

Aus der Anatomischen Anstalt
Lehrstuhl Anatomie II – Neuroanatomie
Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Christoph Schmitz

***Design-based stereologische post mortem Studien zur
Bestimmung von kortikalem Volumen, Neuronenzahl
und Neuronendichte im Gehirn von Patienten mit
Schizophrenie und gesunden Kontrollpersonen***

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

vorgelegt von

Richard Gaus

aus

Akmola

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Schmitz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jochen Herms
Prof. Dr. Thomas Knösel
Prof. Dr. Arthur Liesz

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung:	5
Abstract (English):	5
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	10
1.1 Auswirkungen der Schizophrenie auf Individuum und Gesellschaft	10
1.2 Behandlung zwischen Fortschritt und Stagnation	10
1.3 Die Entschlüsselung der Krankheitsmechanismen bleibt eine offene Herausforderung	12
1.4 Die Rolle der Neuropathologie	13
1.5 Die vorliegende Arbeit im größeren Kontext: Der anteriore cinguläre Cortex und Von Economo-Neurone bei Schizophrenie	14
2. Zielsetzung	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Untersuchtes Kollektiv	17
3.2 Untersuchungsmethoden	20
3.2.1 Herstellung der histologischen Präparate	20
3.2.2 Stereologische Untersuchung	24
3.3 Statistische Methoden	29
3.3.1 Statistisches Modell	29
3.3.2 Überprüfung der ANCOVA-Grundannahmen	30
3.3.3 Variablenkodierung	30
3.3.4 Berechnung der adjustierten Effektstärken	30
3.3.5 Berechnung der nicht-adjustierten Effektstärken	31
4. Ergebnisse	32
5. Diskussion	35
5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse	35
5.2 Diskussion der Ergebnisse	35
5.2.1 Kein statistisch signifikanter Unterschied im mittleren Volumen der KGS zwischen den Patienten mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen	35
5.2.2 Statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronenzahl bei den Patienten mit Schizophrenie als bei den Kontrollpersonen	36
5.2.3 Statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronendichte bei den Patienten mit Schizophrenie als bei den Kontrollpersonen	39
5.2.4 Einfluss der Störvariablen	40
5.3 Diskussion der Methoden	41
5.3.1 Auswahl der Studienteilnehmer	41

5.3.2	Präparation.....	44
5.3.3	Schätzung von Volumen und Neuronenzahl	45
5.3.4	Statistische Methoden.....	47
5.4	Die vorliegende Arbeit im größeren Kontext: Der anteriore cinguläre Cortex und Von Economo-Neurone bei Schizophrenie.....	51
5.5	Ausblick: Neuropathologie der Schizophrenie	53
6.	Publikation	55
	Literaturverzeichnis	56
	Anhang A	76
	Danksagung	79
	Affidavit	80
	Lebenslauf	81
	Publikationsliste.....	82

Zusammenfassung:

