thickness of obtained brain slabs ranged between 4 and 5 mm in foals to 10 mm in draft horses. An appropriate adaption with equidistant serial sections allows for proper presentation of all internal target zones as depicted in the brochure throughout the different sizes of the animals and, consequently, of their brains.

Fixed Brain Weight/Dead Body Weight Ratio

As an interesting side finding, the relationship between body weight and brain weight was non-linear logarithmic relationship. Therefore, results support previous evaluations across species by confirming their hypothesis of brain-body weight interrelation for the first time within a cohort of equids (Jerison, 1973; Cozzi et al., 2014; Minervini et al., 2016).

Institutional Implementation of the Protocol

Naturally, brain size has an effect on subsequent sampling for histology. Each institution will therefore trim the slabs of their regions of interest in accordance with their equipment with microtomes, cuvettes and glass slides with cover slips.

If an institution decides to implement the protocol shown herein, sampling of specific target areas for neuropathological or neuroscientific purposes can be performed easily and reproducibly, even if the person on the bench has no preexisting neuroanatomical knowledge.

²Department of Pathology, The Montreal Childrens Hospital, McGill University, Montreal, Canada.

The application of this protocol also allows for remote selection of regions of interest by external specialists that likewise are aware of the procedure, labeling and number of the slabs. Consequently, less experienced investigators can easily sample brain slabs triaged by experts and convey them for diagnostic and scientific purposes.

Perspective and Forecast

As an incentive, the protocol is equally applicable for other polygyral mammals, such as bovids and new world camelids (data not shown). It is currently implemented in the Clinical & Comparative Neuropathology Laboratory, LMU Munich, for comparative lesion mapping in equine vs. ruminant vs. human brains.

Taken together, we strongly recommend researchers to take advantage of this practicable instruction for equine brain dissection in the field. However, it remains a task for future studies to define more accurately clear landmarks for angulation perpendicularity of planes for brain slabs and imaging slides and to create coregistered multimodal brain atlases in this species and to optimize imaging planes for measuring brain regions in correspondence to their specific histoarchitecture such as established for hippocampal scans in epileptic dogs and cats (Rusbridge et al., 2015).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

REFERENCES

- Annese, J. (2012). The importance of combining MRI and large-scale digital histology in neuroimaging studies of brain connectivity and disease. *Front. Neuroinform.* 6:13. doi: 10.3389/fninf.2012.00013
- Audigie, F., Tapprest, J., George, C., Didierlaurent, D., Foucher, N., Faurie, F., et al. (2004). Magnetic resonance imaging of a brain abscess in a 10-month-old filly. *Vet. Radiol. Ultrasound* 45, 210–215. doi: 10.1111/j.1740-8261.2004.04035.x
- Austin, N. P., and Rogers, L. J. (2007). Asymmetry of flight and escape turning responses in horses. *Laterality* 12, 464–474. doi: 10.1080/13576500701495307
- Barba, M., Fairbanks, E. L., and Daly, J. M. (2019). Equine viral encephalitis: prevalence, impact, and management strategies. *Vet. Med.* 10, 99–110. doi: 10.2147/VMRR.S168227
- Brubaker, L., and Udell, M. A. (2016). Cognition and learning in horses (*Equus caballus*): what we know and why we should ask more. *Behav. Processes* 126, 121–131. doi: 10.1016/j.beproc.2016.03.017
- Carrera, J. P., Bagamian, K. H., Travassos Da Rosa, A. P., Wang, E., Beltran, D., Gundaker, N. D., et al. (2018). Human and equine infection with alphaviruses and flaviviruses in Panamá during 2010: a cross-sectional study of household contacts during an encephalitis outbreak. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98, 1798–1804. doi: 10.4269/ajtmh.17-0679
- Cavalleri, J. M., Metzger, J., Hellige, M., Lampe, V., Stuckenschneider, K., Tipold, A., et al. (2013). Morphometric magnetic resonance imaging and genetic testing in cerebellar atrophy in Arabian horses. *BMC Vet. Res.* 9:105. doi: 10.1186/1746-6148-9-105

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Ethics Commission of the Centre for Veterinary Clinical Medicine of the LMU Munich. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KM and SR: conceptualization and design. LG, ZB, and KM: acquisition of material. M-LB, MR, ZB, KM, and SR: formal analysis, data acquisition and processing. SR: statistical analysis. ZB, LG, and KM: resources. M-LB: visualization. M-LB and KM: writing—original draft preparation. ZB, MR, LG, and SR: writing—review and editing. KM: supervision. All authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to all colleagues who assisted to improve the protocol and to those who volunteered as raters at the Faculty of Veterinary Medicine at LMU Munich and the Institute for Veterinary Disease Control AGES Mödling.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2020.614929/full#supplementary-material>

High-resolution versions of the Supplementary Videos can be requested by email to the corresponding author: kaspar.matiasek@neuropathologie.de.

- Chaffin, M. K., Walker, M. A., McArthur, N. H., Perris, E. E., and Matthews, N. S. (1997). Magnetic resonance imaging of the brain of normal neonatal foals. *Vet. Radiol. Ultrasound* 38, 102–111. doi: 10.1111/j.1740-8261.1997.tb00823.x
- Cozzi, B., Povinelli, M., Ballarin, C., and Granato, A. (2014). The brain of the horse: weight and cephalization quotients. *Brain Behav. Evol.* 83, 9–16. doi: 10.1159/000356527
- David, S., and Abraham, A. M. (2016). Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect. Dis.* 48, 571–586. doi: 10.3109/23744235.2016.1164890
- Ehret, T., Torelli, F., Klotz, C., Pedersen, A. B., and Seeber, F. (2017). Translational rodent models for research on parasitic protozoa—a review of confounders and possibilities. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:238. doi: 10.3389/fcimb.2017.00238
- Farmer, K., Krueger, K., and Byrne, R. W. (2010). Visual laterality in the domestic horse (*Equus caballus*) interacting with humans. *Anim. Cogn.* 13, 229–238. doi: 10.1007/s10071-009-0260-x
- Farmer, K., Krüger, K., Byrne, R. W., and Marr, I. (2018). Sensory laterality in affiliative interactions in domestic horses and ponies (*Equus caballus*). *Anim. Cogn.* 21, 631–637. doi: 10.1007/s10071-018-1196-9
- Finno, C. J., Higgins, R. J., Aleman, M., Ofri, R., Hollingsworth, S. R., Bannasch, D. L., et al. (2011). Equine degenerative myeloencephalopathy in Lusitano horses. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 1439–1446. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.00817.x
- Finno, C. J., Valberg, S. J., Shivers, J., D'almeida, E., and Armien, A. G. (2016). Evidence of the primary afferent tracts undergoing neurodegeneration in horses with equine degenerative myeloencephalopathy based on calretinin immunohistochemical localization. *Vet. Pathol.* 53, 77–86. doi: 10.1177/0300985815598787

- Fortier, J. C., and Hould, R. (2013). *Histotechnologie: Théorie et procédés*. Québec: CCDMD Centre collégial de développement de matériel didactique.
- Frank, C., Madden, D. J., and Duncan, C. (2015). Field necropsy of the horse. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 31, 233–245. doi: 10.1016/j.cveq.2015.04.002
- Furr, M., and Reed, S. (2007a). “The basics of equine neuropathology,” in *Equine Neurology*, ed J. L. Robertson (Iowa: Blackwell Publishing), 157–166.
- Furr, M., and Reed, S. (2007b). “Overview of neuroanatomy,” in *Equine Neurology*, ed J. Mastly (Iowa: Blackwell Publishing), 3–31.
- Furr, M., and Reed, S. (2007c). “Viral diseases of the nervous system,” in *Equine Neurology*, ed L. Göhring (Iowa: Blackwell Publishing), 169–186.
- Hecht, S., and Adams, W. H. (2010). MRI of brain disease in veterinary patients part 1: basic principles and congenital brain disorders. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 21–38. doi: 10.1016/j.cvsm.2009.09.005
- Holmes, S. P. (2014). Equine skull magnetic resonance imaging: the where, when and why? *Equine Vet. Educ.* 26, 605–609. doi: 10.1111/eve.12039
- Jerison, H. (1973). *Evolution of the Brain and Intelligence*. New York, NY: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-385250-2.50018-3
- Joest, E. (1911). Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornaschen Krankheit) des Pferdes. *Ein Beitrag zur vergleichenden Pathologie des Zentralnervensystems. Deutsche Zeitschrift für Vervenheilkunde* 42, 293–324. doi: 10.1007/BF01654290
- Johnson, P. J., Janvier, V., Luh, W. M., Fitzmaurice, M., Southard, T., and Barry, E. F. (2019). Equine stereotaxic population average brain atlas with neuroanatomic correlation. *Front. Neuroanat.* 13:89. doi: 10.3389/fnana.2019.00089
- Kimberlin, L., Linden, A., and Ruoff, L. (2016). *Atlas of Clinical Imaging and Anatomy of the Equine Head*. Iowa: John Wiley and Sons. doi: 10.1002/9781118989005
- Kumar, B., Manuja, A., Gulati, B. R., Virmani, N., and Tripathi, B. N. (2018). Zoonotic viral diseases of equines and their impact on human and animal health. *Open Virol. J.* 12, 80–98. doi: 10.2174/1874357901812010080
- Larose, C., Richard-Yris, M.-A., Hausberger, M., and Rogers, L. J. (2006). Laterality of horses associated with emotionality in novel situations. *Laterality* 11, 355–367. doi: 10.1080/13576500600624221
- Liesche, F., Ruf, V., Zoubaa, S., Kaletka, G., Rosati, M., Rubbenstroth, D., et al. (2019). The neuropathology of fatal encephalomyelitis in human Borna virus infection. *Acta Neuropathol.* 138, 653–665. doi: 10.1007/s00401-019-02047-3
- Lillie, R. D. (1954). *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. New York, NY: Blakiston.
- Lim, N. K., Moestrup, V., Zhang, X., Wang, W. A., Moller, A., and Huang, F. D. (2018). An improved method for collection of cerebrospinal fluid from anesthetized mice. *J. Vis. Exp.* 19:56774. doi: 10.3791/56774
- Manso-Diaz, G., Dyson, S. J., Dennis, R., Garcia-Lopez, J. M., Biggi, M., Garcia-Real, M. I., et al. (2015). Magnetic resonance imaging characteristics of equine head disorders: 84 cases (2000–2013). *Vet. Radiol. Ultrasound* 56, 176–187. doi: 10.1111/vru.12210
- Matiasek, K., Pumarola, I. B. M., Rosati, M., Fernandez-Flores, F., Fischer, A., Wagner, E., et al. (2015). International veterinary epilepsy task force recommendations for systematic sampling and processing of brains from epileptic dogs and cats. *BMC Vet. Res.* 11:216. doi: 10.1186/s12917-015-0467-9
- Minervini, S., Accogli, G., Pirone, A., Grafc, J.-M., Cozzi, B., and Desantis, S. (2016). Brain mass and encephalization quotients in the domestic industrial pig (*Sus scrofa*). *PLoS ONE* 11:e0157378. doi: 10.1371/journal.pone.0157378
- Morton, A. J., and Howland, D. S. (2013). Large genetic animal models of Huntington’s Disease. *J. Huntingtons. Dis.* 2, 3–19. doi: 10.3233/JHD-130050
- Nav (2017). *Nomina anatomica veterinaria, 6th Edn*. Hannover, Ghent, Columbia, Rio de Janeiro: International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature.
- Nickel, R., Schummer, A., and Seiferle, E. (2004). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Stuttgart: Parey.
- Niller, H. H., Angstwurm, K., Rubbenstroth, D., Schlottau, K., Ebinger, A., Giese, S., et al. (2020). Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999–2019: an epidemiological investigation. *Lancet Infect. Dis.* 20, 467–477. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30546-8
- Nitzsche, B., Frey, S., Collins, L. D., Seeger, J., Lobsien, D., Dreyer, A., et al. (2015). A stereotaxic, population-averaged T1w ovine brain atlas including cerebral morphology and tissue volumes. *Front. Neuroanat.* 9:69. doi: 10.3389/fnana.2015.00069
- Pease, A., Mair, T., and Spriet, M. (2017). Imaging the equine head and spine. *Equine Vet. J.* 49, 13–14. doi: 10.1111/evj.12640
- Pickles, K. (2019). Is electrical nerve stimulation the answer for management of equine headshaking? *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 35, 263–274. doi: 10.1016/j.cveq.2019.03.002
- Potschka, H., Fischer, A., Von Ruden, E. L., Hulsmeier, V., and Baumgartner, W. (2013). Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia* 54, 571–579. doi: 10.1111/epi.12138
- Richt, J. A., Grabner, A., and Herzog, S. (2000). Borna disease in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 16, 579–595. doi: 10.1016/S0749-0739(17)30097-4
- Rijkkaert, J., Pardon, B., Saey, V., Raes, E., Van Ham, L., Ducatelle, R., et al. (2019). Determination of magnetic motor evoked potential latency time cutoff values for detection of spinal cord dysfunction in horses. *J. Vet. Intern. Med.* 33, 2312–2318. doi: 10.1111/jvim.15576
- Roberts, K., Hemmings, A. J., McBride, S. D., and Parker, M. O. (2017). Developing a 3-choice serial reaction time task for examining neural and cognitive function in an equine model. *J. Neurosci. Methods* 292, 45–52. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.01.018
- Rooney, J. R. (1971). *Autopsy of the Horse, Technique and Interpretation*. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
- Rusbridge, C., Long, S., Jovanovic, J., Milne, M., Berendt, M., Bhatti, S. F. M., et al. (2015). International Veterinary Epilepsy Task Force recommendations for a veterinary epilepsy-specific MRI protocol. *BMC Vet. Res.* 11:194. doi: 10.1186/s12917-015-0466-x
- Schmidt, M. J., Knemeyer, C., and Heinsen, H. (2019). Neuroanatomy of the equine brain as revealed by high-field (3T) magnetic-resonance-imaging. *PLoS ONE* 14:e0213814. doi: 10.1371/journal.pone.0213814
- Scola, E., Conte, G., Palumbo, G., Avignone, S., Cinnante, C. M., Boito, S., et al. (2018). High resolution post-mortem MRI of non-fixed in situ foetal brain in the second trimester of gestation: normal foetal brain development. *Eur. Radiol.* 28, 363–371. doi: 10.1007/s00330-017-4965-y
- Siso, S., Ferrer, L., and Pumarola, M. (2003). Abnormal synaptic protein expression in two Arabian horses with equine degenerative myeloencephalopathy. *Vet. J.* 166, 238–243. doi: 10.1016/S1090-0233(02)00302-7
- Sisson, S., Grossman, J. D., and Getty, R. (1975). *Sisson and Grossman’s The Anatomy of the Domestic Animals*. Philadelphia, London, Toronto: Saunders.
- Stuckenschneider, K., Hellige, M., Feige, K., and Gasse, H. (2014). 3-Tesla magnetic resonance imaging of the equine brain in healthy horses—Potentials and limitations. *Pferdeheilkunde Equine Med.* 30, 657–670. doi: 10.21836/PEM20140605
- Taqi, S. A., Sami, S. A., Sami, L. B., and Zaki, S. A. (2018). A review of artifacts in histopathology. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 22:279. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_125_15
- Valberg, S. J., Lewis, S. S., Shivers, J. L., Barnes, N. E., Konczak, J., Draper, A. C., et al. (2015). The equine movement disorder “Shivers” is associated with selective cerebellar purkinje cell axonal degeneration. *Vet. Pathol.* 52, 1087–1098. doi: 10.1177/0300985815571668
- Yoshikawa, T. (1968). *Atlas of the Brains of Domestic Animals*. Tokyo, PA: University of Tokyo Press, Pennsylvania State University Press.
- Zilles, K., Palomero-Gallagher, N., and Amunts, K. (2013). Development of cortical folding during evolution and ontogeny. *Trends Neurosci.* 36, 275–284. doi: 10.1016/j.tins.2013.01.006

Conflict of Interest: ZB was employed by the Austrian Agency for Health and Food Safety Ltd.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Bitschi, Bagó, Rosati, Reese, Goehring and Matiasek. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

IV. DISKUSSION

Das Kernstück zur intravitalen Aufarbeitung jeder neurologischen Erkrankung ist der neurologische Untersuchungsgang. Dieser hat zum Ziel, die klinische Symptomatik topographisch zuzuordnen, sowie Krankheiten mit neurologischer Mimikry wie orthopädischen Erkrankungen, Schmerzzuständen, Augenerkrankungen und affektiven Verhaltensstörungen abzugrenzen (LUNN und MAYHEW, 1989; FURR und REED, 2008).

Insbesondere bei klinischen Anzeichen wie Aufsteheschwierigkeiten, Gang-, Haltungs- und Stellungsanomalien, kann es leicht zu Verwechslungen zwischen neurogenen, muskuloskelettalen und anderweitigen, unter Umständen schmerzhaften Zuständen kommen (FURR und REED, 2008; LAUGIER et al., 2009).

Jeder klinischen Diagnose einer neurologischen Erkrankung beim Pferd ist deshalb unbedingt eine sorgfältige allgemeine und orthopädische Untersuchung voranzustellen.

Einen gleichbedeutenden Stellenwert nimmt die neuro-ophthalmologische Untersuchung ein, die neben der Adspektion und der Beurteilung von Stellung, Haltung und Symmetrie der Augen eine Überprüfung der Hirnnerven sowie der sympathischen und parasympathischen Innervation des Kopfes zulässt (IRBY, 2011).

Im Idealfall lassen die Ergebnisse aus der Anamnese und genannter Untersuchungen eine Einschätzung zu, ob eine Läsion des Nervensystems zu erwarten ist und welche Bereiche des zentralen Nervensystems (ZNS) oder des peripheren Nervensystems (PNS) betroffen sein könnten. Während Fehlfunktionen der Hirnnerven, Bewusstseinstörungen, Zwangsverhalten, Epilepsie und verändertes Schlafverhalten für eine Läsion kranial des Foramen magnum sprechen, ist bei Pferden mit unbeeinträchtigter Aufmerksamkeit und normalem Verhalten, bei intakten Hirnnerven-Funktionen und Ataxien, die sich eventuell zwischen Vorder- und Hinterhand unterscheiden, von einer Läsion kaudal des Foramen magnum auszugehen (FURR und REED, 2008).

Gelingt die fokale Zuordnung auf eine einzelne Lokalisation nicht, muss eine Erkrankung mit diffuser oder multifokaler Verteilung in Betracht gezogen werden (FURR und REED, 2008).

Eine Grobzuordnung der klinischen Symptomatik auf die verschiedenen Hauptregionen des equinen Gehirns ist anhand nachstehender Tabelle möglich. Gleichzeitig spiegelt diese die empfohlene Beprobung anhand des vorgestellten Protokolls wider (Tabelle 1).

Tabelle 1. Überblick über die Grobzuordnung der klinischen Symptomatik in der Pferdeneurologie mit Empfehlungen zur Hirnbeprobung für die postmortale Diagnostik			
Symptom	Grobzuordnung	Block	Hirnprobe
Hirnnerven-Dysfunktionen	vorwiegend Hirnstamm (exkl. HN I & II)	C D	6, 7, 8 9, 10, 11, 12, 13, 14
Anfälle, Blindheit, Demenz, Wahn, Milde Ataxie/ Schwäche, Verhaltensstörungen	Prosencephalon / Vorderhirn	A B C	1, 2, 3 4, 5 6, 7, 8
Hypermetrie, Intentionstremor, Schwäche	Metencephalon: Kleinhirn (Pons)	D	10, 11, 14
Gangdefizite, Bewusstseins-Veränderungen, Tetraparese	Hirnstamm	D	9, 10, 11, 12, 13, 14
	Prosencephalon / Vorderhirn	A B C	1, 2, 3 4, 5 6, 7, 8
Ataxie Hypermetrie/ Spastik	Kleinhirn	D	10, 11, 14
	Vestibularapparat	/	/
	<i>C1-C7</i> wenn HGLDM schlechter als VGLDM	/	/
	<i>C6-T2</i> wenn VGLDM schlechter als HGLDM	/	/
	<i>Thorakolumbal</i> wenn VGLDM normal und HGLDM abnormal	/	/
	<i>Sakral</i> bei Schweif-/ Blasenlähmung, perinealer Hypalgesie	/	/

C: cervikale Halswirbel, HGLDM: Hintergliedmaßen, HN: Hirnnerven, VGLDM: Vordergliedmaßen. Modifiziert nach Furr und Reed 2008 (FURR und REED, 2008)

Insbesondere Ataxien sind bei Equiden häufig auch dem Vestibularapparat oder spinalen Läsionen und seltener dem Kleinhirn zuzuordnen. Eine vollständige postmortale Aufarbeitung neurologischer Erkrankungen umfasst, je nach intravitaler Neurolokalisation, demnach auch die Beprobung des Rückenmarks und des PNS. Daraus ergibt sich die Aufgabe zukünftiger Studien, auch für genannte Strukturen systematische Sektionsprotokolle zu etablieren, um Läsionen außerhalb des Gehirns nicht zu verpassen und neuroanatomisch exakt zuordnen zu können.

Bei intrakraniellen Erkrankungen mit diffuser und multifokaler Verteilung, gelingt die histologische Verifizierung während der postmortalen Untersuchung hingegen nur, wenn alle relevanten Subsysteme (Vorderhirn, Hirnstamm, Kleinhirn) systematisch und nachvollziehbar blindbeprobte wurden.

Gleichzeitig müssen Regionen, die im Verdacht stehen betroffen zu sein, oder deren Dysfunktion durch vorherrschende andere Symptome überblendet sein könnten, verlässlich geweblich untersucht werden können.

Vor allem für weniger erfahrene Wissenschaftler/-innen und Diagnostiker/-innen, standen bisher jedoch keine standardisierten oder überarbeiteten Leitlinien für die systematische und reproduzierbare Sektion des equinen Gehirns zur Verfügung. Dabei ist es lediglich über die gleichmäßige Wiederholung von Untersuchungsschemata möglich, eine „Pattern Recognition“ für normale und abnormale makroskopische und histomorphologische Befunde zu entwickeln und feinere Anomalien auch als solche zu erkennen.

Für die solide Vergleichbarkeit von architektonischen und quantitativen Gewebedaten zwischen verschiedenen Studien und Institutionen, ist es zudem von grundlegender Bedeutung, dass zu beprobende Regionen reproduzierbar aufgefunden werden können. Gewährleistet werden kann dies nur, wenn übertragbare Protokolle zur Verfügung stehen, die in verschiedenen Einrichtungen gleichzeitig implementiert und routinemäßig angewendet werden.

Da in einer diagnostischen Einrichtung zudem häufig mehrere Personen in die Probenahme und -verarbeitung involviert sind, bietet ein Routineansatz nicht nur zwischen Institutionen, sondern auch innerhalb einer Institution klare Vorteile zur Beibehaltung einer konstanten Proben- und Untersuchungsqualität inklusive der Möglichkeit, Nachuntersuchungen an Hirnfragmenten vorhersagbarer neuroanatomischer Herkunft und Zusammensetzung durchführen zu können.

Zeitgleich stützt sich die Durchführbarkeit neuroanatomischer Studien auf die regelrechte histologische Darstellung von Hirnstrukturen unter Berücksichtigung ihrer 3-dimensionalen räumlichen Anordnung.

Die traditionell in der Praxis durchgeführten transversalen oder fälschlicherweise als coronal beschriebenen Schnittführungen, nehmen dabei nur wenig Rücksicht auf die Planarität spezifischer Regionen wie dem Hippocampus, der motorischen Großhirnrinde oder dem

zerebellären Kortex. Sie können somit im tangentialen Anschnitt genannter Strukturen resultieren und eine präzise Bewertung der Architektur und Histomorphometrie erschweren.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, ein systematisches Studienprotokoll auszuarbeiten, das die Beprobung und makroskopische Bewertung standardisierter Zielbereiche bei Equiden erleichtert, die neuroanatomischen Gegebenheiten berücksichtigt, aussagekräftig, reproduzierbar und praktikabel ist und von Personen mit unterschiedlichsten neuroanatomischen Kenntnissen angewendet werden kann.

Um den verschiedenen Verfahren zur Enzephektomie in der Praxis mittels medianer oder paramedianer Schädelspaltung sowie extensiver Kraniektomie am exartikulierten Schädel gerecht zu werden (FRANK et al., 2015; RECH und BARROS, 2015), wurde Wert daraufgelegt, dass das Schema je nach institutioneller Ausstattung und Verfügbarkeit von zu untersuchendem Gewebe, sowohl am vollständig entnommenen Gehirn als auch an Gehirnhälften anwendbar ist.

Zur Validierung wurden Studienteilnehmer/-innen mit unterschiedlichen neuroanatomischen Vorkenntnissen und institutionellen Hintergründen, mit je bihemisphärischen und hemisphärischen, bebilderten Protokollen ausgestattet.

Die Probanden/-innen hatten zudem Zugriff auf entsprechende Videoanleitungen von 14 Minuten Dauer für die bihemisphärische Sektion und von je 10 Minuten Dauer für die rechts- und linksseitige hemisphärische Zerlegung.

Die darin dargestellten 21 Zuschnitt-Schritte basierten, je nach anatomischer Zielstruktur, auf transversalen, sagittalen und lateral oder transversal geneigten Schnittführungen. Die richtungsweisenden anatomischen und geometrischen Orientierungspunkte zur Ausrichtung der Schnittführungen, wurden dabei so einfach wie möglich gehalten, um ein schnelles Umsetzen in praxi zu ermöglichen.

Um den psychologischen Faktor „Unsicherheit vs. Zutrauen“ zu berücksichtigen, wurden alle Teilnehmer/-innen nach der jeweils ersten Auseinandersetzung mit dem Protokoll, zur Verständlichkeit und individuellen Einschätzung ihrer Fähigkeiten befragt. Ausgestattet mit genannten Hilfsmitteln, fühlten sich dabei alle Untersucher/-innen, unabhängig von bestehenden Vorkenntnissen, bereit für die praktische Durchführung der Hirnsektion. Insbesondere die Videodokumentation wurde als sehr hilfreich empfunden.

Ebendiese ist als Open Access Videomaterial über Frontiers in Neuroanatomy, nun für alle Interessierten einsehbar (<https://doi.org/10.3389/fnana.2020.614929> bzw.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2020.614929/full#supplementary-material>).

Aufgrund der simplifizierten, aber systematischen Heranführung, war es nach den überwachten fünf Durchgängen für nahezu alle Teilnehmer/-innen der unterschiedlichen Gruppen möglich, Pferdehirne sachgemäß in ~20 Minuten oder weniger zu zerlegen. Von der allerersten bis zur fünften Hirnsektion, verschnellerten sich die Untersucher/-innen bereits um rund 26 Minuten. Beobachtungen der Probanden/-innen über den publizierten Zeitraum hinaus, ergaben bei alltäglicher Anwendung des Schnittschemas, sogar Durchführungszeiten deutlich unter 10 Minuten für Einzelpersonen.

Um negative Auswirkungen des Trainingseffektes, im Sinne einer Nonchalance, auf die neuroanatomische Qualität und Akkuranz der makroskopischen Untersuchung auszuschließen, werden künftig zufallsverteilte Überprüfungen der Sektionsergebnisse erforderlich sein.

Innerhalb der publizierten Studie, Probanden/-innen und Kohorte, war jedoch kein abträglicher Effekt auf die neuroanatomische Akkuranz auszulesen. Ganz im Gegenteil.

Erwartungsgemäß fiel die Orientierung am Gesamthirn gegenüber isolierten Hemisphären leichter. Daher gelang die bihemisphärische Sektion, im Vergleich zur hemisphärischen Sektion, signifikant schneller. Am intakten Gesamthirn sind die festgelegten neuroanatomischer Referenzpunkte eben deutlich leichter zu erkennen.

Obwohl alle Teilnehmer/-innen zufallsbedingt Rechtshänder/-innen waren, konnte eine erwartete schnellere Sektion der linken Hemisphäre, aufgrund der leichteren Handhabbarkeit und Einsehbarkeit der maßgeblich ventral lokalisierten Referenzpunkte, nicht bestätigt werden. Im Gegenteil stellte sich die Sektion der rechten Hemisphäre, bei identer Probenqualität, sogar als signifikant schneller heraus. Linkshemisphäral wurden im Mittel $19,9 \pm 5,6$ Minuten für die Sektion benötigt, während die rechtshemisphärale Zerlegung im Schnitt $15,9 \pm 4,4$ Minuten erforderte.

Der Effekt war nicht auf die Gehirnasymmetrie bei vorwiegender Rechtshirn-Dominanz der Equiden zurückzuführen (LAROSE et al., 2006; AUSTIN und ROGERS, 2007; FARMER et al., 2010; FARMER et al., 2018; JOHNSON et al., 2019) sondern basiert vermutlich auf einem weiteren Trainingseffekt über die vordefinierte Hemisphären-Reihenfolge innerhalb des Studienprotokolls. Die linke Gehirnhälfte wurde nämlich stets vor der rechten Gehirnhälfte zugeschnitten. Diese Reihenfolge resultierte aus der limitierten Anzahl an zur Verfügung stehenden Gehirnen, bei gleichzeitig begrenzter Verfügbarkeit der freiwilligen Studienteilnehmer/-innen, wodurch eine vordefinierte Reihenfolge eine bessere Vergleichbarkeit der Ansätze zuließ.

Ein möglicher Lateralitäts- und Zeitunterschied zwischen Links- und Rechtshändern/-innen, konnte in dieser Studie nicht eruiert werden. Da jedoch lediglich händigkeitneutrale Mikrotom-, Skalpell- und Messerklingen für die Durchführung der Hirnsektion erforderlich sind, ist von einem signifikanten Einfluss der Händigkeit nicht auszugehen.

Bei der Sektion der jeweils 5 Gehirne pro Untersucher/-in wurden pro Hemisphäre je 14 Hirnscheiben evaluiert und auf 36 geforderte Kandidatenregionen überprüft, die einerseits die neuroanatomische Akkuranz und andererseits das Minimum an Strukturen für geblindete diagnostische Untersuchungen widerspiegeln.

Über die Untersuchergruppen hinweg war bei immerhin 95,2% der Hirnscheiben eine gute neuroanatomische Trefferquote gegeben. Laut Studienvorgaben war für diese Einschätzung gefordert, dass mindestens 70% der anatomischen Zielstrukturen auf der zugewandten Schnittfläche der Hirnscheiben (Slabs) und/oder der von ihr abgezogenen histologischen Schnittpräparate erkennbar sein musste.

Bei insgesamt geringen prozeduralen Qualitätsunterschieden, konnten erwartungsgemäß die Untersucher/-innen mit den fundiertesten neuroanatomischen Vorkenntnissen, mit einem Median von 71,8 der 72 Maximalpunkte, *ad hoc* die höchste Trefferquote erzielen.

Dennoch lagen die wenig und komplett Unerfahrenen, mit einem Median von 68 bzw. 65,5 Punkten, relativ dicht dahinter. Verfehlt wurden hierbei vor allem einzelne hippokampale Anteile. Aber selbst in der unerfahrensten Gruppe wurde mindestens eine der drei hippokampalen Zielzonen in >87% der Sektionen vollständig abgebildet.

Bei der erfahreneren Gruppe wurden mindestens zwei der drei geforderten Hippokampussegmente erwischt.

In der Expertengruppe reduzierten sich die Probleme auf gelegentliches Verfehlen des Temporoventralkörpers, an der Übergangszone zwischen Uncus und Mandelkerngebiet. Dies liegt unter anderem an der unterschiedlichen relativen Längsausrichtung und Steilstellung des Hippocampus zwischen den Individuen. Bei Verfehlen ist der Temporoventralkörper allerdings immer im nächsten, kaudal gelegenen Schnitt aufzufinden gewesen. Durch seine charakteristische Form kann er auch von unerfahrenen Probanden/-innen, nach Schnittdurchführung identifiziert und der Histologie zugeführt werden.

Von allen 770 Schnitten aus 55 Hirnen, wurden lediglich 4,8% der Hirnschnitte aus der Blindbeprobung als nicht ausreichend reproduzierbar erachtet. Auf diesen Schnitten waren unter 70% der anatomischen Zielstrukturen abgebildet.

Im Rahmen der postmortalen Diagnostik werden institutsinterne Routineschnitte angefertigt, die entweder mit den Angaben aus der klinischen Neurolokalisation und Bildgebung überlappen, oder durch diese ergänzt werden. Auch hierbei spielt die eigene Kenntnis der funktionellen und topographischen Anatomie, oder eben die Einweisung durch die Spezialisten aus den Komplementärgebieten (Neurologie, Radiologie, Neurochirurgie), eine entscheidende Rolle, um die unterstellten Läsionen aufzufinden.

Darüber hinaus empfiehlt es sich, die synaptisch angeschlossenen Netzwerke, differentialdiagnostisch abzugrenzenden Schaltkreise und ähnlich vulnerable Regionen in die Untersuchung miteinzubinden. Neben offensichtlich betroffenen Bereichen, ist somit die Beprobung weiterer Hirnareale unumgänglich.

Die Makroskopie sieht auch hier eine Art Komplettüberprüfung vor. Die gechecklisteten Kandidatenregionen dieser Studie basieren auf den kollektiven Erfahrungen der Diagnostiker/-innen des Instituts für Tierpathologie (mit etwa 150 Pferdesektionen pro Jahr) und den Vorgaben zu symptomatogenen Arealen aus der Fachliteratur (FURR und REED, 2008; MAYHEW, 2008) und zitierten IVETF-Studie an Hunden und Katzen (MATIASEK et al., 2015).

Da diagnostische Präparate keine vollständige Enzyklopädie der Hirnareale erfordern, wurden hier vor allem symptomatogene und neurobiologische Hauptzentren berücksichtigt. Diese waren auf 100% der seziierten Hirnscheiben in der geforderten Planarität darstellbar, sofern Vorder- oder Rückseite der linken oder rechten Hemisphäre mitberücksichtigt wurden.

Das heißt, dass unabhängig von der Erfahrung, alle Untersucher/-innen durch die Implementierung des Protokolls in der Lage waren, praktisch jedes funktionelle Subsystem (Vorderhirn, Hirnstamm, Kleinhirn) des Pferdehirns unter Beibehaltung optimaler Winkel abzubilden.

Selbst der sagittal und lateral geneigte Zuschnitt des frontoparietalen und frontalen Kortex, erlaubte bei allen Untersuchern/-innen einen repräsentativen Blick auf die irregulären und komplex angeordneten Pyramidenzellschichten des equinen Motorcortex (COZZI et al., 2017). Dieser liegt beim Pferd, anders als beim Kleintier, nicht nur im Bereich des Sulcus cruciatus, sondern erstreckt sich gefaltet über große Teile der rostr dorsalen Frontallappen-Hemisphäre. In allen Präparaten waren die Betz'schen Riesenzellen gut darstellbar und die Kortexdicke zuverlässig zum Volumen der subkortikalen weißen Substanz relativierbar.

Durch die Sequenz geneigter transversaler und sagittaler Schnitte, wurde zudem der gekrümmt dorsomedial nach ventrolateral gerichteten Organisation von Hippocampus und Fornix Rechnung getragen. In mindestens einer Hippocampuszone, d.h. Temporoventralkörper, okzipitaler Flexur oder kommissuralen Anteil des Hippokampus, erwirkten annähernd alle Untersucher/-innen in den vorgesehenen Scheiben, eine perpendikuläre Darstellung der Formation. Hierdurch werden sehr zuverlässig und quasi „blind“, Dicken- und Lagenbeurteilungen der Cornu ammonis -Segmente, des Hippocampus proper sowie des Gyrus dentatus ermöglicht.

Wie oben erwähnt, können eventuelle Lücken durch die Verwendung der nächstgelegenen Schnittflächen ausgeglichen werden, in denen spätestens der rechtwinklige Anschnitt bei allen Probanden/-innen gelang.

Ähnlich zuverlässig gestaltete sich die Darstellung der Purkinje-Zellen und ihres sagittal ausgerichteten Dendritenbaumes, ohne dabei auf vestibulo-, spino-, oder pontozerebellärer Anteile aus rostralen und kaudalen Kleinhirnlappen verzichten zu müssen.

Wie bei der equinen zerebellär kortikalen Degeneration (TURNER-BEATTY et al., 1985; MACKAY, 2008), können die Kleinhirnlappen und -läppchen bei Hirnerkrankungen nämlich unterschiedlich stark betroffen sein. Andere Erkrankungen mögen sich in den dendritischen Spines abspielen und involvieren den Vermis, die paravermalen Strukturen und die äußeren Hemisphären in unterschiedlichem Ausmaß.

Mit dem erarbeiteten Schnittprotokoll sind daher jegliche Hirnpathologien ausreichend histologisch darstell- und kartierbar. Die relevante Schnittauswahl kann auch von einer neuroanatomisch ungeübten Person im Erstansatz, oder nach Routinehistologie, anhand von Tabelle 1 bzw. nach Konsultation eines Spezialisten, vorgenommen werden.

Da das Protokoll eine fixe Anzahl an äquidistanten Hirnschnitten zwischen den Referenzstrukturen vorgibt, passt es sich auch an jeweilige Hirngrößen an. Zielstrukturen finden sich somit entsprechend größenübergreifend wieder, wofür lediglich die Scheibendicke adaptiert werden muss. Die Hirngröße bzw. das Hirnvolumen hat dementsprechend auch keinen nennenswerten Einfluss auf die neuroanatomische Akkuranz, was sich in der homogenen Punkteverteilung bei unterschiedlichem Hirnvolumen widerspiegelte (<400 cm³ mit 67,5±2,7 Punkten, 400-650 cm³ mit 68,3±3,6 Punkten, >650 cm³ mit 69,65±1,91 Punkten).

Mit der Dickenzunahme - im Falle der Studie von 0,4 cm bei Fohlen bis nahezu 1 cm bei großen Kaltblütern - mag allerdings die makroskopische Erkennbarkeit von Läsionen beeinträchtigt sein.

Im Allgemeinen können Texturveränderungen und Verfärbungen bis etwa 3 mm Durchmesser, bei der Adspektion als pathologisch identifiziert werden. Aufgrund der eher gleichmäßigen Färbung und Textur der grauen und weißen Substanz, lassen sich Läsionen, im Sinne eines „Shine through“-Effekts, auch bei Tiefenverlagerung von bis zu 2 mm erkennen. Das bedeutet, dass bis etwa 7 mm Schichtdicke (großes Pferd > 600 kg KG), das geübte Auge diese Läsionen auffinden wird. Darüberhinausgehende Scheibendicken führen zu einem Sensitivitätsverlust. Daher empfiehlt es sich, dickere Scheiben nach regulärer Durchführung des Protokolls, bei flacher Lagerung auf einer Schneideunterlage, mittels Schablone definierter Dicke von etwa 3 mm als Platzhalter, tangential weiter zu lamellieren. Alternativ können Zusatzverfahren wie Vitalfärbungen (MÜLLER, 1998), Fluoreszenzlampen (EDWIN und JACKMAN, 1981) und die Verwendung von Leuchttischen die makroskopische Untersuchung optimieren, sind aber im Routinebetrieb zu aufwendig.

Neben dem Auffinden unklarer oder unentdeckter heterotoper Pathologien, dient die Hirnsektion natürlich auch der isoplanaren Hinterleuchtung von Befunden der Bildgebung im geweblichen Kontext. Während Röntgentechniken lediglich die Gewebisdichte widerspiegeln (LACOMBE et al., 2010), zeigen intravenöse Kontrastmedien, Diffusions- und Perfusionswichtungen, die Durchblutung und die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke sowie Wasserbewegungen an (BOUCHER et al., 2020). Spinechos sind dagegen in der Lage, die histochemische Einbindung von Wassermolekülen darzustellen, während Gradientenechos entsprechende Eisensignale anzeigen (LEUPOLD et al., 2018). Die Histologie zeigt die Summe der komplexen Gewebeveränderungen auf. Nur sie kann zuverlässig zwischen manifesten Core-Läsionen, Übergangszonen und periläsionalen reaktiven Veränderungen unterscheiden.

Auf der anderen Seite bedürfen bestimmte Insulte einer gewissen Zeit, um histologisch greifbar zu sein. Exzitotoxische Nervenzellveränderungen infolge Ischämie, sind im Läsionszentrum beispielweise erstmals zwischen 6 und 12 Stunden nach dem Insult, oft aber auch erst nach 12 bis 24 Stunden nachweisbar (LIPTON, 1999). Das volle Ausmaß der Schädigung in Core und Penumbra, tritt meist gegen 72 h nach Ischämie auf, wobei bestimmte Areale vulnerabler, andere resistenter sind. Bei Diffusionswichtungen sind unmittelbare Infarktfolgen, bereits innerhalb einer Stunde erkennbar (LIPTON, 1999). Bestimmte reversible Missstände (v.a. in der Infarktpenumbra) zeigen sich vielleicht nur in der funktionellen Bildgebung, Perfusions- oder Diffusionswichtung (PESTALOZZA et al., 2002; PACIARONI et al., 2009), und eventuell gar

nicht in der Histologie. Insbesondere akute und generell extrazelluläre Ödeme, sind in der Histologie aufgrund der Entwässerung oft nicht leicht erkennbar.

Zur histologischen Darstellung dieser frühen, reversiblen oder milden zellbiologischen Reaktionen und für die Zuordnung zu bestimmten Kerngebieten etc., bedarf es spezieller Marker (z.B. Neuroglobin bei Hypoxie, Amyloid Precursorprotein bei stumpfem Trauma, Aquaporin 4 beim Postresorptionsödem) (LOVE et al., 2015). Eine exakte Reproduktion der Foci aus der Bildgebung ist daher wünschenswert oder sogar notwendig, um diese auf Zell- oder subzellulärer Ebene untersuchen zu können.

Aufgrund der höheren Auflösung kann die Histologie sehr gut die anatomische Zuordnung feiner Signalunterschiede unterstützen (PAKOZDY et al., 2011).

Zu letzteren gibt es bereits normalanatomische Templates oder Vorlagen im Sinne von MRT-Atlanten für das Pferd (JOHNSON et al., 2019). Hierbei wurden Daten aus der Bildgebung makroskopisch, mit transversal dargestellten anatomischen Gewebeschnitten, koregistriert.

Für die probate Darstellung schräggestellter bzw. verlaufender Strukturen wie dem Hippocampus, werden jedoch auch für das Pferd andere Scan-Einstellungen und -Ebenen, gemäß des Konsensus Statements für Epilepsie-spezifische MRT-Protokolle für das Gehirn (RUSBRIDGE et al., 2015), oder Rekonstruktionsmodelle geschaffen werden müssen.

Das gilt insbesondere zur Ermittlung von Volumendaten, zur Erkennung regionaler Atrophien, bei denen keine aktiven Läsionen mit Veränderung von Signalintensitäten bzw. Kontrastmittelaufnahmen vorliegen.

Bei der histologischen Validierung von MRT-Befunden ist zu berücksichtigen, dass sich Gewebeschemie und Wassergehalt im Laufe der postmortalen Zersetzung und Fixation verändern.

Da im Feld eine rasche Obduktion häufig nicht möglich ist und weder das optimale Gewebe-zu-Fixativ-Volumenverhältnis von 1:10 *in praxi* eingehalten werden kann, noch die vollständige Fixationsdauer vor Versand abgewartet wird, ist der Pathologe/ die Pathologin bei Pferdehirnsektionen häufig mit Autolyse, Unter- und ungleichmäßiger Fixierung konfrontiert (ROBERTSON, 2007).

Der Einfluss dieser Faktoren auf die Hirnsektion, wurde im Rahmen dieser Studie untersucht. Überraschenderweise hatten weder Autolyse noch der Fixierungszustand des Gewebes, einen nachweisbaren Einfluss auf das Prozedere oder die neuroanatomische Akkuranz.

Die Untersucher/-innen fühlten sich lediglich in solchen Situationen subjektiv unsicherer, den Zuschnitt vorzunehmen.

Es ist dennoch angeraten, die Einsender/-innen in Sachen Vorfixierung adäquat zu instruieren bzw. den Großtierkörper bis zur Sektion kühl zu lagern und die Obduktion so schnell wie möglich durchzuführen, da auch bei adäquater Beprobung, der histologische Erhaltungszustand die Erkennung von Pathologien entscheidend beeinflusst bzw. limitiert. Dies gilt insbesondere für nicht-infiltrative, zytomorphologische Veränderungen, sowie die Abgrenzung autolytischer Spongiosen von echten Vakuolisierungen des Neuroparenchyms im Sinne degenerativer Veränderungen (WOHLSEIN et al., 2013).

Um den Fixierungszustand als Einflussfaktor zu minimieren und die Penetration von Fixativen ins Gewebe zu beschleunigen (ROBERTSON, 2007), könnte direkt nach der Enzephektomie, oder – besser – nach 24-48h Vorfixierung, die Unterteilung in die vier Hauptblöcke des Protokolls (Schnitt 1-TS bis 5-TS), begleitet von einer transversalen Durchschneidung des Zerebellums (Schnitt 15-TS-TILT) von Vorteil sein. Für Hirne von Tieren > 4 Wochen Lebensalter eignet sich hierzu das generell für die Pathologie empfohlene 10%ige, neutral gepufferte (pH 6,9) Formalin. Für Neonaten und Feten, mit noch sehr hohem Wassergehalt des Hirnes, sollte dagegen Zink-Formalin verwendet werden, das Verformungen bei Auflage auf die Schneideunterlage und Manipulation verhindert und die Schneidbarkeit verbessert (persönliche Kommunikation mit Steffen Albrecht des Department of Pathology, The Montreal Childrens Hospital, McGill University, Montreal, Canada) (FORTIER und HOULD, 2013).

Einen ähnlichen Effekt hat die Verwendung von Bouinscher Lösung. Allerdings ist der Umgang mit Pikrinsäure arbeitsschutztechnisch als durchaus kritisch anzusehen (LATENDRESSE et al., 2002).

Die frühe und komplette Fixierung minimiert neben der Zersetzung weitere transportbedingte und manipulative Gewebsveränderungen. Wie sich in dieser Studie gezeigt hat, hatte die makropathologische Unversehrtheit über alle Gruppen hinweg sehr wohl einen Einfluss auf die neuroanatomische Akkuranz der Schnitte.

Aus nicht nachvollziehbaren Gründen war die unerfahrenste Gruppe mit dem am stärksten beschädigten Untersuchungsmaterial konfrontiert. Es kann daher sein, dass die neuroanatomischen Fähigkeiten der Junioren durch die Zerstörung der Referenzpunkte unterbewertet wurden. Die Instruktion des Sektionspersonals sollte sich daher auch auf die manuelle Entnahme des ZNS erstrecken.

Leider hat die insgesamt begrenzte Verfügbarkeit der Pferdehirne eine gleichmäßige Verteilung beschädigter Gehirne über die Gruppen verhindert und somit eine systematische Bewertung der Vorschädigung, in Bezug auf den Faktor Erfahrung, limitiert.

Gleichzeitig konnten Größe bzw. Volumen der Hirne nicht randomisiert verteilt werden. Mit einer Spanne von 250 bis 795 cm³ (siehe Abbildung 6), war das Untersuchungsmaterial durchaus heterogen, spiegelt auf der anderen Seite aber die Feldsituation im diagnostischen Betrieb wider.

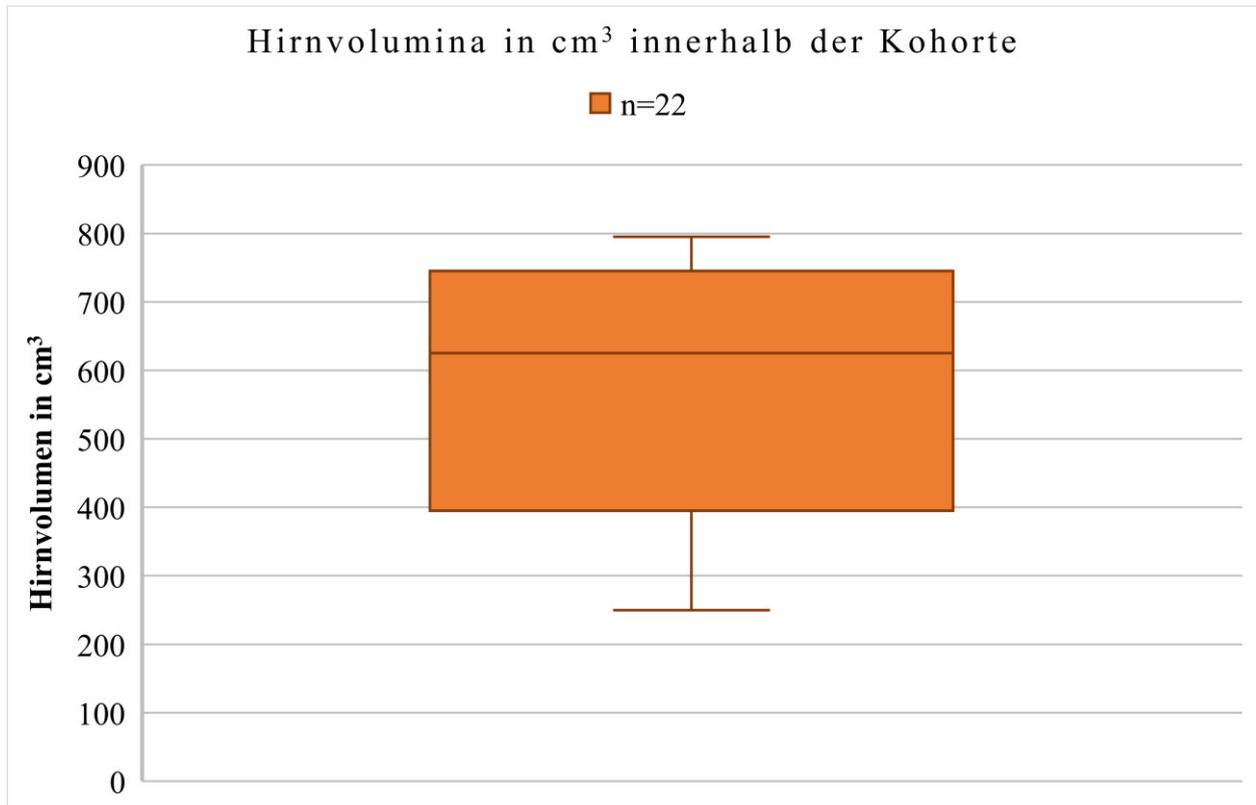


Abbildung 6. Box und Whisker Plot zur Darstellung der Hirnvolumina innerhalb der untersuchten Kohorte (n=22) mit einer Spanne von 250 bis 795 cm³ bei einem Median von 625 cm³ (IQR: 395 bis 745).

Die Beziehung zwischen Körper- und Hirngewicht, stellte sich in vorliegender Studie in einer nicht-linearen, logarithmischen Beziehung dar und stützt dabei frühere Untersuchungen über Spezies hinweg, indem sie die Hypothese zur Wechselbeziehung zwischen Gehirn und Körpergewicht, zum ersten Mal innerhalb einer Kohorte von Equiden bestätigt (JERISON, 1973; COZZI et al., 2014; MINERVINI et al., 2016).

Für Hirne unterschiedlicher Größe und variierenden Erhaltungszustandes, hat sich das vorgeschlagene Protokoll folglich als geeignet erwiesen und erfüllt mit der Einsetzbarkeit bei

unterschiedlich eingelerntem Personal, in wissenschaftlichen und diagnostischen Einrichtungen, entweder direkt oder *by proxy*, wesentliche Voraussetzungen für die adäquate Beprobung und makroskopische Beurteilung.

Im Folgenden gilt es dann vor allem die histologische Probennahme zu standardisieren. Dabei sind neben den essenziellen Kandidatenregionen und wissenschaftlichen Fragestellungen, vor allem Kostenfaktoren seitens Tierhalter und Institut, sowie die Verfügbarkeit von Großschnittmikrotomen zu berücksichtigen.

Im hiesigen Institut der LMU werden routinemäßig Schnitte der Größe 4 x 5,5cm und im Bedarfsfall sogar panhemisphärele Schnitte des Pferdehirnes durchgeführt. Der klare Vorteil großer Gewebsschnitte liegt in der Beurteilbarkeit zusammenhängender Bereiche und möglicher Template-Strukturen auf ein und demselben Objektträger. Somit wird die neuroanatomische Orientierung für die untersuchende Person am Mikroskop deutlich erleichtert und außerdem die Anzahl an kleinen Objektträgern begrenzt. Dafür sind die Glaswaren für die Schnittherstellung (Glasobjektträger, Deckgläser) und Färbung (Küvetten) wesentlich teurer und die Herstellung faltenfreier Großschnitte, die eines speziellen Trainings bedarf, deutlich schwieriger. Außerdem werden auch für teure Spezialfärbungen wie Versilberungstechniken, wesentlich größere Volumina benötigt.

Die meisten Institute werden daher für Alltagsuntersuchungen auf Standardobjektträger der Größe 7,2 x 2,6 cm zurückgreifen.

Das heißt, dass die 14 Hirnschnitte pro Hemisphäre, für die Weiterverarbeitung in histologischen Gewebskassetten kleinerer Größe, weiter unterteilt werden müssen.

Auch nicht beprobtes Material, sollte für spätere und detaillierte Studien asserviert, oder bestmöglich sogar eingeblockt werden.

Da mit dem Trimmen der Hirnschnitte nur wenige Referenzstrukturen für neuroanatomisch Ungeübte erhalten bleiben, die darüber hinaus keine Information zur Seite offerieren, ist für die spätere Orientierung eine standardisierte Kennzeichnung der Kassetten und Objektträger notwendig. Diese Kennzeichnung kann zum einen durch Markierungen wie Inzisionen am Gewebe und zum anderen durch die Verwendung von Tusche erfolgen. Da diese Markierungen aber erst am Mikroskop erkennbar werden, muss ein einheitliches Beschriftungssystem bereits bei der Vorsortierung implementiert werden.

Ein Vorschlag hierzu wäre die Kodierung gemäß Schnittnummer, Sektor und Seite (siehe Abbildung 7). Linke und rechte Hemisphäre können dabei durch Groß (z.B. links)- und Kleinschreibung (z.B. rechts) voneinander unterschieden werden.

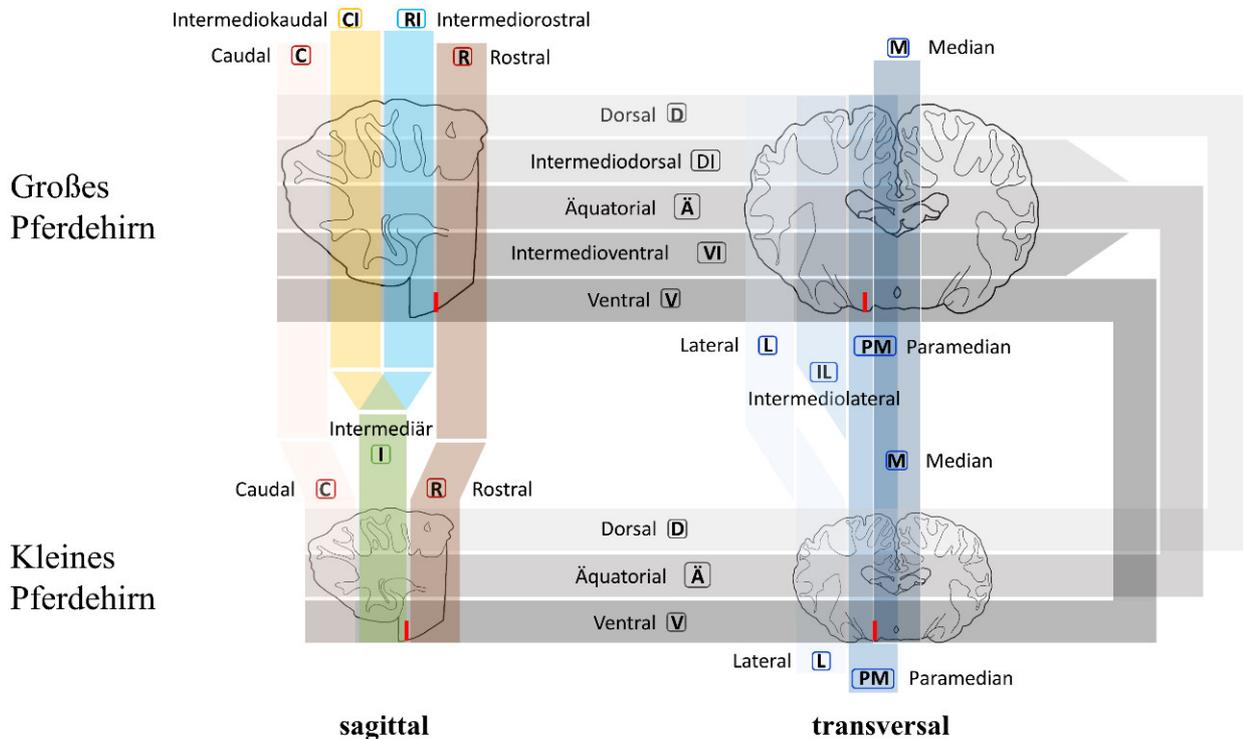


Abbildung 7. Vorschlag zur geometrisch-anatomischen Unterteilung großer und kleiner Pferdehirne nach sagittaler (links) und transversaler (rechts) Sektion. Sagittale Proben (links) werden in der horizontalen Achse unterteilt in R: rostral, RI: rostral intermediär (bei großen Gehirnen), CI: caudal intermediär (bei großen Gehirnen) oder I: intermediär (nur bei kleinen Gehirnen) und C: caudal. Transversale Proben (rechts) werden in der horizontalen Achse unterteilt in M: median (bei bihemisphären Schnitten), PM: paramedian, IL: intermediolateral (bei großen Gehirnen) und L: lateral. Sowohl Sagittal- als auch Transversalschnitte werden in der vertikalen Achse unterteilt in D: dorsal, DI: dorsal intermediär (bei großen Gehirnen), Ä: äquatorial, VI: ventral intermediär (bei großen Gehirnen) und V: ventral. Die rote Markierung dient der Kennzeichnung der ventralen Oberfläche und soll an jedem Schnitt für die Histologie ventral angebracht werden, um dem Pathologen/der Pathologin am Mikroskop die Orientierung zu erleichtern.

V. SCHLUSSBEMERKUNG & AUSBLICK

Entscheidet sich eine Institution zur Implementierung des Protokolls, kann die Probenahme bestimmter Zielbereiche für neuropathologische oder neurowissenschaftliche Zwecke, selbst von Personen ohne neuroanatomische Vorkenntnisse, einfach und reproduzierbar durchgeführt werden.

Außerdem ermöglicht die Anwendung des Protokolls die Fernauswahl von interessanten Regionen durch externe Spezialisten/-innen, die gleichermaßen mit dem Verfahren, der Kennzeichnung und der Anzahl der Hirnproben vertraut sind. Infolgedessen können weniger erfahrene Forscher/-innen leicht von Experten/-innen vorausgewählte Hirnproben entnehmen und diese für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke übermitteln.

Weiters kann das Protokoll gleichermaßen für andere polygyrale Säugetiere wie Rinder und Neuweltkameliden eingesetzt werden (Daten nicht gezeigt). Derzeit wird das Protokoll im Labor für klinische und vergleichende Neuropathologie der LMU München für die vergleichende Läsionskartierung bei Pferden, Wiederkäuern, diversen Zootierspezies und Menschen eingesetzt.

Insgesamt kann das praktikable Protokoll allerlei Forschern/-innen für die Sektion des Pferdegehirns im Praxisalltag empfohlen werden. Es bleibt jedoch eine Aufgabe zukünftiger Studien, genauere eindeutige Orientierungspunkte für die rechtwinklige Darstellung von Hirnschnittebenen in der Histologie und Bildgebung zu definieren, und somit zur Erstellung koregistrierter multimodaler Gehirnatlanten beim Pferd beizutragen. Anatomisch angepasste Schnittebenen in der Bildgebung, könnten zudem auch in der Pferdemedizin, die Messbarkeit von Gehirnregionen entsprechend ihrer spezifischen Histoarchitektur optimieren, wie dies bereits in Hippocampus-Scans bei epileptischen Hunden und Katzen der Fall ist (Rusbridge 2015).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Erstellung und Neuroanatomische Validierung eines IVETF-angelehnten Protokolls zur Systematischen Sektion von Equidenhirnen zu neurowissenschaftlichen und diagnostischen Zwecken

von Maya-Lena Bitschi

Mit der zunehmenden Implementierung bildgebender Verfahren in der Pferdeneurologie und der damit verbundenen Notwendigkeit zur neuroanatomischen Ko-Registrierung von Ergebnissen aus Bildgebung und Histologie, ist eine systematische Herangehensweise zur überschneidenden Darstellung neurophysiologischer und -pathologischer Zustände im Pferdehirn erforderlich geworden.

Während in der bildgebenden Diagnostik erste Vorlagen zur Standardisierung wesentlicher Schnittebenen für das Pferdehirn publiziert wurden, sind ebensolche Hilfestellung für die strukturierte und reproduzierbare postmortale Aufarbeitung des equinen Hirns nicht existent.

Insbesondere weniger erfahrene Wissenschaftler/-innen und Diagnostiker/-innen werden somit vor die Herausforderung gestellt, symptomatogene Zonen und Regionen mit definierter oder unklarer Vulnerabilität im voluminösen Pferdehirn zu untersuchen oder zumindest sachgemäß zu beproben.

Diese Doktorarbeit hat sich deshalb zum Ziel gesetzt, ein Spezies-spezifisches Zuschnittprotokoll, analog zum Konsensus Statement der International Veterinary Epilepsy Task Force (IVETF) für Hunde und Katzen, für die sequenzielle hemisphärische und bihemisphärische Sektion des Pferdegehirns auszuarbeiten, das 1. an Hirnen unterschiedlicher Volumina anhand simpler externer anatomischer Orientierungspunkte anwendbar ist, 2. von Personen mit heterogenen neuroanatomischen Kenntnissen eingesetzt werden kann und 3. die 3-dimensionale Anordnung von Hirnstrukturen berücksichtigt und somit in repräsentativen und reproduzierbaren Zuschnitten unter Erhalt der Histomorphologie und -architektur resultiert.

Hierfür wurde eine bebilderte Zuschnittserie, begleitet von schematischen Illustrationen und instruktiven Videos, zusammengestellt und zur Überprüfung an 55 Formalin-fixierten Gehirnen, zugeschnitten von Personen mit unterschiedlichen neuroanatomischen Vorkenntnissen, getestet.

Die hieraus resultierenden 14 Hirnschnitte pro Gehirn wurden anhand 36 makro- und mikroskopischer Kriterien auf Eignung für neuroanatomische Studien und die neuropathologische Routinediagnostik beurteilt. Über alle Untersuchergruppen hinweg stellten sich dabei 95,2% der

Hirnschnitte als geeignet für neuroanatomische Studien bei gleichzeitiger 100%-iger Eignung für die Routinediagnostik heraus.

Obwohl die Untersucher/-innen mit heterogenem Material in Bezug auf Volumen, Fixierung und Autolyse konfrontiert waren, konnte ein signifikant negativer Effekt auf die neuroanatomische Akkuranz, beurteilt anhand erwähnter Kriterien, nur bei durch die Entnahme beschädigten Gehirnen nachgewiesen werden. Die notwendige Zeit für die Durchführung der Sektion erstreckte sich über einen Zeitraum von 14 bis 66 Minuten und konnte ohne negative Auswirkungen auf die neuroanatomische Akkuranz mit zunehmender Erfahrung auf ~20 Minuten reduziert werden.

Das erarbeitete Protokoll bewies sich somit als praktikabel, aussagekräftig und personenunabhängig reproduzierbar und kann generell für Forschungen am Pferdehirn im Praxisalltag empfohlen werden.

VII. SUMMARY

Neuroanatomical Evaluation of a Species-adapted Protocol for Systematic Brain Dissection in Horses for Scientific and Diagnostic Purposes

by Maya-Lena Bitschi

The implementation of advanced imaging modalities in equine neurology entails the need for accurate co-registration of imaging findings, neuroanatomical data and histological changes.

Whilst imaging templates for standardization of scanning planes and the algorithms for 3D reconstruction of the horse brain are readily available, there are no such aids for a structured and reproducible post-mortem processing. In the broad field, trimming in transverse sections is most common. This approach however provides unsatisfactory results for those structures with complex spatial organization. Moreover, section levels were chosen empirically without mentioning clear landmarks and therefore sections and data cannot be easily reproduced by other raters. In addition, it cannot be expected from routine pathologists to have sufficient knowledge of neuroanatomy to address symptomatogenic zones nor of neuropathology to address and sample explicitly vulnerable zones.

This doctoral thesis has therefore set itself the goal of developing a species-specific dissection protocol for sequential hemispheric and bihemispheric dissection of the horse brain, that 1. refers to simple and unequivocal external anatomical landmarks, 2. can be used by people with heterogenous neuroanatomical knowledge and 3. respects the 3-dimensional arrangement of complex areas and therefore results in representative and reproducible samples while preserving histomorphology and -architecture.

For this purpose, a systematic dissection protocol was created analogously to the consensus guidelines of the International Veterinary Epilepsy Task Force (IVETF) for dogs and cats (MATIASEK et al., 2015). After sequences went smoothly, the protocol was introduced to and tested in a group of volunteers with variable neuroanatomical skills using text instructions, a series of figures of landmarks and dissection planes, schematic illustrations and instructive videos for both hemispheric and bihemispheric dissection.

Altogether 55 dissections were monitored concerning time, performance and neuroanatomical accuracy. All raters felt confident to apply the protocol from the scratch. Across investigators, 95.2% of brain slabs were suitable for neuroanatomical studies while at the same 100% of

reference structures considered appropriate for routine diagnostics were appropriately presented. Although the investigators were confronted to the field situation of heterogenous volumes, structural preservation, fixation and autolysis, a significantly negative effect on neuroanatomical accuracy could only be ascertained in brains damaged during extraction.

Time required for performing the dissection ranged over a period of 14 to 66 minutes and could be reduced to ~20 minutes with repetition. Acceleration of performance did not negatively impact on the neuroanatomical accuracy.

The developed protocol therefore proved to be practicable, representative, and reproducible for young and experienced investigators and therefore can generally be recommended for application in equine brain research and diagnostics.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adolf JE, Perkins GA, Ainsworth D, Lahunta A. Lymphoma of the Central Nervous System in Horses. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2001; 23: 194-201.
- Annese J. The importance of combining MRI and large-scale digital histology in neuroimaging studies of brain connectivity and disease. *Frontiers in neuroinformatics* 2012; 6: 13-.
- Austin N, Rogers L. Asymmetry of flight and escape turning responses in horses. *Laterality* 2007; 12: 464-74.
- Baker JR, Ellis CE. A survey of post mortem findings in 480 horses 1958 to 1980: (1) causes of death. *Equine Vet J* 1981; 13: 43-6.
- Bassuino DM, Konradt G, Cruz RA, Silva GS, Gomes DC, Pavarini SP, Driemeier D. Characterization of spinal cord lesions in cattle and horses with rabies: the importance of correct sampling. *J Vet Diagn Invest* 2016; 28: 455-60.
- Beech J, Dodd DC. Toxoplasma-like encephalomyelitis in the horse. *Vet Pathol* 1974; 11: 87-96.
- Beichele G. Die Entwicklung der Osteologie des Pferdes in der Stallmeisterzeit. Diss. med. vet. 1979. LMU München.
- Blythe LL, Hultgren BD, Craig AM, Appell LH, Lassen ED, Mattson DE, Duffield D. Clinical, viral, and genetic evaluation of equine degenerative myeloencephalopathy in a family of Appaloosas. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198: 1005-13.
- Boone AC, Susta L, Rech RR, Steffens RC, Howerth EW. Pathology in practice. Diagnosis: Poliomyelitis with intraneuronal Negri bodies. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 237: 277-9.
- Boucher S, Arribarat G, Cartiaux B, Lallemand EA, Péran P, Deviers A, Mogenicato G. Diffusion Tensor Imaging Tractography of White Matter Tracts in the Equine Brain. *Front Vet Sci* 2020; 7: 382.
- Bugno-Poniewierska M, Stefaniuk-Szmukier M, Kajtoch AP, Fornal A, Piórkowska K, Ropka-Molik K. Genetic screening for cerebellar atrophy, severe combined immunodeficiency and lavender foal syndrome in Arabian horses in Poland. *Vet J* 2019; 248: 71-3.
- Burns E, Finno C. Equine degenerative myeloencephalopathy: prevalence, impact, and management. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 2018; Volume 9: 63-7.
- Cahill JI, Goulden BE. The pathogenesis of equine laryngeal hemiplegia — a review. *N Z Vet J* 1987; 35: 82-90.
- Cantile C, Del Piero F, Di Guardo G, Arispici M. Pathologic and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile virus infection in horses. *Vet Pathol* 2001; 38: 414-21.
- Cavalleri JMV, Metzger J, Hellige M, Lampe V, Stuckenschneider K, Tipold A, Beineke A, Becker K, Distl O, Feige K. Morphometric magnetic resonance imaging and genetic testing in cerebellar atrophy in Arabian horses. *BMC Veterinary Research* 2013; 9: 105-.
- Chang HT, Rumbelha WK, Patterson JS, Puschner B, Knight AP. Toxic equine parkinsonism: an immunohistochemical study of 10 horses with nigropallidal encephalomalacia. *Vet Pathol* 2012; 49: 398-402.
- Clercq E, Rossignol F, Martens A. Laryngeal hemiplegia in the horse: An update. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2018; 87: 283-94.

- Cole FJ (1949) A history of comparative anatomy, from Aristotle to the eighteenth century. Dover Publications, London
- Cordy DR. Nigropallidal encephalomalacia in horses associated with ingestion of yellow star thistle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1954; 13: 330-42.
- Covington AL, Magdesian K, Madigan J, Maleski K, Gray LC, Smith PA, Wisner E. Recurrent Esophageal Obstruction and Dysphagia due to a Brainstem Melanoma in a Horse. *J Vet Intern Med* 2008; 18: 245-7.
- Cozzi B, Povinelli M, Ballarin C, Granato A. The brain of the horse: weight and cephalization quotients. *Brain, behavior and evolution* 2014; 83: 9-16.
- Cozzi B, De Giorgio A, Peruffo A, Montelli S, Panin M, Bombardi C, Grandis A, Pirone A, Zambenedetti P, Corain L, Granato A. The laminar organization of the motor cortex in monodactylous mammals: a comparative assessment based on horse, chimpanzee, and macaque. *Brain Structure and Function* 2017; 222: 2743-57.
- David S, Abraham AM. Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect Dis (Lond)* 2016; 48: 571-86.
- de Lahunta A, Glass E, Kent M. Lower Motor Neuron: General Somatic Efferent, Cranial Nerve. In: *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*: Saunders 2014a: 193-6.
- de Lahunta A, Glass E, Kent M. Large Animal Spinal Cord Disease. In: *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*: Saunders 2014b: 308-26.
- DeBowes RM, Leipold HW, Turner-Beatty M. Cerebellar abiotrophy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1987; 3: 345-52.
- Dexler H (1899) *Die Nervenkrankheiten des Pferdes*. Franz Deuticke, Wien und Leipzig. 277
- Diallo-Danebrock R, Abbas M, Groß D, Kellner U. Geschichte der anatomischen und klinischen Obduktion. *Der Pathologe* 2019; 40: 93-100.
- Dominguez M, Münstermann S, de Guindos I, Timoney P. Equine disease events resulting from international horse movements: Systematic review and lessons learned. *Equine Vet J* 2016; 48: 641-53.
- Draper ACE, Piercy RJ. Pathological classification of equine recurrent laryngeal neuropathy. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1397-409.
- Dubey JP, Lindsay D, Saville W, Reed S, Granstrom D, Speer CA. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary parasitology* 2001; 95: 89-131.
- Dunowska M. A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part B: pathogenesis and epidemiology. *N Z Vet J* 2014; 62: 179-88.
- Dürwald R, Ludwig H. Borna Disease Virus (BDV), a (Zoonotic?) Worldwide Pathogen. A review of the History of the Disease and the Virus Infection with Comprehensive Bibliography. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 1997; 44: 147-84.
- Edwards L, Finno CJ. Genetics of Equine Neurologic Disease. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2020; 36: 255-72.
- Edwin EE, Jackman R. Nature of the Autofluorescent Material in Cerebrocortical Necrosis. *Journal of Neurochemistry* 1981; 37: 1054-6.

- Elliott C, McCowan C. Nigropallidal encephalomalacia in horses grazing *Rhaponticum repens* (creeping knapweed). *Australian Veterinary Journal* 2012; 90: 151-4.
- EQUINELLA. <http://www.equinella.ch>. 14.01.2021.
- Farmer K, Krueger K, Byrne RW. Visual laterality in the domestic horse (*Equus caballus*) interacting with humans. *Animal Cognition* 2010; 13: 229-38.
- Farmer K, Krüger K, Byrne RW, Marr I. Sensory laterality in affiliative interactions in domestic horses and ponies (*Equus caballus*). *Animal Cognition* 2018; 21: 631-7.
- Finnie JW. Pathology of traumatic brain injury. *Vet Res Commun* 2014; 38: 297-305.
- Finno CJ, Higgins RJ, Aleman M, Ofri R, Hollingsworth SR, Bannasch DL, Reilly CM, Madigan JE. Equine Degenerative Myeloencephalopathy in Lusitano Horses. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1439-46.
- Finno CJ, Valberg SJ, Shivers J, D'Almeida E, Armién AG. Evidence of the Primary Afferent Tracts Undergoing Neurodegeneration in Horses With Equine Degenerative Myeloencephalopathy Based on Calretinin Immunohistochemical Localization. *Vet Pathol* 2016; 53: 77-86.
- Fischer A (2013) 3 Diagnostik (II). In: *Die idiopathische Epilepsie des Hundes*. Eds Fischer A, Jurina K, Rentmeister K, Tipold A, von Klopmann T. Enke Verlag, Stuttgart. 120
- Fortier JC, Hould R (2013) *Histotechnologie: Théorie et procédés*. CCDMD Centre collégial de développement de matériel didactique, Québec
- Fowler ME. Nigropallidal encephalomalacia in the horse. *J Am Vet Med Assoc* 1965; 147: 607-16.
- Frank C, Madden DJ, Duncan C. Field Necropsy of the Horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2015; 31: 233-45.
- Furr M. Disorders of the peripheral nervous system. In: *Equine Neurology*, 2nd edn. Furr M, Reed F, eds. Oxford (United Kingdom): Blackwell Publishing 2008: 329-36.
- Furr M, Reed S. Neurologic Examination. In: *Equine Neurology*, 2nd edn. Furr M, Reed S, eds. Oxford (United Kingdom): Blackwell Publishing 2008: 65-76.
- Gandini G, Fatzer R, Mariscoli M, Spadari A, Cipone M, Jaggy A. Equine degenerative myeloencephalopathy in five Quarter Horses: clinical and neuropathological findings. *Equine Vet J* 2004; 36: 83-5.
- Goehring LS, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MMS. The mystery of equine herpes myeloencephalopathy. *Equine Veterinary Education* 2001; 13: 36-42.
- Goehring LS. Viral Diseases of the Nervous System. In: *Equine Neurology*. Furr MO, Reed S, eds.: 2007: 169-86.
- Goehring LS, Hussey GS, Ashton LV, Schenkel AR, Lunn DP. Infection of central nervous system endothelial cells by cell-associated EHV-1. *Vet Microbiol* 2011; 148: 389-95.
- Gosztonyi G, Ludwig H. Borna disease of horses. An immunohistological and virological study of naturally infected animals. *Acta Neuropathol* 1984; 64: 213-21.
- Gosztonyi G, Dietzschold B, Kao M, Rupprecht CE, Ludwig H, Koprowski H. Rabies and borna disease. A comparative pathogenetic study of two neurovirulent agents. *Lab Invest* 1993; 68: 285-95.

- Granstrom DE, Dubey JP, Davis SW, Fayer R, Fox JC, Poonacha KB, Giles RC, Comer PF. Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5: 88-90.
- Gurlt EF (1860) *Hand-Atlas zu dem Handbuche der vergleichenden Anatomie der Haus-Säugethiere*. Verlag von August Hirschwald, Berlin
- Hahn CN, Matiasek K, Dixon PM, Molony V, Rodenacker K, Mayhew IG. Histological and ultrastructural evidence that recurrent laryngeal neuropathy is a bilateral mononeuropathy limited to recurrent laryngeal nerves. *Equine Vet J* 2008; 40: 666-72.
- Hamir AN, Moser G, Rupprecht CE. A five year (1985–1989) retrospective study of equine neurological diseases with special reference to rabies. *J Comp Pathol* 1992; 106: 411-21.
- Hanche-Olsen S, Matiasek K, Molín J, Rosati M, Hahn C, Hultin Jäderlund K, Gröndahl G. Acquired equine polyneuropathy of Nordic horses: A conspicuous inclusion body schwannopathy. *Neuromuscul Disord* 2017; 27: 931-41.
- Holz CL, Sledge DG, Kiupel M, Nelli RK, Goehring LS, Soboll Hussey G. Histopathologic Findings Following Experimental Equine Herpesvirus 1 Infection of Horses. *Front Vet Sci* 2019; 6: 59.
- Irby NL. Neuro-ophthalmology in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2011; 27: 455-79.
- Jackson CA, deLahunta A, Dykes NL, Divers TJ. Neurological manifestation of cholesterinic granulomas in three horses. *Vet Rec* 1994; 135: 228-30.
- Jerison H (1973) *Evolution of the Brain and Intelligence*. Academic Press, New York, NY
- Joest E. Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornaschen Krankheit) des Pferdes. Ein Beitrag zur vergleichenden Pathologie des Zentralnervensystems. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 1911; 42: 293-324.
- Johnson PJ, Janvier V, Luh W-M, FitzMaurice M, Southard T, Barry EF. Equine Stereotaxic Population Average Brain Atlas With Neuroanatomic Correlation. *Frontiers in Neuroanatomy* 2019; 13
- Kaneene JB, Ross WA, Miller R. The Michigan equine monitoring system. II. Frequencies and impact of selected health problems. *Preventive Veterinary Medicine* 1997; 29: 277-92.
- Kinnunen PM, Palva A, Vaheri A, Vapalahti O. Epidemiology and host spectrum of Borna disease virus infections. *Journal of General Virology* 2013; 94: 247-62.
- Klaus C, Hörügel U, Hoffmann B, Beer M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: Clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet Microbiol* 2013; 163: 368-72.
- Koch T. Geschichte des Instituts für Veterinär-Anatomie. *Wiss. Zeitschr. der Humboldt - Univ. zu Berlin* 1965a; Sonderband: 117-25.
- Koch T. Zur Geschichte der Veterinärmedizinischen Fakultät der Humboldt - Universität zu Berlin. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Humboldt - Universität zu Berlin* 1965b; Sonderband: 9-52.
- Kohn CW, Fenner WR. Equine herpes myeloencephalopathy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1987; 3: 405-19.

- Kühn E. Was wird aus Friedrichs Lieblingpferd, wenn der Professor geht, Die anatomische Sammlung des Humboldt-Veterinärs Tankred Koch hat die DDR überstanden, ist aber erneut in Gefahr. Tagesspiegel vom 21.2.1994 1994;
- Kumar B, Manuja A, Gulati BR, Virmani N, Tripathi BN. Zoonotic Viral Diseases of Equines and Their Impact on Human and Animal Health. *Open Virol J* 2018; 12: 80-98.
- Lacombe VA, Sogaro-Robinson C, Reed SM. Diagnostic utility of computed tomography imaging in equine intracranial conditions. *Equine Veterinary Journal* 2010; 42: 393-9.
- Lafosse P-E (1772) *Cours d'hippiatrique, ou traité complet de la médecine des chevaux, orné de soixante & cinq planches gravées avec soin.* Par M. Lafosse, Hippiatre, A Paris: chez Edme. 685
- Larose C, Richard-Yris M-A, Hausberger M, Rogers LJ. Laterality of horses associated with emotionality in novel situations. *Laterality* 2006; 11: 355-67.
- Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 524-33.
- Laugier C, Tapprest J, Foucher N, Sevin C. A Necropsy Survey of Neurologic Diseases in 4,319 Horses Examined in Normandy (France) from 1986 to 2006. *Journal of equine veterinary science* 2009; 29: 561-8.
- Leblond A, Villard I, Leblond L, Sabatier P, Sasco AJ. A retrospective evaluation of the causes of death of 448 insured French horses in 1995. *Vet Res Commun* 2000; 24: 85-102.
- Lecollinet S, Pronost S, Couplier M, Beck C, Gonzalez G, Leblond A, Tritz P. Viral Equine Encephalitis, a Growing Threat to the Horse Population in Europe? *Viruses* 2019; 12
- Lerche E, Laverty S, Blais D, Sauvageau R, Cuvelliez S. Hemorrhagic myelomalacia following general anesthesia in a horse. *Cornell Vet* 1993; 83: 267-73.
- Lester GD, MacKay RJ, Smith-Meyer B. Primary meningeal lymphoma in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 201: 1219-21.
- Leupold J, Neubauer J, Bock M. Spinecho und Gradientenecho. *Der Radiologe* 2018; 58: 769-84.
- Liesche F, Ruf V, Zoubaa S, Kaletka G, Rosati M, Rubbenstroth D, Herden C, Goehring L, Wunderlich S, Wachter MF, Rieder G, Lichtmannegger I, Permanetter W, Heckmann JG, Angstwurm K, Neumann B, Märkl B, Haschka S, Niller HH, Schmidt B, Jantsch J, Brochhausen C, Schlottau K, Ebinger A, Hemmer B, Riemenschneider MJ, Herms J, Beer M, Matiasek K, Schlegel J. The neuropathology of fatal encephalomyelitis in human Bornavirus infection. *Acta Neuropathol* 2019; 138: 653-65.
- Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews* 1999; 79: 1431-568.
- Love S, Budka H, Ironside JW, Perry A (2015) *Greenfield's neuropathology*, 9th edition edn. CRC Press, Taylor & Francis Group, Florida
- Lunn DP, Mayhew IG. The neurological evaluation of horses. *Equine Veterinary Education* 1989; 1: 94-101.
- Lunn DP, Davis-Poynter N, Flaminio MJ, Horohov DW, Osterrieder K, Pusterla N, Townsend HG. Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 450-61.

- MacKay RJ. Neurodegenerative Disorders. In: Equine Neurology. Furr M, Reed S, eds.: Blackwell Publishing 2008: 235-55.
- Masty J. Overview of Neuroanatomy. In: Equine Neurology. Furr M, Reed S, eds. Iowa: Blackwell Publishing 2007: 3-31.
- Matiasek K, Pumarola M, Rosati M, Fernández-Flores F, Fischer A, Wagner E, Berendt M, Bhatti S, Risio L, Robyn F, Long S, Muñana K, Patterson E, Pakozdy A, Penderis J, Platt S, Podell M, Potschka H, Rusbridge C, Volk H. International Veterinary Epilepsy Task Force recommendations for systematic sampling and processing of brains from epileptic dogs and cats. *BMC Veterinary Research* 2015; 11: 216.
- Mayhew IG, Watson AG, Heissan JA. Congenital occipitoatlantoaxial malformations in the horse. *Equine Vet J* 1978a; 10: 103-13.
- Mayhew IG, deLahunta A, Whitlock RH, Krook L, Tasker JB. Spinal cord disease in the horse. *Cornell Vet* 1978b; 68 Suppl 6: 1-207.
- Mayhew IG, Brown CM, Stowe HD, Trapp AL, Derksen FJ, Clement SF. Equine degenerative myeloencephalopathy: a vitamin E deficiency that may be familial. *J Vet Intern Med* 1987; 1: 45-50.
- Mayhew IG (1989) Large animal neurology : a handbook for veterinary clinicians. Philadelphia (Pa.) : Lea & Febiger
- Mayhew IG. Equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Equine Veterinary Education* 1996; 8: 29-31.
- Mayhew IG (2008) Large Animal Neurology, Second edn. Wiley-Blackwell Publishing, Chichester, U.K.; Ames, Iowa
- McCabe L, Griffin LD, Kinzer A, Chandler M, Beckwith JB, McCabe ER. Overo lethal white foal syndrome: equine model of aganglionic megacolon (Hirschsprung disease). *Am J Med Genet* 1990; 36: 336-40.
- McFadyean JS (1884) The anatomy of the horse, a dissection guide. W. & A. K. Johnston, Ltd., Edinburgh and London
- Metcalfe LVA, O'Brien PJ, Papakonstantinou S, Cahalan SD, McAllister H, Duggan VE. Malignant melanoma in a grey horse: case presentation and review of equine melanoma treatment options. *Irish Veterinary Journal* 2013; 66: 22.
- Minervini S, Accogli G, Pirone A, Graic J-M, Cozzi B, Desantis S. Brain mass and encephalization quotients in the domestic industrial pig (*Sus scrofa*). *PLOS ONE* 2016; 11: e0157378.
- Morgan RE, Dunkel B, Spiro S, Beltran E. Computed tomographic and magnetic resonance imaging of a coup contrecoup traumatic brain injury in a horse. *Equine Veterinary Education* 2021;
- Müller T. Methylene blue supravital staining: an evaluation of its applicability to the mammalian brain and pineal gland. *Histol Histopathol* 1998; 13: 1019-26.
- Nappert G, Vrins A, Breton L, Beauregard M. A retrospective study of nineteen ataxic horses. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* 1989; 30: 802-6.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004) Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Parey, Stuttgart

- Nitzsche B, Frey S, Collins LD, Seeger J, Lobsien D, Dreyer A, Kirsten H, Stoffel MH, Fonov VS, Boltze J. A stereotaxic, population-averaged T1w ovine brain atlas including cerebral morphology and tissue volumes. *Front Neuroanat* 2015; 9: 69.
- Nout Y. Central Nervous System Trauma. In: *Equine Neurology*: Blackwell Publishing 2008: 305-28.
- Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. The Concept of Ischemic Penumbra in Acute Stroke and Therapeutic Opportunities. *European Neurology* 2009; 61: 321-30.
- Pakozdy A, Gruber A, Kneissl S, Leschnik M, Halasz P, Thalhammer JG. Complex partial cluster seizures in cats with orofacial involvement. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 687-93.
- Paradis MR. Tumors of the Central Nervous System. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1998; 14: 543-61.
- Pellegrini-Masini A, Livesey LC. Meningitis and Encephalomyelitis in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2006; 22: 553-89.
- Pestalozza IF, Legge SD, Calabresi M, Lenzi GL. Ischaemic penumbra: highlights. *Clinical and Experimental Hypertension* 2002; 24: 517-29.
- Peters M, Graf G, Pohlenz J. Idiopathic systemic granulomatous disease with encephalitis in a horse. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003; 50: 108-12.
- Pongratz MC, Kircher PR, Lang J, Hilbe M, Wehrli Eser M. Diagnostic evaluation of a foal with Cerebellar Abiotrophy using Magnetic Resonance Imaging (MRI). *Pferdeheilkunde* 2010; 26: 559-62.
- Porter R (2000) *Die Kunst des Heilens*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Rech R, Barros C. Neurologic Diseases in Horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2015; 31: 281-306.
- Reed S. Neurology is not a euphemism for necropsy: A review of selected neurological diseases affecting horses. 2008: 78-109.
- RESPE. <http://www.respe.net>. 14.01.2021.
- Robertson JL. The Basics of Equine Neuropathology. In: *Equine Neurology*. Furr M, Reed SM, eds.: 2007: 157-66.
- Rooney JR (1970) *Autopsy of the Horse, Technique and Interpretation*. By James R. Rooney, D.V.M. The Williams & Wilkins Co., Baltimore
- Ruini C (1598) *Dell'anatomia et dell'infirmita del cavallo*. Presso gli Heredi di Gio. Rossi, Bologna
- Rusbridge C, Long S, Jovanovik J, Milne M, Berendt M, Bhatti SFM, De Risio L, Farquhar RG, Fischer A, Matiasek K, Muñana K, Patterson EE, Pakozdy A, Penderis J, Platt S, Podell M, Potschka H, Stein VM, Tipold A, Volk HA. International Veterinary Epilepsy Task Force recommendations for a veterinary epilepsy-specific MRI protocol. *BMC Veterinary Research* 2015; 11: 194.
- Rushton JO, Lecollinet S, Hubálek Z, Svobodová P, Lussy H, Nowotny N. Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011. *Emerging infectious diseases* 2013; 19: 635-7.
- Rütten M, Lehner A, Pospischil A, Sydler T. Cerebral Listeriosis in an Adult Freiburger Gelding. *J Comp Pathol* 2006; 134: 249-53.
- Salat J, Ruzek D. Tick-borne encephalitis in domestic animals. *Acta Virol* 2020; 64: 226-32.

- Schäffer J. Die Pferdeheilkunde in der Spätantike - zum Stand der Bearbeitung des Corpus Hippiatricorum Graecorum. *Pferdeheilkunde* 1985; 75-94.
- Schmidt MJ, Knemeyer C, Heinsen H. Neuroanatomy of the equine brain as revealed by high-field (3Tesla) magnetic-resonance-imaging. *PLOS ONE* 2019; 14: e0213814.
- Schrader GW (1863) Biographisch-literarisches Lexicon der Thierärzte aller Zeiten und Länder sowie der Naturforscher, Aerzte, Landwirthe, Stallmeister u.s.w., welche sich um die Thierheilkunde verdient gemacht haben. Ebner & Seubert, Stuttgart
- Schröder F. In der Fakultät der Veterinärmedizin entdeckt: "Condé", das letzte Leibpferd Friedrich des Großen. ND 1990;
- Schultze C, Wuttke W, Otto B, Kähn W, Venner M. Toxisch bedingter Hahnentritt (Australian Stringhalt) bei Pferden in Deutschland. *Pferdeheilkunde* 25 2009; 2 (März/April): 115-8.
- Scott EY, Woolard KD, Finno CJ, Murray JD. Cerebellar Abiotrophy Across Domestic Species. *Cerebellum* 2018; 17: 372-9.
- Sebastian MM, Giles RC. Fibrocartilaginous Embolic Myelopathy in a Horse. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 2004; 51: 341-3.
- Sipma KD, Cornillie P, Saulez MN, Stout TA, Voorhout G, Back W. Phenotypic characteristics of hydrocephalus in stillborn Friesian foals. *Vet Pathol* 2013; 50: 1037-42.
- Sisó S, Ferrer I, Pumarola M. Abnormal synaptic protein expression in two Arabian horses with equine degenerative myeloencephalopathy. *Vet J* 2003; 166: 238-43.
- Sisson S, Grossman JD, Getty R (1975) Sisson and Grossman's The anatomy of the domestic animals. Saunders, Philadelphia
- Stein LT, Rech RR, Harrison L, Brown CC. Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species. *Vet Pathol* 2010; 47: 630-3.
- Stewart WJ. A case of suspected acute grass sickness in a thoroughbred mare. *Aust Vet J* 1977; 53: 196.
- Stuckenschneider K, Hellige M, Feige K, Gasse H. 3-Tesla magnetic resonance imaging of the equine brain in healthy horses - Potentials and limitations. *Pferdeheilkunde* 2014; 30: 657-70.
- Summers B. Diseases of the peripheral nervous system. In: *Veterinary neuropathology*. Summers B, Cummings JF, De Lahunta A, eds. St. Louis: Mosby: 1995a: 402-501.
- Summers BA, Cummings JF, DeLahunta A (1995a) *Veterinary neuropathology*, St. Louis: Mosby
- Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A. Injuries to the central nervous system: vertebral malformations and injuries to the spinal cord. In: *Veterinary neuropathology*. Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A, eds. St. Louis, Missouri: Mosby 1995b: 189-207.
- Summers BA. Inflammatory diseases of the central nervous system. In: *Veterinary neuropathology*. Summers BA, Cummings JF, DeLahunta A, eds. St. Louis: Mosby: 1995b: 95-188.
- Tapprest J, Laugier C. l'activité d'autopsie des équidés à l'anses-dozulé: un dispositif spécifique pour des retombées particulières. *Bulletin Epidémiologique* 2012: 5-7.
- Taqi SA, Sami SA, Sami LB, Zaki SA. A review of artifacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol* 2018; 22: 279.

- Taylor HW, Vandeveld M, Firth EC. Ischemic myelopathy caused by fibrocartilaginous emboli in a horse. *Vet Pathol* 1977; 14: 479-81.
- Toribio RE. Equine Neonatal Encephalopathy: Facts, Evidence, and Opinions. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2019; 35: 363-78.
- Trim CM. Postanesthetic hemorrhagic myelopathy or myelomalacia. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1997; 13: 73-7.
- Trostle S, Dubielzig R, Beck K. Examination of frozen cross sections of cervical spinal intersegments in nine horses with cervical vertebral malformation: lesions associated with spinal cord compression. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1993; 5: 423-31.
- Turner-Beatty M, Leipold HW, Cash W, al. e (1985) Cerebellar disease in the horse. Proceedings of the 21st annual convention of the American Association of Equine Practitioners. 241-55
- Tyler CM, Davis RE, Begg AP, Hutchins DR, Hodgson DR. A survey of neurological diseases in horses. *Aust Vet J* 1993; 70: 445-9.
- Valberg S, Lewis S, Shivers J, Barnes N, Konczak J, Draper A, Armién A. The Equine Movement Disorder "Shivers" Is Associated With Selective Cerebellar Purkinje Cell Axonal Degeneration. *Veterinary pathology* 2015; 52
- Vandeveld M, Higgins RJ, Oevermann A. Metabolic encephalopathy. *Veterinary neuropathology. Essentials of theory and practice* 2012: 122-4.
- von den Driesch A, Peters J (2003) *Geschichte der Tiermedizin 5000 Jahre Tierheilkunde*. Schattauer GmbH, Stuttgart. 278
- von Staden H, Chalcedonius H (1989) *Herophilus: The Art of Medicine in Early Alexandria: Edition, Translation and Essays*. Cambridge University Press
- Waldvogel A. Zeckenenzephalitis beim Pferd. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1981; 123: 227-33.
- Walling BE, Stewart MC, Valli VE. Pathology in practice. Fibrocartilaginous embolism. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 239: 199-201.
- Watson AG, Mayhew IG. Familial congenital occipitoatlantoaxial malformation (OAAM) in the Arabian horse. *Spine (Phila Pa 1976)* 1986; 11: 334-9.
- Wernicke RKH. *Anmerkungen zur Geschichte der "Alten Zootomie"*. Selbstverlag Berlin 2004;
- Wernicke RKH. Von der Zootomie zur neuzeitlichen Pferdeheilkunde - Entwicklung der Tiermedizin in Berlin-Mitte. *Pferdeheilkunde* 2005; 21: 327-40.
- Wilson WD, Hughes SJ, Ghoshal NG, McNeel SV. Occipitoatlantoaxial malformation in two non-Arabian horses. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 187: 36-40.
- Winter GS (1678) *Georg Simon Winters. Wolerfahrner Roß-Arzt oder Vollständige Roß-Artzney-Kunst*. Endter, Nürnberg
- Wohlsein P, Deschl U, Baumgärtner W. Nonlesions, unusual cell types, and postmortem artifacts in the central nervous system of domestic animals. *Vet Pathol* 2013; 50: 122-43.
- Wylie CE, Proudman CJ. Equine grass sickness: epidemiology, diagnosis, and global distribution. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2009; 25: 381-99.

- Yoshikawa T (1968) Atlas of the brains of domestic animals. University of Tokyo Press; Pennsylvania State University Press, Tokyo; University Park
- Young S, Brown WW, Klinger B. Nigropallidal encephalomalacia in horses fed Russian knapweed--*Centaurea repens* L. *Am J Vet Res* 1970a; 31: 1393-404.
- Young S, Brown WW, Klinger B. Nigropallidal encephalomalacia in horses caused by ingestion of weeds of the genus *Centaurea*. *J Am Vet Med Assoc* 1970b; 157: 1602-5.
- Yovich JV, LeCouteur RA, Stashak TS, Grandy JL, Whalen LR. Postanesthetic hemorrhagic myelopathy in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 188: 300-1.
- Zientara S, Trap D, Fontaine JJ, Gicquel B, Sailleau C, Plateau E. Survey of equine hepatic encephalopathy in France in 1992. *Vet Rec* 1994; 134: 18-9.

IX. ANHANG

1. Sektionsvideos

Den nachstehenden Sektionsprotokollen entsprechende Videos sind online als .mp4 verfügbar und herunterladbar unter: <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.614929> bzw.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2020.614929/full#supplementary-material>

- Hemisphärische Version (links): Video_1_A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain–Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts.mp4
- Hemisphärische Version (rechts): Video_2_A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain–Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts.mp4
- Bihemisphärische Version: Video_3_A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain–Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts.mp4

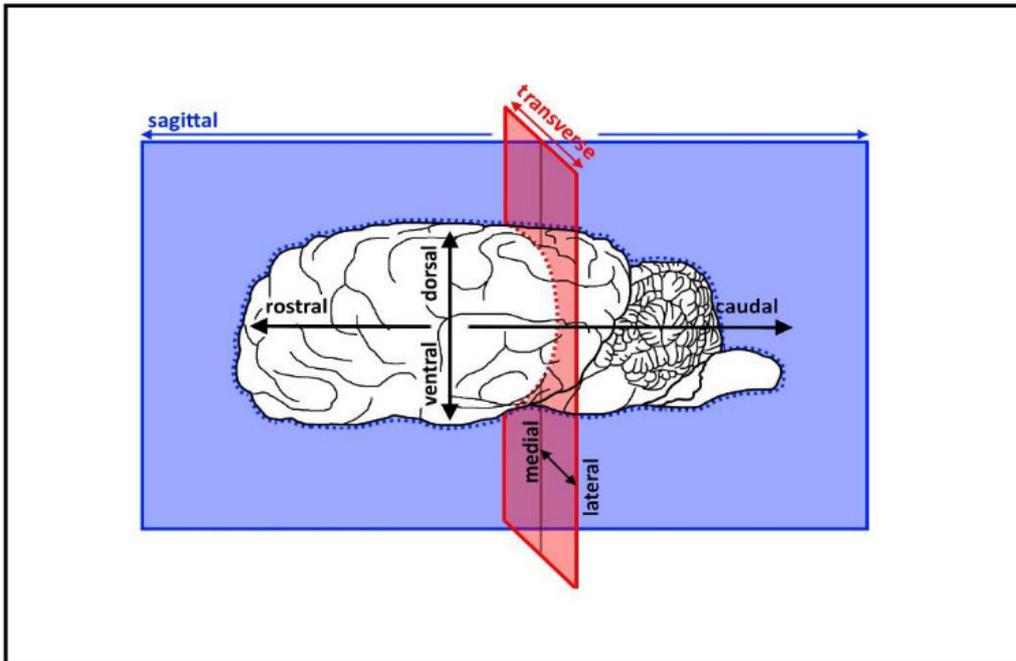
2. Sektionsanleitungen

Die Anleitungen für die links-, rechts- und bihemisphärische Sektion sind auch online als PDF verfügbar und herunterladbar unter: <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.614929> bzw.

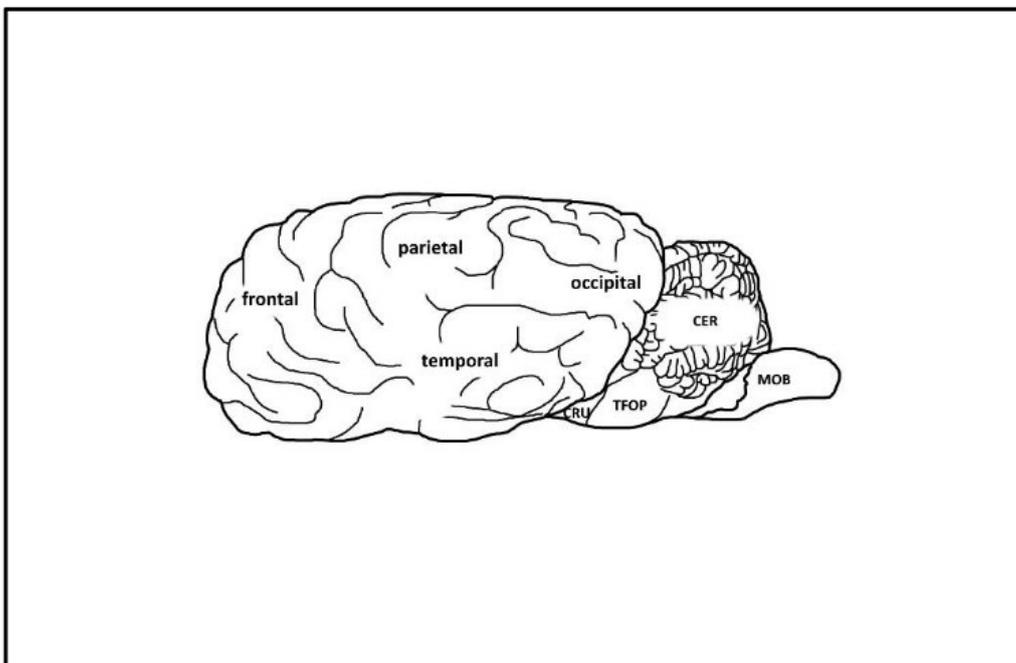
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2020.614929/full#supplementary-material>

- Hemisphärische Version (links): Data_Sheet_3_A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain–Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts.PDF
- Hemisphärische Version (rechts): Data_Sheet_4_A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain–Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts.PDF
- Bihemisphärische Version: Data_Sheet_5_A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain–Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts.PDF

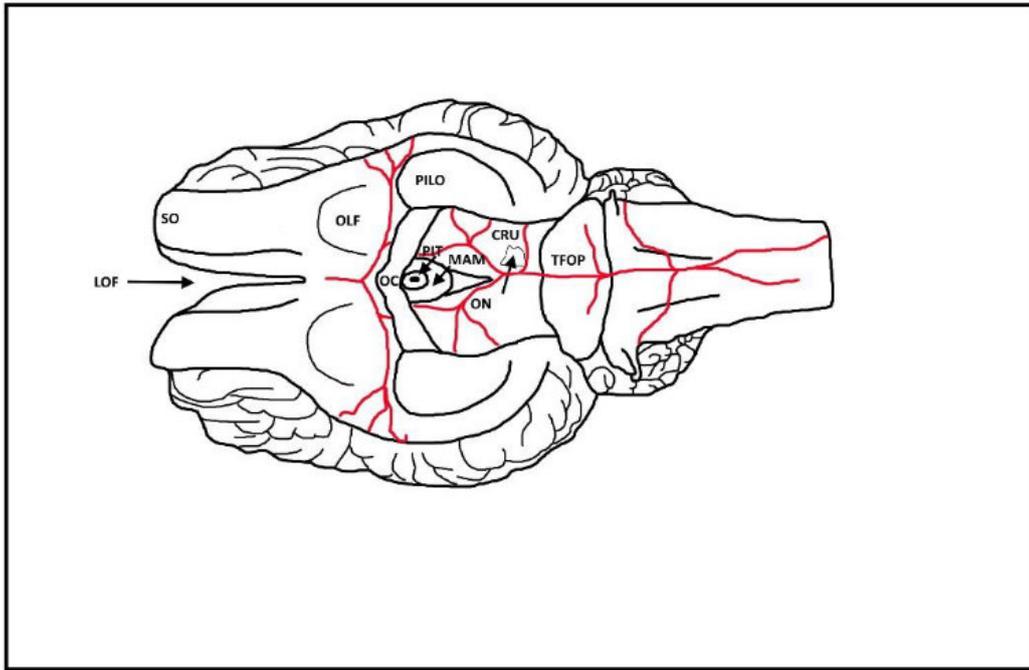
2.1. Hemisphärische Version (links)



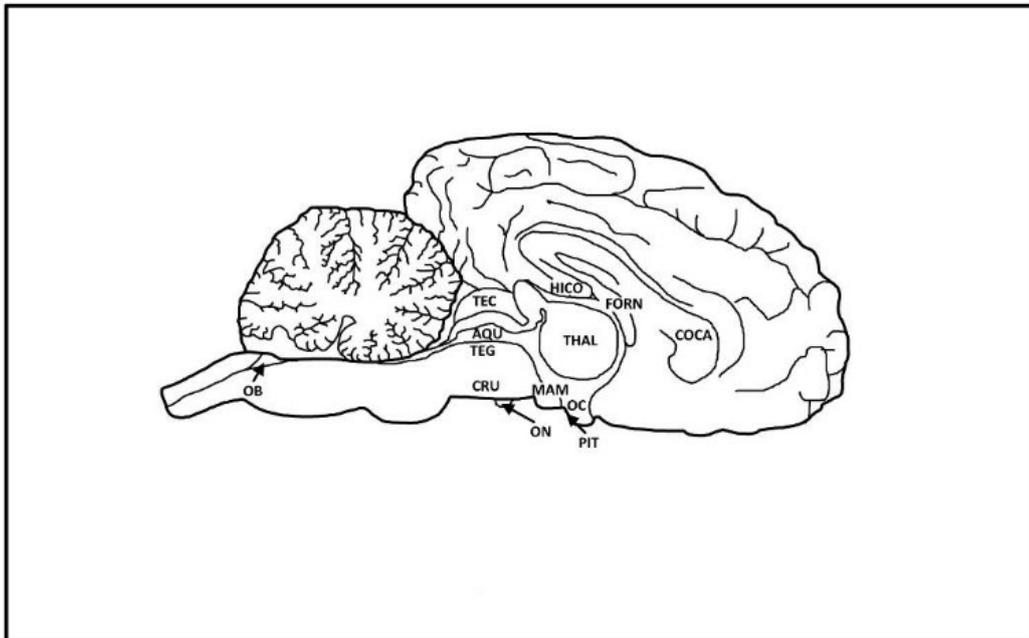
Supplementary Figure 1. Planes and orientation. Colours demonstrate sagittal (blue) and transverse (red) planes. The sections performed in the protocol are numbered from 1-21 in the order of implementation and termed according to the individual plane (e.g., 1-TS, 6-SAG, 8-TILT). Sagittal (SAG), lateral-tilted (TILT), transverse (TS) and transverse-tilted (TS-TILT).



Supplementary Figure 2. Landmarks of the dorsolateral brain surface. Forebrain with frontal, parietal, temporal, occipital lobe. Midbrain with cerebral crus (CRU). Hindbrain with transverse fibres of pons (TFOP), cerebellum (CER) and medulla oblongata (MOB).



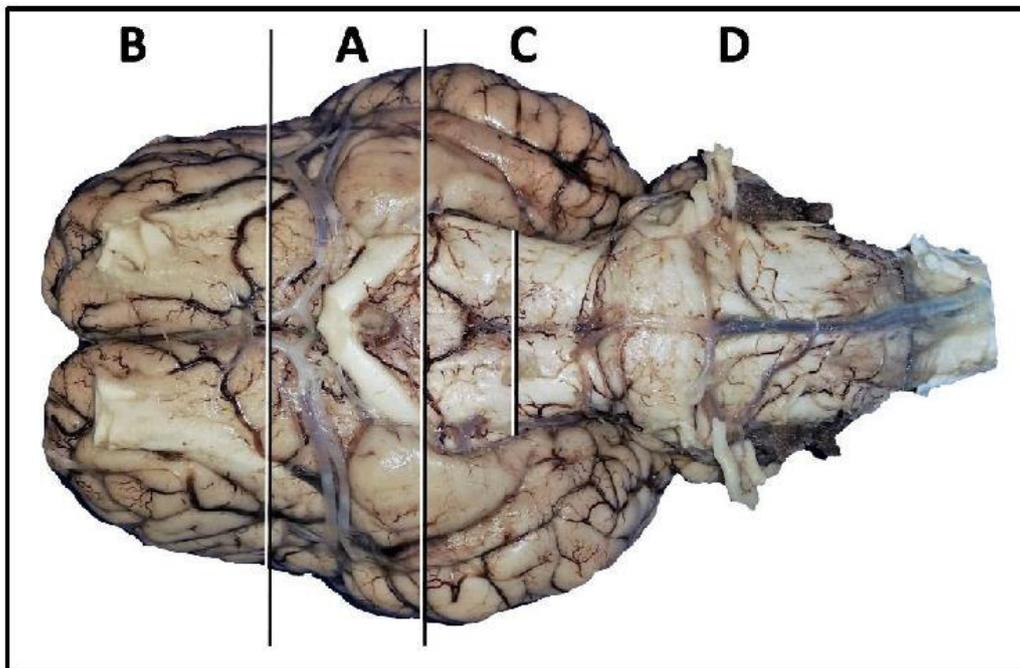
Supplementary Figure 3. Landmarks of the ventral brain surface. Cerebral crus (CRU), longitudinal fissure (LOF), mammillary bodies (MAM), optic chiasm (OC), olfactory tubercle (OLF), oculomotor nerve (ON), piriform lobe (PILO), pituitary stalk/infundibular recess (PIT), stria olfactoria (SO) and transverse fibres of pons (TFOP).



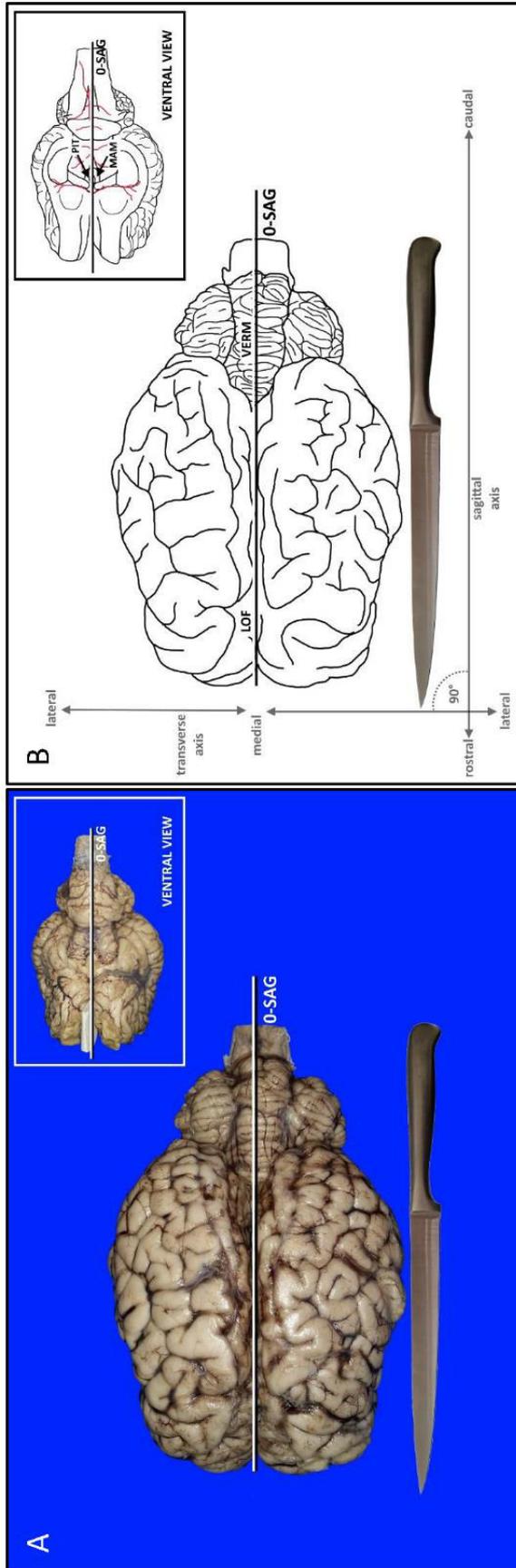
Supplementary Figure 4. Landmarks of the median brain surface. Mesencephalic aqueduct (AQU), corpus callosum (COCA), cerebral crus (CRU), fornix (FORN), hippocampal commissure (HICO), mammillary bodies (MAM), obex (OB), optic chiasm (OC), oculomotor nerve (ON), pituitary stalk/ infundibular recess (PIT), midbrain tectum (TEC), midbrain tegmentum (TEG), transverse fibres of pons (TFOP) and thalamus (THAL).



Supplementary Figure 5. Equipment for performance of the protocol. Cutting board (1), scalpel blade and handle (2), microtome blade (3), customary long blade (4), microscope slide labelled with maximum slab size herein 4 x 5.5cm (5)



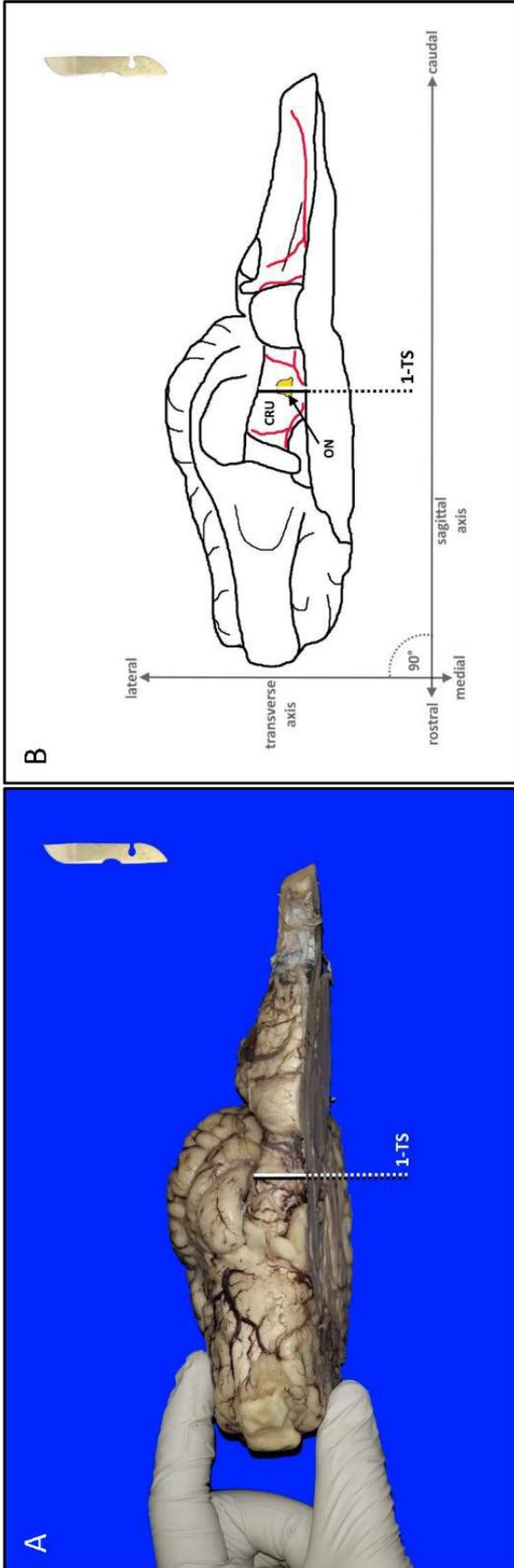
Supplementary Figure 6. Virtual division of the brain into 4 blocks (A to D) for simplification of tissue handling and obtainment of even cut surfaces for placement of the blocks on the worktop.



Supplementary Figure 7. Landmarks for 0-SAG: longitudinal fissure (LOF), mammillary bodies (MAM), pituitary stalk/ infundibular recess (PIT), vermis (VERM). Sagittal section (SAG). Customary long blade. (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 1 Instruction for performance of 0-SAG (Supplementary Figure 7)

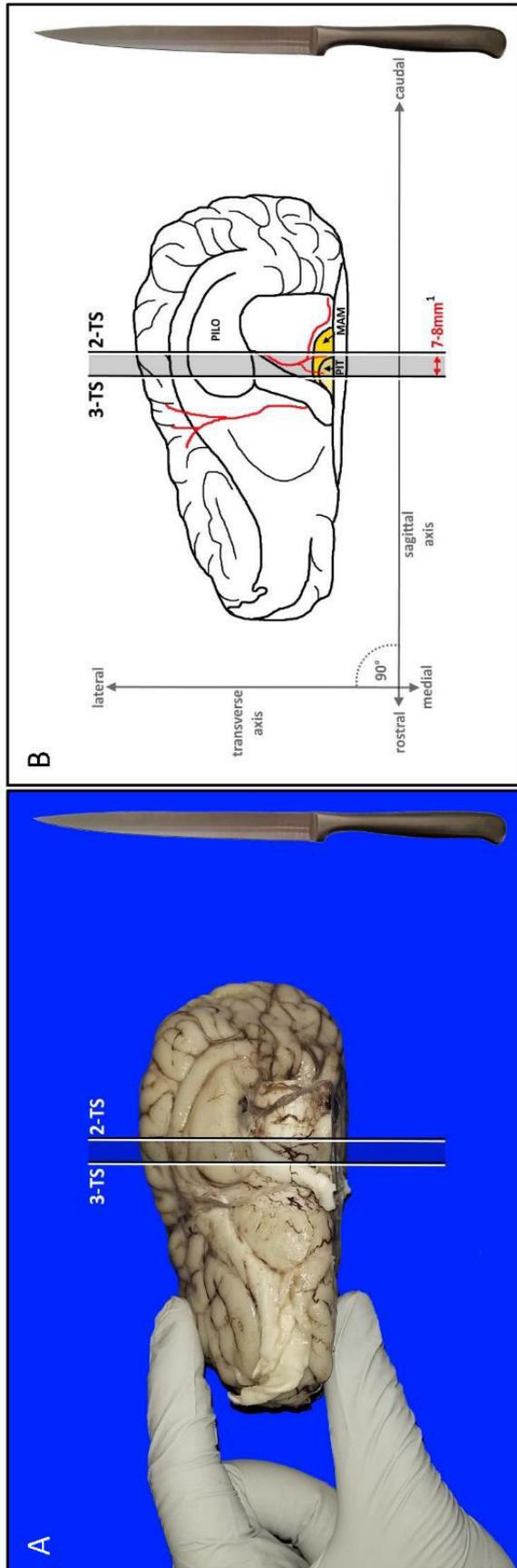
Step	Aim / harvest	Preparation and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Difficulty
0-SAG	Separation of hemispheres	Place the brain with its ventral or dorsal surface on the worktop Put folded gauze or paper into the longitudinal fissure (interhemispheric fissure) to prevent accidental cut of one of the hemispheres during separation	Dorsal or ventral view of the brain	Midsagittal line extending from the longitudinal fissure to the dorsal or ventral median sulcus of the medulla oblongata	2D knife axis: rostrocaudal Plane: sagittal (SAG) Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: dorsoventral or ventrodorsal	Easy



Supplementary Figure 8. Landmarks for 1-TS: cerebral crus (CRU), oculomotor nerve (ON). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow). Scalpel blade. (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 2 Instruction for performance of 1-TS (Supplementary Figure 8)

Step	Aim / harvest	Placement and preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Difficulty
1-TS	Transsection of the midbrain <u>Cave:</u> do not cut into occipital lobe (use small blade)	Place the hemisphere with its dorsal surface on the worktop and fix it between your thumb and forefinger to allow for ventrodorsal section	Ventral top view of the left hemisphere	Transverse line through cerebral crus at oculomotor nerve emergence	2D knife axis: mediolateral Plane: transverse (TS) Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: ventrodorsal	Easy



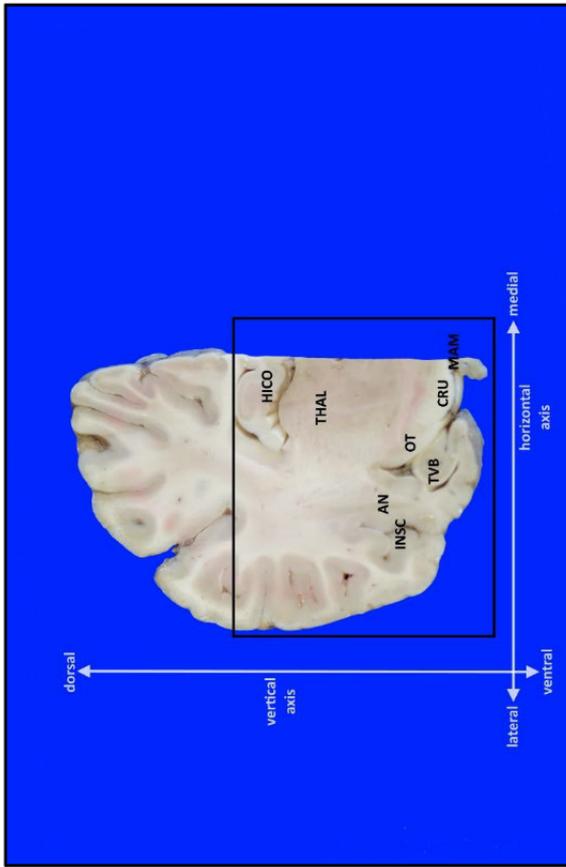
Supplementary Figure 9. Landmarks for 2-TS and 3-TS: mammillary bodies (MAM), piriform lobe (PILO), pituitary stalk/ infundibular recess (PIT). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). Customary long blade. (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 3 Instructions for obtainment of 1st slab out of Block A (Supplementary Figure 9)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
2-TS	Place the block with its dorsal surface on the worktop and fix it between your thumb and forefinger to allow for ventrodorsal section. → hold hemisphere in the way and direction of your convenience	Ventral top view of the left hemisphere	Transverse line through widest part of piriform lobe and mammillary bodies	2D knife axis: mediolateral Plane: transverse (TS) Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: ventrodorsal	<ul style="list-style-type: none"> hippocampal commissure temporoventral body of hippocampus amygdaloid nucleus optic tract cerebral crus mammillary bodies piriform cortex 	Easy

3-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line through pituitary stalk/infundibular recess resp. 7-8mm ¹ parallel and rostral to 2-TS	as above	<ul style="list-style-type: none"> • prehippocampal fornix • caudate nucleus (tail) • ventral anterior nucleus • optic tract • periventricular zone of the hypothalamus • piriform cortex 	Easy
-------------	------------------------------------	----------	--	----------	---	------

¹ the distance (mm) between sections depends on animal size resp. brain size and ranges from 4-5mm (foal) to 10mm (draft horse)

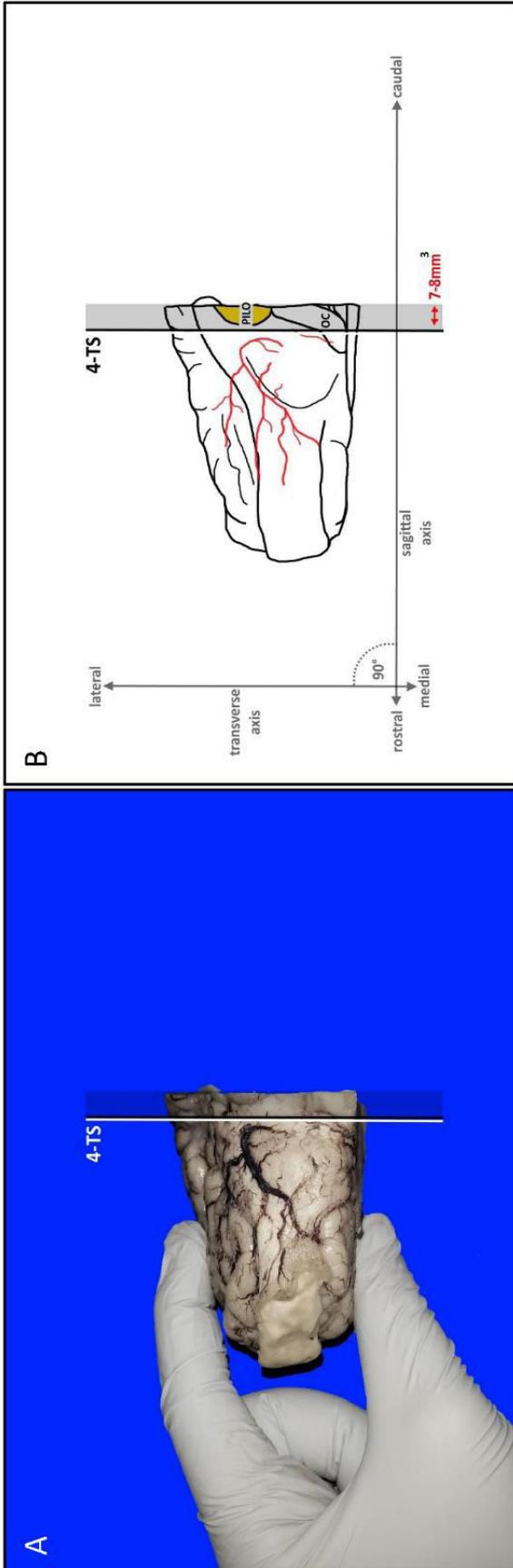


Supplementary Figure 9.1. Top view. 1st slab out of Block A. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: amygdaloid nucleus (AN), cerebral crus (CRU), hippocampal commissure (HICO), insular cortex (INSC), mammillary bodies (MAM), optic tract (OT), thalamus (THAL), temporoventral body of hippocampus (TVB).

Supplementary Table 3.1 Trimming of 1st slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Rostral cutting surface ²	Top view	Horizontal line above hippocampal commissure	<ul style="list-style-type: none"> • hippocampal commissure • thalamus • temporoventral body of hippocampus • amygdaloid nucleus • optic tract • cerebral crus • mammillary bodies • piriform cortex 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

² use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 10. Landmarks for 4-TS: optic chiasm (OC), piriform lobe (PILO). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 4 Instruction for obtainment of 2nd slab out of Block A (Supplementary Figure 10)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
4-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line at the caudal border of the optic chiasm, rostral to piriform lobe resp. 7-8mm ³ parallel and rostral to 3-TS	<p><i>2D knife axis:</i> mediolateral</p> <p><i>Plane:</i> transverse (TS)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> ventrodorsal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • prehippocampal fornix • basal nuclei • capsules • rostral commissure • septal nuclei • prepiriform cortex 	Easy

³ the distance (mm) between sections depends on animal size resp. brain size and ranges from 4-5mm (foal) to 10mm (draft horse)

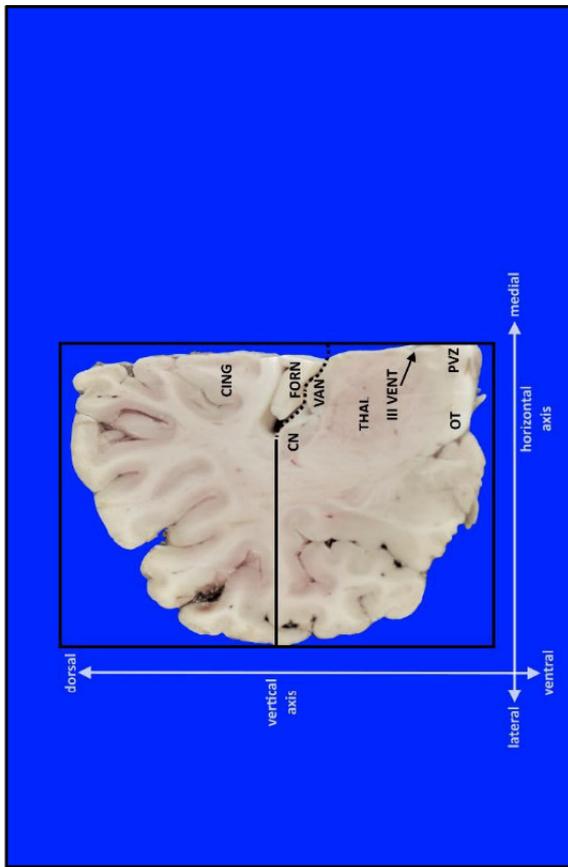
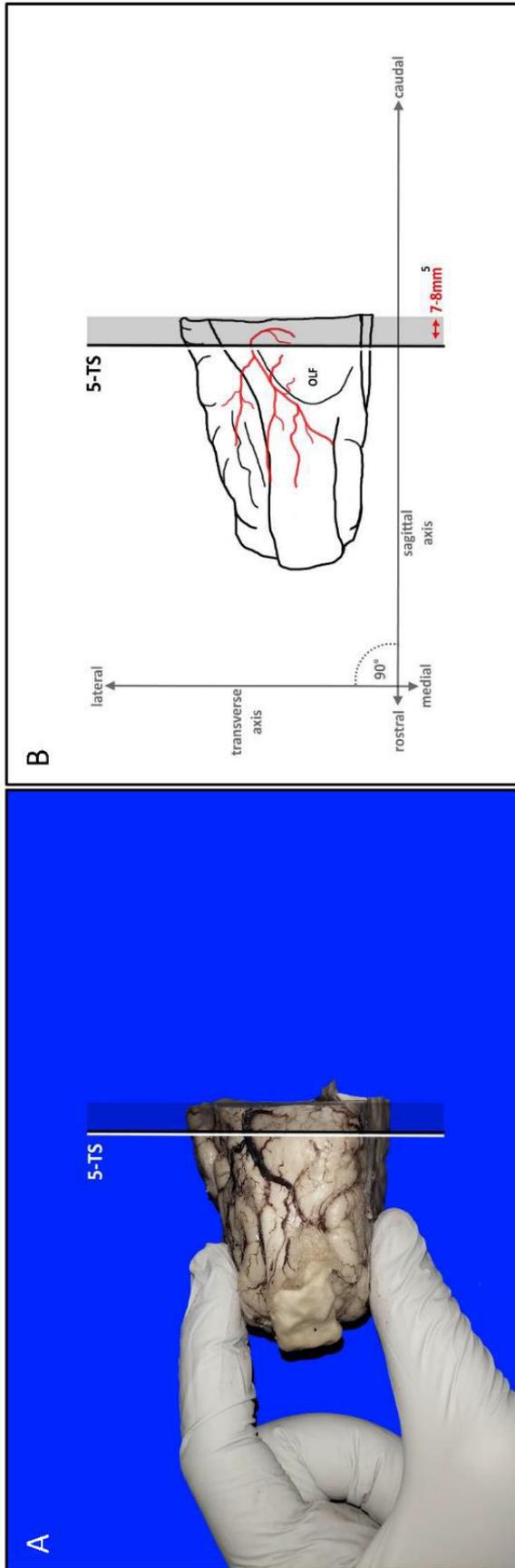


Figure 10.1. Top view. 2nd slab out of Block A. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: 3rd ventricle (III VENT), cingulate gyrus (CING), tail of caudate nucleus (CN), fornix (FORN), optic tract (OT), periventricular zone (PVZ) of hypothalamus, thalamus (THAL), ventral anterior nucleus (VAN).

Supplementary Table 4.1 Trimming of 2nd slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Rostral cutting surface ⁴	Top view	Horizontal line at lateral angle of lateral ventricles	<ul style="list-style-type: none"> • corpus callosum • ventral anterior nucleus • caudate nucleus (tail) • optic tract • periventricular zone of hypothalamus 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

⁴ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

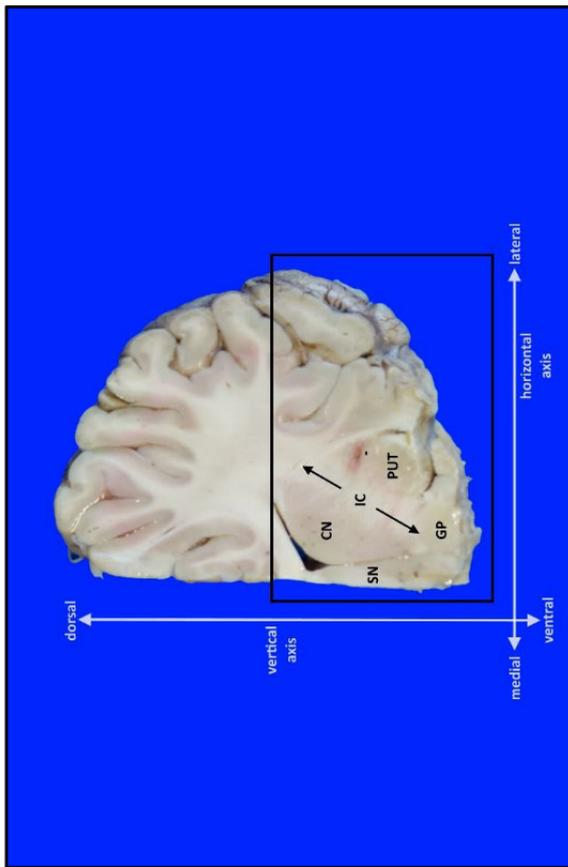


Supplementary Figure 11. Landmarks for 5-TS: olfactory tubercle (OLF). Transverse section (TS). Blood vessels (red), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 5 Instruction for obtainment of 3rd slab out of Block A (Supplementary Figure 11)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
5-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line through pre-piriform cortex and olfactory tubercle rostral to optic chiasm resp. 7-8mm ⁵ parallel and rostral to 4-TS	2D knife axis: mediolateral Plane: transverse (TS) Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: ventrodorsal	<ul style="list-style-type: none"> • prehippocampal fornix • basal nuclei • capsules • rostral commissure • septal nuclei • frontotemporal cortex 	Easy

⁵ the distance (mm) between sections depends on animal size resp. brain size and ranges from 4-5mm (foal) to 10mm (draft horse)

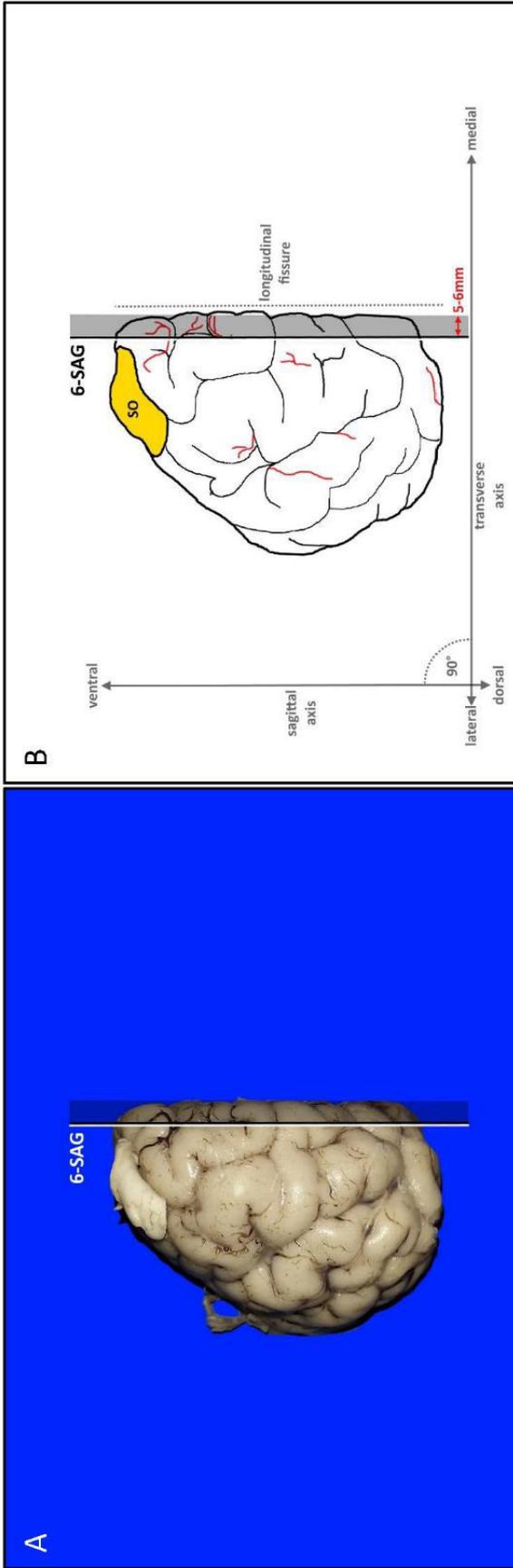


Supplementary Figure 11.1. Top view, 3rd slab out of Block A. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudate nucleus (CN), globus pallidus (GP), internal capsule (IC), putamen (PUT), septal nuclei (SN).

Supplementary Table 5.1 Trimming of 3rd slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Caudal cutting surface ⁶	Top view	Horizontal line at lateral angle of lateral ventricles	<ul style="list-style-type: none"> • caudate nucleus • putamen • globus pallidus • internal capsule • septal nuclei • frontotemporal cortex 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

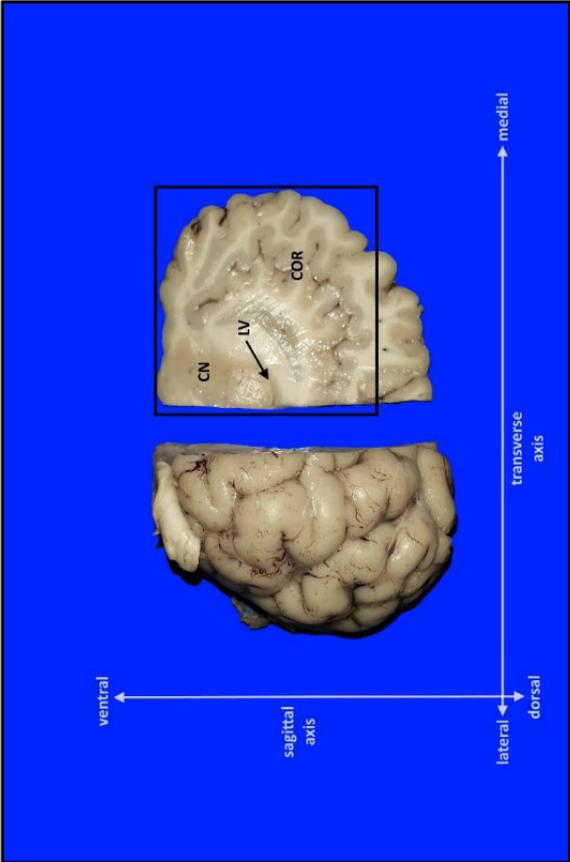
⁶ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 12. Landmark for 6-SAG: stria olfactoria (SO). Sagittal section (SAG). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 6 Instruction for obtainment of 4th slab out of Block B (Supplementary Figure 12)

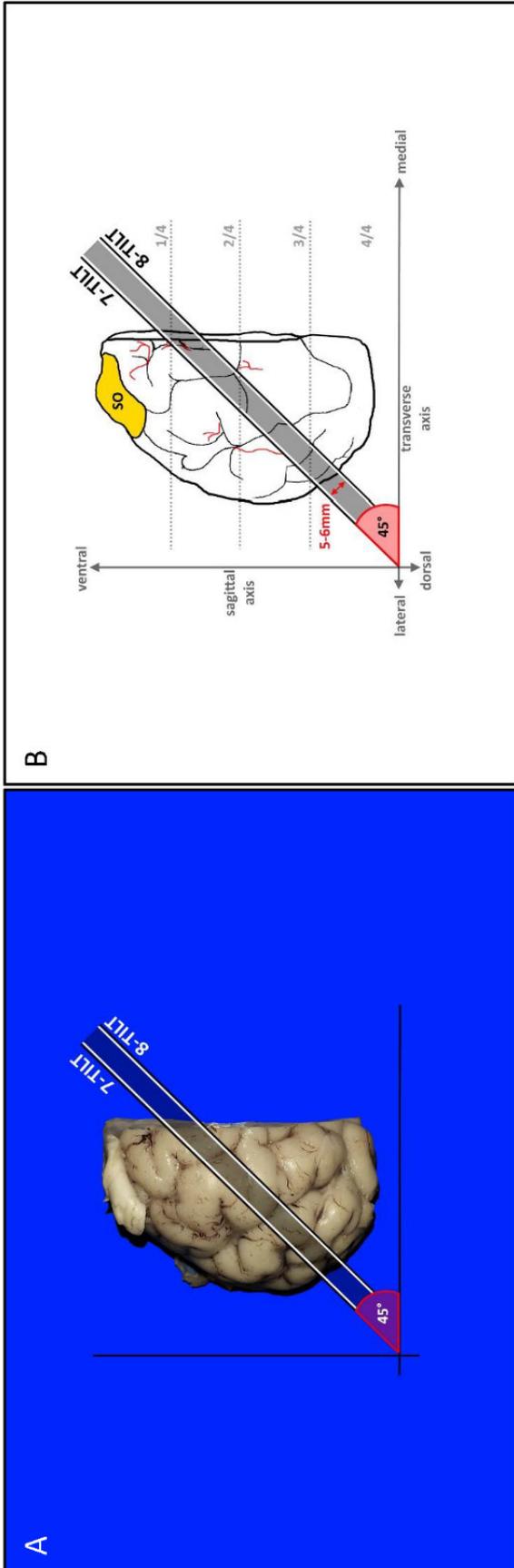
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
6-SAG	Place the block with its caudal cutting surface on the worktop The ventral aspect of the block is facing away from the investigator	Rostr-caudal view	Stria olfactoria Sagittal line through frontoparietal lobe 5-6mm lateral to midline	<i>2D knife axis:</i> dorsoventral <i>Plane:</i> sagittal (SAG) <i>Inclination:</i> orthogonal to worktop <i>Blade movement:</i> rostrocaudal	<ul style="list-style-type: none"> • caudate nucleus • lateral ventricle • frontoparietal medial cortex 	Easy



Supplementary Figure 12.1 Top view. 4th obtained slab of both hemispheres out of Block B. Axes (white) refer to brain blocks. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudate nucleus (CN), frontoparietal cortex (COR), lateral ventricle (LV), white matter (WM).

Supplementary Table 6.1 Trimming of 4th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial surface	Top view	Adjust to maximum slab size	subcortical white matter of gyrus marginalis/ cinguli (precruciate part)	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

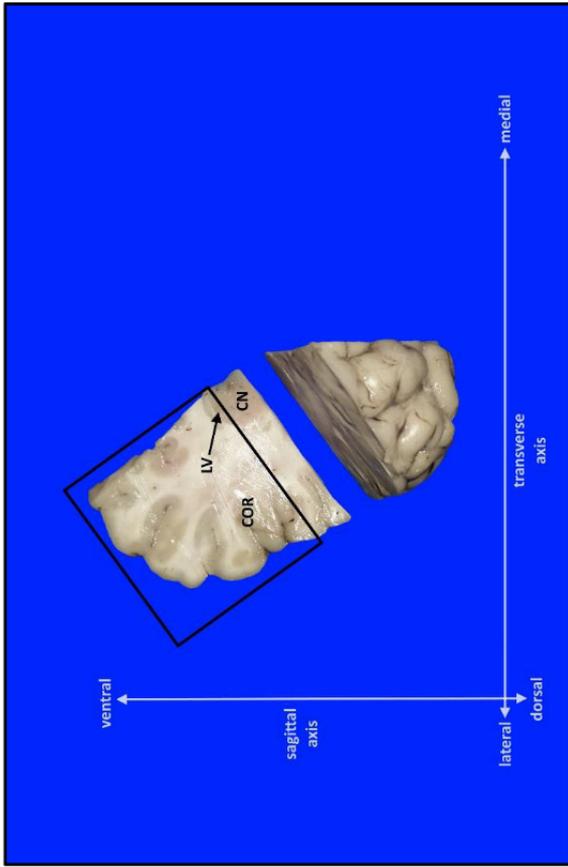


Supplementary Figure 13. Landmark for 7-TILT and 8-TILT: stria olfactoria (SO). Tilted section (TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 7 Instructions for obtainment of 5th slab out of Block B (Supplementary Figure 13)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
7-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Stria olfactoria Tilted line through frontal lobe decussating an imaginary border to the most ventral 1/4 of the block	2D knife axis: laterodorsal to medioventral Plane: tilted (TILT) (45°) to dorsoventral axis Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: rostrocaudal	<ul style="list-style-type: none"> • caudate nucleus • lateral ventricles • white matter tracts • frontal (motor) cortex 	Requires some practice

8-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Tilted line through frontal lobe parallel to and at 5-6 mm interslice distance dorsal to 7-TILT	as above	as above	Requires some practice
---------------	------------------------------------	----------	---	----------	----------	------------------------

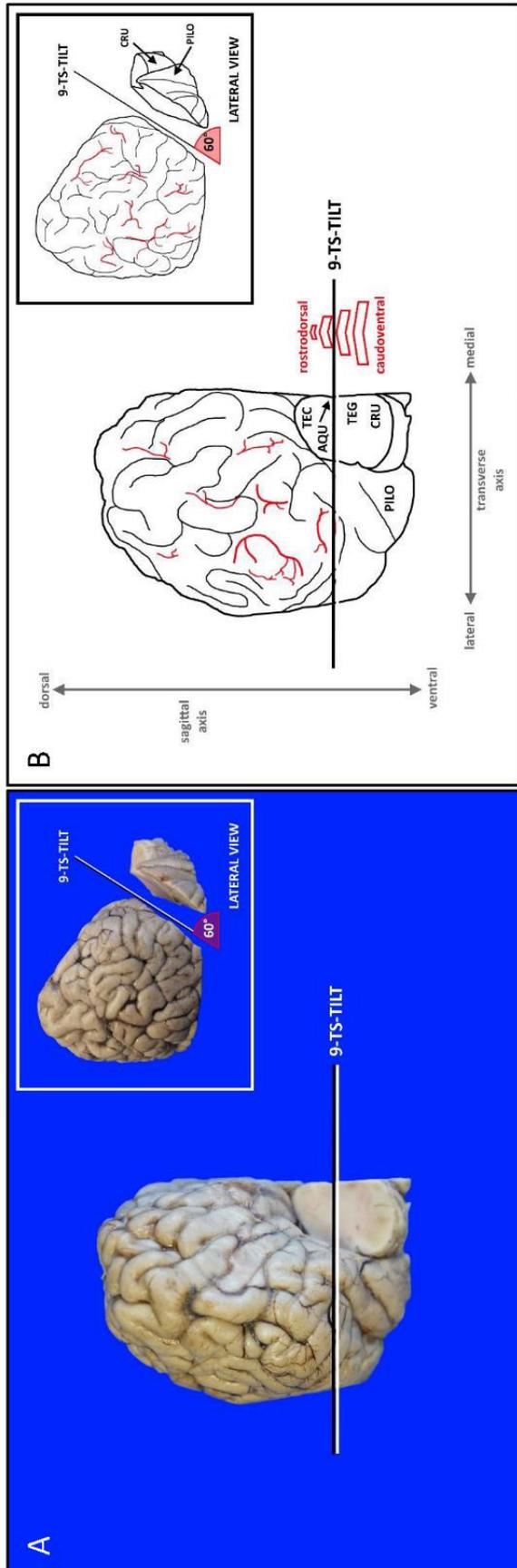


Supplementary Figure 13.1. Top view, 5th obtained slab out of Block B. Axes (white) refer to brain block. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudate nucleus (CN), cortex (COR), lateral ventricle (LV).

Supplementary Table 7.1 Trimming of 5th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Ventrolateral cutting surface ⁷	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> rostral composite gyrus Betz cells (histological confirmation) 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

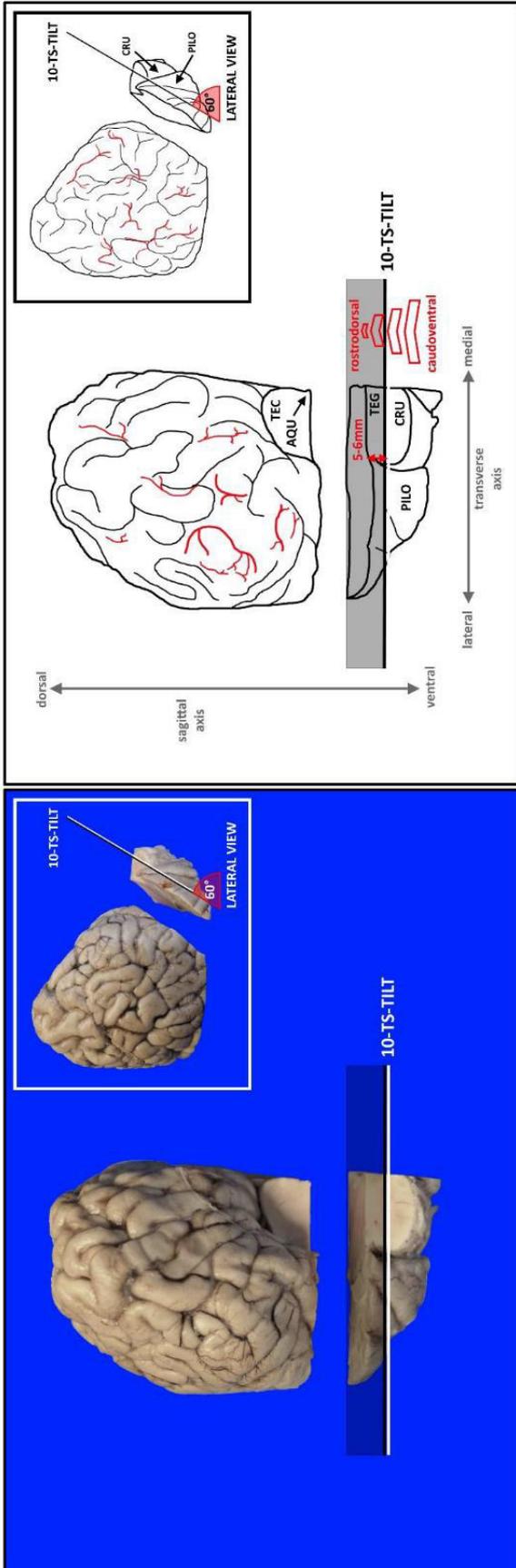
⁷ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 14. Landmarks for 9-TS-TILT: mesencephalic aqueduct (AQU), cerebral crus (CRU), piriform lobe (PILO), midbrain tectum (TEC), midbrain tegmentum (TEG). Transverse-tilted section (TS-TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 8 Instructions for obtainment of 6th slab out of Block C (Supplementary Figure 14)

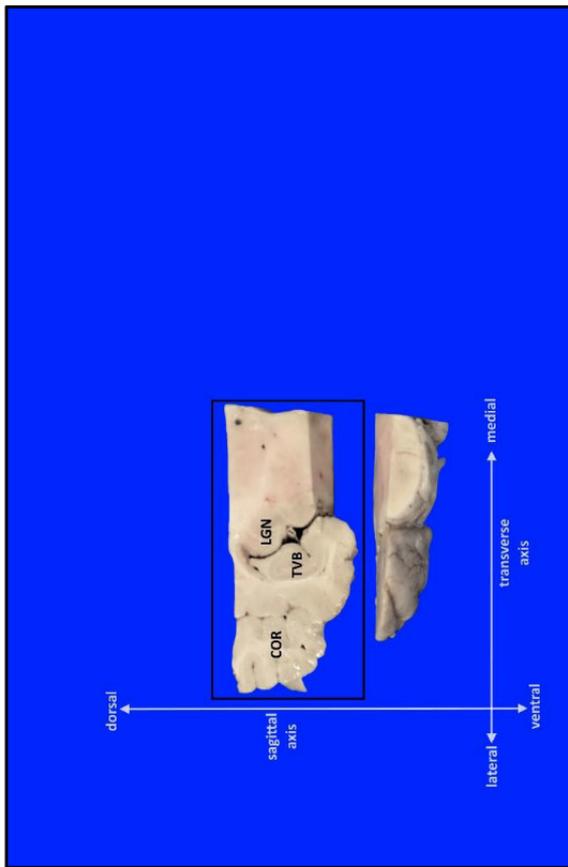
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
9-TS-TILT	Place the block with its rostral cutting surface on the worktop The dorsal aspect of the block is facing away from the investigator	Caudo-rostral view	Transverse-tilted line through piriform lobe and midbrain tectum/tegmentum Cutting guide directly ventral of/ resp. through mesencephalic aqueduct	<i>2D knife axis:</i> mediolateral <i>Plane:</i> tilted to PILO surface <i>Inclination:</i> tilted (TILT) (60°) to worktop → please note inlet for elucidation of approach <i>Blade movement:</i> caudoventral to rostradorsal	<ul style="list-style-type: none"> brain stem nuclei lateral geniculate nucleus temporoventral body of the hippocampus cortex (temporal) 	Requires some practice



Supplementary Figure 14.1. Landmarks for 10-TS-TILT: mesencephalic aqueduct (AQU), cerebral crus (CRU), piriform lobe (PILO), midbrain tectum (TEC), midbrain tegmentum (TEG). Transverse-tilted section (TS-TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 8.1 Instructions for obtainment of 6th slab out of Block C (Supplementary Figure 14.1)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
10-TS-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Transverse-tilted line through piriform lobe and midbrain tegmentum/ cerebral crus Parallel to and at 5-6mm interslice distance ventral to 9-TS-TILT	as above	as above	Requires some practice

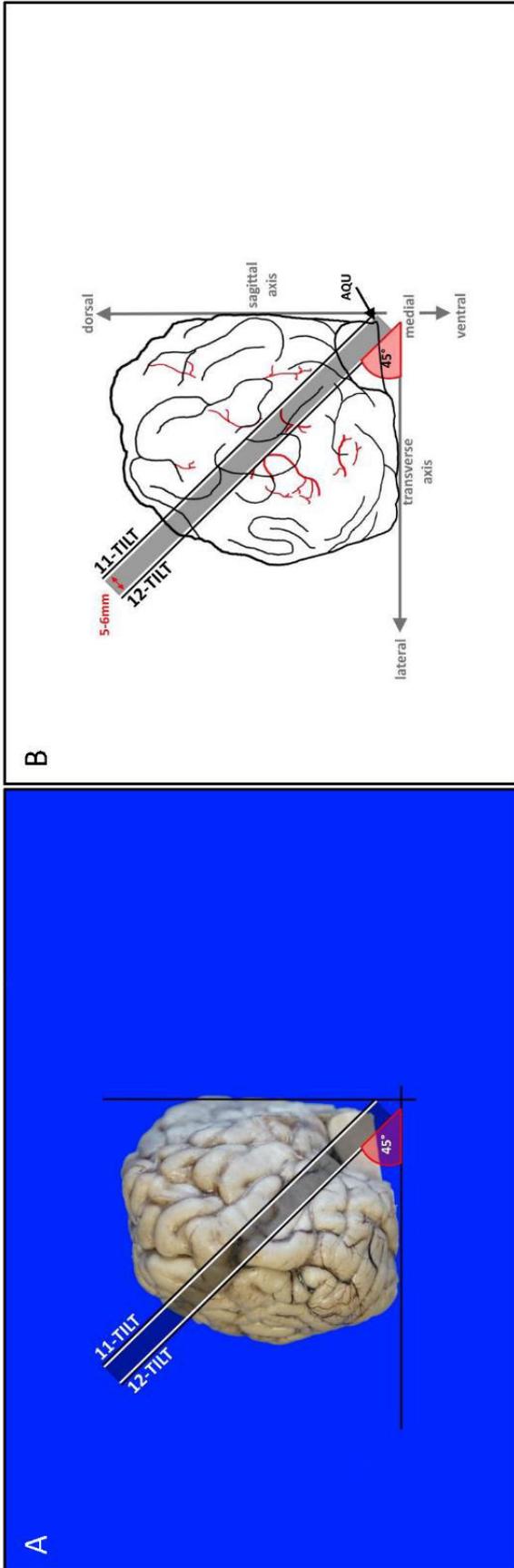


Supplementary Figure 14.2. Top view. 6th obtained slab out of Block C. Axes (white) refer to brain block. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: cortex (COR), lateral geniculate nucleus (LGN), temporoventral body (TVB) of hippocampus.

Supplementary Table 8.2 Trimming of 6th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Ventral cutting surface ⁸	Top view	No adjustment necessary	<ul style="list-style-type: none"> • cortex (temporal) • temporoventral body of the hippocampus • lateral geniculate nucleus • midbrain nuclei 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

⁸ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

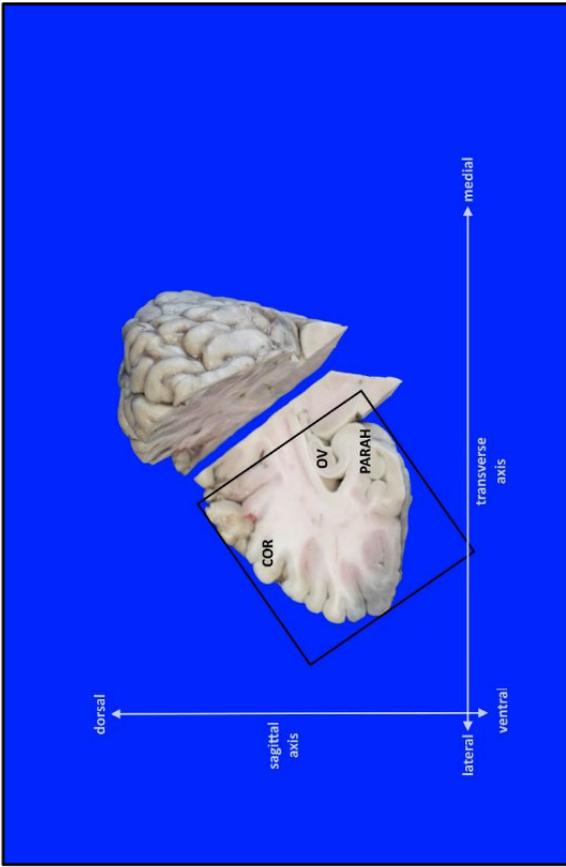


Supplementary Figure 15. Landmarks for 11-TILT and 12-TILT. Mesencephalic aqueduct (AQU). Tilted section (TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 9 Instructions for obtainment of 7th slab out of Block C (Supplementary Figure 15)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
11-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Tilted line through occipital lobe and mesencephalic stump decussating the mesencephalic aqueduct	<p>2D knife axis: medioventral to laterodorsal</p> <p>Plane: tilted (TILT) (45°)</p> <p>Inclination: orthogonal to worktop</p> <p>Blade movement: caudorostral</p>	<ul style="list-style-type: none"> • brain stem nuclei • optic radiations • main visual cortex • occipital vertex of the hippocampus and associated parahippocampal gyrus 	Requires some practice

12-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Tilted line through occipital lobe and mesencephalic stump at 5-6 mm interslice distance ventrolateral to 11-TILT	as above	as above	Requires some practice
----------------	------------------------------------	----------	---	----------	----------	------------------------

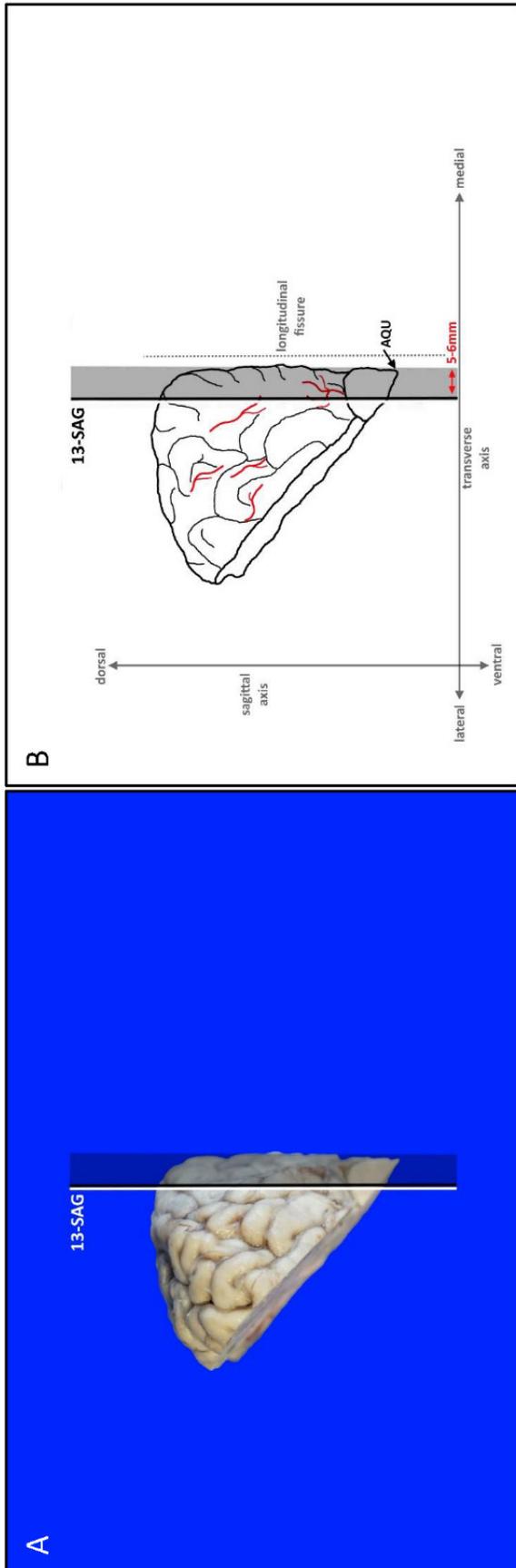


Supplementary Figure 15.1. Top view. 7th obtained slab out of Block C. Axes (white) refer to brain block. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: cortex (COR), occipital vertex (OV) of hippocampus, parahippocampal gyrus (PARAH).

SupplementaryTable 9.1 Trimming of 7th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Ventrolateral cutting surface ⁹	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • optic radiations • main visual cortex • occipital vertex of the hippocampus • occipital apex of parahippocampal gyrus 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

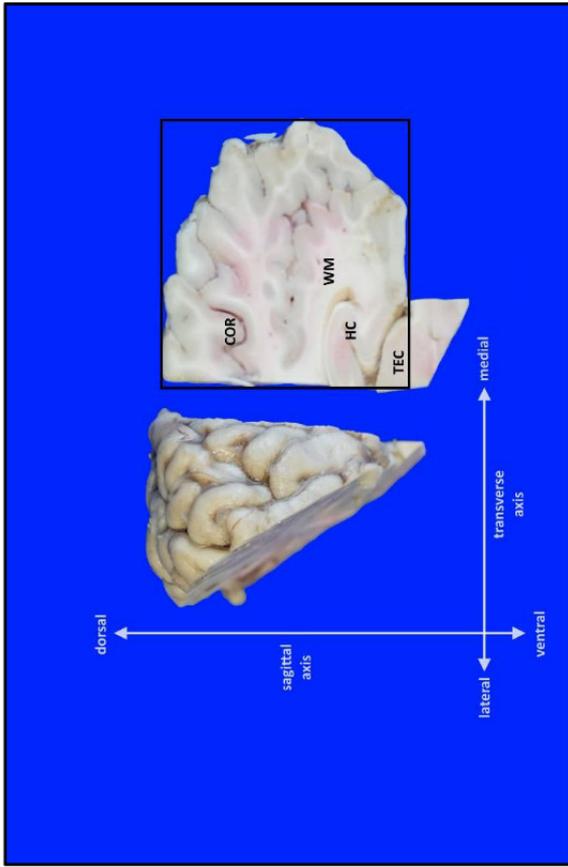
⁹ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 16. Landmarks for 13-SAG: mesencephalic aqueduct (AQU). Sagittal section (SAG). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 10 Instructions for obtainment of 8th slab out of Block C (Supplementary Figure 16)

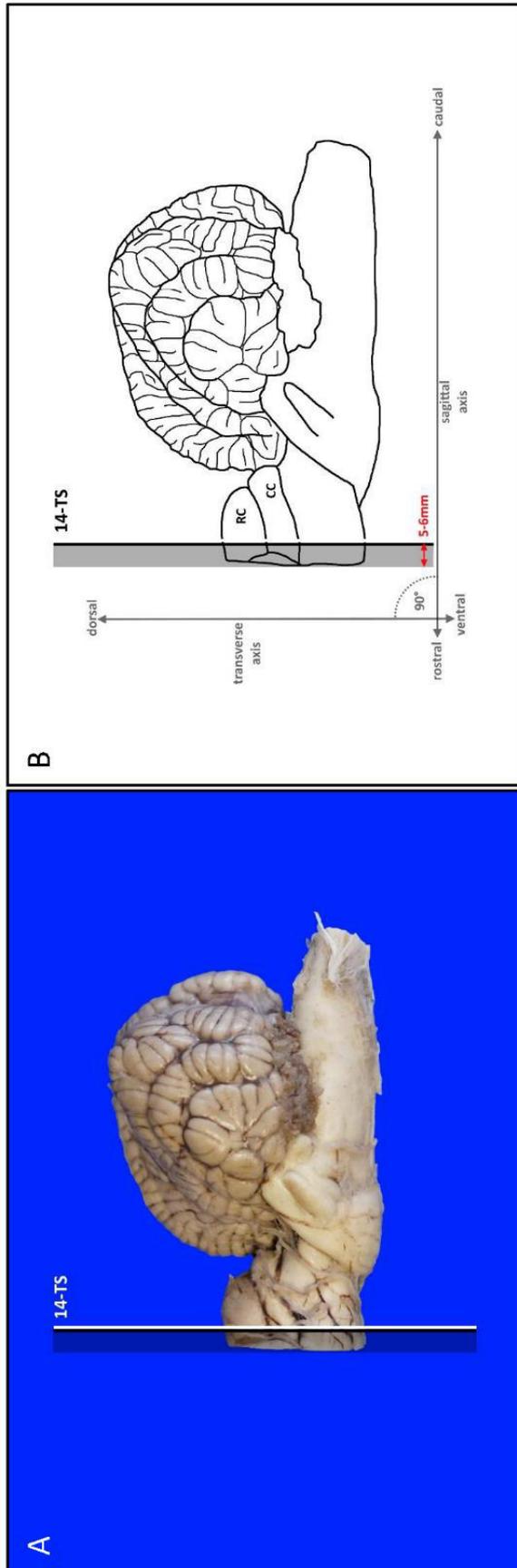
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
13-SAG	Maintain placement as stated above	as above	Sagittal line through occipital lobe and midbrain tectum 5-6mm lateral to midline	<i>2D knife axis:</i> ventrodorsal <i>Plane:</i> sagittal (SAG) <i>Inclination:</i> orthogonal to worktop <i>Blade movement:</i> caudorostral	<ul style="list-style-type: none"> subcortical white matter of gyrus marginalis/cingula (postercruciate part) hippocampal alveus longitudinal view of splenial sulcus 	Easy



Supplementary Figure 16.1. Top view. 8th obtained slab out of Block C. Axes (white) refer to brain blocks. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: occipital cortex (COR), alveus of hippocampus (HC), midbrain tectum (TEC), white matter (WM).

Supplementary Table 10.1 Trimming of 8th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial surface	Top view	Adjust to maximum slab size if necessary	<ul style="list-style-type: none"> subcortical white matter of gyrus marginalis/cingula (postcruciate part) hippocampal alveus paramedial occipital cortex (splenial sulcus) 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

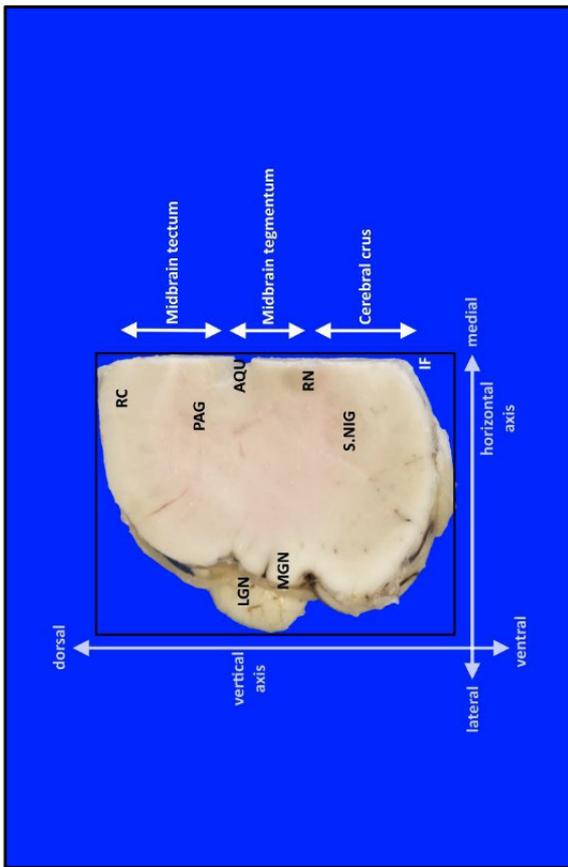


Supplementary Figure 17. Landmarks for 14-TS: caudal colliculi (CC), rostral colliculi (RC), Transverse section (TS). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 11 Instruction for obtainment of 9th slab out of Block D (Supplementary Figure 17)

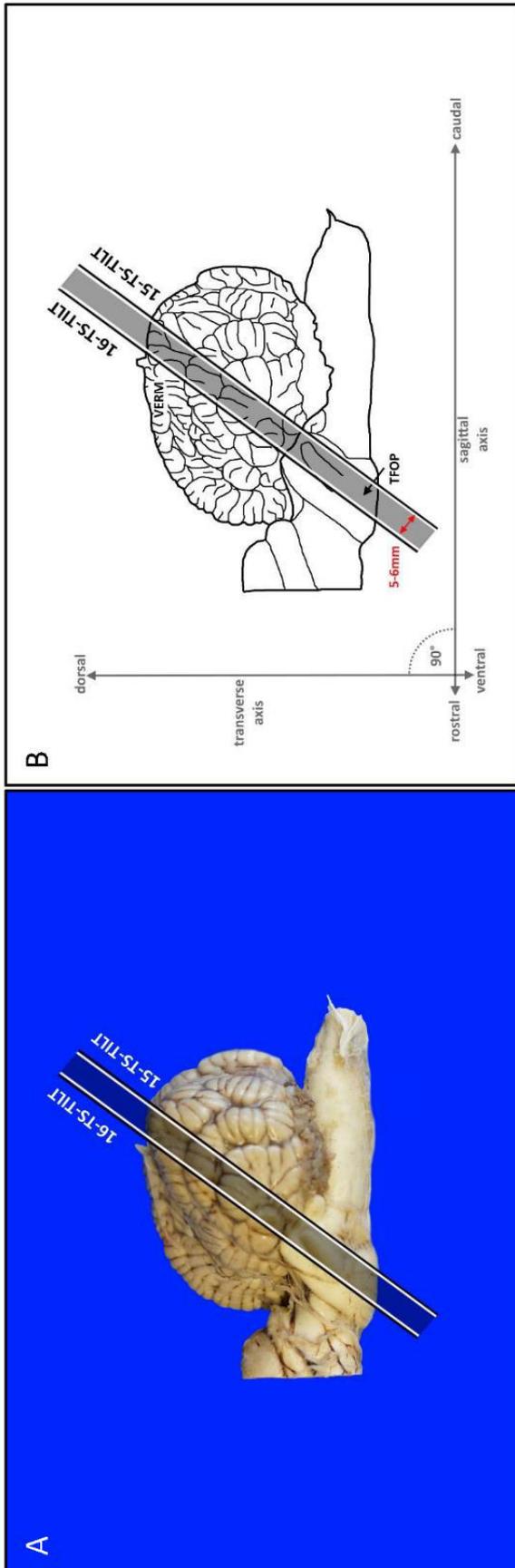
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
14-TS	Place the block with its medial surface on the worktop	Lateral view of the midbrain	Transverse line through rostral colliculi resp. 5-6mm caudal to 1-TS ¹⁰	<i>2D knife axis:</i> dorsoventral <i>Plane:</i> transverse (TS) <i>Inclination:</i> orthogonal to worktop <i>Blade movement:</i> lateromedial	<ul style="list-style-type: none"> • geniculate nuclei • midbrain tectum • midbrain tegmentum • aqueduct • cerebral crus 	Easy

¹⁰ 1-TS = 1st cut (pre-step)



Supplementary Figure 17.1. Top view. 9th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). The slab is placed on its rostral cutting surface¹¹. Pertinent landmarks for sampling: mesencephalic aqueduct (AQU), intercrural fossa (IF); lateral geniculate nucleus (LGN), medial geniculate nucleus (MGN), periaqueductal gray matter (PAG), rostral colliculi (RC), red nucleus (RN), substantia nigra (S.NIG).

¹¹ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

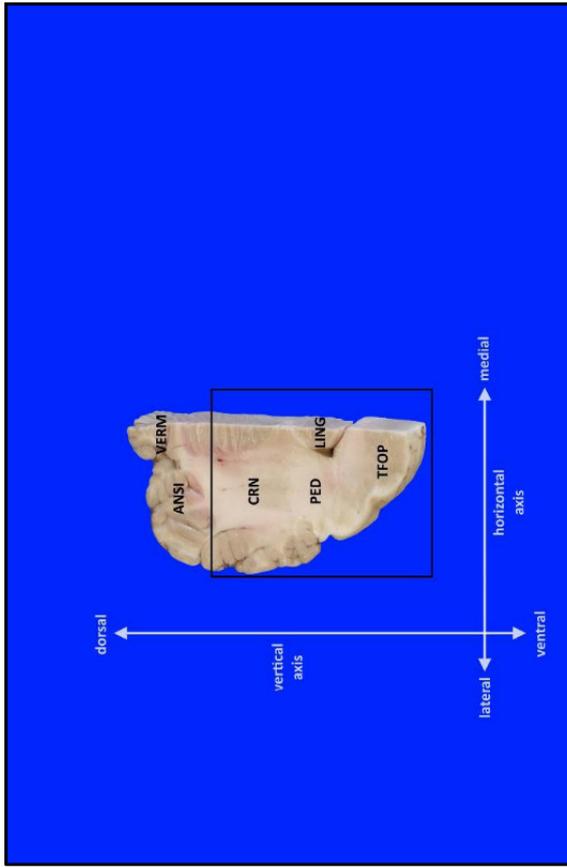


Supplementary Figure 18. Landmarks for 15-TS-TILT and 16-TS-TILT: transverse fibres of pons (TFOP), vermis (VERM). Transverse-tilted section (TS-TILT). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 12 Instruction for obtaining of 10th slab out of Block D (Supplementary Figure 18)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
15-TS-TILT	Place the block with its medial surface on the worktop	Lateral view of the cerebellum	Transverse tilted line at widest extension between vermis (VERM) and pons (TFOP)	<p>2D <i>knife axis</i>: dorsocaudal to ventrostral</p> <p><i>Plane</i>: transverse (TS), tilted (TILT)</p> <p><i>Inclination</i>: Inclination required to meet the pons (TFOP)</p> <p><i>Blade movement</i>: lateromedial</p>	<ul style="list-style-type: none"> • cerebellar cortex, nuclei and peduncles • reticular formation • 4th ventricle • transverse fibres of pons 	Requires some practice

16-TS-TILT	Maintain placement as stated above	As above	Horizontal line 5-6mm rostral and parallel to 15-TS-TILT	As above	as 15-TS-TILT	Requires some practice
-------------------	------------------------------------	----------	--	----------	---------------	------------------------

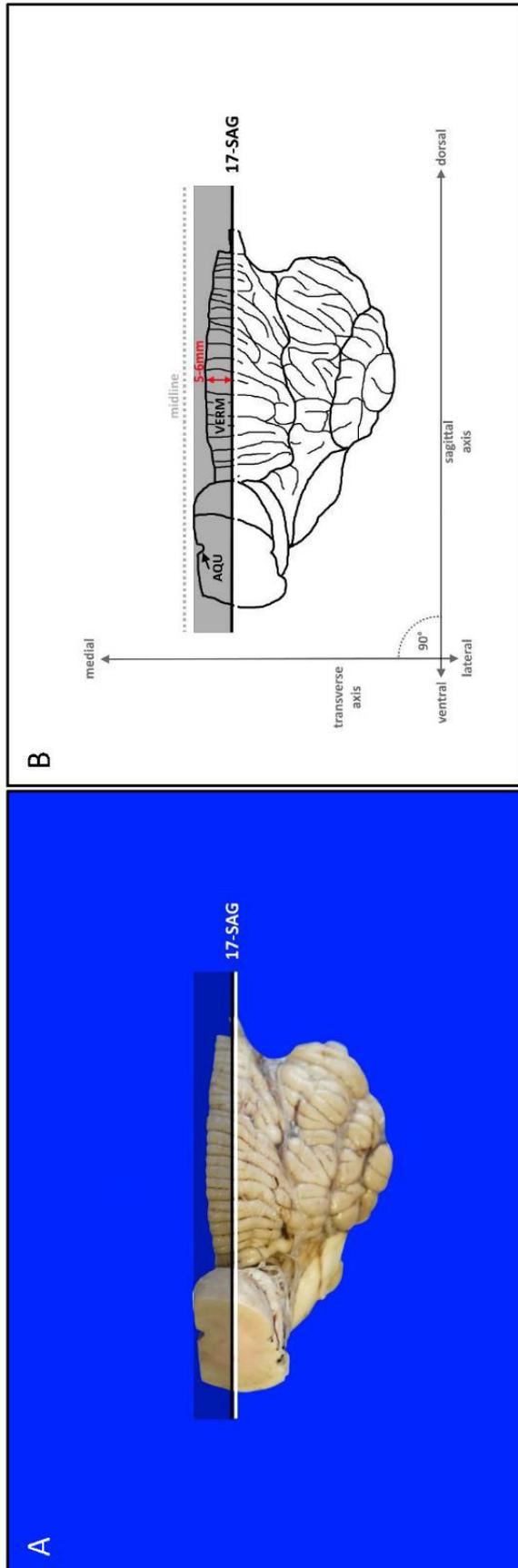


Supplementary Figure 18.1. Top view. 10th obtained slab out of block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: ansiform lobule (ANSI), cerebellar roof nuclei (CRN), lingula (LING), cerebellar peduncles (PED), transverse fibres of pons (TFOP), vermis (VERM).

Supplementary Table 12.1 Trimming of 10th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Rostral cutting surface ¹²	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • cerebellar roof nuclei • cerebellar peduncles • transverse fibres of pons • lingula 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

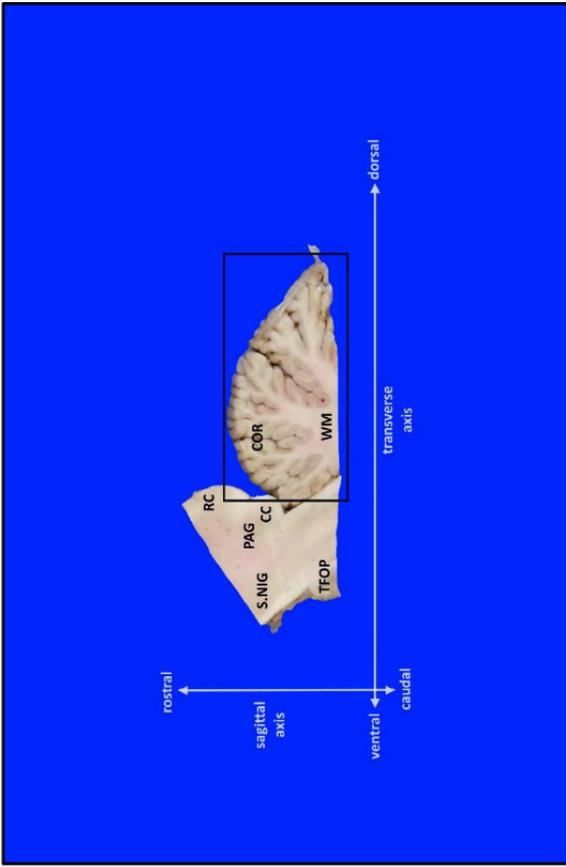
¹² use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 19. Landmarks for 17-SAG: mesencephalic aqueduct (AQU), vermis (VERM). Sagittal section (SAG). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 13 Instruction for obtainment of 11th slab out of Block D (Supplementary Figure 19)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
17-SAG	Place the rostral cerebellar block with its caudal cutting surface on the worktop	Dorsal view of the rostral cerebellar block	Sagittal line approx. 5-6mm lateral to midline	<p><i>2D knife axis:</i> dorsoventral</p> <p><i>Plane:</i> sagittal (SAG)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> rostrocaudal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • sagittal paravermis • sagittal midbrain 	Easy

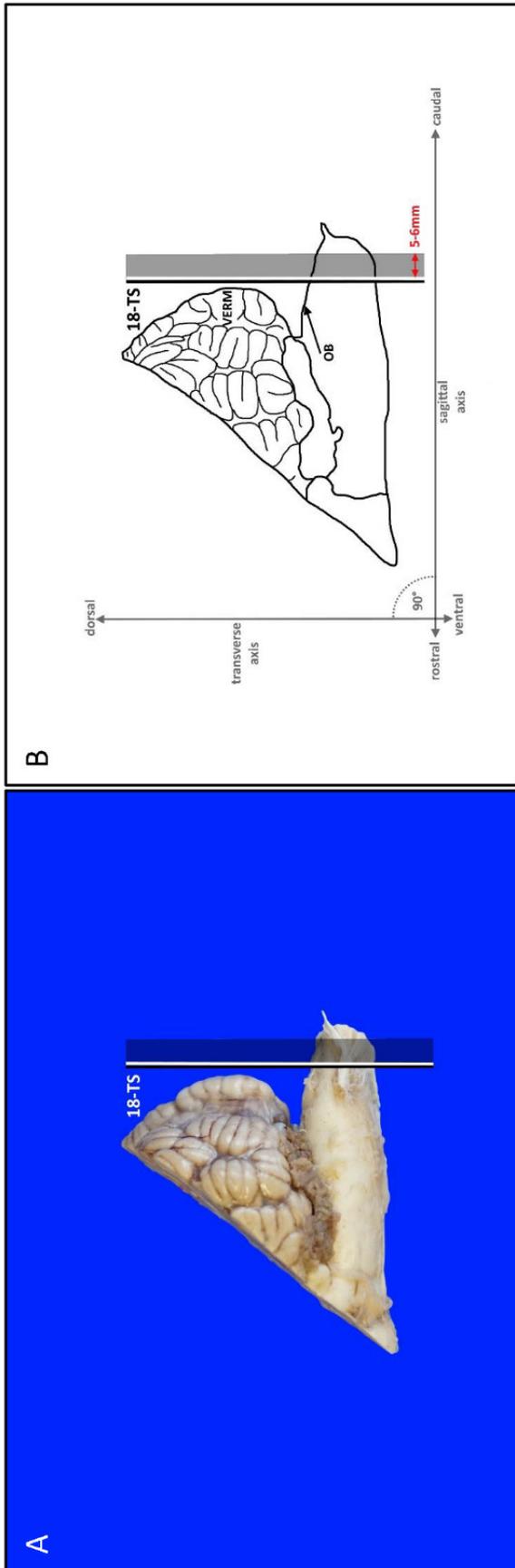


Supplementary Figure 19.1. Top view. 11th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudal colliculi (CC), cerebellar cortex (COR), periaqueductal gray matter (PAG), rostral colliculi (RC), substantia nigra (S.NIG), transverse fibres of pons (TFOP), white matter (WM).

Supplementary Table 13.1 Trimming of 11th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial or lateral cutting surface ¹³	Top view	Adjust to maximum slab size	sagittal paravermis	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

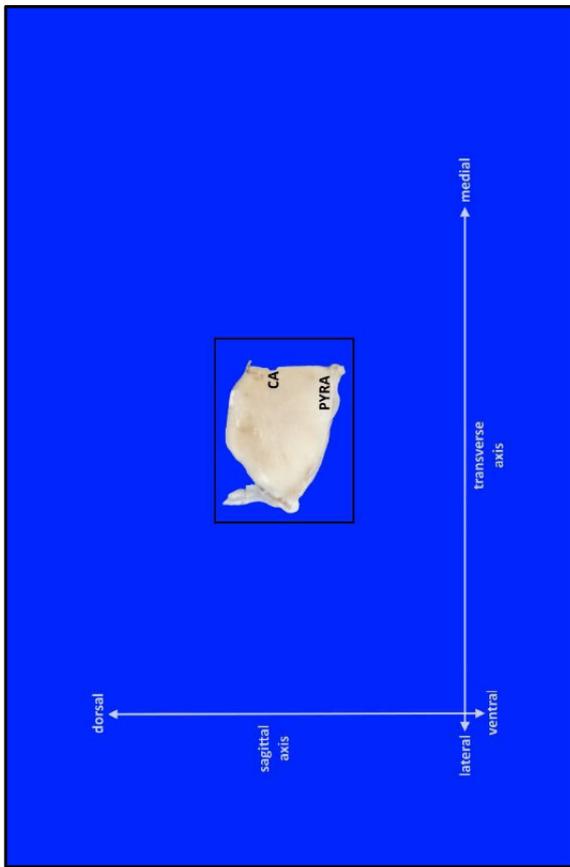
¹³ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 21. Landmarks for 18-TS: obex (OB: obex), vermis (VERM). Transverse section (TS). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

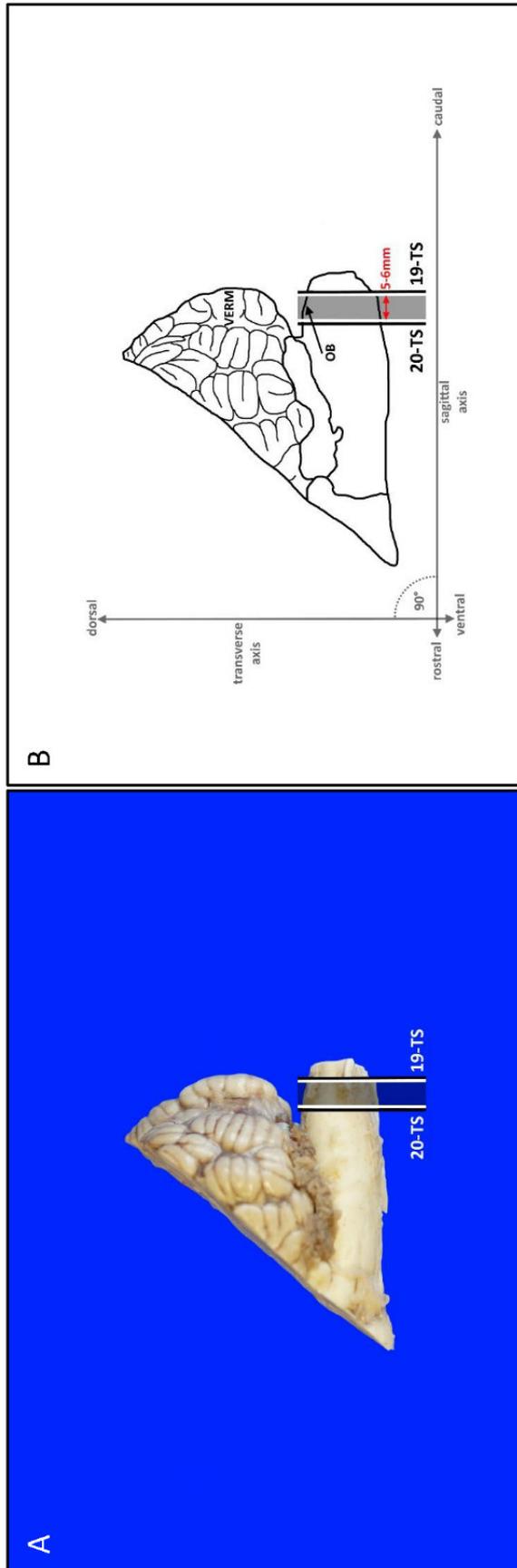
Supplementary Table 15 Instruction for obtainment of 12th slab out of Block D (Supplementary Figure 21)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
18-TS	Place the caudal cerebellar block with its medial surface on the worktop	Lateral view of the medulla oblongata	Transverse line through medulla oblongata caudal to the obex	<p><i>2D knife axis:</i> dorsoventral</p> <p><i>Plane:</i> transverse (TS)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> lateromedial</p>	<ul style="list-style-type: none"> Medulla oblongata 	Easy



Supplementary Figure 21.1: Top view. The slab is placed on its rostral cutting surface¹⁴. 12th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: central canal (CA), pyramids (PYRA).

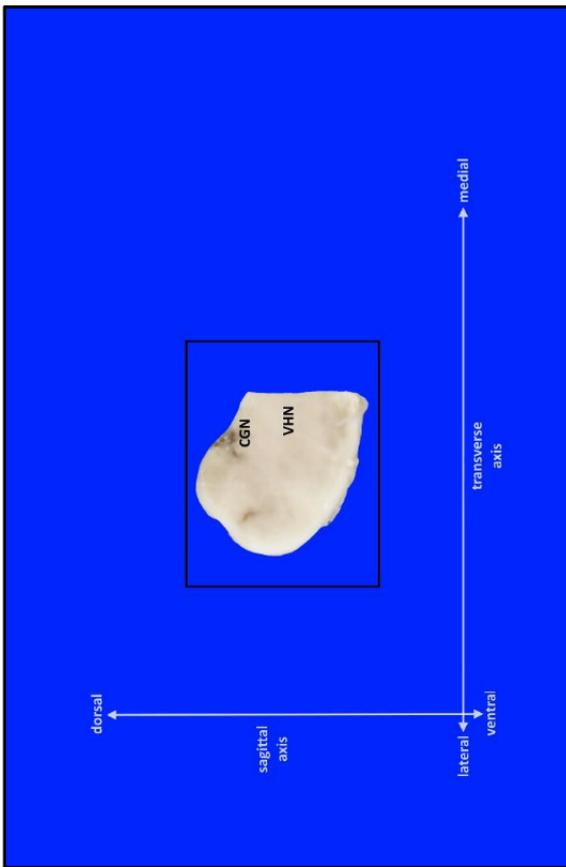
¹⁴ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 22. Landmarks for 19-TS and 20-TS: obex (OB), vermis (VERM). Transverse section (TS). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

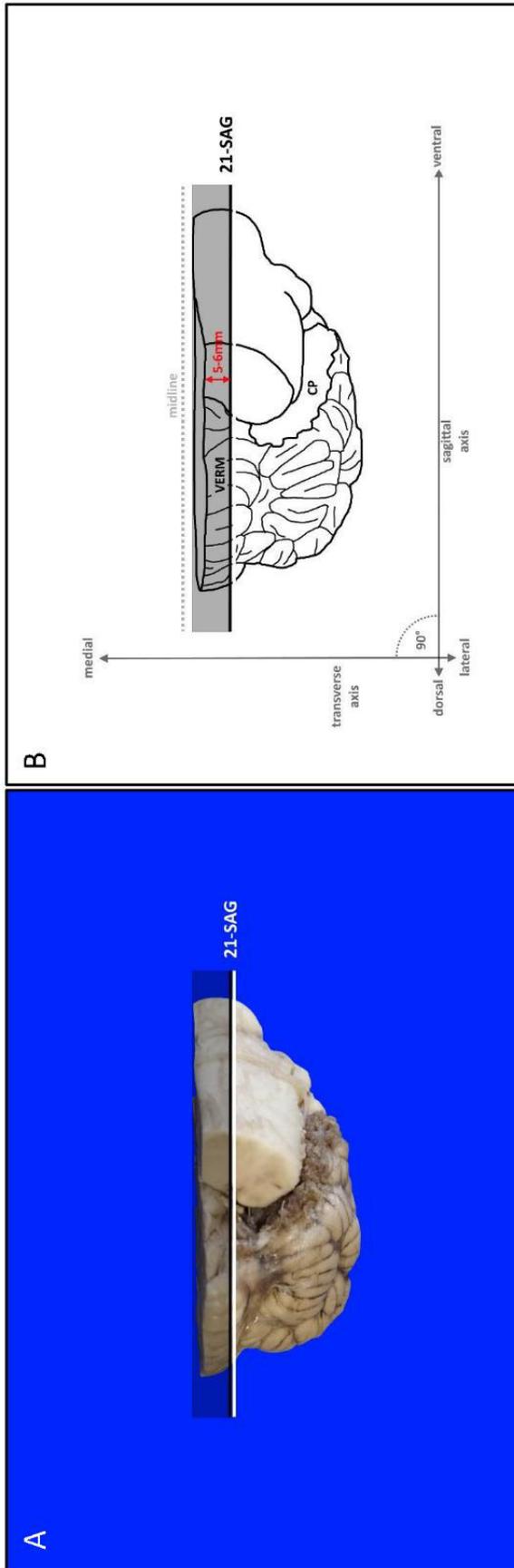
Supplementary Table 16 Instruction for obtainment of 13th slab out of Block D (Supplementary Figure 22)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
19-TS	Maintain placement as stated above	Lateral view of the hindbrain	Transverse line near the obex	<p>2D knife axis: dorsoventral</p> <p>Plane: transverse (TS)</p> <p>Inclination: orthogonal to worktop</p> <p>Blade movement: lateromedial</p> <p>as above</p>	<ul style="list-style-type: none"> • area postrema • spinal tracts • decussation of sensory fibres • vagal and associated nuclei • proprioceptive nuclei <p>as above</p>	Easy
20-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line 5-6 mm rostral and parallel to 19-TS	as above	as above	Easy



Supplementary Figure 22.1. Top view. The slab is placed on its rostral cutting surface¹⁵. 13th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: cuneate and gracile nuclei (CGN), vagal and hypoglossal nuclei (VHN).

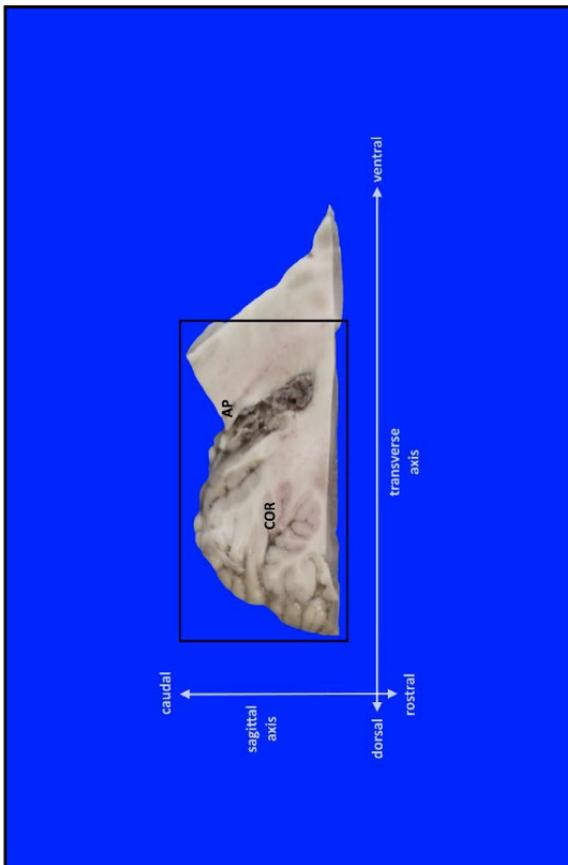
¹⁵ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 23. Landmarks for 21-SAG: central canal (CA), choroid plexus (CP), vermis (VERM). Sagittal section (SAG). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 17 Instruction for obtainment of 14th slab out of Block D (Supplementary Figure 23)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
21-SAG	Place the caudal cerebellar block with its rostral cutting surface on the worktop	Caudal view of caudal cerebellar block	Sagittal line approx. 5-6mm lateral to midline	<p><i>2D knife axis:</i> ventrodorsal</p> <p><i>Plane:</i> sagittal (SAG)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> caudorostral</p>	<ul style="list-style-type: none"> • sagittal mid-uvula • brainstem nuclei • medial wall of area postrema 	Easy



Supplementary Figure 23.1. Top view. 14th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: area postrema (AP), cortex (COR).

Supplementary Table 17.1 Trimming of 14th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial or lateral cutting surface ¹⁶	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • sagittal mid-uvula • brainstem nuclei • medial wall of area postrema 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

¹⁶ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

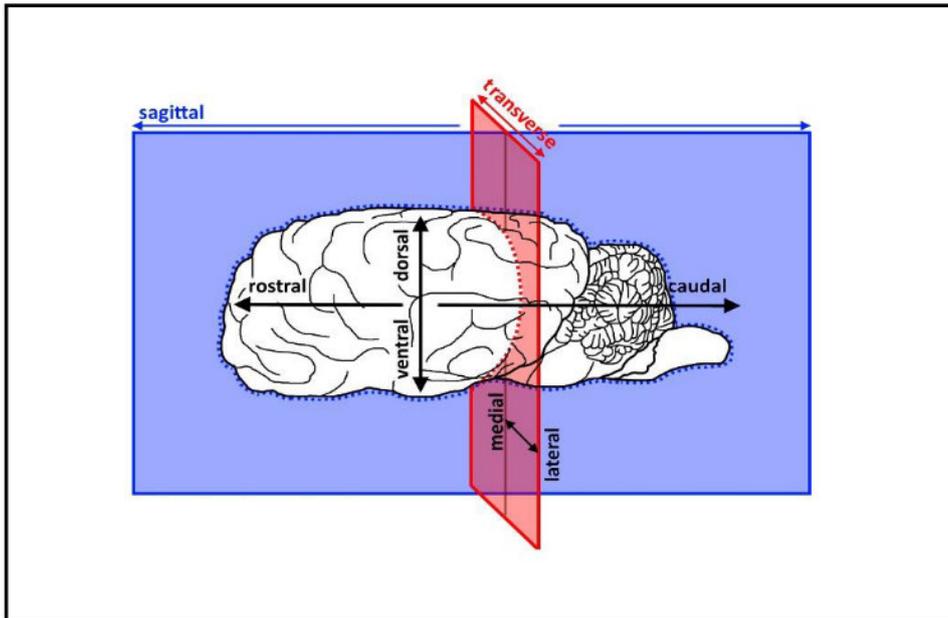
Abbreviations**I. Planes/ Orientation**

SAG: sagittal plane/section
TILT: lateral-tilted plane/section
TS: transverse plane/section
TS-TILT: transverse-tilted plane/section

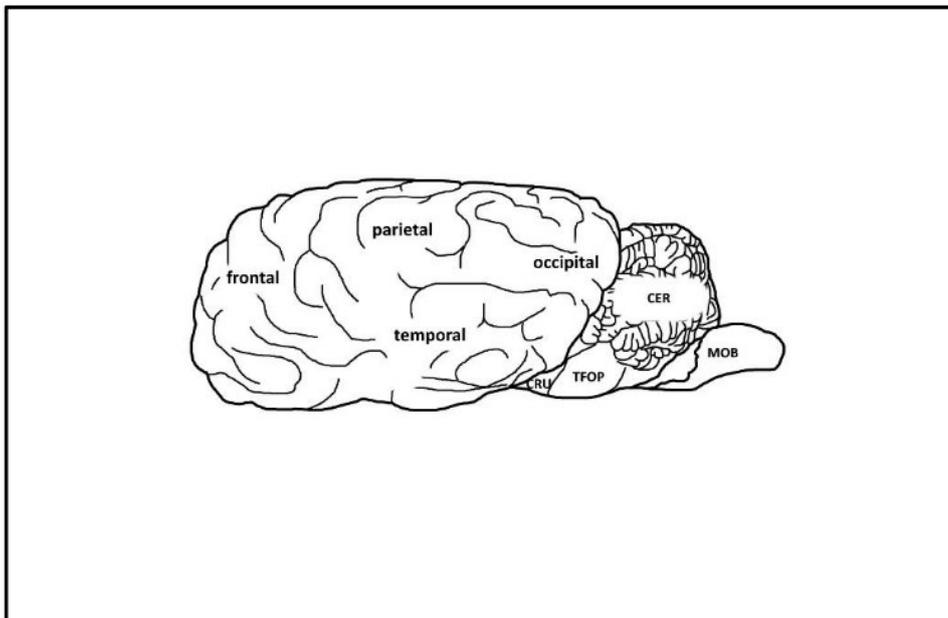
II. Landmarks

III VENT: 3rd ventricle
AN: amygdaloid nucleus
ANSI: ansiform lobule
AP: area postrema
AQU: mesencephalic aqueduct
CA: central canal
CC: caudal colliculi
CER: cerebellum
CGN: cuneate and gracile nuclei
CING: cingulate gyrus
CN: caudate nucleus
COCA: corpus callosum
COR: cortex
CP: choroid plexus
CRN: cerebellar roof nuclei
CRU: cerebral crus
FORN: fomic
GP: globus pallidus
HC: hippocampus
HICO: hippocampal commissure
IC: internal capsule
INSC: insular cortex
LING: lingula
LGN: lateral geniculate nucleus
LOF: longitudinal fissure
LV: lateral ventricle
MAM: mammillary bodies
MGN: medial geniculate nucleus
MOB: medulla oblongata
OB: obex
OC: optic chiasm
ON: oculomotor nerve
OLF: olfactory tubercle
OT: optic tract
OV: occipital vertex of hippocampus
PAG: periaqueductal gray matter
PARAH: parahippocampal gyrus
PED: cerebellar peduncles
PILO: piriform lobe
PIT: pituitary stalk/ infundibular recess
PUT: putamen
PVZ: periventricular zone of the hypothalamus
PYRA: pyramids (decussation)
RC: rostral colliculi
RN: red nucleus
S.NIG: substantia nigra
SN: septal nuclei
SO: stria olfactoria
TEC: midbrain tectum
TEG: midbrain tegmentum
TFOP: transverse fibres of pons
THAL: thalamus
TVB: temporoventral body of the hippocampus
VAN: ventral anterior nucleus
VERM: vermis
VHN: vagal and hypoglossal nuclei
WM: white matter

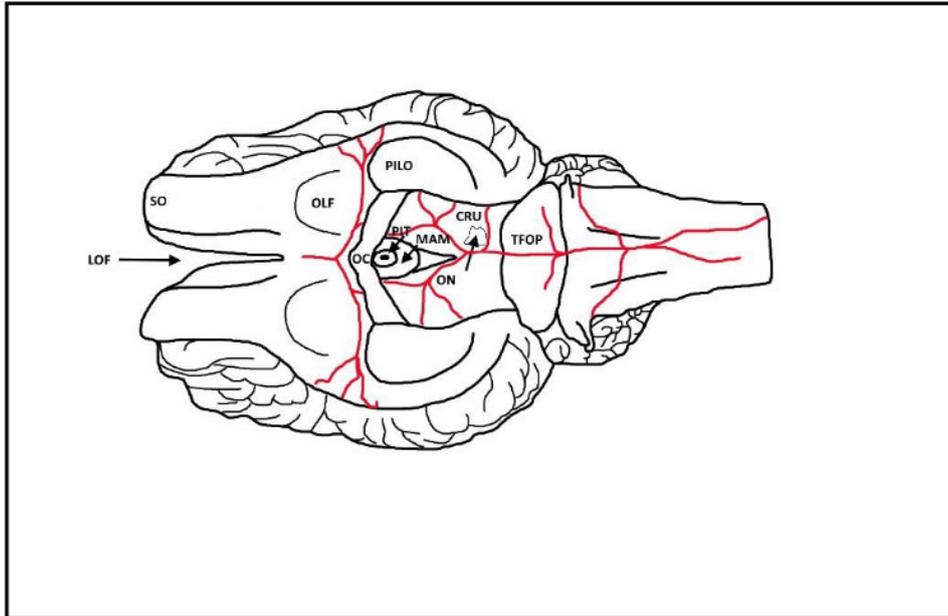
2.2. Hemisphärische Version (rechts)



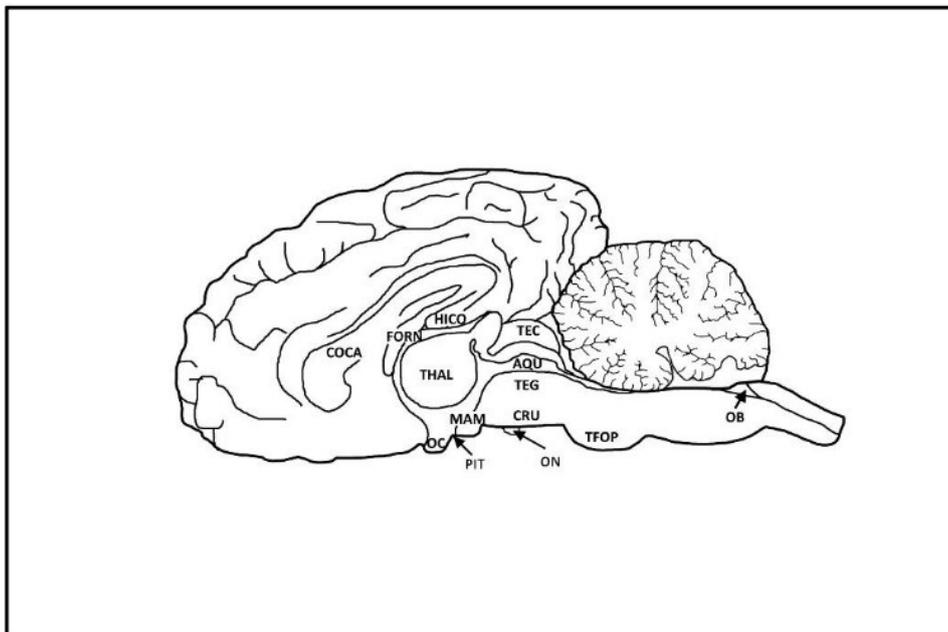
Supplementary Figure 1. Planes and orientation. Colours demonstrate sagittal (blue) and transverse (red) planes. The sections performed in the protocol are numbered from 1-21 in the order of implementation and termed according to the individual plane (e.g., 1-TS, 6-SAG, 8-TILT). Sagittal (SAG), lateral-tilted (TILT), transverse (TS) and transverse-tilted (TS-TILT).



Supplementary Figure 2. Landmarks of the dorsolateral brain surface. Forebrain with frontal, parietal, temporal, occipital lobe. Midbrain with cerebral crus (CRU). Hindbrain with transverse fibres of pons (TFOP), cerebellum (CER) and medulla oblongata (MOB).



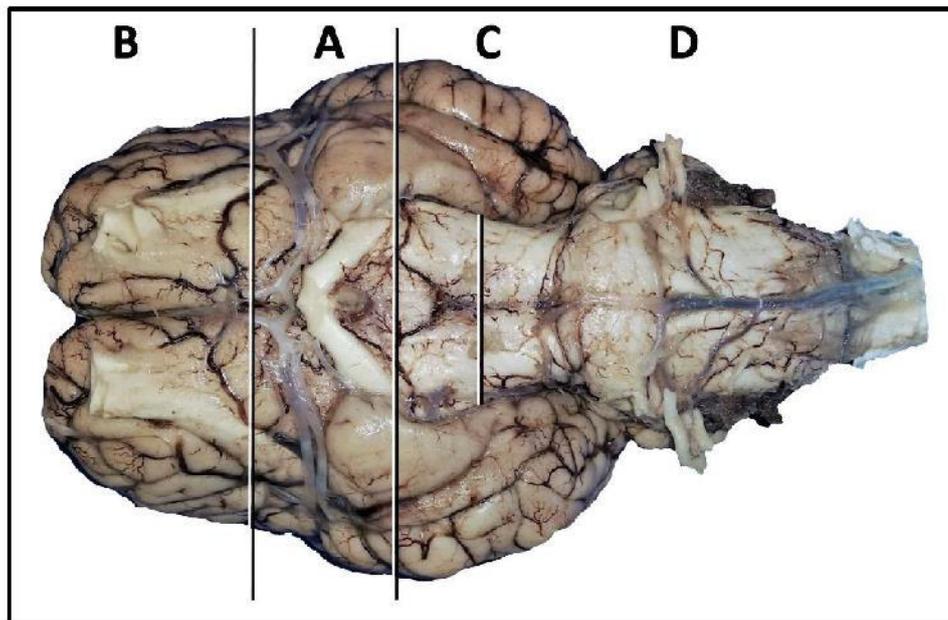
Supplementary Figure 3. Landmarks of the ventral brain surface. Cerebral crus (CRU), longitudinal fissure (LOF), mammillary bodies (MAM), optic chiasm (OC), olfactory tubercle (OLF), oculomotor nerve (ON), piriform lobe (PILO), pituitary stalk/infundibular recess (PIT), stria olfactoria (SO) and transverse fibres of pons (TFOP).



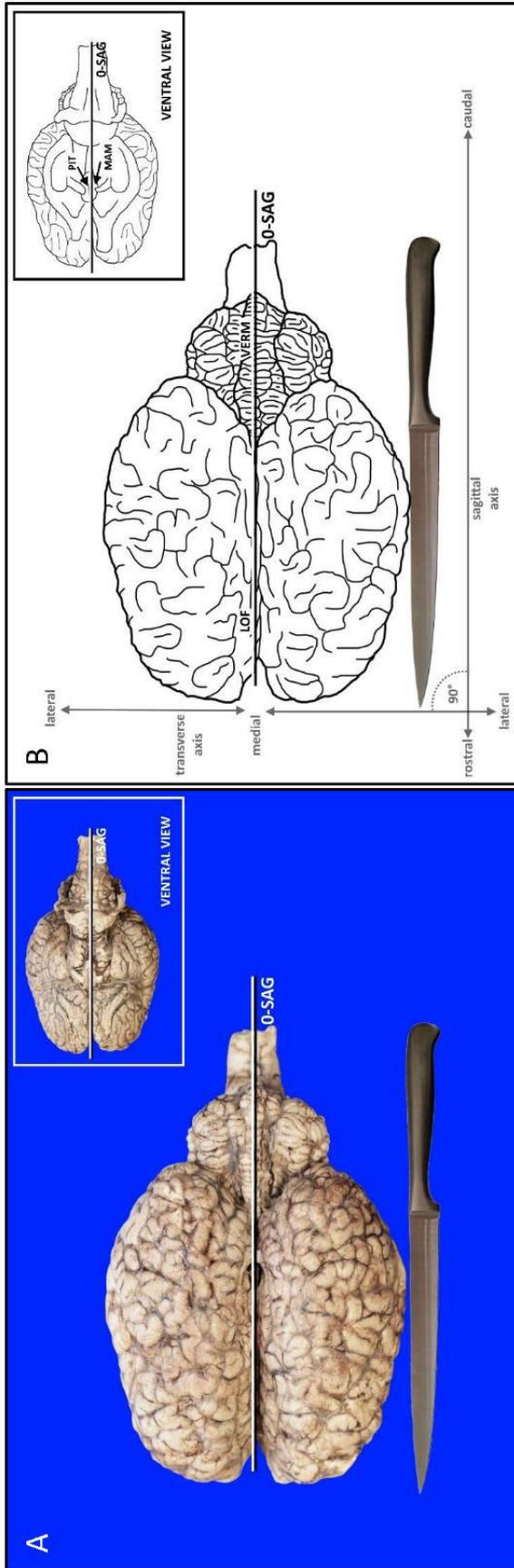
Supplementary Figure 4. Landmarks of the median brain surface. Mesencephalic aqueduct (AQU), corpus callosum (COCA), cerebral crus (CRU), fornix (FORN), hippocampal commissure (HICO), mammillary bodies (MAM), obex (OB), optic chiasm (OC), oculomotor nerve (ON), pituitary stalk/ infundibular recess (PIT), midbrain tectum (TEC), midbrain tegmentum (TEG), transverse fibres of pons (TFOP) and thalamus (THAL).



Supplementary Figure 5. Equipment for performance of the protocol. Cutting board (1), scalpel blade and handle (2), microtome blade (3), customary long blade (4), microscope slide labelled with maximum slab size herein 4 x 5.5cm (5)



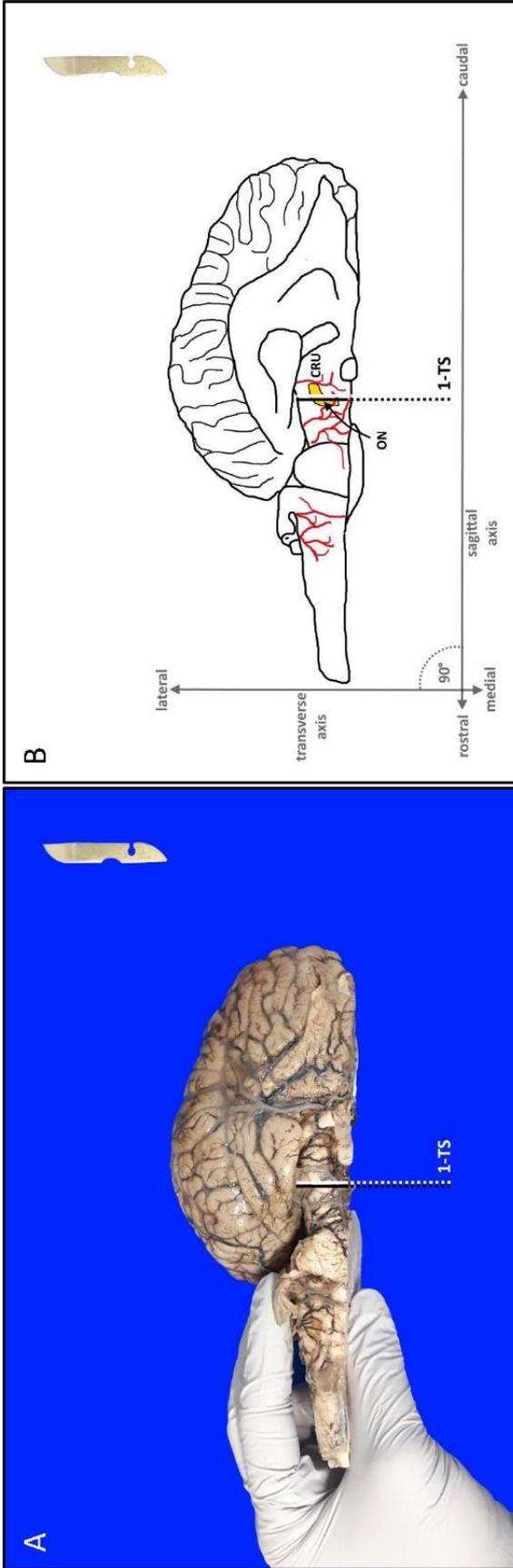
Supplementary Figure 6. Virtual division of the brain into 4 blocks (A to D) for simplification of tissue handling and obtainment of even cut surfaces for placement of the blocks on the worktop.



Supplementary Figure 7. Landmarks for 0-SAG: longitudinal fissure (LOF), mammillary bodies (MAM), pituitary stalk/ infundibular recess (PIT), vermis (VERM). Sagittal section (SAG). Customary long blade. (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 1 Instruction for performance of 0-SAG (Supplementary Figure 7)

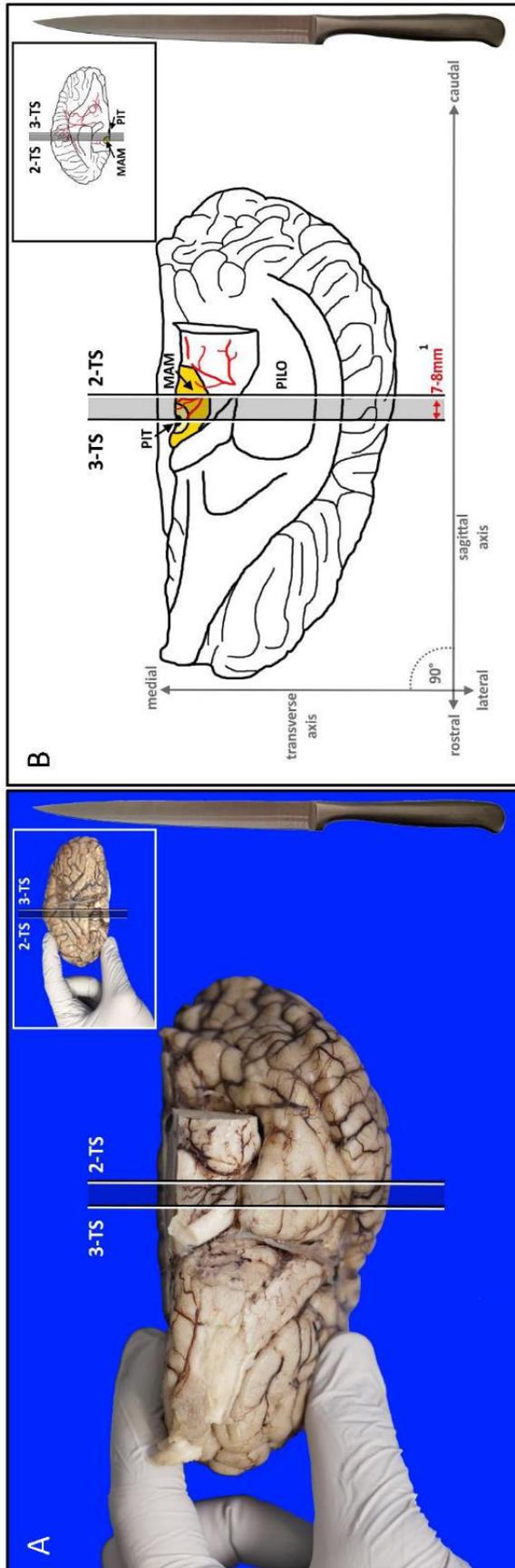
Step	Aim / harvest	Placement and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Difficulty
0-SAG	Separation of hemispheres	Place the brain with its ventral or dorsal surface on the worktop Put folded gauze or paper into the longitudinal fissure (interhemispheric fissure) to prevent accidental cut of one of the hemispheres during separation	Dorsal or ventral view of the brain	Midsagittal line extending from the longitudinal fissure to the dorsal or ventral median sulcus of the medulla oblongata	2D knife axis: rostrocaudal Plane: sagittal (SAG) Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: dorsoventral or ventrodorsal	Easy



Supplementary Figure 8. Landmarks for 1-TS: cerebral crus (CRU), oculomotor nerve (ON). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow). Scalpel blade. (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 2 Instruction for performance of 1-TS (Supplementary Figure 8)

Step	Aim / harvest	Preparation and preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Difficulty
1-TS	Transsection of the midbrain <u>Cave:</u> do not cut into occipital lobe (use small blade)	Place the hemisphere with its dorsal surface on the worktop and fix it between your thumb and forefinger to allow for ventrodorsal section	Ventral top view of the right hemisphere	Transverse line through cerebral crus at oculomotor nerve emergence	2D knife axis: mediolateral Plane: transverse (TS) Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: ventrodorsal	Easy



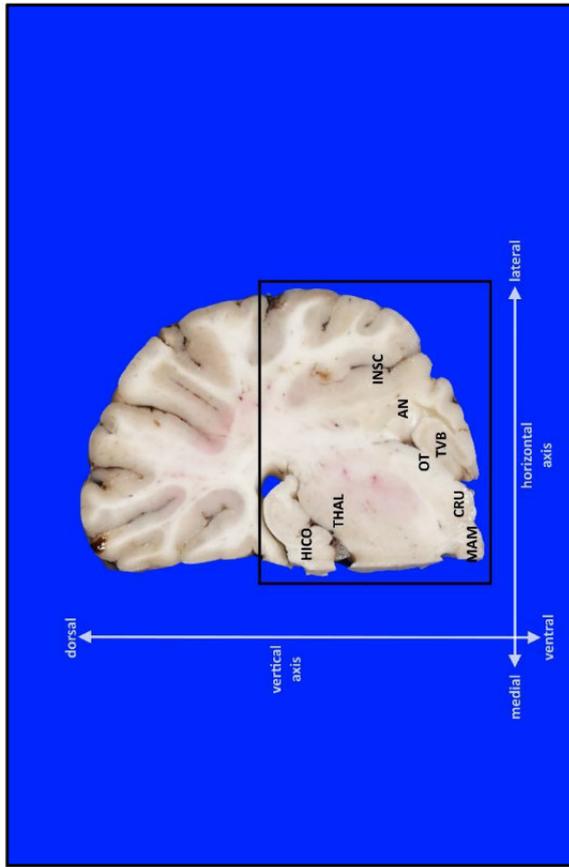
Supplementary Figure 9. Landmarks for 2-TS and 3-TS: mammillary bodies (MAM), piriform lobe (PILO), pituitary stalk/ infundibular recess (PIT). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). Customary long blade. (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 3 Instructions for obtaiment of 1st slab out of Block A (Supplementary Figure 9)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
2-TS	Place the block with its dorsal surface on the worktop and fix it between your thumb and forefinger to allow for ventrodorsal section. → hold hemisphere in the way and direction of your convenience (inlet → see video)	Ventral top view of the right hemisphere	Transverse line through widest part of piriform lobe and mammillary bodies	<p><i>2D knife axis:</i> mediolateral</p> <p><i>Plane:</i> transverse (TS)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> ventrodorsal</p>	<ul style="list-style-type: none"> hippocampal commissure temporoventral body of hippocampus amygdaloid nucleus optic tract cerebral crus mammillary bodies piriform cortex 	Easy

3-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line through pituitary stalk/infundibular recess resp. 7-8mm ¹ parallel and rostral to 2-TS	as above	<ul style="list-style-type: none"> • prehippocampal fornix • caudate nucleus (tail) • ventral anterior nucleus • optic tract • periventricular zone of the hypothalamus • piriform cortex 	Easy
-------------	------------------------------------	----------	--	----------	---	------

¹ the distance (mm) between sections depends on animal size resp. brain size and ranges from 4-5mm (foal) to 10mm (draft horse)

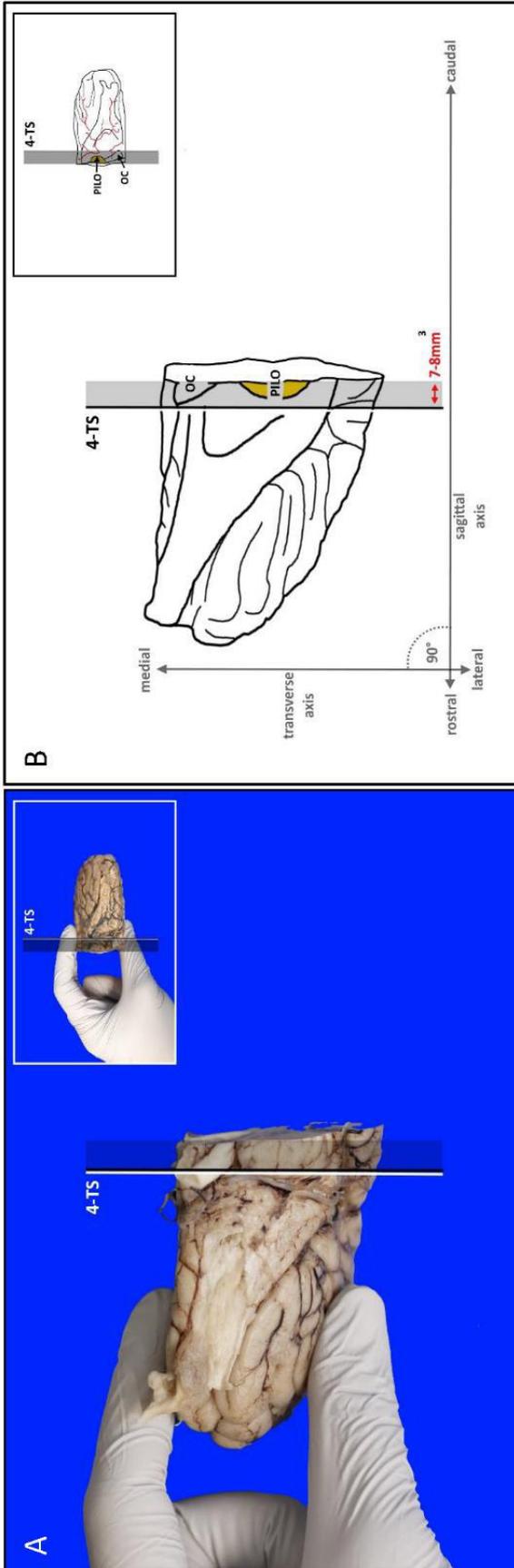


Supplementary Figure 9.1. Top view. 1st slab out of Block A. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: amygdaloid nucleus (AN), cerebral crus (CRU), hippocampal commissure (HICO), insular cortex (INSC), mammillary bodies (MAM), optic tract (OT), thalamus (THAL), temporoventral body of hippocampus (TVB).

Supplementary Table 3.1 Trimming of 1st slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Rostral cutting surface ²	Top view	Horizontal line above hippocampal commissure	<ul style="list-style-type: none"> • hippocampal commissure • thalamus • temporoventral body of hippocampus • amygdaloid nucleus • optic tract • cerebral crus • mammillary bodies • piriform cortex 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

² use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 10. Landmarks for 4-TS: optic chiasm (OC), piriform lobe (PILO). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 4 Instruction for obtainment of 2nd slab out of Block A (Supplementary Figure 10)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
4-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line at the caudal border of the optic chiasm, rostral to piriform lobe resp. 7-8mm ³ parallel and rostral to 3-TS	2D <i>knife axis</i> : mediolateral <i>Plane</i> : transverse (TS) <i>Inclination</i> : orthogonal to worktop <i>Blade movement</i> : ventrodorsal	<ul style="list-style-type: none"> • prehippocampal fornix • basal nuclei • capsules • rostral commissure • septal nuclei • prepiriform cortex 	Easy

³ the distance (mm) between sections depends on animal size resp. brain size and ranges from 4-5mm (foal) to 10mm (draft horse)

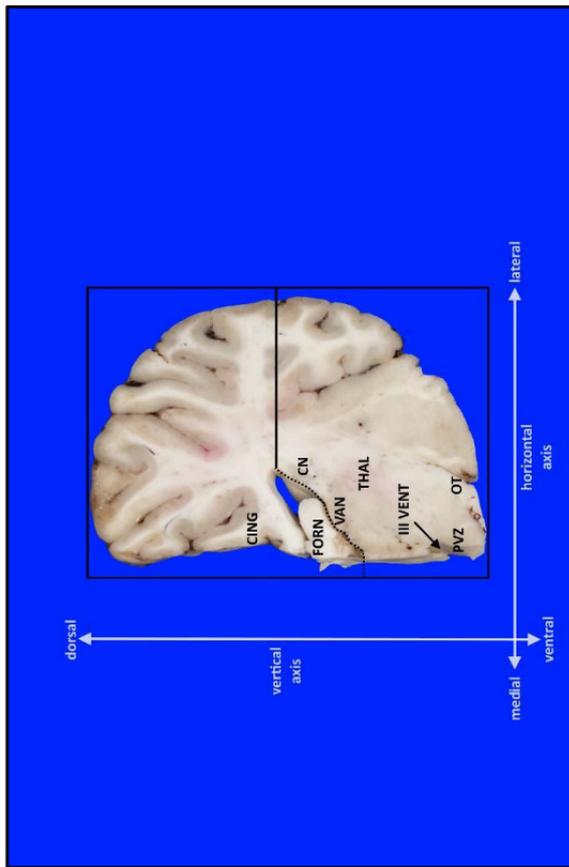
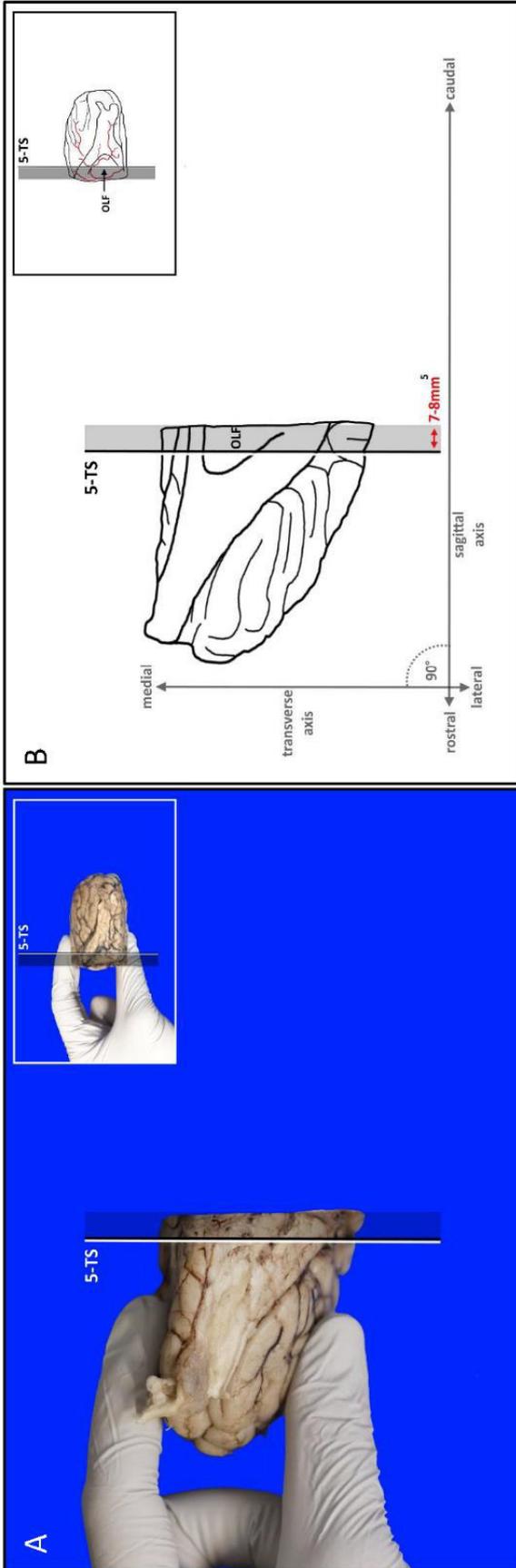


Figure 10.1. Top view. 2nd slab out of Block A. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: 3rd ventricle (III VENT), cingulate gyrus (CING), tail of caudate nucleus (CN), fornix (FORN), optic tract (OT), periventricular zone (PVZ) of hypothalamus, thalamus (THAL), ventral anterior nucleus (VAN).

Supplementary Table 4.1 Trimming of 2nd slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Rostral cutting surface ⁴	Top view	Horizontal line at lateral angle of lateral ventricles	<ul style="list-style-type: none"> • corpus callosum • ventral anterior nucleus • caudate nucleus (tail) • optic tract • periventricular zone of hypothalamus 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

⁴ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

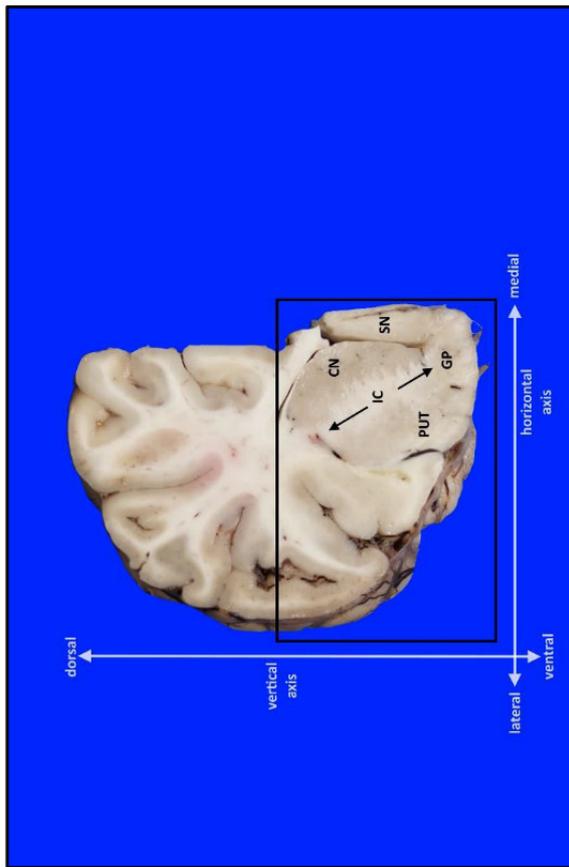


Supplementary Figure 11. Landmarks for 5-TS: olfactory tubercle (OLF). Transverse section (TS). Blood vessels (red), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 5 Instruction for obtainment of 3rd slab out of Block A (Supplementary Figure 11)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
5-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line through pre-piriform cortex and olfactory tubercle rostral to optic chiasm resp. 7-8mm ⁵ parallel and rostral to 4-TS	2D knife axis: mediolateral Plane: transverse (TS) Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: ventrodorsal	<ul style="list-style-type: none"> • prehippocampal fornix • basal nuclei • capsules • rostral commissure • septal nuclei • frontotemporal cortex 	Easy

⁵ the distance (mm) between sections depends on animal size resp. brain size and ranges from 4-5mm (foal) to 10mm (draft horse)

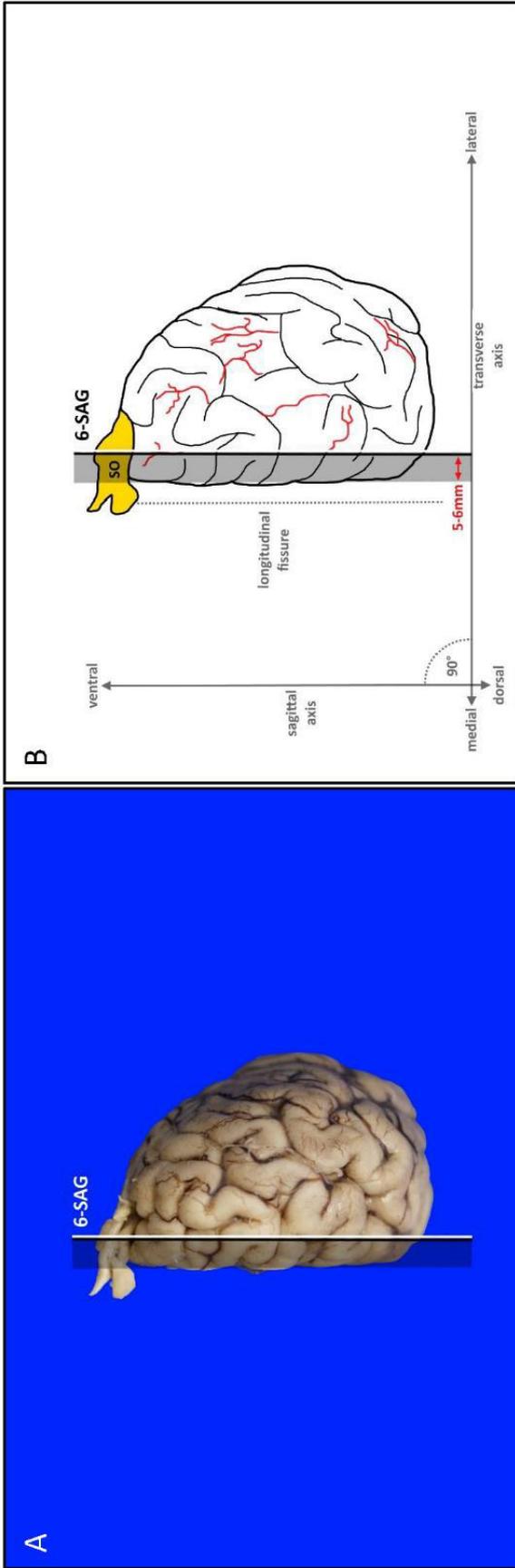


Supplementary Figure 11.1. Top view. 3rd slab out of Block A. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudate nucleus (CN), globus pallidus (GP), internal capsule (IC), putamen (PUT), septal nuclei (SN).

Supplementary Table 5.1 Trimming of 3rd slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Caudal cutting surface ⁶	Top view	Horizontal line at lateral angle of lateral ventricles	<ul style="list-style-type: none"> • caudate nucleus • putamen • globus pallidus • internal capsule • septal nuclei • frontotemporal cortex 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

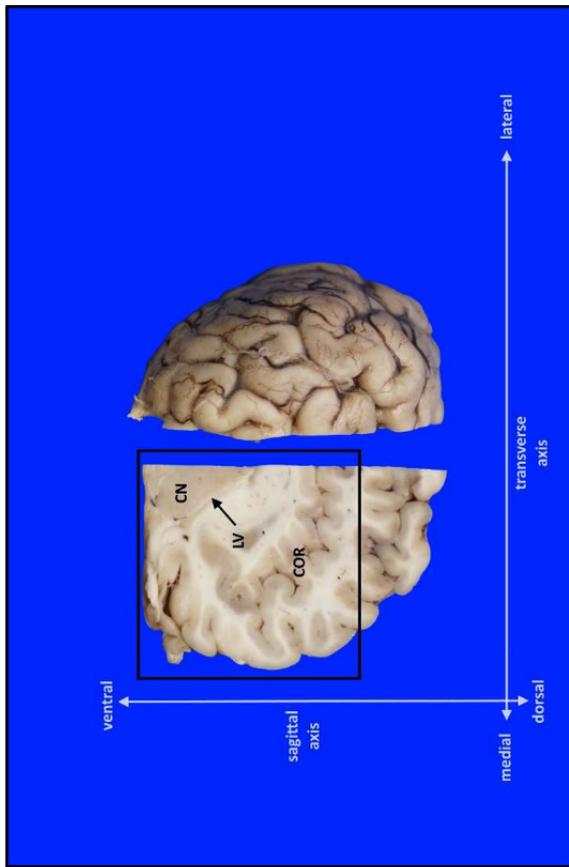
⁶ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 12. Landmark for 6-SAG: stria olfactoria (SO). Sagittal section (SAG). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 6 Instruction for obtainment of 4th slab out of Block B (Supplementary Figure 12)

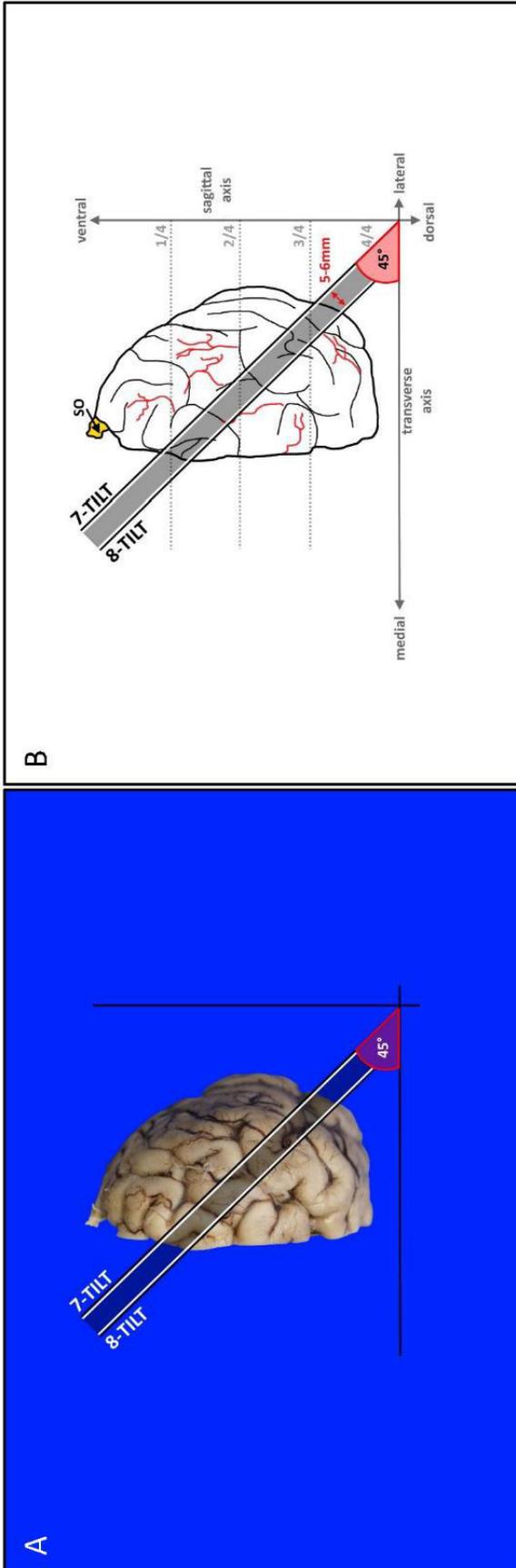
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
6-SAG	Place the block with its caudal cutting surface on the worktop The ventral aspect of the block is facing away from the investigator	Rostr-caudal view	Stria olfactoria Sagittal line through frontoparietal lobe 5-6mm lateral to midline	<i>2D knife axis:</i> dorsoventral <i>Plane:</i> sagittal (SAG) <i>Inclination:</i> orthogonal to worktop <i>Blade movement:</i> rostrocaudal	<ul style="list-style-type: none"> • caudate nucleus • lateral ventricle • frontoparietal medial cortex 	Easy



Supplementary Figure 12.1 Top view, 4th obtained slab of both hemispheres out of Block B. Axes (white) refer to brain blocks. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudate nucleus (CN), frontoparietal cortex (COR), lateral ventricle (LV), white matter (WM).

Supplementary Table 6.1 Trimming of 4th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial surface	Top view	Adjust to maximum slab size	subcortical white matter of gyrus marginalis/ cinguli (precruciate part)	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

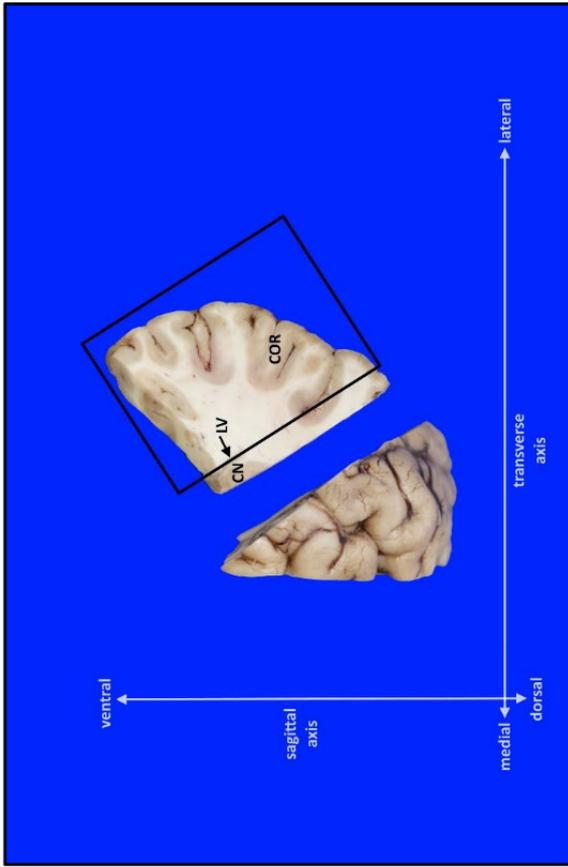


Supplementary Figure 13. Landmark for 7-TILT and 8-TILT: stria olfactoria (SO). Tilted section (TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 7 Instructions for obtainment of 5th slab out of Block B (Supplementary Figure 13)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
7-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Stria olfactoria Tilted line through frontal lobe decussating an imaginary border to the most ventral 1/4 of the block	2D knife axis: laterodorsal to medioventral Plane: tilted (TILT) (45°) to dorsoventral axis Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: rostrocaudal	<ul style="list-style-type: none"> • caudate nucleus • lateral ventricles • white matter tracts • frontal (motor) cortex 	Requires some practice

8-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Tilted line through frontal lobe parallel to and at 5-6 mm interslice distance dorsal to 7-TILT	as above	as above	Requires some practice
---------------	------------------------------------	----------	---	----------	----------	------------------------

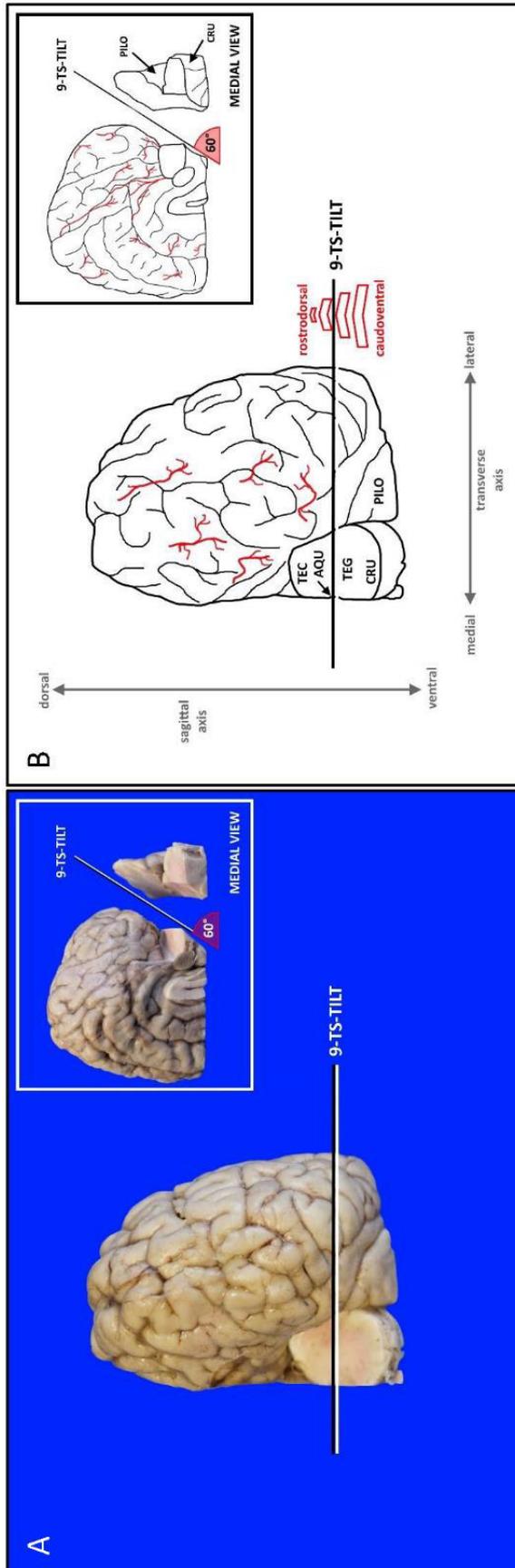


Supplementary Figure 13.1. Top view. 5th obtained slab out of Block B. Axes (white) refer to brain block. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudate nucleus (CN), cortex (COR), lateral ventricle (LV).

Supplementary Table 7.1 Trimming of 5th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Ventrolateral cutting surface ⁷	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> rostral composite gyrus Betz cells (histological confirmation) 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

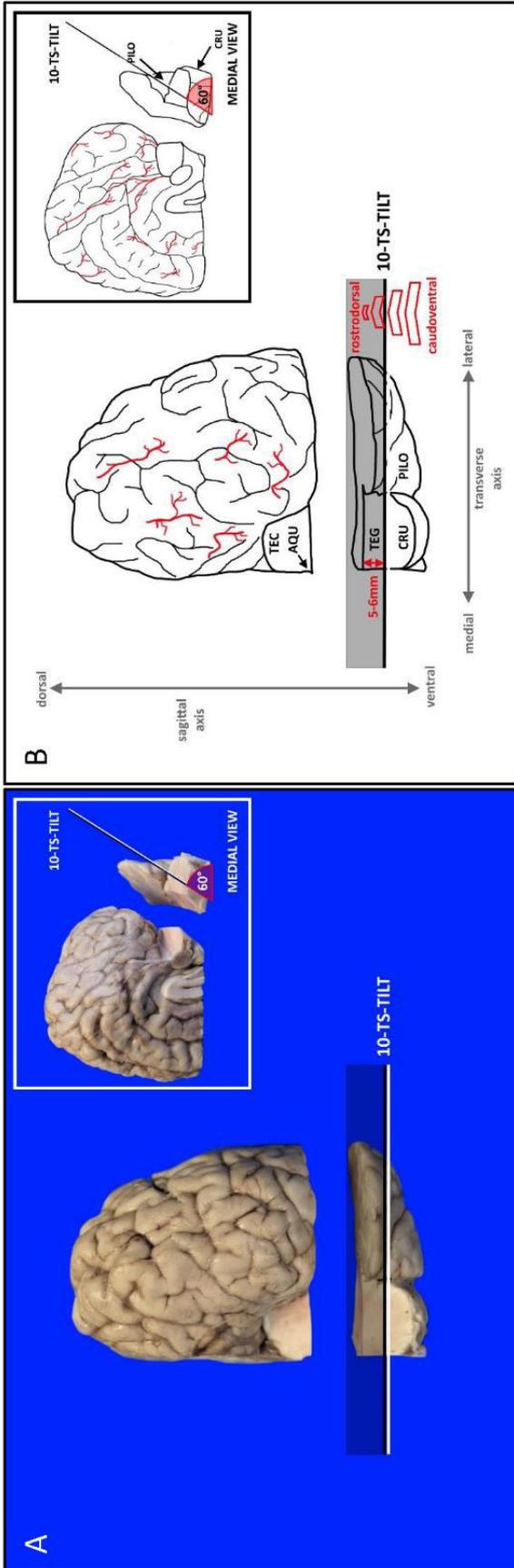
⁷ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 14. Landmarks for 9-TS-TILT: mesencephalic aqueduct (AQU), cerebral crus (CRU), piriform lobe (PILO), midbrain tectum (TEC), midbrain tegmentum (TEG). Transverse-tilted section (TS-TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 8 Instructions for obtainment of 6th slab out of Block C (Supplementary Figure 14)

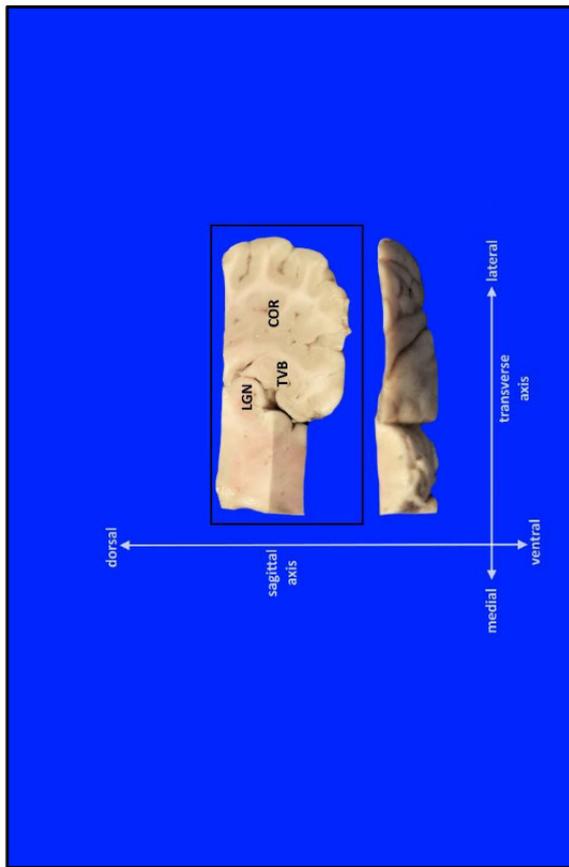
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
9-TS-TILT	Place the block with its rostral cutting surface on the worktop The dorsal aspect of the block is facing away from the investigator	Caudo-rostral view	Transverse-tilted line through piriform lobe and midbrain tectum/tegmentum Cutting guide directly ventral of/ resp. through mesencephalic aqueduct	2D knife axis: mediolateral Plane: tilted to PILO surface Inclination: tilted (TILT) (60°) to worktop → please note inlet for elucidation of approach Blade movement: caudoventral to rostradorsal	<ul style="list-style-type: none"> brain stem nuclei lateral geniculate nucleus temporoventral body of the hippocampus cortex (temporal) 	Requires some practice



Supplementary Figure 14.1. Landmarks for 10-TS-TILT: mesencephalic aqueduct (AQU), cerebral crus (CRU), piriform lobe (PILO), midbrain tectum (TEC), midbrain tegmentum (TEG). Transverse-tilted section (TS-TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 8.1 Instructions for obtainment of 6th slab out of Block C (Supplementary Figure 14.1)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
10-TS-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Transverse-tilted line through piriform lobe and midbrain tegmentum/ cerebral crus Parallel to and at 5-6mm interslice distance ventral to 9-TS-TILT	as above	as above	Requires some practice

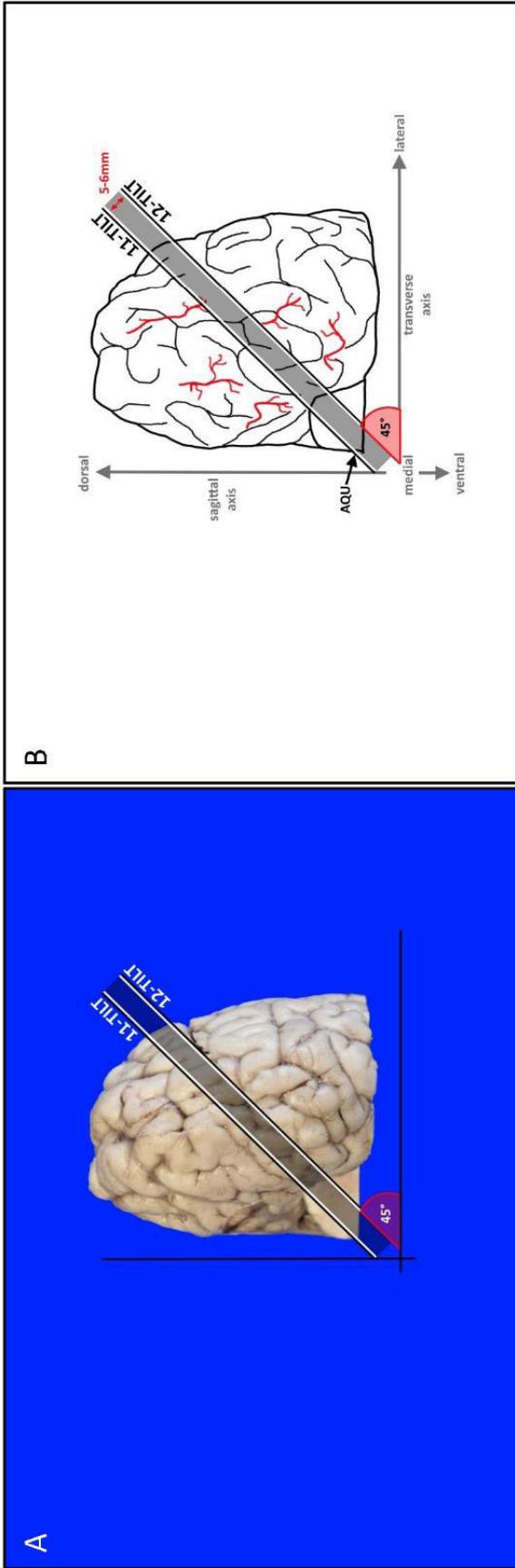


Supplementary Figure 14.2. Top view. 6th obtained slab out of Block C. Axes (white) refer to brain block. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: cortex (COR), lateral geniculate nucleus (LGN), temporovertebral body (TVB) of hippocampus.

Supplementary Table 8.2 Trimming of 6th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Ventral cutting surface ⁸	Top view	No adjustment necessary	<ul style="list-style-type: none"> cortex (temporal) temporovertebral body of the hippocampus lateral geniculate nucleus midbrain nuclei 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

⁸ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

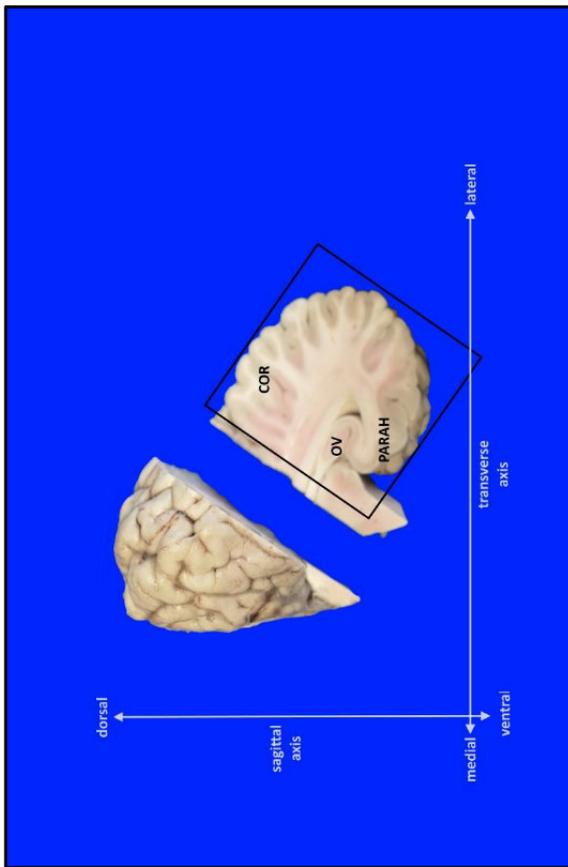


Supplementary Figure 15. Landmarks for 11-TILT and 12-TILT. Mesencephalic aqueduct (AQU). Tilted section (TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 9 Instructions for obtainment of 7th slab out of Block C (Supplementary Figure 15)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
11-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Tilted line through occipital lobe and mesencephalic stump decussating the mesencephalic aqueduct	<p><i>2D knife axis:</i> medioventral to laterodorsal</p> <p><i>Plane:</i> tilted (TILT) (45°)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> caudorostral</p>	<ul style="list-style-type: none"> • brain stem nuclei • optic radiations • main visual cortex • occipital vertex of the hippocampus and associated parahippocampal gyrus 	Requires some practice

12-TILT	Maintain placement as stated above	as above	Tilted line through occipital lobe and mesencephalic stump at 5-6 mm interslice distance ventrolateral to 11-TILT	as above	as above	Requires some practice
----------------	------------------------------------	----------	---	----------	----------	------------------------

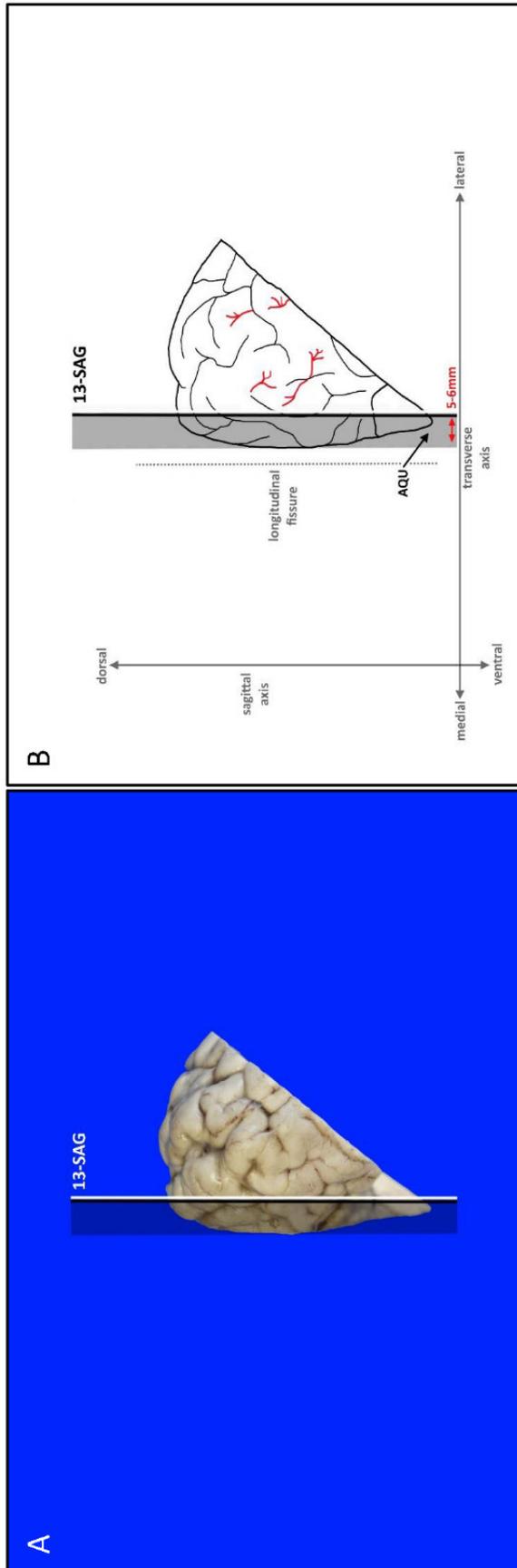


Supplementary Figure 15.1. Top view. 7th obtained slab out of Block C. Axes (white) refer to brain block. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: cortex (COR), occipital vertex (OV) of hippocampus, parahippocampal gyrus (PARAH).

Supplementary Table 9.1 Trimming of 7th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Ventrolateral cutting surface ⁹	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • optic radiations • main visual cortex • occipital vertex of the hippocampus • occipital apex of parahippocampal gyrus 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

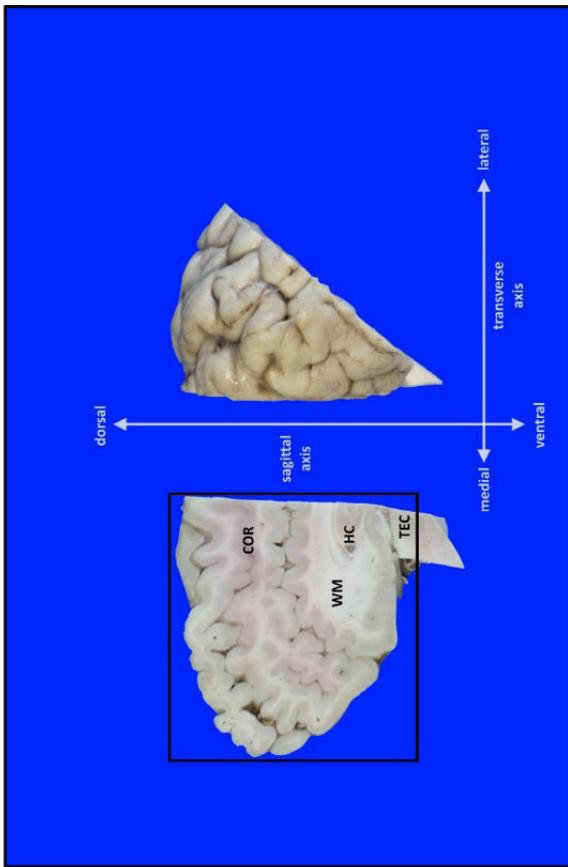
⁹ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 16. Landmarks for 13-SAG: mesencephalic aqueduct (AQU). Sagittal section (SAG). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 10 Instructions for obtainment of 8th slab out of Block C (Supplementary Figure 16)

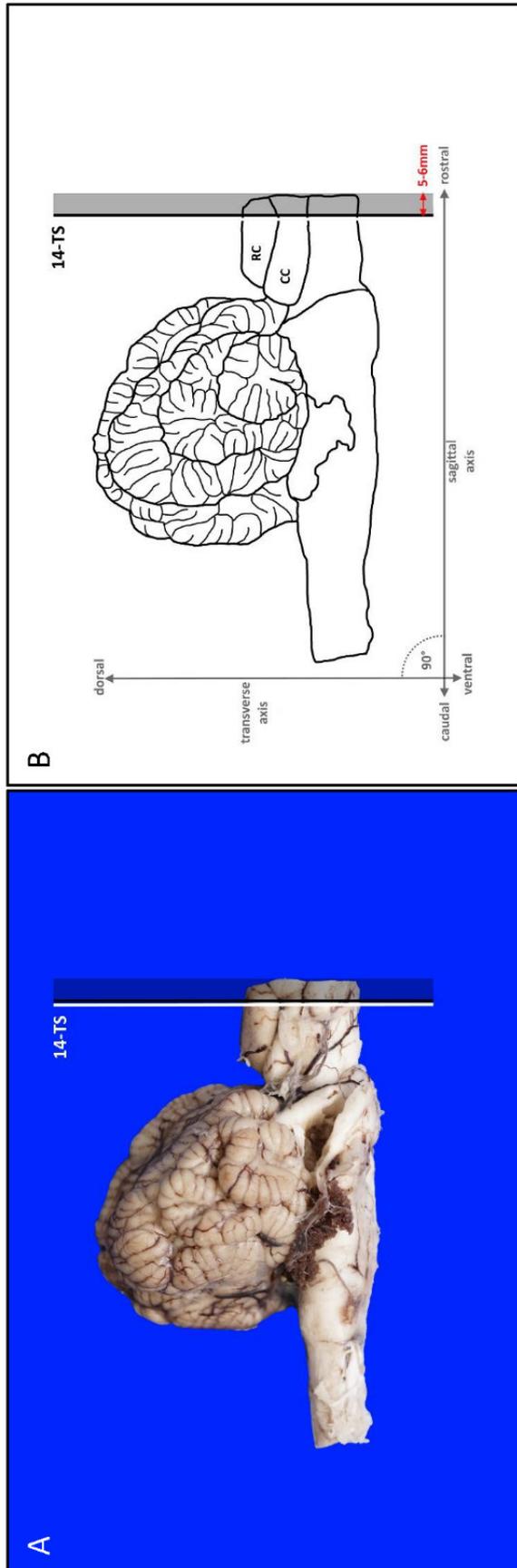
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
13-SAG	Maintain placement as stated above	as above	Sagittal line through occipital lobe and midbrain tectum 5-6mm lateral to midline	<p><i>2D knife axis:</i> ventrodorsal</p> <p><i>Plane:</i> sagittal (SAG)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> caudorostral</p>	<ul style="list-style-type: none"> subcortical white matter of gyrus marginalis/cingula (postcruciate part) hippocampal alveus longitudinal view of splenial sulcus 	Easy



Supplementary Figure 16.1. Top view. 8th obtained slab out of Block C. Axes (white) refer to brain blocks. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: occipital cortex (COR), alveus of hippocampus (HC), midbrain tectum (TEC), white matter (WM).

Supplementary Table 10.1 Trimming of 8th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial surface	Top view	Adjust to maximum slab size if necessary	<ul style="list-style-type: none"> subcortical white matter of gyrus marginalis/cingula (postcruciate part) hippocampal alveus paramedial occipital cortex (splenial sulcus) 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

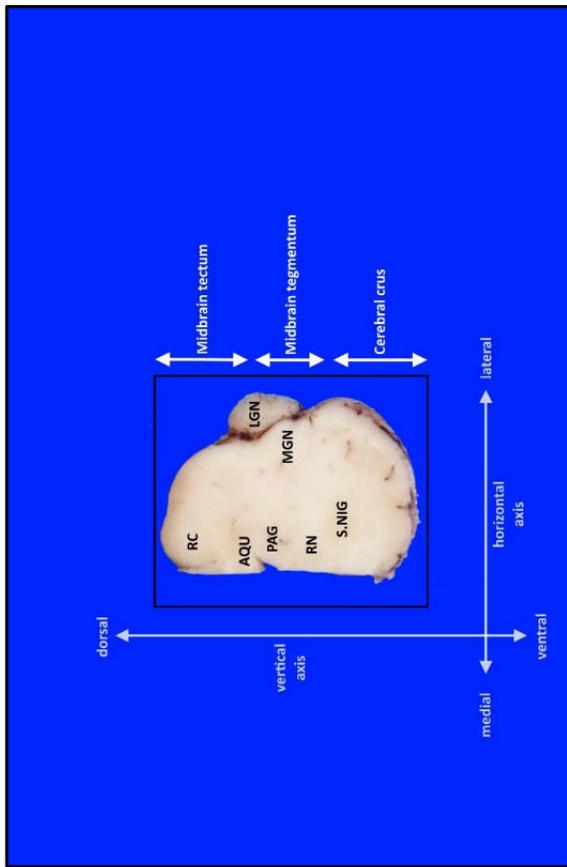


Supplementary Figure 17. Landmarks for 14-TS: caudal colliculi (CC), rostral colliculi (RC), Transverse section (TS). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 11 Instruction for obtaintment of 9th slab out of Block D (Supplementary Figure 17)

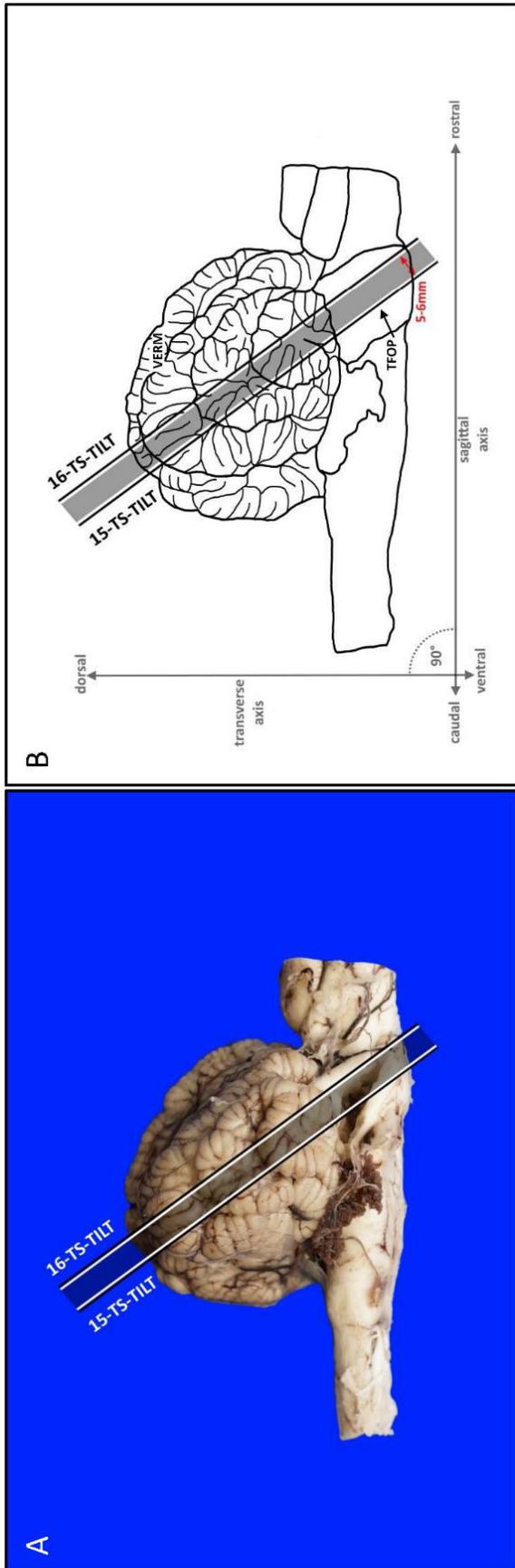
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
14-TS	Place the block with its medial surface on the worktop	Lateral view of the midbrain	Transverse line through rostral colliculi resp. 5-6mm caudal to 1-TS ¹⁰	<i>2D knife axis:</i> dorsoventral <i>Plane:</i> transverse (TS) <i>Inclination:</i> orthogonal to worktop <i>Blade movement:</i> lateromedial	<ul style="list-style-type: none"> • geniculate nuclei • midbrain tectum • midbrain tegmentum • aqueduct • cerebral crus 	Easy

¹⁰ 1-TS = 1st cut (pre-step)



Supplementary Figure 17.1. Top view, 9th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). The slab is placed on its rostral cutting surface¹¹. Pertinent landmarks for sampling: mesencephalic aqueduct (AQU), intercrural fossa (IF); lateral geniculate nucleus (LGN), medial geniculate nucleus (MGN), periaqueductal gray matter (PAG), rostral colliculi (RC), red nucleus (RN), substantia nigra (S.NIG).

¹¹ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

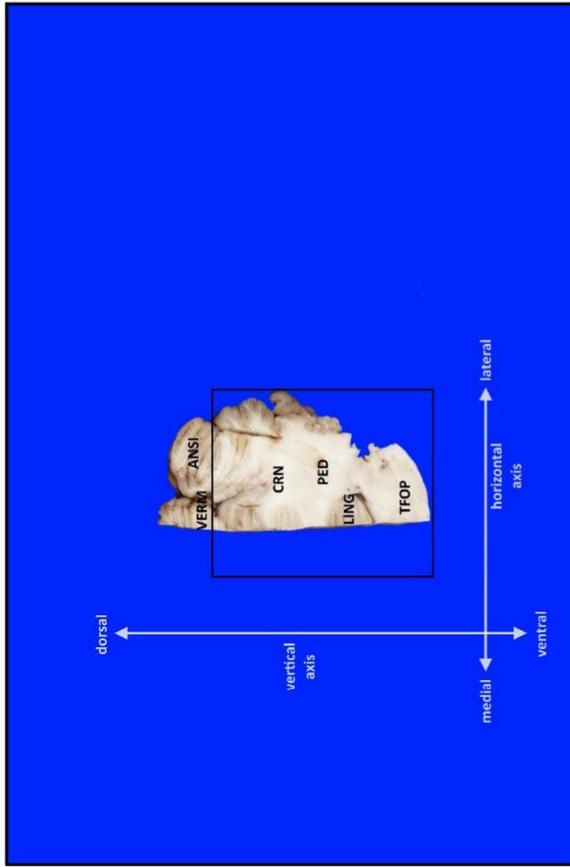


Supplementary Figure 18. Landmarks for 15-TS-TILT and 16-TS-TILT: transverse fibres of pons (TFOP), vermis (VERM). Transverse-tilted section (TS-TILT). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 12 Instruction for obtainment of 10th slab out of Block D (Supplementary Figure 18)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
15-TS-TILT	Place the block with its medial surface on the worktop	Lateral view of the cerebellum	Transverse tilted line at widest extension between vermis (VERM) and pons (TFOP)	<p><i>2D knife axis:</i> dorsocaudal to ventrostral</p> <p><i>Plane:</i> transverse (TS), tilted (TILT)</p> <p><i>Inclination:</i> Inclination required to meet the pons (TFOP)</p> <p><i>Blade movement:</i> lateromedial</p>	<ul style="list-style-type: none"> • cerebellar cortex, nuclei and peduncles • reticular formation • 4th ventricle • transverse fibres of pons 	Requires some practice

16-TS-TILT	Maintain placement as stated above	As above	Horizontal line 5-6mm rostral and parallel to 15-TS-TILT	As above	as 15-TS-TILT	Requires some practice
-------------------	------------------------------------	----------	--	----------	---------------	------------------------

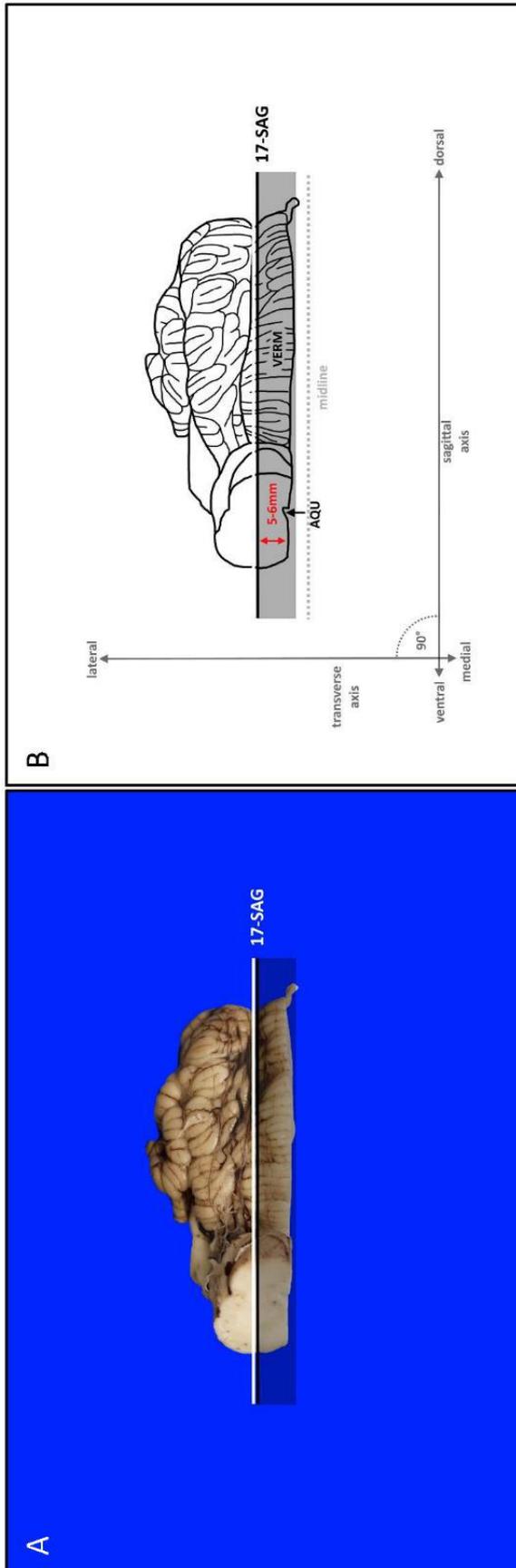


Supplementary Figure 18.1. Top view. 10th obtained slab out of block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: ansiform lobule (ANSI), cerebellar roof nuclei (CRN), lingula (LING), cerebellar peduncles (PED), transverse fibres of pons (TFOP), vermis (VERM).

Supplementary Table 12.1 Trimming of 10th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Rostral cutting surface ¹²	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • cerebellar roof nuclei • cerebellar peduncles • transverse fibres of pons • lingula 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

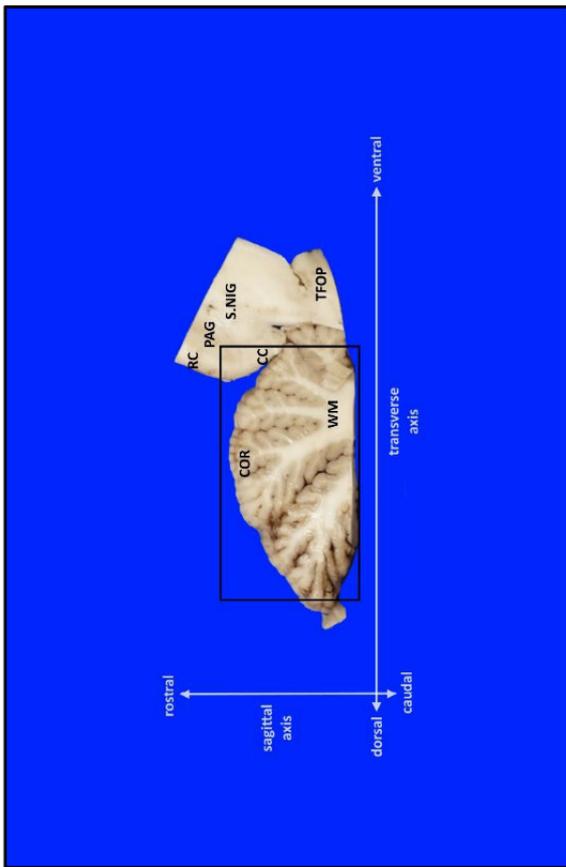
¹² use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 19. Landmarks for 17-SAG: mesencephalic aqueduct (AQU), vermis (VERM). Sagittal section (SAG). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 13 Instruction for obtainment of 11th slab out of Block D (Supplementary Figure 19)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
17-SAG	Place the rostral cerebellar block with its caudal cutting surface on the worktop	Dorsal view of the rostral cerebellar block	Sagittal line approx. 5-6mm lateral to midline	<p>2D knife axis: dorsoventral</p> <p>Plane: sagittal (SAG)</p> <p>Inclination: orthogonal to worktop</p> <p>Blade movement: rostrocaudal</p>	<ul style="list-style-type: none"> sagittal paravermis sagittal midbrain 	Easy

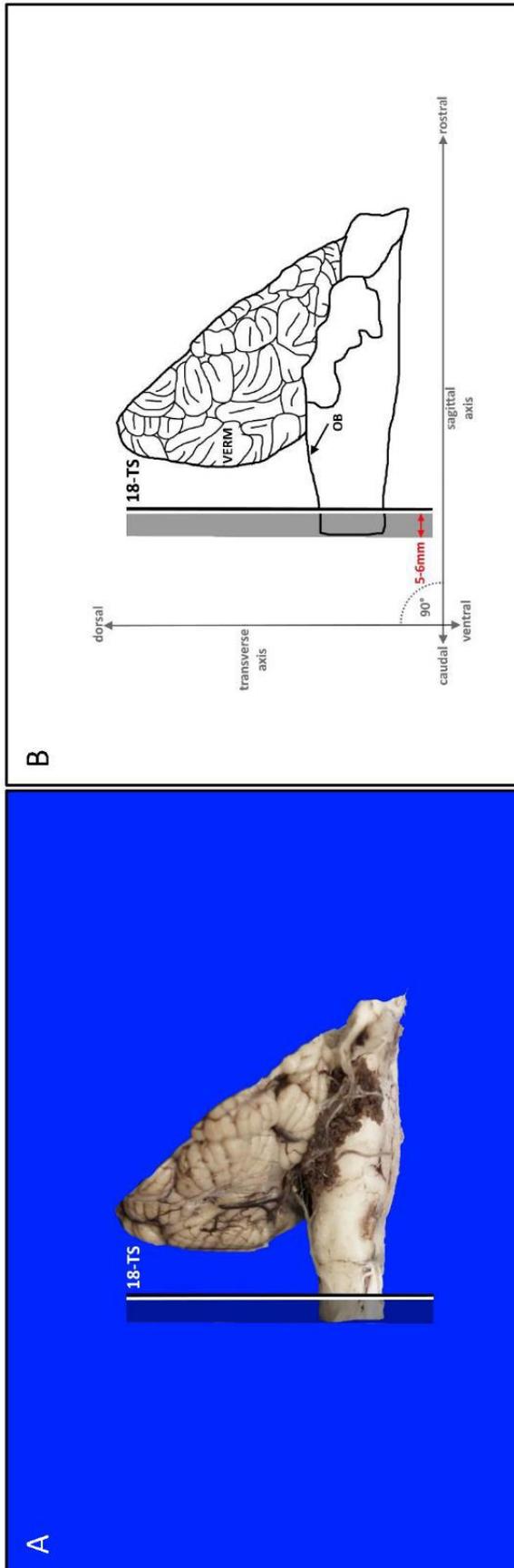


Supplementary Figure 19.1. Top view. 11th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudal colliculi (CC), cerebellar cortex (COR), periaqueductal gray matter (PAG), rostral colliculi (RC), substantia nigra (S.NIG), transverse fibres of pons (TFOP), white matter (WM).

Supplementary Table 13.1 Trimming of 11th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial or lateral cutting surface ¹³	Top view	Adjust to maximum slab size	sagittal paravermis	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

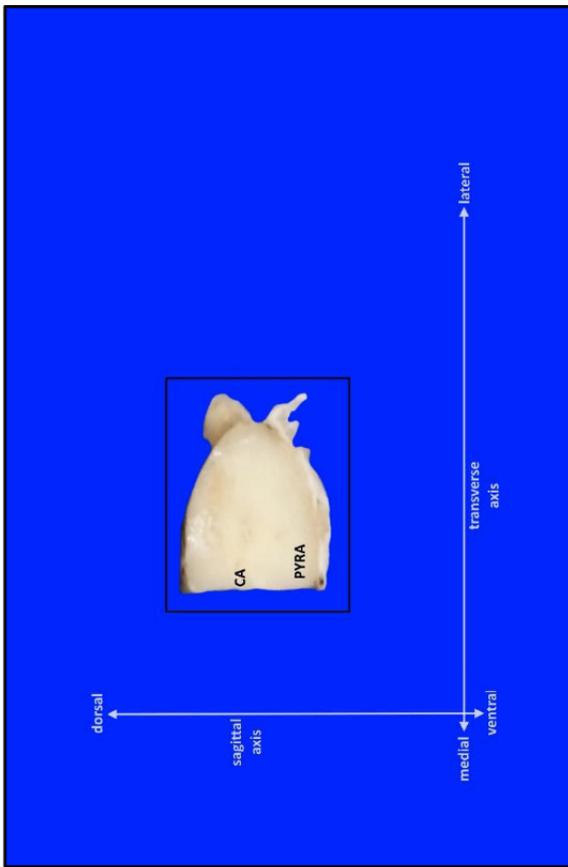
¹³ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 21. Landmarks for 18-TS: obex (OB: obex), vermis (VERM). Transverse section (TS). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

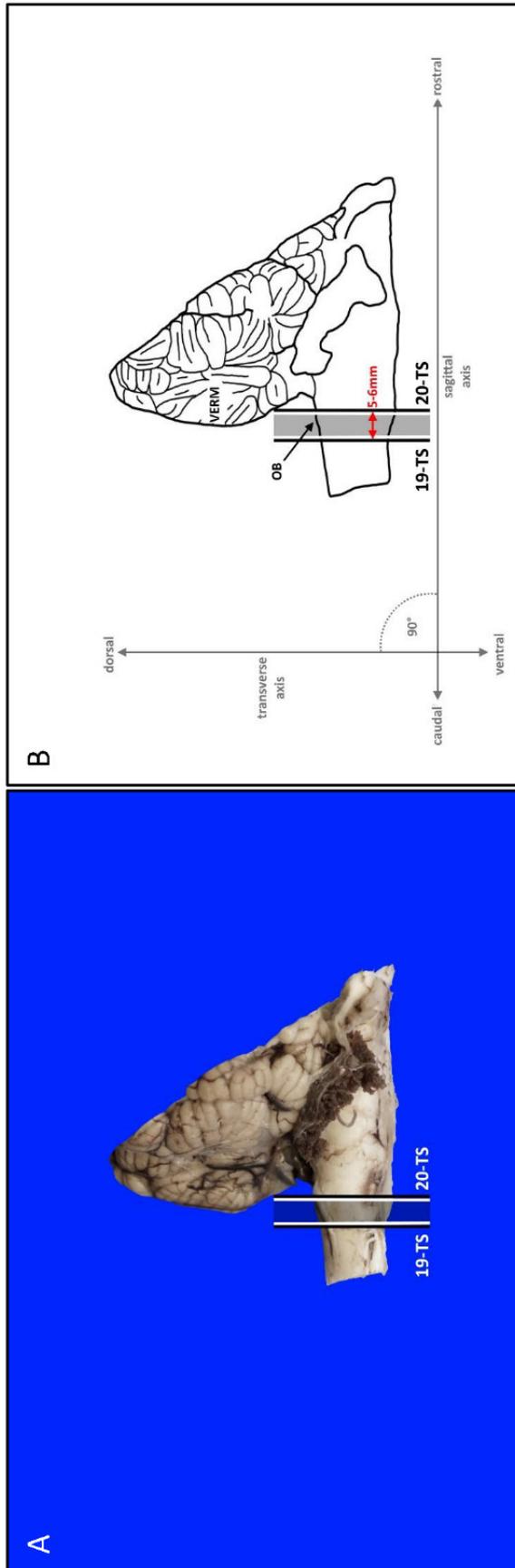
Supplementary Table 15 Instruction for obtainment of 12th slab out of Block D (Supplementary Figure 21)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
18-TS	Place the caudal cerebellar block with its medial surface on the worktop	Lateral view of the medulla oblongata	Transverse line through medulla oblongata caudal to the obex	<p>2D knife axis: dorsoventral</p> <p>Plane: transverse (TS)</p> <p>Inclination: orthogonal to worktop</p> <p>Blade movement: lateromedial</p>	<ul style="list-style-type: none"> Medulla oblongata 	Easy



Supplementary Figure 21.1: Top view. The slab is placed on its rostral cutting surface¹⁴. 12th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: central canal (CA), pyramids (PYRA).

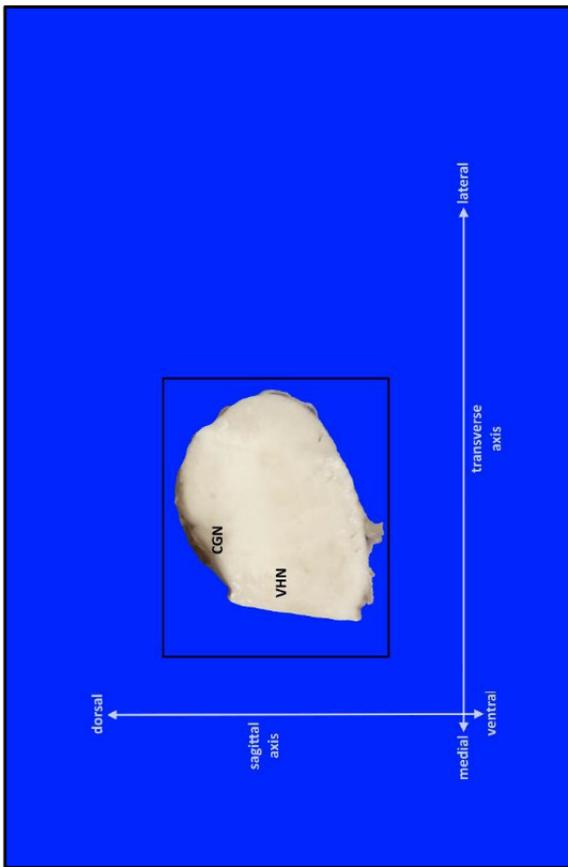
¹⁴ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 22. Landmarks for 19-TS and 20-TS: obex (OB), vermis (VERM). Transverse section (TS). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

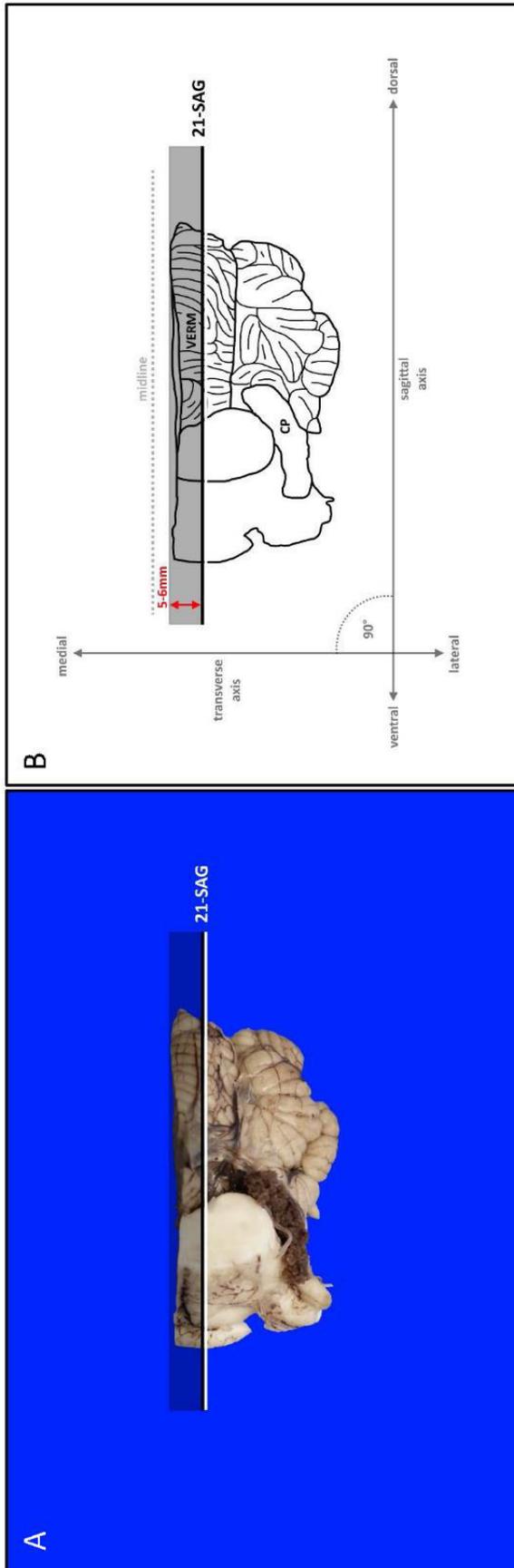
Supplementary Table 16 Instruction for obtainment of 13th slab out of Block D (Supplementary Figure 22)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
19-TS	Maintain placement as stated above	Lateral view of the hindbrain	Transverse line near the obex	<p><i>2D knife axis:</i> dorsoventral</p> <p><i>Plane:</i> transverse (TS)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> lateromedial</p>	<ul style="list-style-type: none"> • area postrema • spinal tracts • decussation of sensory fibres • vagal and associated nuclei • proprioceptive nuclei 	Easy
20-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line 5-6 mm rostral and parallel to 19-TS	as above	as above	Easy



Supplementary Figure 22.1.1. Top view. The slab is placed on its rostral cutting surface¹⁵. 13th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: cuneate and gracile nuclei (CGN), vagal and hypoglossal nuclei (VHN).

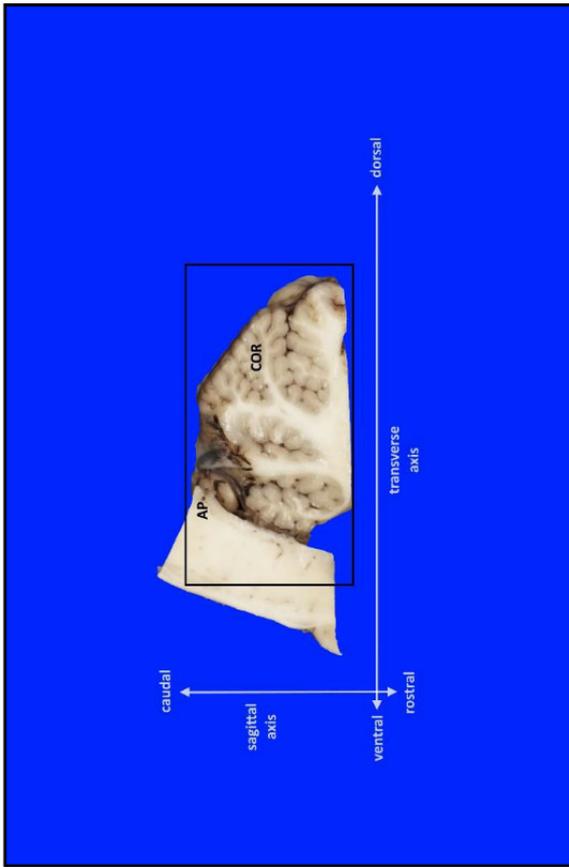
¹⁵ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 23. Landmarks for 21-SAG: central canal (CA), choroid plexus (CP), vermis (VERM). Sagittal section (SAG). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 17 Instruction for obtainment of 14th slab out of Block D (Supplementary Figure 23)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
21-SAG	Place the caudal cerebellar block with its rostral cutting surface on the worktop	Caudal view of caudal cerebellar block	Sagittal line approx. 5-6mm lateral to midline	<p><i>2D knife axis:</i> ventrodorsal</p> <p><i>Plane:</i> sagittal (SAG)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> caudorostral</p>	<ul style="list-style-type: none"> sagittal mid-uvula brainstem nuclei medial wall of area postrema 	Easy



Supplementary Figure 23.1. Top view. 14th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: area postrema (AP), cortex (COR).

Supplementary Table 17.1 Trimming of 14th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial or lateral cutting surface ¹⁶	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • sagittal mid-uvula • brainstem nuclei • medial wall of area postrema 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

¹⁶ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

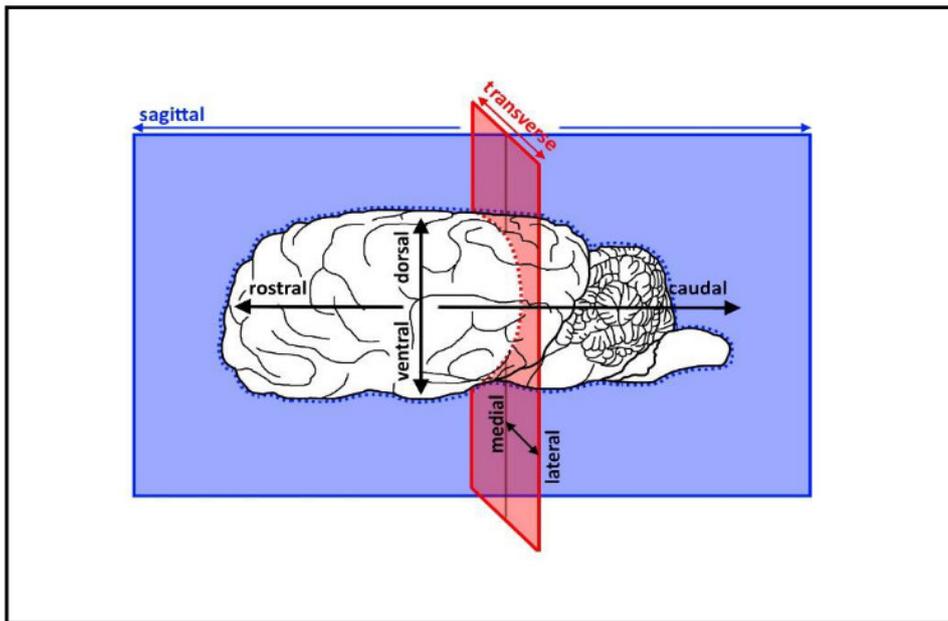
Abbreviations**I. Planes/ Orientation**

SAG: sagittal plane/section
TILT: lateral-tilted plane/section
TS: transverse plane/section
TS-TILT: transverse-tilted plane/section

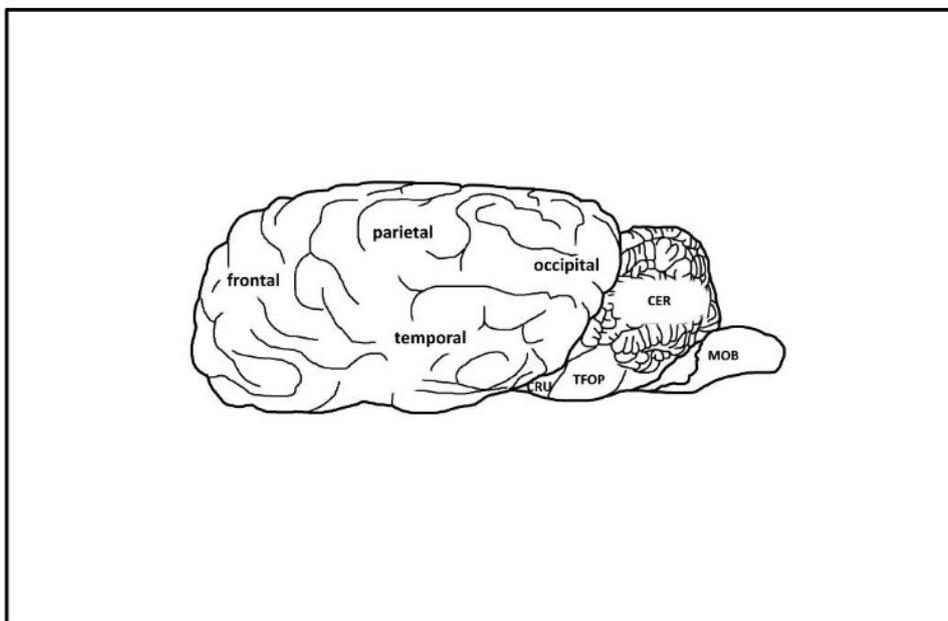
II. Landmarks

III VENT: 3rd ventricle
AN: amygdaloid nucleus
ANSI: ansiform lobule
AP: area postrema
AQU: mesencephalic aqueduct
CA: central canal
CC: caudal colliculi
CER: cerebellum
CGN: cuneate and gracile nuclei
CING: cingulate gyrus
CN: caudate nucleus
COCA: corpus callosum
COR: cortex
CP: choroid plexus
CRN: cerebellar roof nuclei
CRU: cerebral crus
FORN: fornix
GP: globus pallidus
HC: hippocampus
HICO: hippocampal commissure
IC: internal capsule
INSC: insular cortex
LING: lingula
LGN: lateral geniculate nucleus
LOF: longitudinal fissure
LV: lateral ventricle
MAM: mammillary bodies
MGN: medial geniculate nucleus
MOB: medulla oblongata
OB: obex
OC: optic chiasm
ON: oculomotor nerve
OLF: olfactory tubercle
OT: optic tract
OV: occipital vertex of hippocampus
PAG: periaqueductal gray matter
PARAH: parahippocampal gyrus
PED: cerebellar peduncles
PILO: piriform lobe
PIT: pituitary stalk/ infundibular recess
PUT: putamen
PVZ: periventricular zone of the hypothalamus
PYRA: pyramids (decussation)
RC: rostral colliculi
RN: red nucleus
S.NIG: substantia nigra
SN: septal nuclei
SO: stria olfactoria
TEC: midbrain tectum
TEG: midbrain tegmentum
TFOP: transverse fibres of pons
THAL: thalamus
TVB: temporoventral body of the hippocampus
VAN: ventral anterior nucleus
VERM: vermis
VHN: vagal and hypoglossal nuclei
WM: white matter

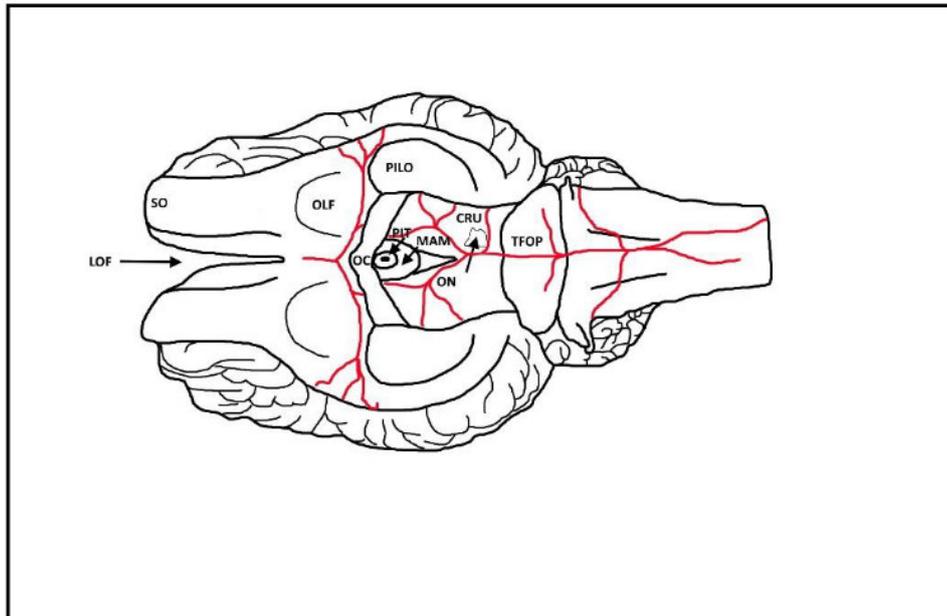
2.3. Bihemisphärische Version



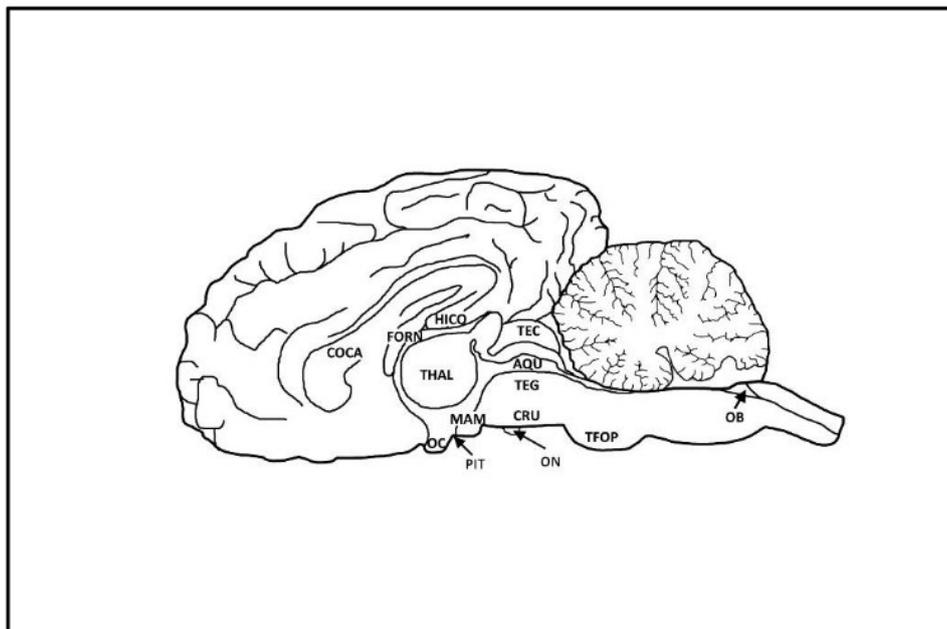
Supplementary Figure 1. Planes and orientation. Colours demonstrate sagittal (blue) and transverse (red) planes. The sections performed in the protocol are numbered from 1-21 in the order of implementation and termed according to the individual plane (e.g., 1-TS, 6-SAG, 8-TILT). Sagittal (SAG), lateral-tilted (TILT), transverse (TS) and transverse-tilted (TS-TILT).



Supplementary Figure 2. Landmarks of the dorsolateral brain surface. Forebrain with frontal, parietal, temporal, occipital lobe. Midbrain with cerebral crus (CRU). Hindbrain with transverse fibres of pons (TFOP), cerebellum (CER) and medulla oblongata (MOB).



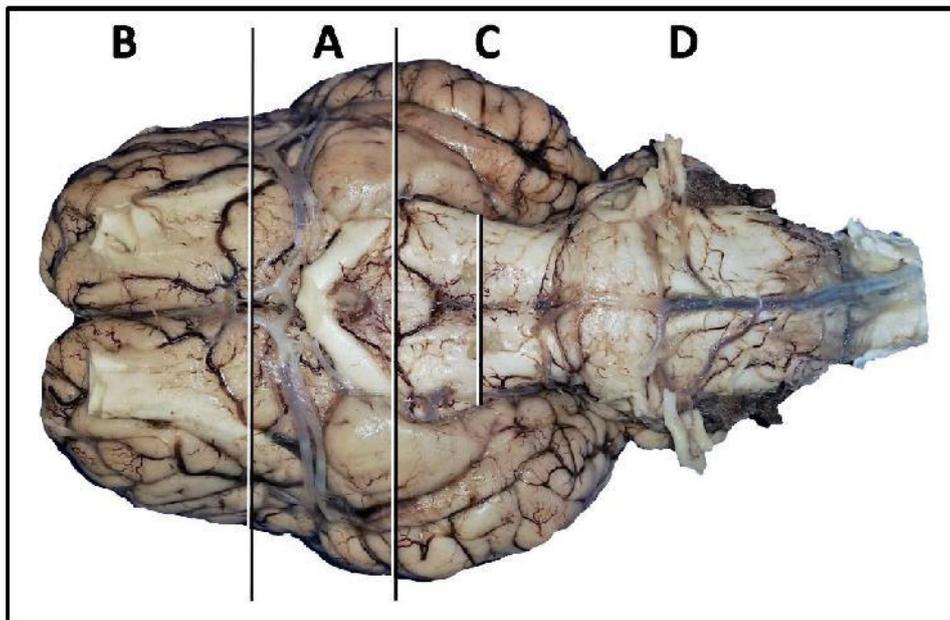
Supplementary Figure 3. Landmarks of the ventral brain surface. Cerebral crus (CRU), longitudinal fissure (LOF), mammillary bodies (MAM), optic chiasm (OC), olfactory tubercle (OLF), oculomotor nerve (ON), piriform lobe (PILO), pituitary stalk/infundibular recess (PIT), stria olfactoria (SO) and transverse fibres of pons (TFOP).



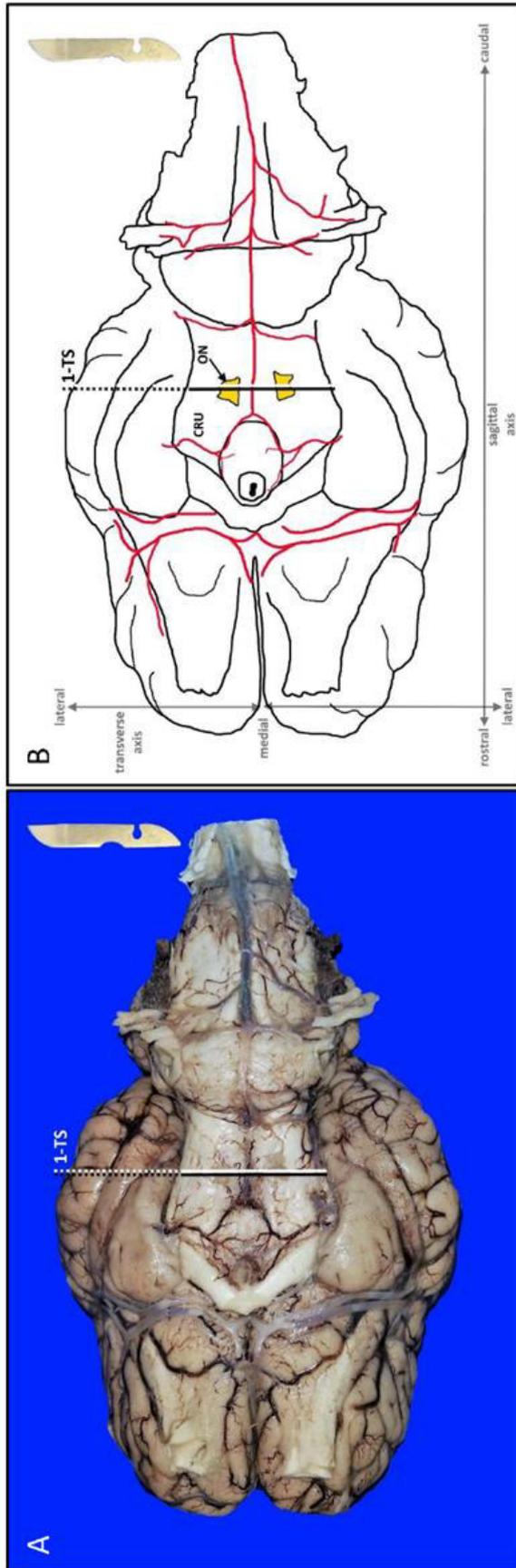
Supplementary Figure 4. Landmarks of the median brain surface. Mesencephalic aqueduct (AQU), corpus callosum (COCA), cerebral crus (CRU), fornix (FORN), hippocampal commissure (HICO), mammillary bodies (MAM), obex (OB), optic chiasm (OC), oculomotor nerve (ON), pituitary stalk/ infundibular recess (PIT), midbrain tectum (TEC), midbrain tegmentum (TEG), transverse fibres of pons (TFOP) and thalamus (THAL).



Supplementary Figure 5. Equipment for performance of the protocol. Cutting board (1), scalpel blade and handle (2), microtome blade (3), customary long blade (4), microscope slide labelled with maximum slab size herein 4 x 5.5cm (5)



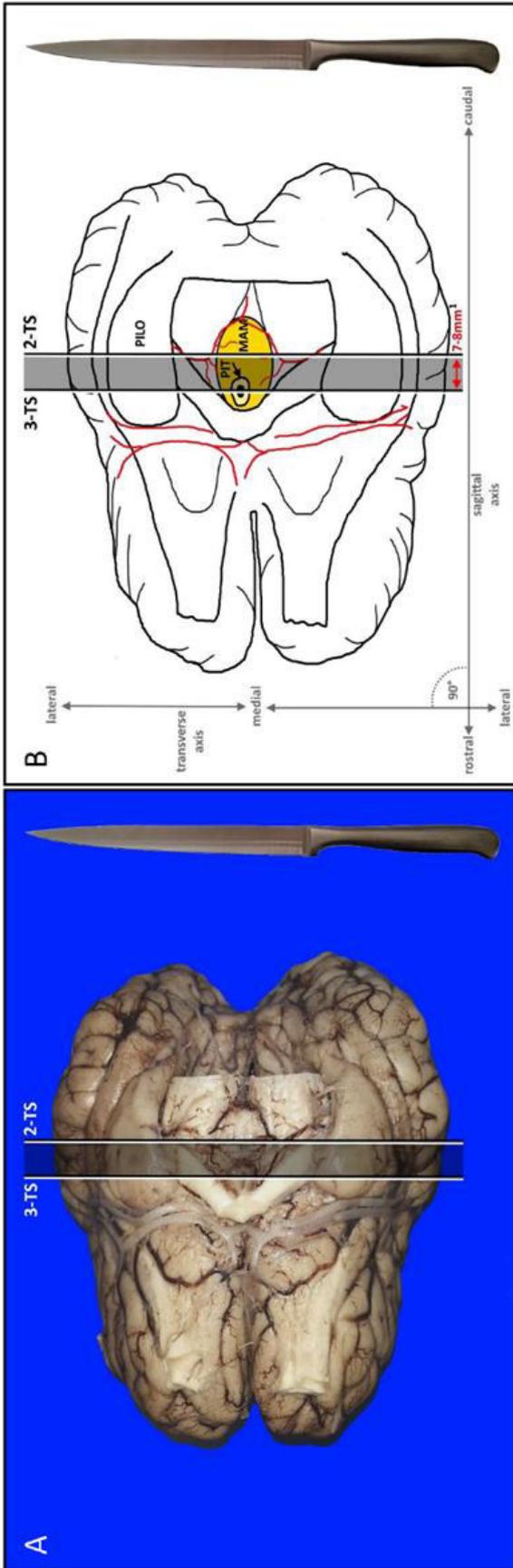
Supplementary Figure 6. Virtual division of the brain into 4 blocks (A to D) for simplification of tissue handling and obtainment of even cut surfaces for placement of the blocks on the worktop.



Supplementary Figure 7. Landmarks for 1-TS: cerebral crus (CRU), oculomotor nerve (ON). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow). Scalpel blade. (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 1 Instruction for performance of 1-TS (Supplementary Figure 7)

Step	Aim / harvest	Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Difficulty
1-TS	Transsection of the midbrain <u>Cave:</u> do not cut into occipital lobe (use small blade)	Place the brain with its dorsal surface on the worktop and fix it between your thumb and forefinger to allow for ventrodorsal section	Ventral top view of the brain	Transverse line through cerebral crus at oculomotor nerve emergence	2D knife axis: laterolateral Plane: transverse (TS) Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: ventrodorsal	Easy



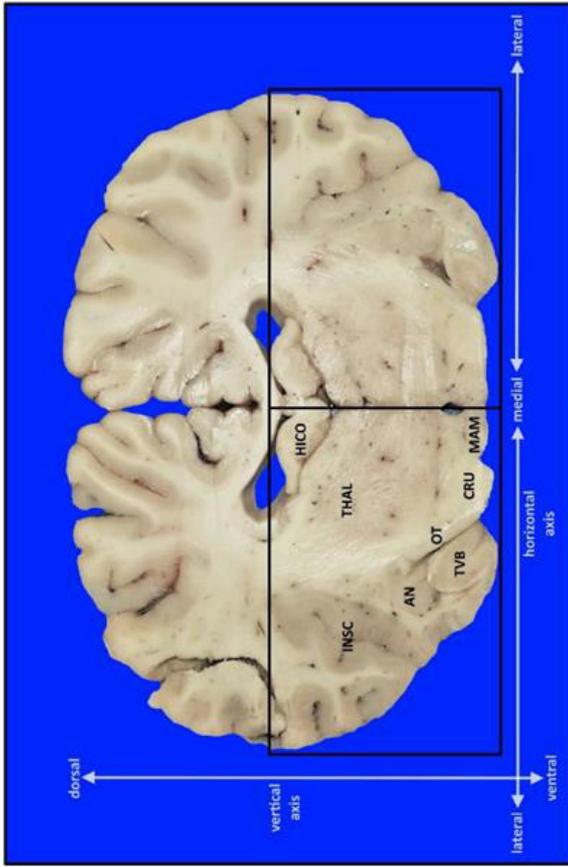
Supplementary Figure 8. Landmarks for 2-TS and 3-TS: mammillary bodies (MAM), piriform lobe (PILO), pituitary stalk/ infundibular recess (PIT). Transverse section (TS). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). Customary long blade. (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 2 Instructions for obtainment of 1st slab out of Block A (Supplementary Figure 8)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
2-TS	Place the block with its dorsal surface on the worktop and fix it between your thumb and forefinger to allow for ventrodorsal section. → hold brain in the way and direction of your convenience	Ventral top view of the brain	Transverse line through widest part of piriform lobe and mammillary bodies	<i>2D knife axis:</i> laterolateral <i>Plane:</i> transverse (TS) <i>Inclination:</i> orthogonal to worktop <i>Blade movement:</i> ventrodorsal	<ul style="list-style-type: none"> hippocampal commissure temporoventral body of hippocampus amygdaloid nucleus optic tract cerebral crus mammillary bodies piriform cortex 	Easy

3-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line through pituitary stalk/infundibular recess resp. 7-8mm ¹ parallel and rostral to 2-TS	as above	<ul style="list-style-type: none"> • prehippocampal fornix • caudate nucleus (tail) • ventral anterior nucleus • optic tract • periventricular zone of the hypothalamus • piriform cortex 	Easy
-------------	------------------------------------	----------	--	----------	---	------

¹ the distance (mm) between sections depends on animal size resp. brain size and ranges from 4-5mm (foal) to 10mm (draft horse)

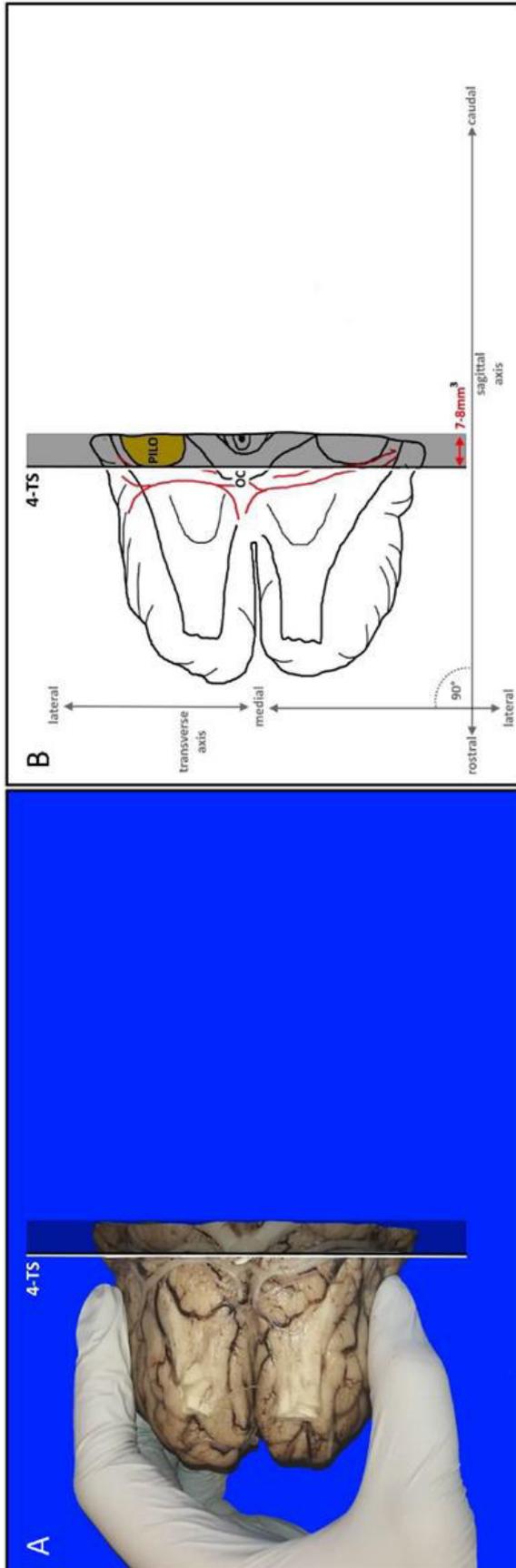


Supplementary Figure 8.1. Top view. 1st slab out of Block A. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: amygdaloid nucleus (AN), cerebral crus (CRU), hippocampal commissure (HICO), insular cortex (INSC), mammillary bodies (MAM), optic tract (OT), thalamus (THAL), temporoventral body of hippocampus (TVB).

Supplementary Table 2.1 Trimming of 1st slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Rostral cutting surface ²	Top view	Horizontal line above hippocampal commissure Vertical line at midline for separation of hemispheres	<ul style="list-style-type: none"> • hippocampal commissure • thalamus • temporoventral body of hippocampus • amygdaloid nucleus • optic tract • cerebral crus • mammillary bodies • piriform cortex 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

² use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 9. Landmarks for 4-TS: optic chiasm (OC), piriform lobe (PILO). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 3 Instruction for obtainment of 2nd slab out of Block A (Supplementary Figure 9)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
4-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line at the caudal border of the optic chiasm, rostral to piriform lobe resp. 7-8mm ³ parallel and rostral to 3-TS	2D <i>knife axis</i> : laterolateral <i>Plane</i> : transverse (TS) <i>Inclination</i> : orthogonal to worktop <i>Blade movement</i> : ventrodorsal	<ul style="list-style-type: none"> • prehippocampal fornix • basal nuclei • capsules • rostral commissure • septal nuclei • prepiriform cortex 	Easy

³ the distance (mm) between sections depends on animal size resp. brain size and ranges from 4-5mm (foal) to 10mm (draft horse)

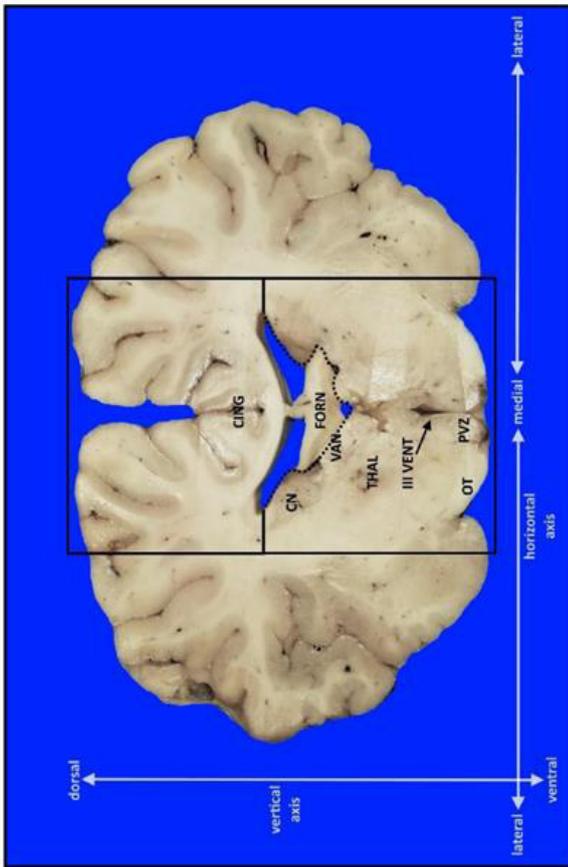
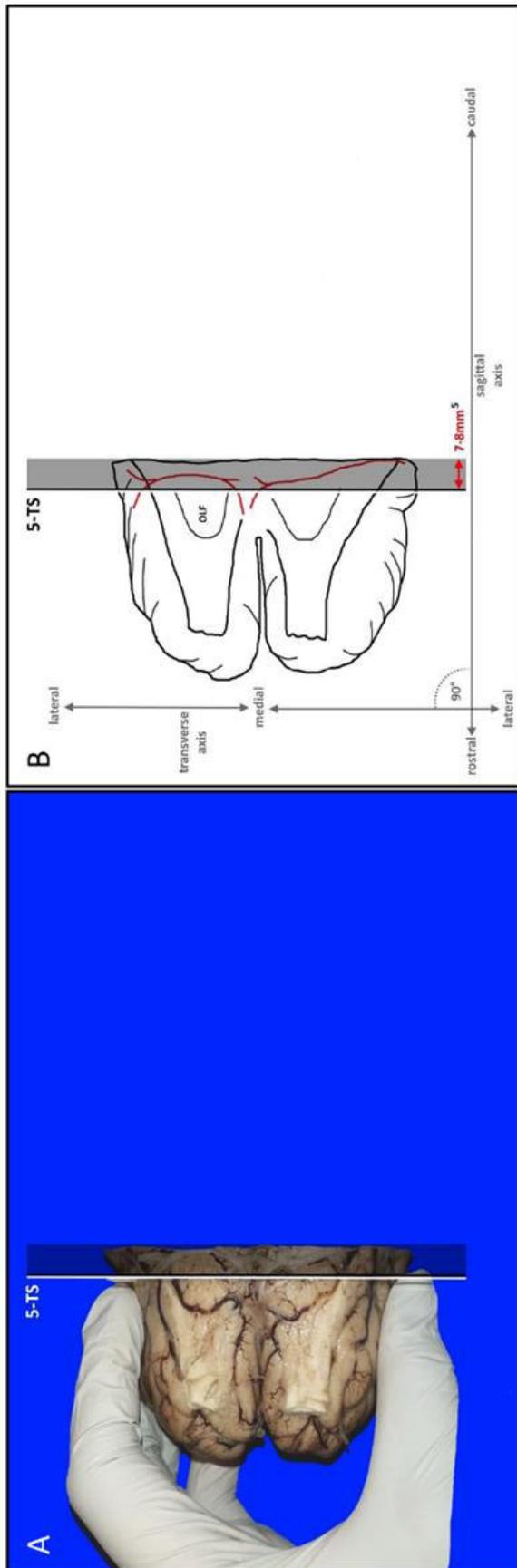


Figure 9.1. Top view. 2nd slab out of Block A. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: 3rd ventricle (III VENT), cingulate gyrus (CING), tail of caudate nucleus (CN), fornix (FORN), optic tract (OT), periventricular zone (PVZ) of hypothalamus, thalamus (THAL), ventral anterior nucleus (VAN).

Supplementary Table 3.1 Trimming of 2nd slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Rostral cutting surface ⁴	Top view	Horizontal line at lateral angle of lateral ventricles Vertical line to adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • corpus callosum • ventral anterior nucleus • caudate nucleus (tail) • optic tract • periventricular zone of hypothalamus 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

⁴ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

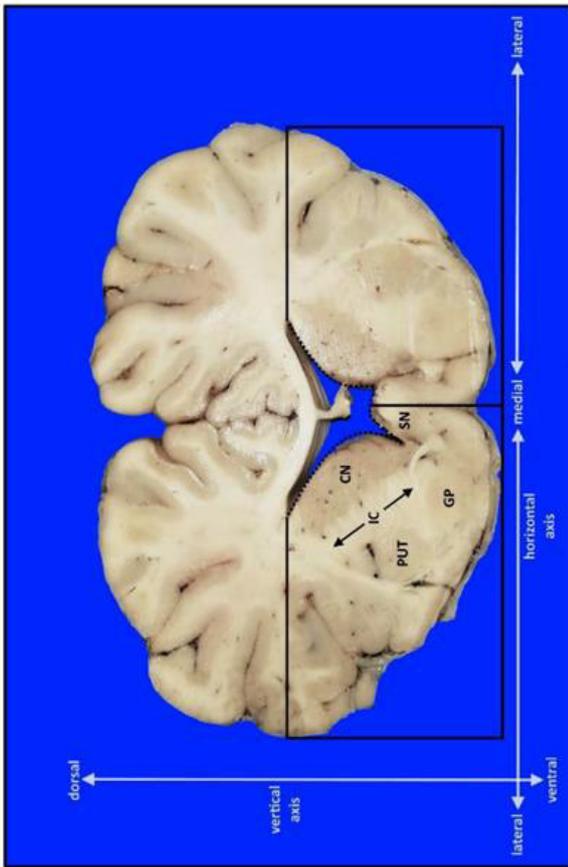


Supplementary Figure 10. Landmarks for 5-TS: olfactory tubercle (OLF). Transverse section (TS). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 4 Instruction for obtainment of 3rd slab out of Block A (Supplementary Figure 10)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
5-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line through pre-piriform cortex and olfactory tubercle rostral to optic chiasm resp. 7-8mm ⁵ parallel and rostral to 4-TS	2D <i>knife axis</i> : laterolateral <i>Plane</i> : transverse (TS) <i>Inclination</i> : orthogonal to worktop <i>Blade movement</i> : ventrodorsal	<ul style="list-style-type: none"> • prehippocampal fornix • basal nuclei • capsules • rostral commissure • septal nuclei • frontotemporal cortex 	Easy

⁵ the distance (mm) between sections depends on animal size resp. brain size and ranges from 4-5mm (foal) to 10mm (draft horse)

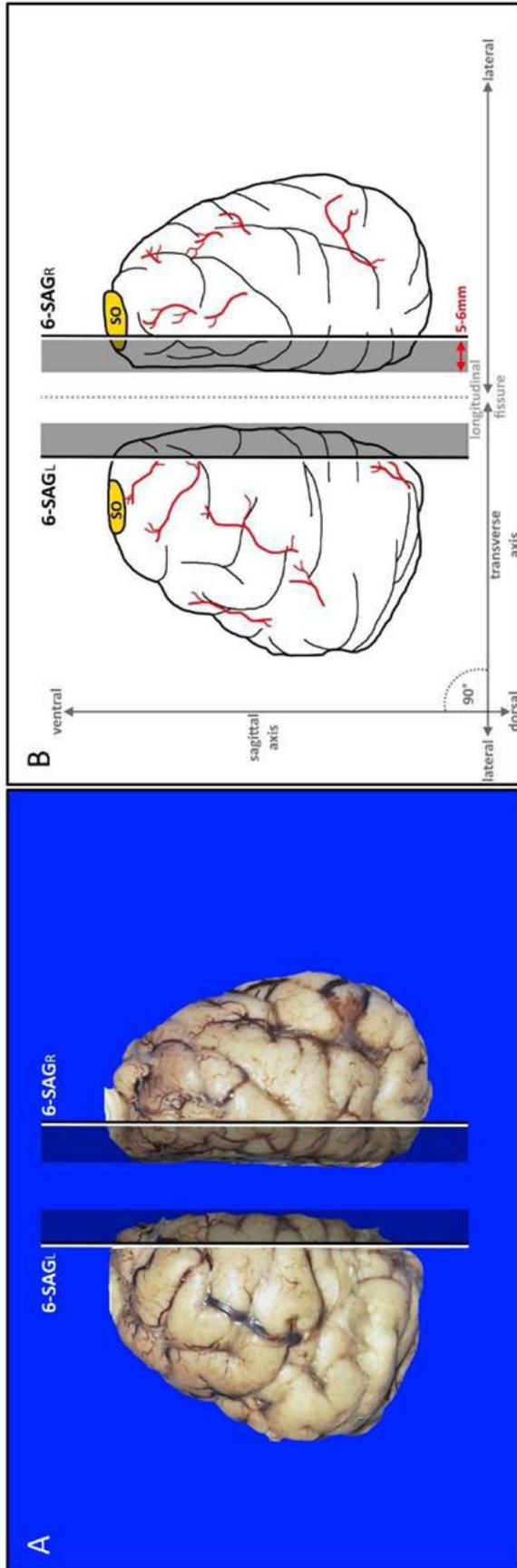


Supplementary Figure 10.1. Top view. 3rd slab out of Block A. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudate nucleus (CN), globus pallidus (GP), internal capsule (IC), putamen (PUT), septal nuclei (SN).

Table 4.1 Trimming of 3rd slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Caudal cutting surface ⁶	Top view	Horizontal line at lateral angle of lateral ventricles Vertical line at midline for separation of hemispheres to adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • caudate nucleus • putamen • globus pallidus • internal capsule • septal nuclei • frontotemporal cortex 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

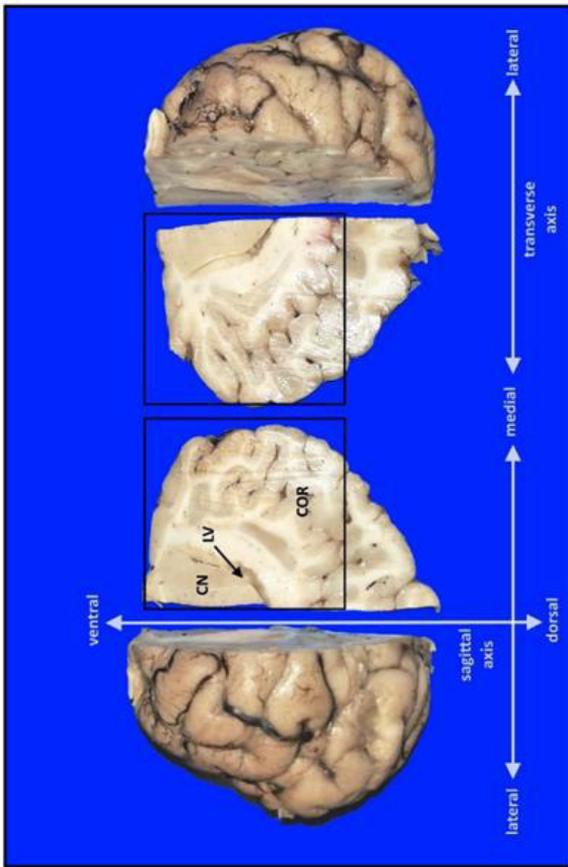
⁶ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 11. Landmark for 6-SAGL and 6-SAGR: stria olfactoria (SO). Sagittal section (SAG). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 5 Instruction for obtainment of 4th slab out of Block B (Supplementary Figure 11)

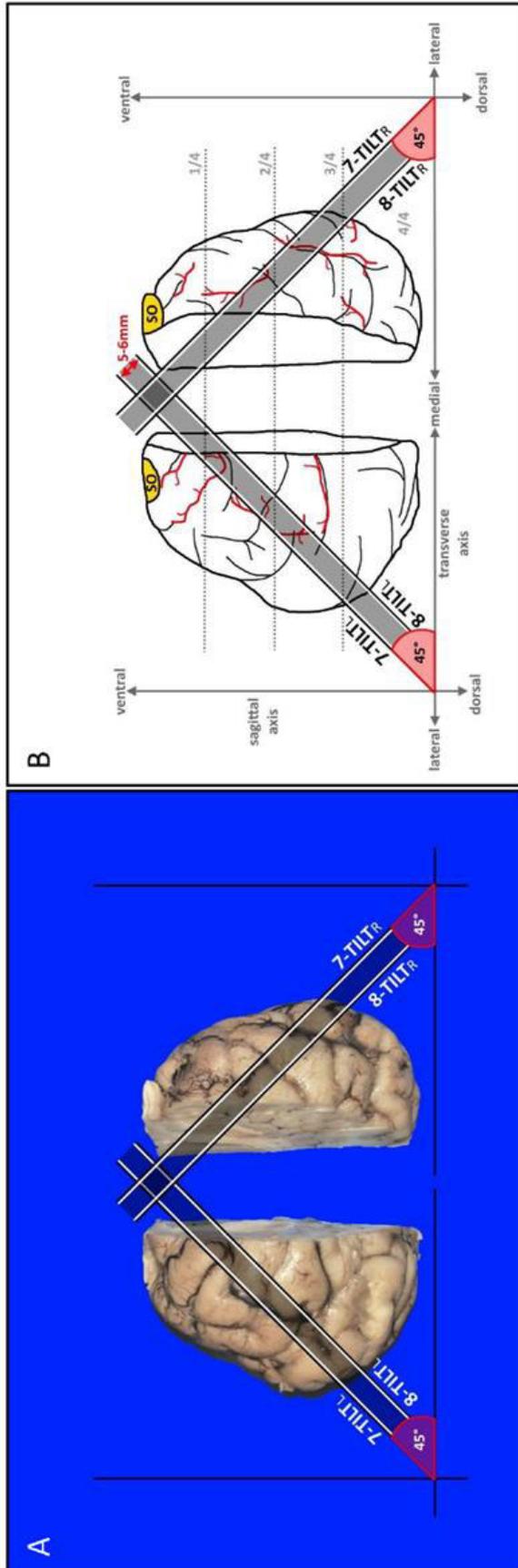
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
6-SAGL and 6-SAGR	Place the block with its caudal cutting surface on the worktop The ventral aspect of the block is facing away from the investigator Separate the hemispheres at longitudinal fissure	Rostro-caudal view	Stria olfactoria Sagittal line through frontoparietal lobe 5-6mm lateral to midline	<i>2D knife axis:</i> dorsoventral <i>Plane:</i> sagittal (SAG) <i>Inclination:</i> orthogonal to worktop <i>Blade movement:</i> rostrocaudal	<ul style="list-style-type: none"> caudate nucleus lateral ventricle frontoparietal medial cortex 	Easy



Supplementary Figure 11.1 Top view, 4th obtained slab of both hemispheres out of Block B. Axes (white) refer to brain blocks. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudate nucleus (CN), frontoparietal cortex (COR), lateral ventricle (LV), white matter (WM).

Supplementary Table 5.1 Trimming of 4th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial surface	Top view	Adjust to maximum slab size	subcortical white matter of gyrus marginalis/ cinguli (precruciate part)	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy



Supplementary Figure 12. Landmark for 7-TILT_{L/R} and 8-TILT_{L/R}: stria olfactoria (SO). Tilted section (TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 6 Instructions for obtainment of 5th slab out of Block B (Supplementary Figure 12)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
7-TILT _L and 7-TILT _R	Maintain placement as stated above	as above	Stria olfactoria Tilted line through frontal lobe decussating an imaginary border to the most ventral 1/4 of the block	2D knife axis: laterodorsal to medioventral Plane: tilted (TILT) (45°) to dorsoventral axis Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: rostrocaudal	<ul style="list-style-type: none"> • caudate nucleus • lateral ventricles • white matter tracts • frontal (motor) cortex 	Requires some practice

Requires
some
practice

as above

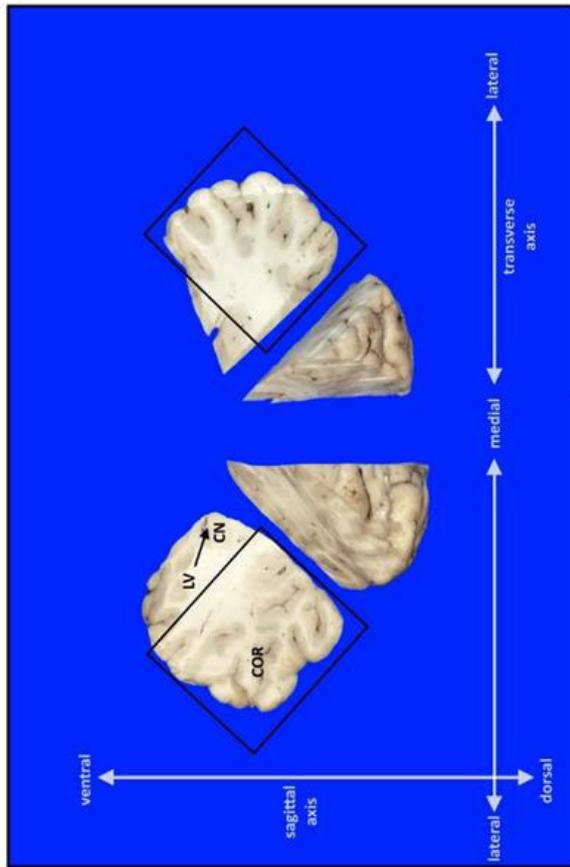
as above

Tilted line through
frontal lobe parallel to
and at 5-6 mm interslice
distance dorsal to
7-TIL_{TL/R}

as above

Maintain placement
as stated above

8-TIL_L
and
8-TIL_R

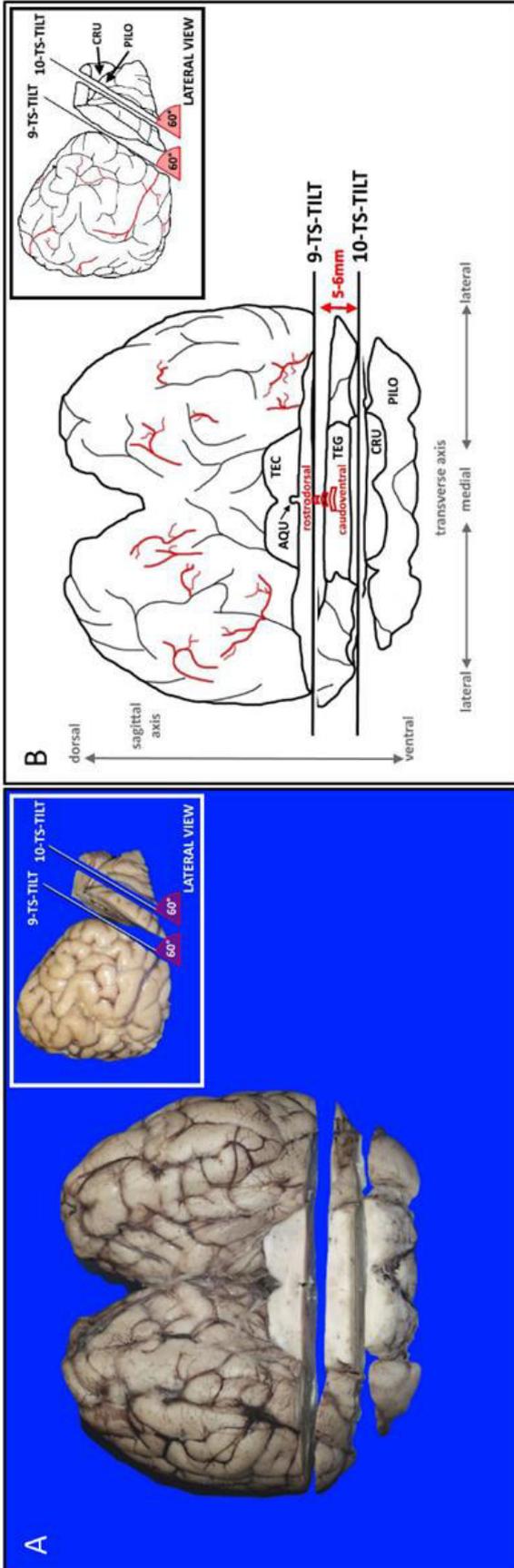


Supplementary Figure 12.1. Top view. 5th obtained slab of both hemispheres out of Block B. Axes (white) refer to brain blocks. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudate nucleus (CN), cortex (COR), lateral ventricle (LV).

Supplementary Table 6.1 Trimming of 5th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Ventrolateral cutting surface ⁷	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> rostral composite gyrus Betz cells (histological confirmation) 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

⁷ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

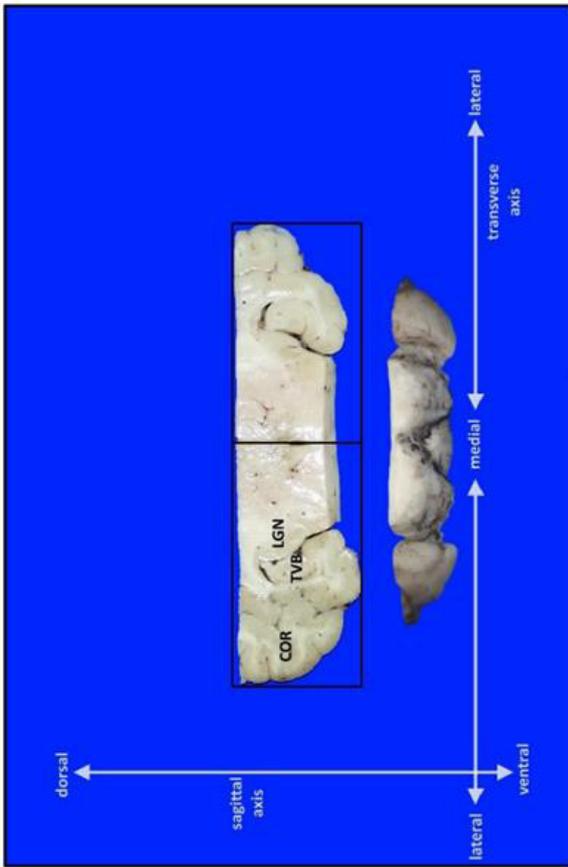


Supplementary Figure 13. Landmarks for 9-TS-TILT and 10-TS-TILT: mesencephalic aqueduct (AQU), cerebral crus (CRU), piriform lobe (PILO), midbrain tectum (TEC), midbrain tegmentum (TEG). Transverse-tilted section (TS-TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 7 Instructions for obtainment of 6th slab out of Block C (Supplementary Figure 13)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
9-TS-TILT	Place the block with its rostral cutting surface on the worktop The dorsal aspect of the block is facing away from the investigator	Caudo-rostral view	Transverse-tilted line through piriform lobe and midbrain tectum/tegmentum Cutting guide directly ventral of/ resp. through mesencephalic aqueduct	2D knife axis: laterolateral Plane: tilted to PILO surface Inclination: tilted (TILT) (60°) to worktop → please note inlet for elucidation of approach Blade movement: caudoventral to rostradorsal	<ul style="list-style-type: none"> brain stem nuclei lateral geniculate nucleus temporoventral body of the hippocampus cortex (temporal) 	Requires some practice

10-TS-TILT	Maintain placement as stated above	as above	<p>Transverse-tilted line through piriform lobe and midbrain tegmentum/ cerebral crus</p> <p>Parallel to and at 5-6mm interslice distance ventral to 9-TS-TILT</p>	as above	as above	Requires some practice
-------------------	------------------------------------	----------	--	----------	----------	------------------------

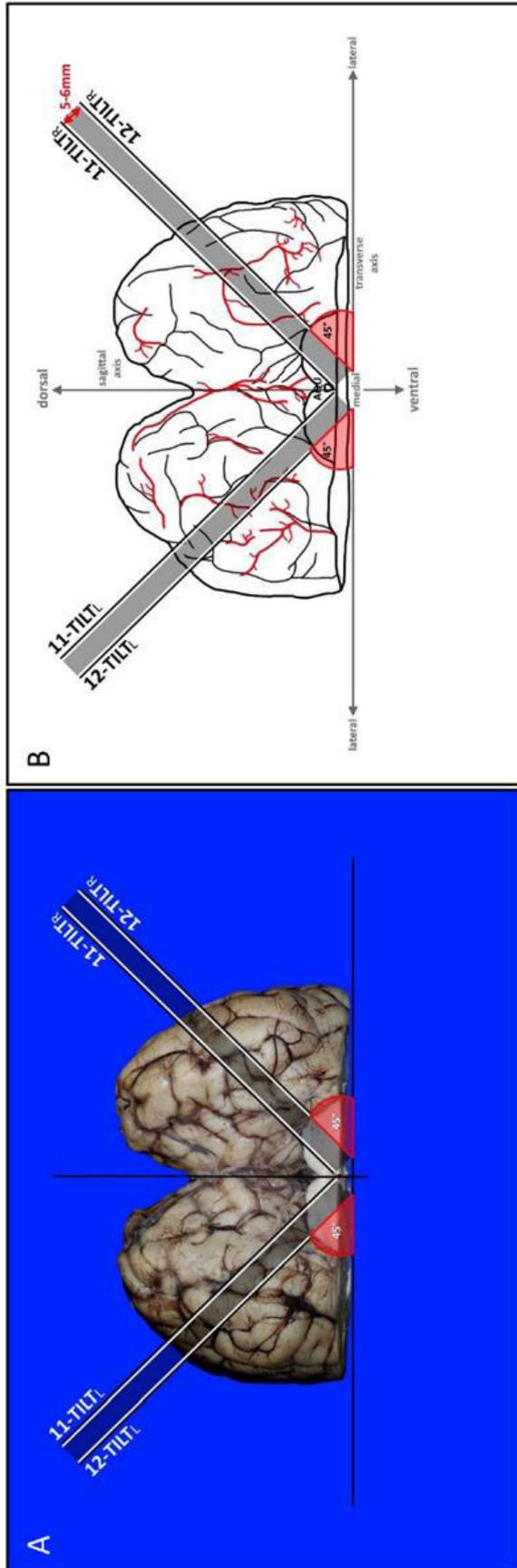


Supplementary Figure 13.1. Top view. 6th obtained slab out of Block C. Axes (white) refer to brain block. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: cortex (COR), lateral geniculate nucleus (LGN), temporoventral body (TVB) of hippocampus.

Supplementary Table 7.1 Trimming of 6th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Ventral cutting surface ⁸	Top view	Vertical line at midline to adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> cortex (temporal) temporoventral body of the hippocampus lateral geniculate nucleus midbrain nuclei 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

⁸ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

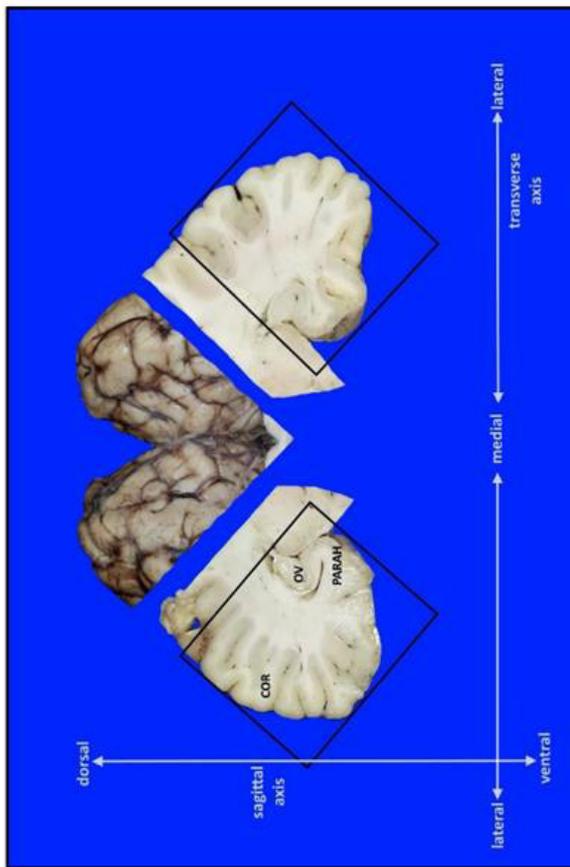


Supplementary Figure 14. Landmarks for 11-TILT_{L/R} and 12-TILT_{L/R}. Mesencephalic aqueduct (AQU). Tilted section (TILT). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 8 Instructions for obtaiment of 7th slab out of Block C (Supplementary Figure 14)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
11-TILT _L and 11-TILT _R	Maintain placement as stated above	as above	Tilted line through occipital lobe and mesencephalic stump decussating the mesencephalic aqueduct	<p><i>2D knife axis:</i> medioventral to laterodorsal</p> <p><i>Plane:</i> tilted (TILT) (45°)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> caudorostral</p>	<ul style="list-style-type: none"> • brain stem nuclei • optic radiations • main visual cortex • occipital vertex of the hippocampus and associated parahippocampal gyrus 	Requires some practice

12-TILT_L and 12-TILT_R	Maintain placement as stated above	as above	Tilted line through occipital lobe and mesencephalic stump at 5-6 mm interslice distance ventrolateral to 11-TILT _{L/R}	as above	as above	Requires some practice
---	------------------------------------	----------	--	----------	----------	------------------------

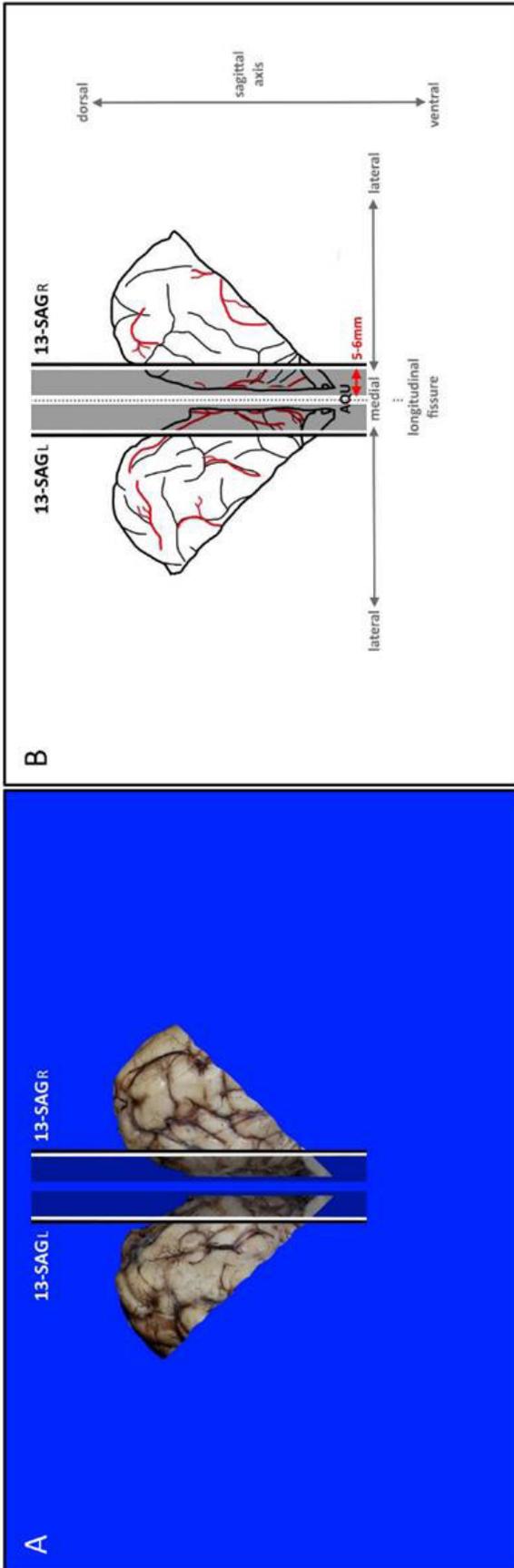


Supplementary Figure 14.1. Top view. 7th obtained slab of both hemispheres out of Block C. Axes (white) refer to brain block. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: cortex (COR), occipital vertex (OV) of hippocampus, parahippocampal gyrus (PARAH).

Supplementary Table 8.1 Trimming of 7th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Ventrolateral cutting surface ⁹	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • optic radiations • main visual cortex • occipital vertex of the hippocampus • occipital apex of parahippocampal gyrus 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

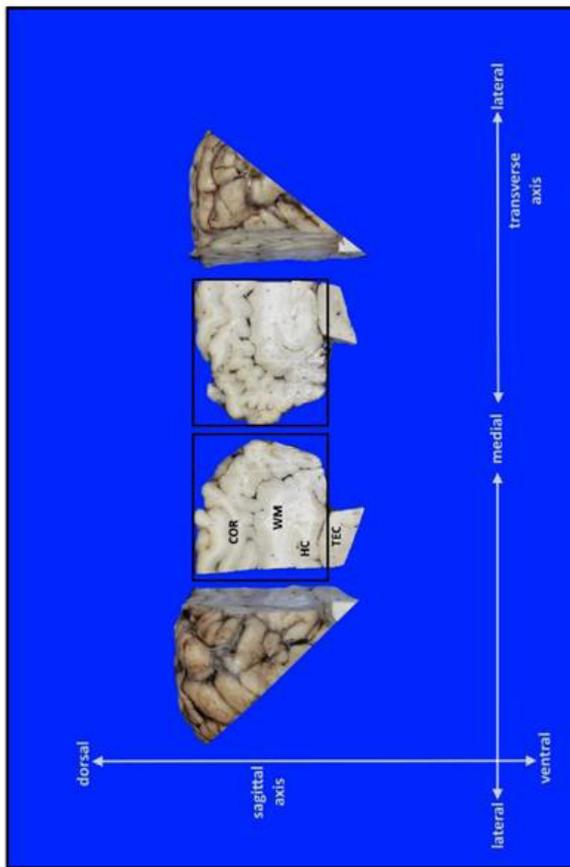
⁹ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 15. Landmarks for 13-SAG_{L/R}: mesencephalic aqueduct (AQU). Sagittal section (SAG). Blood vessels (red), pertinent landmark (yellow), requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 9 Instructions for obtainment of 8th slab out of Block C (Supplementary Figure 15)

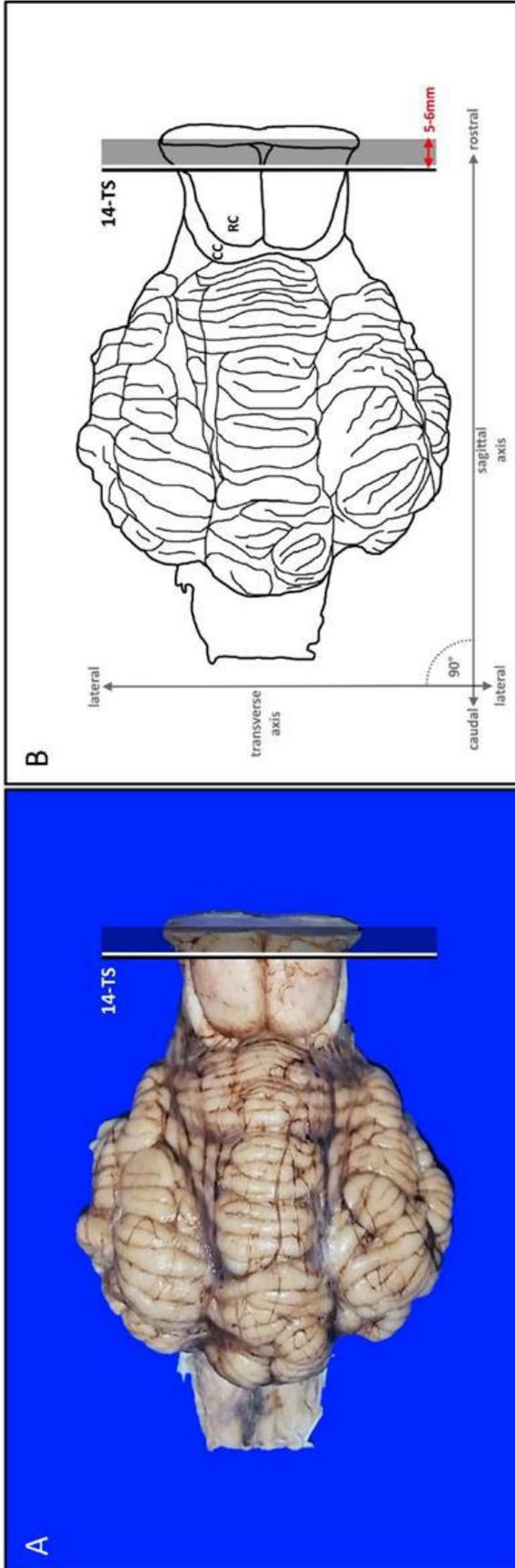
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
13-SAG _L and 13-SAG _R	Maintain placement as stated above Separation of hemispheres at longitudinal fissure	as above	Sagittal line through occipital lobe and midbrain tectum 5-6mm lateral to midline after separation of hemispheres at longitudinal fissure	<i>2D knife axis:</i> ventrodorsal <i>Plane:</i> sagittal (SAG) <i>Inclination:</i> orthogonal to worktop <i>Blade movement:</i> caudorostral	<ul style="list-style-type: none"> subcortical white matter of gyrus marginalis/cingula (postcruciate part) hippocampal alveus longitudinal view of splenial sulcus 	Easy



Supplementary Figure 15.1. Top view. 8th obtained slab of both hemispheres out of Block C. Axes (white) refer to brain blocks. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: occipital cortex (COR), alveus of hippocampus (HC), midbrain tectum (TEC), white matter (WM).

Supplementary Table 9.1 Trimming of 8th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial surface	Top view	Adjust to maximum slab size if necessary	<ul style="list-style-type: none"> subcortical white matter of gyrus marginalis/cingula (postcruciate part) hippocampal alveus paramedial occipital cortex (splenial sulcus) 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

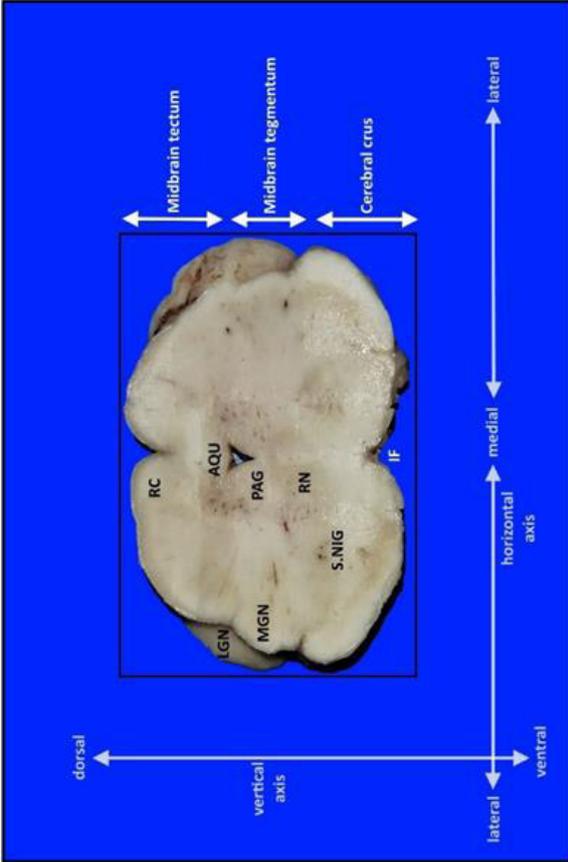


Supplementary Figure 16. Landmarks for 14-TS: caudal colliculi (CC), rostral colliculi (RC), transverse section (TS). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 10 Instruction for obtainment of 9th slab out of Block D (Supplementary Figure 16)

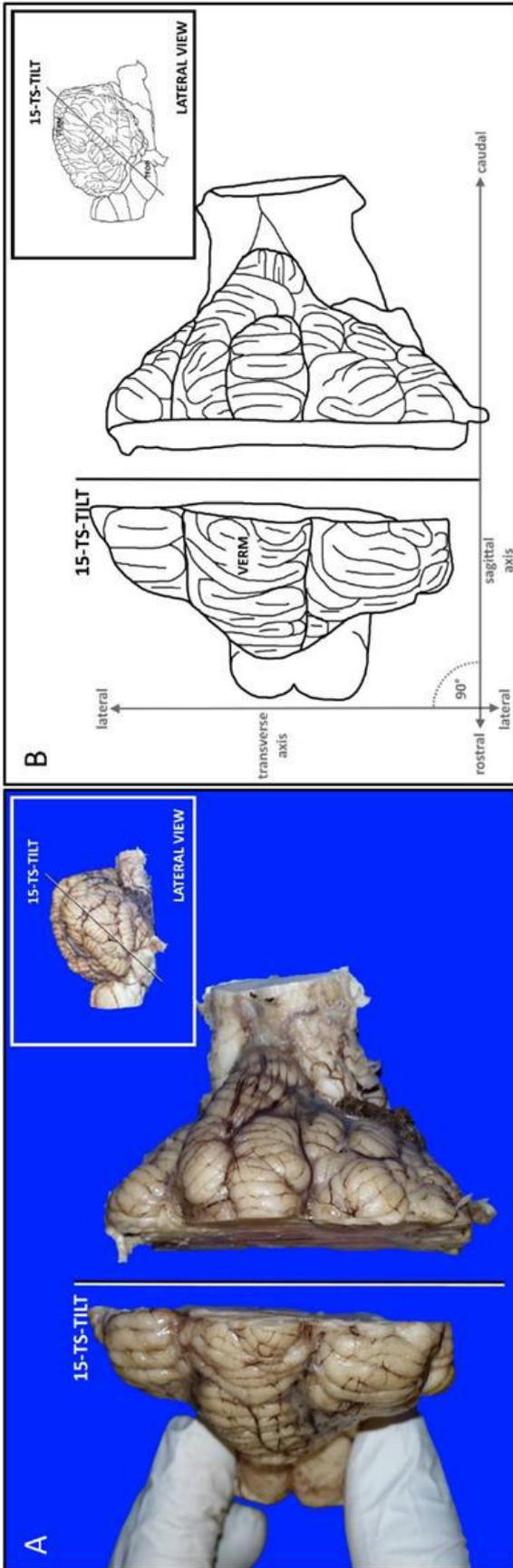
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
14-TS	Place the block with its ventral surface on the worktop	Dorsal view of the midbrain	Transverse line through rostral colliculi resp. 5-6mm caudal to 1-TS ¹⁰	2D <i>knife axis</i> : laterolateral <i>Plane</i> : transverse (TS) <i>Inclination</i> : orthogonal to worktop <i>Blade movement</i> : dorsoventral	<ul style="list-style-type: none"> • geniculate nuclei • midbrain tectum • midbrain tegmentum • aqueduct • cerebral crus 	Easy

¹⁰ 1-TS = 1st cut (pre-step)



Supplementary Figure 16.1. Top view, 9th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). The slab is placed on its rostral cutting surface¹¹. Pertinent landmarks for sampling: mesencephalic aqueduct (AQU), intercrural fossa (IF); lateral geniculate nucleus (LGN), medial geniculate nucleus (MGN), periaqueductal gray matter (PAG), rostral colliculi (RC), red nucleus (RN), substantia nigra (S.NIG).

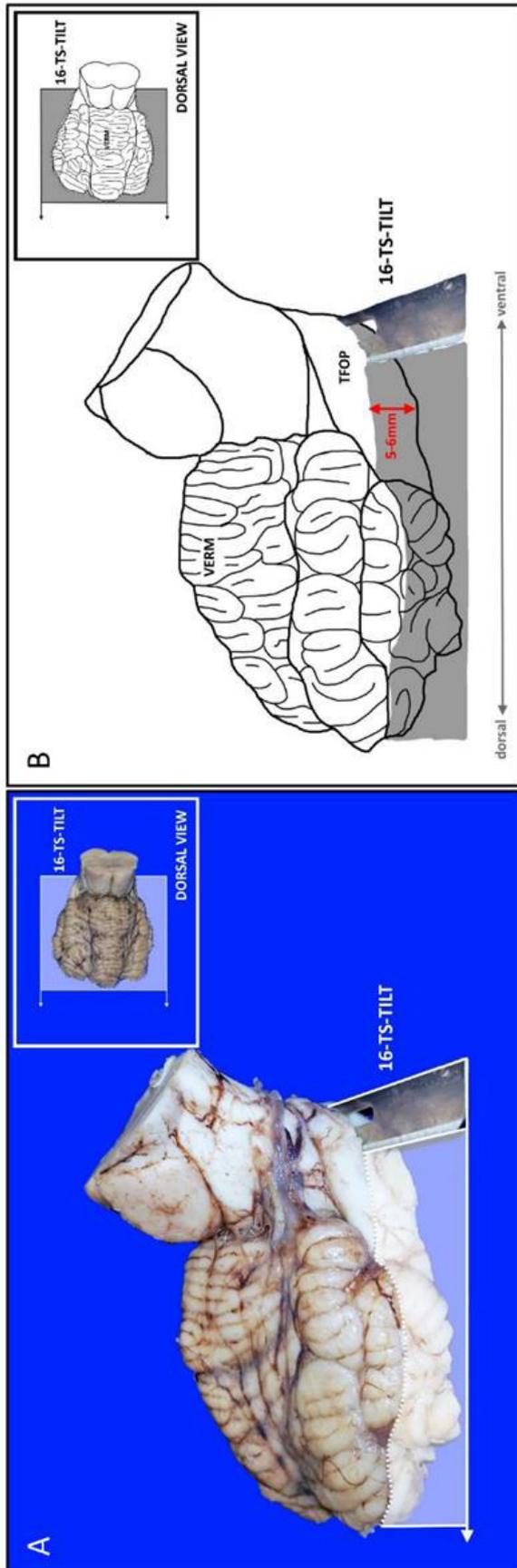
¹¹ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 17. Landmarks for 15-TS-TILT: transverse fibres of pons (TFOP), vermis (VERM). Transverse-tilted section (TS-TILT). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 11 Instruction for obtainment of 10th slab out of Block D (Supplementary Figure 17)

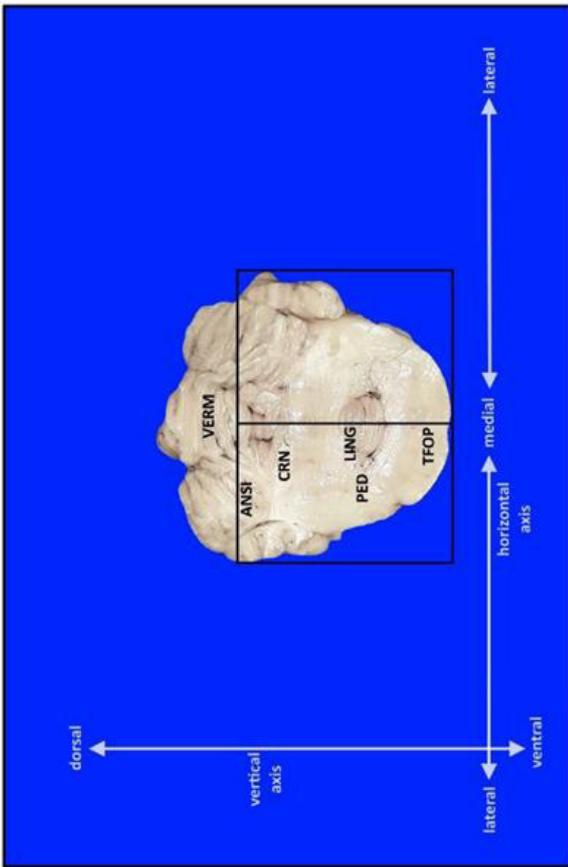
Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
15-TS-TILT	Place the block with its ventral surface on the worktop	Dorsal view of the cerebellum	Transverse tilted line at widest lateral extension of the cerebellum through cerebellum and pons (TFOP)	<p><i>2D knife axis:</i> laterolateral</p> <p><i>Plane:</i> transverse (TS), tilted (TILT)</p> <p><i>Inclination:</i> Inclination required to meet the pons (TFOP) → please note inlet for elucidation of approach</p> <p><i>Blade movement:</i> dorsocaudal to ventrorostral</p>	<ul style="list-style-type: none"> • cerebellar cortex, nuclei and peduncles • reticular formation • 4th ventricle • transverse fibres of pons 	Requires some practice



Supplementary Figure 18. Landmarks for 16-TS-TILT: transverse fibres of pons (TFOP), vermis (VERM). Transverse-tilted section (TS-TILT). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 12 Instruction for obtainment of 10th slab out of Block D (Supplementary Figure 18)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
16-TS-TILT	Place the rostral cerebellar block with its caudal cutting surface on the worktop	Lateral view of the rostral cerebellar block	Horizontal line 5-6mm rostral and parallel to 15-TS-TILT	2D knife axis: lateral laterolateral Plane: transverse (TS), tilted (TILT) Inclination: parallel to worktop → please note inlet for elucidation of approach Blade movement: ventrorostral to dorsocaudal	as 15-TS-TILT	Requires some practice

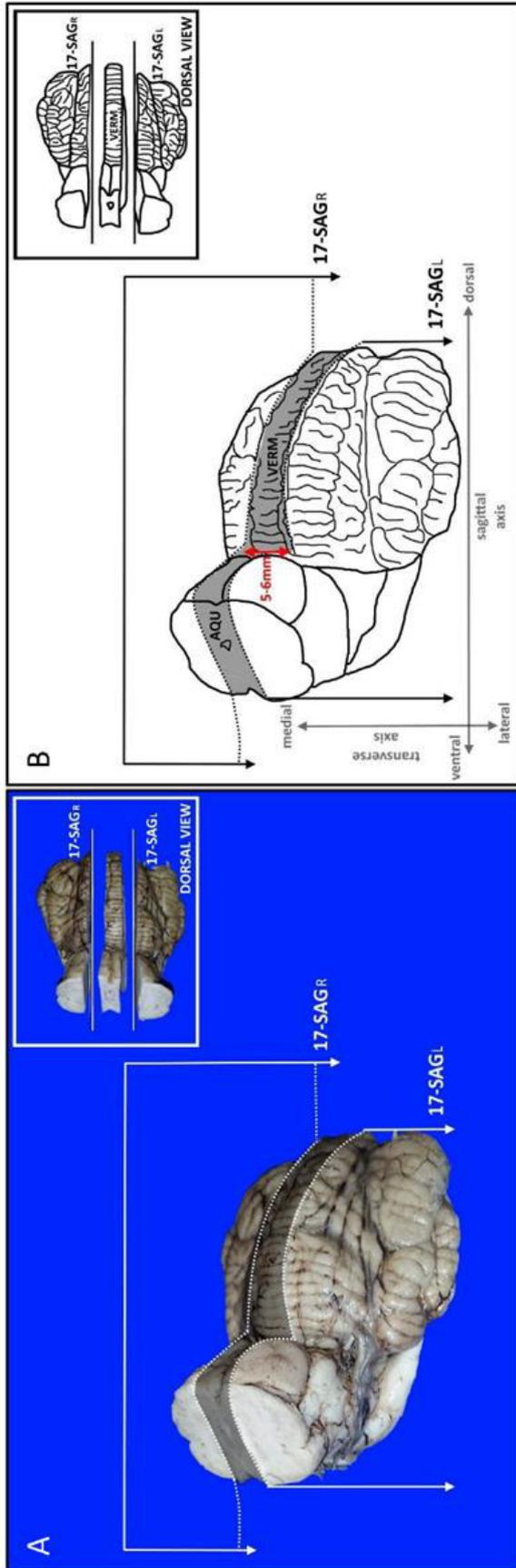


Supplementary Figure 18.1. Top view. 10th obtained slab out of block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: ansiform lobule (ANSI), cerebellar roof nuclei (CRN), lingula (LING), cerebellar peduncles (PED), transverse fibres of pons (TFOP), vermis (VERM).

Supplementary Table 12.1 Trimming of 10th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Rostral cutting surface ¹²	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • cerebellar roof nuclei • cerebellar peduncles • transverse fibres of pons • lingula 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

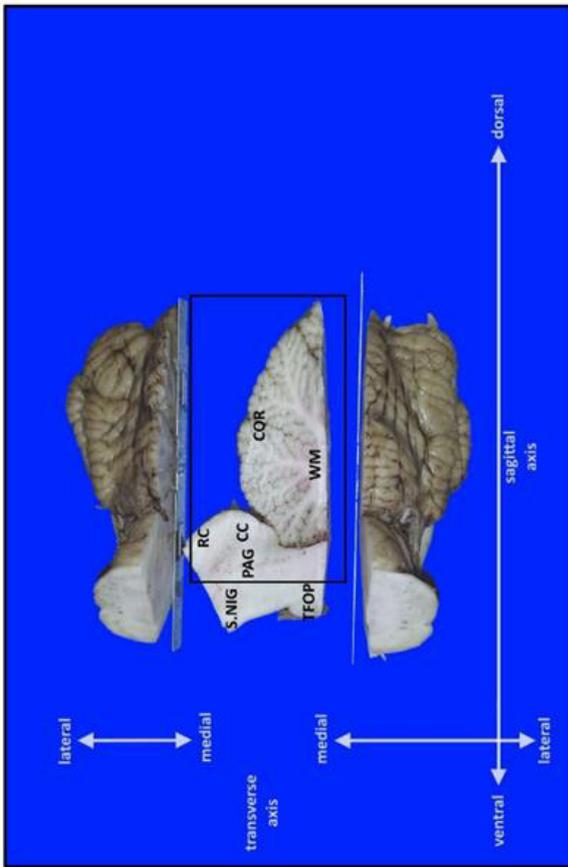
¹² use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 19. Landmarks for 17-SAG_{LR}: mesencephalic aqueduct (AQU), vermis (VERM), Sagittal section (SAG). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 13 Instruction for obtainment of 11th slab out of Block D (Supplementary Figure 19)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
17-SAG _L and 17-SAG _R	Place the rostral cerebellar block with its caudal cutting surface on the worktop	Dorsal view of the rostral cerebellar block	Sagittal line approx. 3mm lateral to midline	<p><i>2D knife axis:</i> dorsoventral</p> <p><i>Plane:</i> sagittal (SAG)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> rostrocaudal</p>	<ul style="list-style-type: none"> sagittal paravermis sagittal midbrain 	Easy

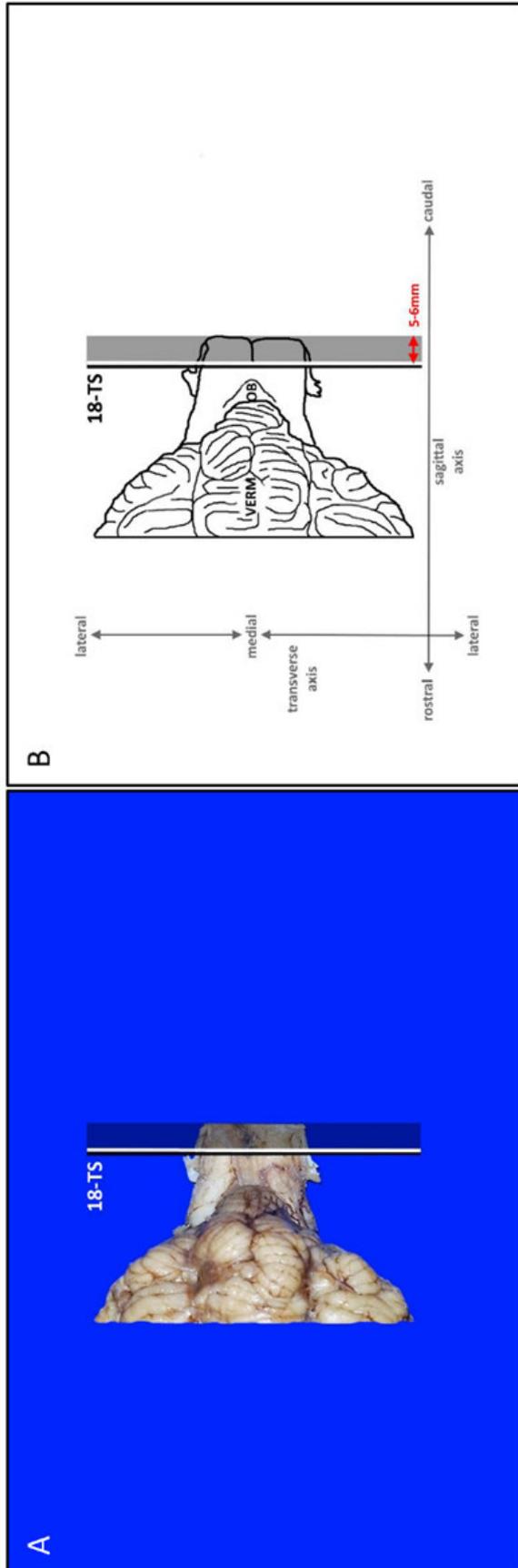


Supplementary Figure 19.1. Top view. 11th obtained slab out of Block D. Axes (white) refer to brain blocks. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: caudal colliculi (CC), cerebellar cortex (COR), periaqueductal gray matter (PAG), rostral colliculi (RC), substantia nigra (S.NIG), transverse fibres of pons (TFOP), white matter (WM).

Supplementary Table 13.1 Trimming of 11th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial or lateral cutting surface ¹³	Top view	Adjust to maximum slab size	sagittal paravermis	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

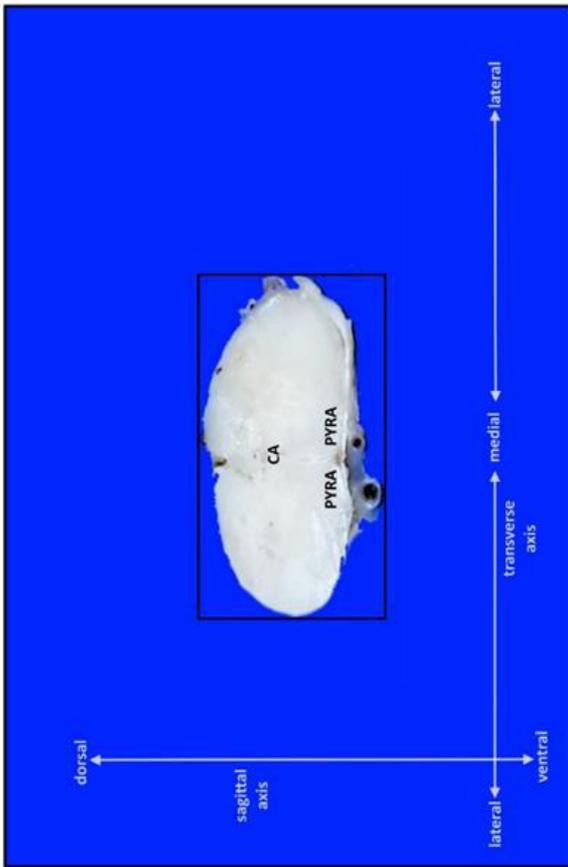
¹³ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 20. Landmarks for 18-TS: obex (OB: obex), vermis (VERM). Transverse section (TS). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

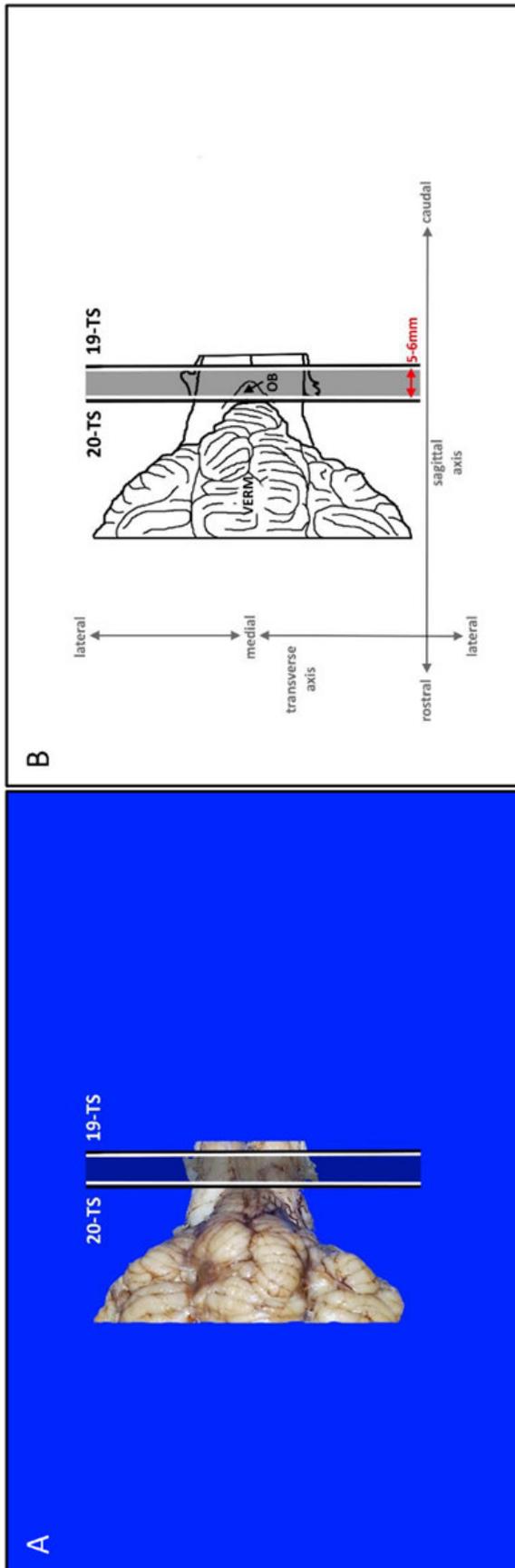
Supplementary Table 14 Instruction for obtainment of 12th slab out of Block D (Supplementary Figure 20)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
18-TS	Place the caudal cerebellar block with its ventral surface on the worktop	Dorsal view of the medulla oblongata	Transverse line through medulla oblongata caudal to the obex	<p>2D <i>knife axis</i>: laterolateral</p> <p><i>Plane</i>: transverse (TS)</p> <p><i>Inclination</i>: orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement</i>: dorsoventral</p>	<ul style="list-style-type: none"> Medulla oblongata 	Easy



Supplementary Figure 20.1: Top view. The slab is placed on its rostral cutting surface¹⁴. 12th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: central canal (CA), pyramids (PYRA).

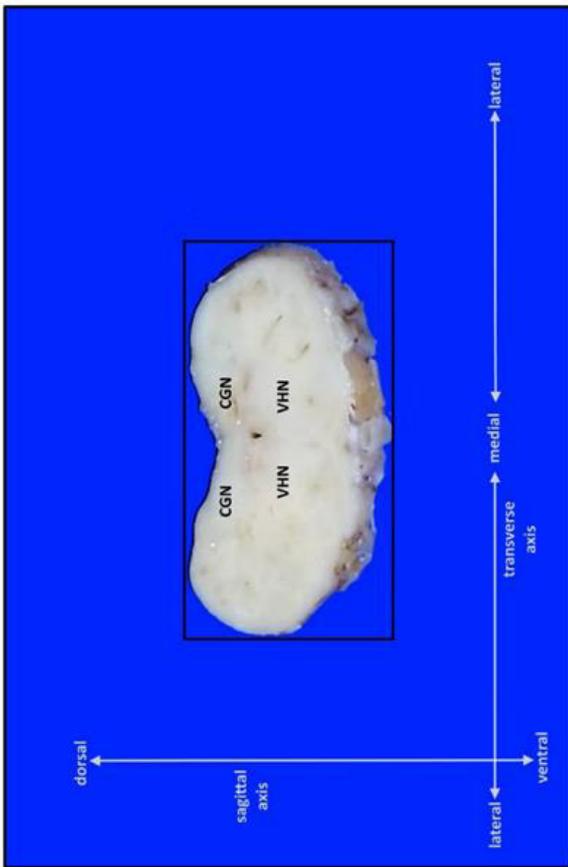
¹⁴ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 21. Landmarks for 19-TS and 20-TS: obex (OB), vermis (VERM). Transverse section (TS). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

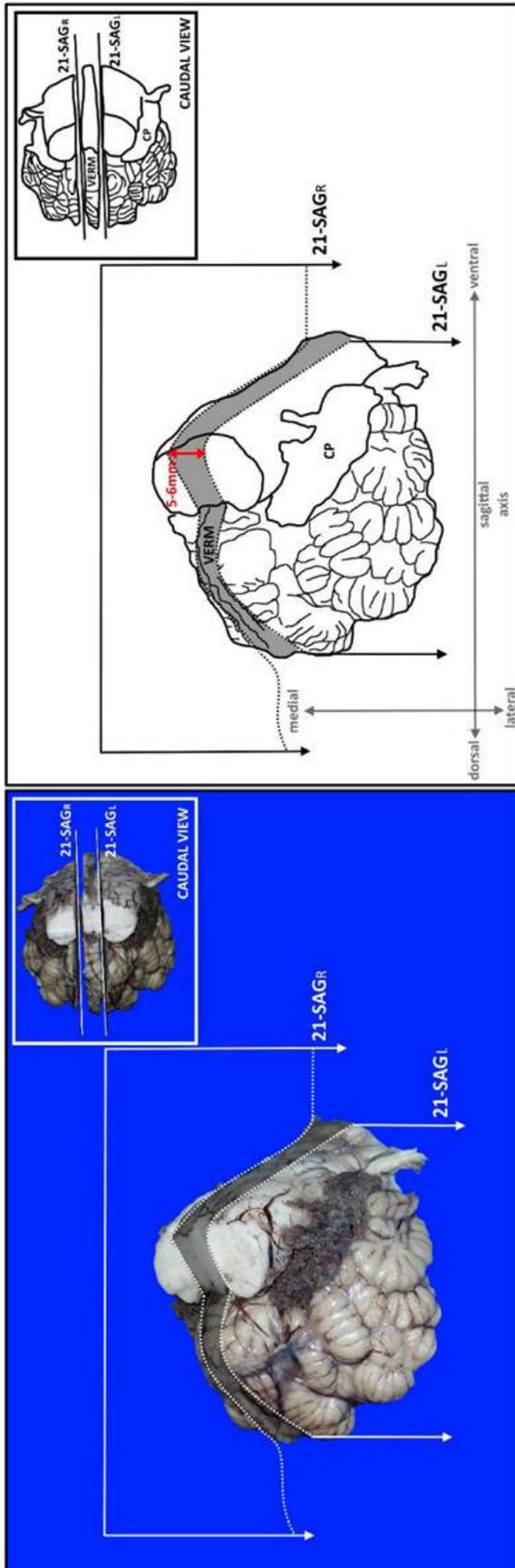
Supplementary Table 15 Instruction for obtainment of 13th slab out of Block D (Supplementary Figure 21)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
19-TS	Maintain placement as stated above	Dorsal view of the hindbrain	Transverse line near the obex	2D knife axis: laterolateral Plane: transverse (TS) Inclination: orthogonal to worktop Blade movement: dorsoventral	<ul style="list-style-type: none"> • area postrema • spinal tracts • decussation of sensory fibres • vagal and associated nuclei • proprioceptive nuclei 	Easy
20-TS	Maintain placement as stated above	as above	Transverse line 5-6 mm rostral and parallel to 19-TS	as above	as above	Easy



Supplementary Figure 21.1. Top view. The slab is placed on its rostral cutting surface¹⁵. 13th obtained slab out of Block D. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: cuneate and gracile nuclei (CGN), vagal and hypoglossal nuclei (VHN).

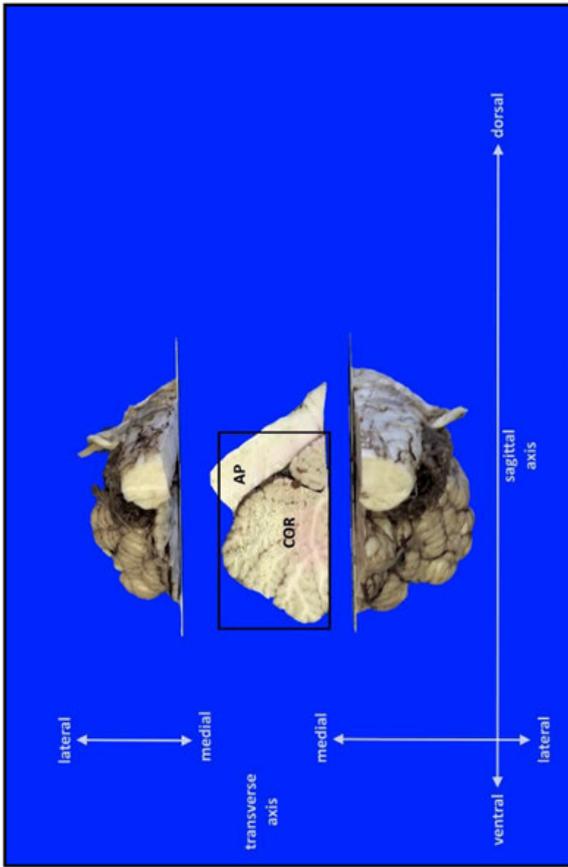
¹⁵ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion



Supplementary Figure 22. Landmarks for 21-SAG_{L/R}: central canal (CA), choroid plexus (CP), vermis (VERM). Sagittal section (SAG). Requested slab (graying). (A) Fixed brain. (B) Schematic illustration.

Supplementary Table 16 Instruction for obtainment of 14th slab out of Block D (Supplementary Figure 22)

Step	Positioning and Preparation	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Orientation of sections	Exposed structures	Difficulty
21-SAG _L and 21-SAG _R	Place the caudal cerebellar block with its rostral cutting surface on the worktop	Caudal view of caudal cerebellar block	Sagittal line approx. 3mm lateral to midline	<p><i>2D knife axis:</i> ventrodorsal</p> <p><i>Plane:</i> sagittal (SAG)</p> <p><i>Inclination:</i> orthogonal to worktop</p> <p><i>Blade movement:</i> caudorostral</p>	<ul style="list-style-type: none"> sagittal mid-uvula brainstem nuclei medial wall of area postrema 	Easy



Supplementary Figure 22.1. Top view. 14th obtained slab out of Block D. Axes (white) refer to brain blocks. Proposed area for histoprocessing (black frame). Pertinent landmarks for sampling: area postrema (AP), cortex (COR).

Supplementary Table 16.1 Trimming of 14th slab according to sampling recommendations

Placement of the slab	View / specimen	Landmarks and cutting levels	Target structures	Slab size	Difficulty
Place the slab on its medial or lateral cutting surface ¹⁶	Top view	Adjust to maximum slab size	<ul style="list-style-type: none"> • sagittal mid-uvula • brainstem nuclei • medial wall of area postrema 	maximum 4cm x 5.5cm (herein)	Easy

¹⁶ use the side/surface better exposing the target structures resp. the lesion

Abbreviations**I. Planes/ Orientation**

SAG: sagittal plane/section
TILT: lateral-tilted plane/section
TS: transverse plane/section
TS-TILT: transverse-tilted plane/section

II. Landmarks

III VENT: 3rd ventricle
AN: amygdaloid nucleus
ANSI: ansiform lobule
AP: area postrema
AQU: mesencephalic aqueduct
CA: central canal
CC: caudal colliculi
CER: cerebellum
CGN: cuneate and gracile nuclei
CING: cingulate gyrus
CN: caudate nucleus
COCA: corpus callosum
COR: cortex
CP: choroid plexus
CRN: cerebellar roof nuclei
CRU: cerebral crus
FORN: fornix
GP: globus pallidus
HC: hippocampus
HICO: hippocampal commissure
IC: internal capsule
INSC: insular cortex
LING: lingula
LGN: lateral geniculate nucleus
LOF: longitudinal fissure
LV: lateral ventricle
MAM: mammillary bodies
MGN: medial geniculate nucleus
MOB: medulla oblongata
OB: obex
OC: optic chiasm
ON: oculomotor nerve
OLF: olfactory tubercle
OT: optic tract
OV: occipital vertex of hippocampus
PAG: periaqueductal gray matter
PARAH: parahippocampal gyrus
PED: cerebellar peduncles
PILO: piriform lobe
PIT: pituitary stalk/ infundibular recess
PUT: putamen
PVZ: periventricular zone of the hypothalamus
PYRA: pyramids (decussation)
RC: rostral colliculi
RN: red nucleus
S.NIG: substantia nigra
SN: septal nuclei
SO: stria olfactoria
TEC: midbrain tectum
TEG: midbrain tegmentum
TFOP: transverse fibres of pons
THAL: thalamus
TVB: temporoventral body of the hippocampus
VAN: ventral anterior nucleus
VERM: vermis
VHN: vagal and hypoglossal nuclei
WM: white matter

3. Originaldaten/-tabellen

Die nachstehenden Originaldaten/-tabellen sind auch online als PDF verfügbar und herunterladbar unter: <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.614929> bzw.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2020.614929/full#supplementary-material>

- Data_Sheet_1_A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain–Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts.pdf
- Data_Sheet_2_A Systematic Approach to Dissection of the Equine Brain–Evaluation of a Species-Adapted Protocol for Beginners and Experts.pdf

Supplementary Table 1. Applied equipment for storage, measurement of brain weight, brain volume and time, as well as histoprocessing and final examination.		
Application area	Denotation	Model/Manufacturer
Dead body weight (DBW) measurement	Scale	Panther BBA330-CC150, Mettler-Toledo GmbH, Albstadt, Germany
Brain storage	Containers with lid	EO 0351, Wolf Plastics Verpackungen GmbH, Kammern i. Liesingtal, Austria
Brain weight measurement	Scale	10.000 g x 1 g, Aevobas
Brain volume measurement	Measuring cup	3000 ml, 40814, Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Germany
Dissection	Customary cutting board	not specified
	Long knife (300 mm blade)	not specified
	Microtome blade	FEAT207500006_U, Feather Safety Razor Co. Ltd., Japan
	Scalpel handle	503, C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Germany
	Scalpel blade	320, C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Germany
	Microscope slide labeled with maximum slab size (herein 4 x 5.5 cm)	Large (03-0024, R. Langenbrinck GmbH, Emmerdingen, Germany)
Time measurement	Digital timer	38.2022, TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Wertheim, Germany
Photo and video documentation	Camera	Samsung Galaxy S5 Duos G900FD
Graphical editing	Image processing software	paint.net Windows Movie Maker
Postfixation	Metal tissue cassettes	Leica Biosystems, Nussloch, Germany
Tissue processing	Automatic tissue processor	14042280100 RevJ, Leica Biosystems, Nussloch, Germany
Paraffin embedding	Paraplast PLUS	39502004, Leica Biosystems, Nussloch, Germany
Cutting of FFPE	Rotary microtome	HM 315, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
Stretching of cut tissue	Tissue float bath	1052, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Germany

Mounting	Microscope slides	Small (11250, Engelbrecht GmbH, Edermünde, Germany) Medium (03-0226, R. Langenbrinck GmbH, Emmerdingen, Germany) Large (03-0024, R. Langenbrinck GmbH, Emmerdingen, Germany)
Coating of medium and large slides	Silanization	In-house production with A3648, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany
Embedding of stained tissue slides	Coverslips	e.g., K12440 (depending on matching size of microscope slides), Engelbrecht GmbH, Edermünde, Germany
Embedding of stained tissue slides	Histofluid mounting medium	19350, Engelbrecht GmbH, Edermünde, Germany
Microscopic examination	Zeiss Axioplan microscope	Carl Zeiss Microscopy, NY, United States

Supplementary Table 2. Formulations of deployed solutions for tissue fixation.

Solution	Formulation	Manufacturer
1 l phosphate-buffered formalin	6.5 g Di-sodium hydrogen phosphate	131679.1211, PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany
	4.0 g Sodium dihydrogen phosphate monohydrate	131965.1211, PanReac AppliChem, Darmstadt, Germany
	100 ml Formaldehyde 37%	FO-10000-37-1, SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn, Germany
	900 ml H ₂ O dest	in-house production
1 l zinc formalin	3 g Zinc sulfate	8883, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
	8 g Sodium chloride	131659.1211, PanReac AppliChem
	100 ml Formaldehyde 37%	FO-10000-37-1, SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn, Germany
	900 ml H ₂ O dest	in-house production

Supplementary Table 3. Age, sex, breed and evidence of autolysis (AL) of each subject included in the study in chronological order [Age (d: days, w: weeks, m: months, y: years, -: premature/aborted); Sex (Fe: female entire, Mi: male intact (stallion), Mn: male neutered (gelding)); Breed (AH: arabian horse, DH: draft horse, OE: other equid, PO: pony, TB: thoroughbred, WB: warmblood); AL (0: fresh, 1: no macroscopic evidence of autolysis, 2: mild autolysis, 3: moderate autolysis)]

Subject	Age	Sex	Breed	AL
1	11y	Mi	Oldenburg horse (WB)	2
2	4y	Mn	Noriker horse (DH)	1
3	8w	Mi	Warmblood (WB)	1
4	4w	Fe	Icelandic horse (WB)	2
5	6y	Fe	Przewalski's horse (OE)	1
6	19y	Mn	Pony (PO)	1
7	25y	Mn	Hanoverian horse (WB)	1
8	23y	Fe	Haflinger (PO)	2
9	12y	Mn	Dutch warmblood (WB)	0
10	11y	Mi	Friesian (WB)	2
11	5y	Mn	Shire Horse (DH)	0
12	12y	Mn	Warmblood (WB)	0
13	17y	Mn	Shetland pony (PO)	2
14	13y	Mn	Holsteiner horse (WB)	1
15	8y	Mn	German sport horse (WB)	2
16	9y	Fe	Warmblood (WB)	0
17	17y	Mn	Pony (PO)	2
18	4d	Mi	Warmblood (WB)	0
19	20y	Mn	Bavarian warmblood (WB)	0
20	Adult	Mn	Warmblood (WB)	0
21	3y	Mn	Warmblood (WB)	2
22	12.5y	Mn	Thoroughbred (TB)	0
23	23y	Mn	Zebra (OE)	3
24	13y	Fe	Warmblood (WB)	1
25	20.5y	Mn	German sport horse (WB)	2
26	Adult	Mn	Friesian (WB)	1
27	1.5y	Mi	Warmblood (WB)	1
28	6.5y	Mn	Westphalian horse (WB)	2
29	5d	Fe	Mini Shetland pony (PO)	1
30	7m	Fe	Trakehner (WB)	3
31	2d	Fe	Pura Raza Española (WB)	1
32	-4d	Mi	Warmblood (WB)	1
33	3y	Mn	Bavarian warmblood (WB)	0

34	1y	Mi	Trakehner (WB)	3
35	23y	Fe	German pony (PO)	2
36	1y	Fe	Wuerttemberg Warmblood (WB)	0
37	Adult	Fe	Warmblood (WB)	1
38	16y	Mn	Shetland pony (PO)	3
39	5y	Mn	Pura Raza Española (WB)	0
40	1.3y	Fe	Arabian horse (AH)	1
41	Adult	Mn	Warmblood (WB)	0
42	15y	Mn	Haflinger (PO)	2
43	8y	Mi	Wuerttemberg Warmblood (WB)	0
44	Adult	Mi	Haflinger (PO)	1
45	11y	Fe	Warmblood (WB)	0
46	25y	Mn	Arabian horse (AH)	1
47	-8w	Fe	Warmblood (WB)	2
48	-8w	Fe	Iberian horse (WB)	2
49	-4w	Mi	Thoroughbred (TB)	1
50	10y	Fe	Warmblood (WB)	1
51	7y	Mn	Warmblood (WB)	1
52	-4w	Mi	Trakehner (WB)	2
53	1.5d	Mi	Hanoverian horse (WB)	1
54	Adult	Fe	Warmblood (WB)	0
55	Adult	Mn	Thoroughbred (TB)	0

Supplementary Table 4. Demographics of 22 subjects: dead body weight (DBW) in kilograms (kg), brain weight (BW) post fixation in grams (g) and brain volume post fixation in cubic centimeter (cm³)

Subject	DBW (kg)	BW (g)	BV (cm ³)
4	49.6	362	405
5	350	589	660
9	500	670	750
10	450	666	745
13	135	353	395
20	700	674	755
29	10.8	312	350
31	65	272	305
32	48	352	395
33	600	669	750
35	200	660	740
37	350	665	745
40	200	361	405
41	550	576	645
42	350	540	605
43	500	621	695
44	600	664	745

47	18.5	353	395
48	25	357	400
49	28	362	405
51	600	710	795
52	30.7	223	250

Supplementary Table 5. Total procedure times (TPT) in minutes throughout trials (T1 to T5) and groups (I to III). SD: standard deviation; IQR: interquartile range

Rater	Group	TPT (T1)	TPT (T2)	TPT (T3)	TPT (T4)	TPT (T5)	Mean±SD	Median (IQR)
1	I	55	40	28	24	18	33±14.7	28(21 to 47.5)
2	I	52	45	36	28	21	36.4±12.5	36(24.5 to 48.5)
3	I	55	37	37	21	19	33.8±14.6	37(20 to 46)
4	I	54	50	66	40	35	49±12.2	50(37.5 to 60)
5	II	40	38	41	25	18	32.4±10.3	38(21.5 to 40.5)
6	II	55	42	35	30	25	40.4±9.4	40(32.5 to 48.5)
7	II	40	32	28	21	18	27.8±8.8	28(19.5 to 36)
8	II	38	35	30	20	15	27.6±9.8	30(17.5 to 36.5)
9	II	32	28	30	17	15	24.4±7.8	28(16 to 31)
10	III	35	30	25	15	14	23.8±9.2	25(14.5 to 32.5)
11	III	40	35	25	20	18	27.6±9.6	25(19 to 37.5)

Supplementary Table 6. Scores throughout trials (T1 to T5) and groups (I to III). SD: standard deviation; IQR: interquartile range; CV: coefficient of variation

Rater	Group	Score (T1)	Score (T2)	Score (T3)	Score (T4)	Score (T5)	Mean ±SD	Median (IQR)	CV
1	I	60	69	61	71.5	72	66.7±5.8	69(60.5 to 71.7)	8.7%
2	I	65	70.5	68	62	64.5	66±3.3	65(63.3 to 69.3)	5.0%
3	I	64	68	64	63.5	68.5	65.5±2.4	64(63.8 to 68.3)	4.6%
4	I	65.5	71	63	65.5	68.5	66.7±3.1	65.5(64.3 to 69.8)	3.7%
5	II	64	65	64.5	71	69	66.7±3.1	65(64.3 to 70)	5.9%
6	II	65.5	69.5	60.5	63.5	69.5	65.7±3.9	65.5(62 to 69.5)	4.7%
7	II	68	64.5	66.5	66	69	66.8±1.7	66.5(65.3 to 68.5)	3.0%
8	II	64	68	68.5	68	69	67.5±2	68(66 to 68.8)	2.6%
9	II	72	70.5	67.5	70	69.5	69.9±1.6	70(68.5 to 71.3)	2.3%
10	III	71.5	71.5	66.5	69.5	63.5	68.5±3.5	69.5(65 to 71.5)	5.1%
11	III	72	72	72	72	72	72±0	72(72 to 72)	0.0%

Supplementary Table 7. Details regarding aptitude of slabs for neuroanatomical studies by reference to 36 criteria (see Table 1) across all groups. Strikes of anatomical landmarks were scored as either full match (1), partly featured (0.5) or not evident at all (0), and slabs were graded as excellent (> 80% of landmarks fully featured on the slide), sufficient (70-80% of landmarks fully featured on the slide) or insufficient (< 70% of landmarks fully featured on the slide) for neuroanatomical studies

Slab		Aptitude for neuroanatomical studies			Total
		excellent	sufficient	insufficient	
1	Total № of slabs	47	5	3	55
	%	85.5%	9.1%	5.5%	100.0%
2	Total № of slabs	42	7	6	55
	%	76.4%	12.7%	10.9%	100.0%
3	Total № of slabs	50	3	2	55
	%	90.9%	5.5%	3.6%	100.0%
4	Total № of slabs	55	0	0	55
	%	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%
5	Total № of slabs	55	0	0	55
	%	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%
6	Total № of slabs	50	1	4	55
	%	90.9%	1.8%	7.3%	100.0%
7	Total № of slabs	46	4	5	55
	%	83.6%	7.3%	9.1%	100.0%
8	Total № of slabs	44	2	9	55
	%	80.0%	3.6%	16.4%	100.0%
9	Total № of slabs	50	5	0	55
	%	90.9%	9.1%	0.0%	100.0%
10	Total № of slabs	51	4	0	55
	%	92.7%	7.3%	0.0%	100.0%
11	Total № of slabs	53	1	1	55
	%	96.4%	1.8%	1.8%	100.0%
12	Total № of slabs	44	8	3	55
	%	80.0%	14.5%	5.5%	100.0%
13	Total № of slabs	43	8	4	55
	%	78.2%	14.5%	7.3%	100.0%
14	Total № of slabs	50	5	0	55
	%	90.9%	9.1%	0.0%	100.0%
Total	Total № of slabs	680	53	37	770
	%	88.3%	6.9%	4.8%	100.0%

Supplementary Table 8. Comparison of absolute (A) and relative (R) scores and coefficient of variation (CV) between all slabs and groups. Most problematic slabs per group with a mean relative score < 90% are highlighted in dark gray

Slab	Score group I			Score group II			Score group III		
	A		R (%)	A		R (%)	A		R (%)
	Range	Mean±SD	Mean±SD	Range	Mean±SD	Mean±SD	Range	Mean±SD	Mean±SD
1	3-10	8.5±1.9	85±18.7	6-10	8.8±1.0	88.4±10.3	8.5-10	9.6±0.7	96±6.6
2	5-8	7.3±1.1	90.8±13.2	4-8	6.9±1.2	86.1±14.9	8- 8	8.0±0.0	100±0
3	7.5-10	9.7±0.9	96.5±8.6	5-10	9.3±1.5	93.2±15.2	10- 10	10.0±0.0	100±0
4	2-2	2.0±0.0	100±0	2-2	2.0±0.0	100±0	2-2	2.0±0.0	100±0
5	4-4	4.0±0.0	100±0	4-4	4.0±0.0	100±0	4-4	4.0±0.0	100±0
6	2-4	3.7±0.6	93.2±15.4	2-4	3.9±0.4	98±10	0-4	3.5±1.6	86.3±31.4
7	1-4	3.6±0.8	88.9±19.8	1-4	3.6±0.8	89.6±18.9	4-4	4.0±0.0	100±0
8	4-6	5.3±0.8	88.4±18.8	4-6	5.4±0.8	90.3±12.6	3-6	5.7±0.9	94.2±15.7
9	3-4	3.8±0.4	95.7±9.3	3-4	3.9±0.3	98±6.9	4-4	4.0±0.0	100±0
10	6-8	7.6±0.8	95±9.7	6-8	7.8±0.5	97.6±6.2	7-8	7.9±0.3	98.8±3.8
11	2-2	2.0±0.0	100±0	1.5-2	2.0±0.1	99±5	1-2	1.9±0.3	95±15.8
12	0-2	1.8±0.5	87.5±23.6	0-2	1.9±0.4	93±22.3	1.5-2	2.0±0.2	97.5±7.9
13	0-4	3.3±1.3	81.3±32.3	3-4	3.8±0.4	96±9.4	3-4	3.9±0.3	97.5±7.9
14	3-4	3.9±0.4	96.3±9.2	3-4	4.0±0.2	99±5	3-4	3.9±0.3	97.5±7.9

Supplementary Table 9. Details regarding symmetry of slabs across all groups. Strikes of symmetry were scored as either good (1), moderate (0.5) or not present (0).

Slab		Symmetry			Total
		Good	Moderate	Not present	
1	Total № of slabs	39	16	0	55
	%	70.9%	29.1%	0.0%	100.0%
2	Total № of slabs	37	18	0	55
	%	67.3%	32.7%	0.0%	100.0%
3	Total № of slabs	49	6	0	55
	%	89.1%	10.9%	0.0%	100.0%
4	Total № of slabs	45	10	0	55
	%	81.8%	18.2%	0.0%	100.0%
5	Total № of slabs	43	12	0	55
	%	78.2%	21.8%	0.0%	100.0%
6	Total № of slabs	46	8	1	55
	%	83.6%	14.5%	1.8%	100.0%
7	Total № of slabs	33	22	0	55
	%	60.0%	40.0%	0.0%	100.0%
8	Total № of slabs	39	16	0	55
	%	70.9%	29.1%	0.0%	100.0%
9	Total № of slabs	48	7	0	55
	%	87.3%	12.7%	0.0%	100.0%
10	Total № of slabs	49	6	0	55
	%	89.1%	10.9%	0.0%	100.0%
11	Total № of slabs	17	5	0	22
	%	77.3	22.7%	0.0%	100.0%
12	Total № of slabs	47	6	2	55
	%	85,5%	10,9%	3,6%	100,0%
13	Total № of slabs	43	10	2	55
	%	78,2%	18,2%	3,6%	100,0%
14	Total № of slabs	17	5	0	22
	%	77,3%	22,7%	0.0%	100,0%
Total	Total № of slabs	552	147	5	704
	%	78.4%	20.9%	0.7%	100.0%

Supplementary Table 10. Symmetry comparison of absolute (A) and relative (R) numbers of slabs throughout groups I to III. Slab 11 and 14 could only be assessed for symmetry in hemispheric approaches. Most problematic slabs per group with an amount of < 70% of slabs with good symmetry are highlighted in dark gray

Slab	Symmetry group I						Symmetry group II						Symmetry group III					
	Good		Moderate		Not present		Good		Moderate		Not present		Good		Moderate		Not present	
	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)
1	14	70	6	30	0	0	17	68	8	32	0	0	8	80	2	20	0	0
2	14	70	6	30	0	0	15	60	10	40	0	0	8	80	2	20	0	0
3	18	90	2	10	0	0	21	84	4	16	0	0	10	100	0	0	0	0
4	13	65	7	35	0	0	24	96	1	4	0	0	8	80	2	20	0	0
5	16	80	4	20	0	0	20	80	5	20	0	0	7	70	3	30	0	0
6	14	70	6	30	0	0	25	100	0	0	0	0	7	70	2	20	1	10
7	13	65	7	35	0	0	15	60	10	40	0	0	5	50	5	50	0	0
8	12	60	8	40	0	0	19	76	6	24	0	0	8	80	2	20	0	0
9	17	85	3	15	0	0	21	84	4	16	0	0	10	100	0	0	0	0
10	17	85	3	15	0	0	22	88	3	12	0	0	10	100	0	0	0	0
11	6	75	2	25	0	0	8	80	2	20	0	0	3	75	1	25	0	0
12	14	70	5	25	1	5	23	92	1	4	1	4	10	100	0	0	0	0
13	15	75	3	15	2	10	20	80	5	20	0	0	8	80	2	20	0	0
14	7	87.5	1	12.5	0	0	7	70	3	30	0	0	3	75	1	25	0	0

Supplementary Table 11. Details regarding angulation error of slabs from prescribed cutting angle across all groups. Strikes of deviation were scored as either correct angle (1), mild deviation (0.5) or severe deviation (0), and slabs were graded as excellent ($\geq 80\%$ of slabs with correct angle) sufficient (70-80% of slabs with correct angle) or insufficient ($< 70\%$ of slabs with correct angle)

Slab		Angulation error			Total
		Correct angle	Mild deviation	Severe deviation	
1	Total № of slabs	42	5	8	55
	%	76.4%	9.1%	14.5%	100.0%
2	Total № of slabs	33	0	22	55
	%	60.0%	0.0%	40.0%	100.0%
3	Total № of slabs	47	0	8	55
	%	85.5%	0.0%	14.5%	100.0%
4	Total № of slabs	48	7	0	55
	%	87.3%	12.7%	0.0%	100.0%
5	Total № of slabs	55	0	0	55
	%	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%
6	Total № of slabs	46	2	7	55
	%	83.6%	3.6%	12.7%	100.0%
7	Total № of slabs	43	6	6	55
	%	78.2%	10.9%	10.9%	100.0%
8	Total № of slabs	31	14	10	55
	%	56.4%	25.5%	18.2%	100.0%
9	Total № of slabs	46	8	1	55
	%	83.6%	14.5%	1.8%	100.0%
10	Total № of slabs	46	5	4	55
	%	83.6%	9.1%	7.3%	100.0%
11	Total № of slabs	48	6	1	55
	%	87.3%	10.9%	1.8%	100.0%
12	Total № of slabs	49	4	2	55
	%	89.1%	7.3%	3.6%	100.0%
13	Total № of slabs	51	4	0	55
	%	92.7%	7.3%	0.0%	100.0%
14	Total № of slabs	48	5	2	55
	%	87.3%	9.1%	3.6%	100.0%
Total	Total № of slabs	633	66	71	770
	%	82.2%	8.6%	9.2%	100.0%

Supplementary Table 12. Grading of absolute (A) and relative (R) numbers of slabs concerning angulation errors throughout groups and approaches. Most problematic slabs per group with an amount of < 70% of slabs with correct angle are highlighted in dark gray

Slab	Angulation error group I						Angulation error group II						Angulation error group III					
	Correct angle		Mild deviation		Severe deviation		Correct angle		Mild deviation		Severe deviation		Correct angle		Mild deviation		Severe deviation	
	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)
1	15	75	1	5	4	20	18	72	4	16	3	12	9	90	0	0	1	10
2	14	70	0	0	6	30	13	52	0	0	12	48	6	60	0	0	4	40
3	18	90	0	0	2	10	20	80	0	0	5	20	9	90	0	0	1	10
4	14	70	0	0	6	30	25	100	0	0	0	0	9	90	1	10	0	0
5	20	100	0	0	0	0	25	100	0	0	0	0	10	100	0	0	0	0
6	14	70	2	10	4	20	25	100	0	0	0	0	7	70	0	0	3	30
7	12	60	4	20	4	20	21	84	2	8	2	8	10	100	0	0	0	0
8	10	50	5	25	5	25	13	52	8	32	4	16	8	80	1	10	1	10
9	16	80	4	20	0	0	21	84	3	12	1	4	9	90	1	10	0	0
10	16	80	1	5	3	15	21	84	3	12	1	4	9	90	1	10	0	0
11	18	90	2	10	0	0	20	80	4	16	1	4	10	100	0	0	0	0
12	15	75	4	20	1	5	24	96	0	0	1	4	10	100	0	0	0	0
13	18	90	2	10	0	0	23	92	0	0	2	8	10	100	0	0	0	0
14	18	90	2	10	0	0	22	88	1	4	2	8	8	80	2	20	0	0

Supplementar Table 13. Correlation between grade of damage and identifiability of landmarks in absolute (A) and relative (R) numbers of slabs throughout groups and approaches. Grades of damage (1: no macroscopic alterations; 2: negligible alterations; 3: moderate alterations; 4: severe alterations)

Grade of damage	Identifiability group I						Identifiability group II						Identifiability group III	
	Easy		Fair		Moderate		Easy		Fair		Moderate		Easy	
	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)	A	R (%)
1	104	70.3	80	71.4	3	15	191	82	75	72.8	6	42.9	113	80.7
2	23	15.5	9	8.0	0	0	6	2.6	6	5.8	0	0	12	8.6
3	18	12.2	5	4.5	0	0	21	9	14	13.6	2	14.3	6	4.3
4	3	2.0	18	16.1	17	85	15	6.4	8	7.8	6	42.9	9	6.4

X. DANKSAGUNG

Nach vielen Jahren der intensiven Arbeit kann ich nun mit Stolz meine Dissertation zum Abschluss bringen.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater und Mentor Prof. Dr. Kaspar Matiasek, der mir diese Doktorarbeit durch Überlassung des Themas überhaupt erst ermöglicht hat und mir in Bezug auf meine wissenschaftliche Arbeit höchstes Vertrauen entgegenbrachte. Durch seine verständnisvolle Art und Geduld, durfte ich mich auf zwischenmenschlicher und professioneller Ebene stets in einem ausgesprochen freundschaftlichen und motivierenden Arbeitsklima auf Augenhöhe bewegen und mich bei Anliegen, Fragen und Problemen immer auf ein offenes Ohr verlassen.

Danke für die lehrreiche Zeit, den unablässigen Support und die wunderbare Zusammenarbeit. Wenngleich es mich in die österreichische Heimat zurückgezogen hat, freue ich mich, wenn wir auch in Zukunft in Kontakt bleiben und im Zuge des Pathologie-Wiesn´-Tisches in post-pandemischen Zeiten vielleicht auch wieder die eine oder andere Maß genießen können ;)

Bei PD Dr. Sven Reese möchte ich mich für die hervorragende Betreuung in statistischen Belangen bedanken. Vielen Dank für jeglichen Input und alle kurzfristigen Rückmeldungen, die wesentlich zur Qualität der Statistik beigetragen haben.

Von Herzen bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Marco Rosati. Egal mit welchem Anliegen ich auf dich zugekommen bin, bist du mir stets mit einem Lächeln auf den Lippen begegnet und hast mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Danke Marco, deine Inspiration und Motivation waren mir eine wahrliche Hilfe!

Ein Herzliches Dankeschön möchte ich auch an alle restlichen Mitarbeiter/-innen der Tierpathologie der LMU München richten und mich für jede helfende Hand bedanken, die mich beim Sammeln und Verarbeiten meines Studienmaterials unterstützt hat. Danke an alle namentlich nicht genannten Personen, die mir ihre diagnostischen Fälle für die Studienzwecke zur Verfügung gestellt haben, mir in labortechnischen Fragen behilflich waren und einen wertvollen Beitrag zur Archivierung des zugeschnittenen Materials leisteten.

Danke auch an jede/n Einzelne/n, die/der sich Zeit für das Studium des Schnittschemas genommen und zur finalen Version beigetragen hat. Ich danke euch für eure konstruktive Kritik, euren Input und euren Enthusiasmus bei der Hirnsektion!

Auch bei meinen Mitdoktorandinnen, insbesondere Clara und Ninja, möchte ich mich für die ausgesprochen schöne Zeit bedanken, in der wir uns immer eine gegenseitige Stütze waren, die eine oder andere Tasse Kaffee in Kopf-rauchenden Momenten miteinander teilten und uns auch abseits des Instituts ans Herz gewachsen sind. An die gemeinsame Zeit mit euch werde ich mich immer gerne zurückerinnern.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen ehemaligen und bestehenden Arbeitgebern einen großen Dank aussprechen. Danke für die Flexibilität, ohne welche die Fertigstellung der Arbeit unter Umständen noch längere Zeit in Anspruch genommen hätte.

Meinen sicherlich größten Dank möchte ich an meine Familie und Freunde richten, die mich durch all die Jahre der Doktorarbeit begleitet, immer an mich geglaubt und mir zu jedem Zeitpunkt den Rücken gestärkt haben.

Von ganzem Herzen möchte ich dabei meinen geliebten Eltern danken. Erst durch eure Unterstützung konnte ich mir meinen Kindheitstraum Tierärztin zu werden erfüllen und stehe heute da, wo ich jetzt bin. Meiner Ahna, meinen Geschwistern Gernot, Quido und Ursula, sowie meiner gesamten restlichen Familie danke ich für die immer wiederkehrende Zusprache, die regelmäßige Versorgung mit Herzensnahrung und die gelegentliche Ablenkung, wenn mir mal wieder die Decke auf den Kopf gefallen ist. Jaboo, Danke für die zahlreichen Schnurr-/Schnarch-Attacken und Moon-Walks über meine Laptop-Tastatur ;)

Last but not least möchte ich mich auch bei meinen lieben Herzensmenschen, insbesondere Verena, Christina, Gabi, Silke und Simon bedanken. Danke, dass ihr immer für mich da seid, mich durch alle Hochs und Tiefs meiner Doktorarbeit begleitet habt und mir so eine riesige emotionale Stütze seid.

Eure Liebe und Freundschaft möchte ich in meinem Leben nicht mehr missen!