Natur und Bedeutung der neuropathologischen Veränderungen bei Schizophrenie sind wenig verstanden. Bildgebungsstudien legen ein bei Erkrankten im Vergleich zu Gesunden niedrigeres mittleres kortikales Volumen nahe, während *post mortem* Untersuchungen Hinweise auf eine unveränderte mittlere kortikale Neuronenzahl bei zugleich höherer mittlerer kortikaler Neuronendichte fanden. Zusammen führten diese Ergebnisse zur Reduced-Neuropil-Hypothese, nach der es bei der Schizophrenie nicht zu einer Verringerung der Neuronenzahl, sondern lediglich zu einem Verlust des interneuronalen Neuropils mit einer folglich dichteren Packung kortikaler Neurone kommt. Diese Daten stammen allerdings aus Untersuchungen an abgegrenzten kortikalen Bereichen und sind nicht durch Untersuchungen des gesamten Kortex mit Berücksichtigung neuropathologischer Störvariablen wie dem *post mortem* Intervall und der Fixationszeit gestützt. In der vorliegenden Arbeit wird ein Hinweis darauf präsentiert, dass die Schizophrenie entgegen bisheriger Annahmen mit einer niedrigeren mittleren kortikalen Neuronenzahl und -dichte einhergeht. Mittels einer design-based stereologischen Untersuchung der gesamten kortikalen grauen Substanz (KGS) von *post mortem* Gehirnen von 11 Patienten mit Schizophrenie und 10 gesunden Kontrollpersonen wurde in der Gruppe der Patienten eine statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronenzahl ($-14,9\%$; adjustierte Effektstärke $d_{\text{adj}} = -0,94$; $P = 0,007$) sowie eine statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronendichte ($-9,6\%$; $d_{\text{adj}} = -0,57$; $P = 0,041$) in der KGS festgestellt. Zudem wurde ein statistisch hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der Neuronenzahl in der KGS und dem *post mortem* Intervall ($P < 0,001$) festgestellt, was auf einen Störeinfluss durch diesen Parameter mit Notwendigkeit einer statistischen Berücksichtigung hinwies. Zusammenfassend fordern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Reduced-Neuropil-Hypothese heraus und stützen das Modell von Schizophrenie als komplexer Störung der Gehirnentwicklung, indem sie auf einen Verlust kortikaler Neurone möglicherweise im Rahmen eines überaktiven Pruning hindeuten.

Abstract (English):

Nature and significance of neuropathological changes in schizophrenia are poorly understood. Imaging studies have suggested a lower mean cortical volume in patients with schizophrenia compared to healthy controls, while post mortem studies found evidence of unchanged mean cortical neuron number but increased mean cortical neuron density. Together, these results led to the reduced neuropil hypothesis of schizophrenia, according to which there is no reduction in the number of neurons in schizophrenia, but only a loss of interneuronal neuropil with a consequently denser packing of cortical neurons. However, these data come from studies of individual cortical areas and are not supported by studies of the whole cortex with adjustment by neuropathological confounders such as the post mortem interval and the fixation time. In this study, evidence is presented that, contrary to previous belief, schizophrenia is associated with lower mean cortical neuron number and density. Using a design-based stereologic examination of the total cortical grey matter (CGM) of post mortem brains of 11 patients with schizophrenia and 10 healthy controls, a statistically significantly lower mean neuron number (-14.9% ; adjusted Cohen's $d_{\text{adj}} = -0.94$; $P = 0.007$) as well as a statistically significantly lower mean neuron density (-9.6% ; $d_{\text{adj}} = -0.57$; $P = 0.041$) was found in the CGM of the patients with schizophrenia. In addition, a statistically significant correlation between the neuron number in the CGM and the post mortem interval ($P < 0.001$) was found, indicating a confounding relationship with a need for statistical adjustment. Collectively, the results of this study challenge the reduced neuropil hypothesis of

schizophrenia and support the model of schizophrenia as a complex neurodevelopmental disorder by suggesting a loss of cortical neurons possibly in the context of overactive pruning.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Repräsentative Koronarschnitte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *post mortem* Gehirnhemisphären. Dargestellt ist die Hemisphäre einer Kontrollperson (A, C) und eines Patienten mit Schizophrenie (B, D). Beispielhaft bezeichnen die Klammern in den Übersichtsaufnahmen (A, B) das Brodmann-Areal 24, von dem jeweils ein Teil in den Nahaufnahmen (C, D) gezeigt ist. Die Schichten sind in römischen Ziffern angegeben. Maßstabsbalken = 10 mm in A und B, 370 μm in C und D. Diese Abbildung wurde der Publikation (Gaus et al., 2022) entnommen.23
- Abbildung 2:** Zählverfahren mit unbiased virtual counting spaces (UVCS) im Brodmann-Areal 24 der kortikalen grauen Substanz (KGS). Die Felder zeigen beispielhaft verschiedene Fokusebenen (0 bis -60 μm) eines UVCS mit den Dimensionen Breite und Länge 42 μm sowie Höhe 50 μm . Gezählt wurden Neurone, deren Nukleolus innerhalb eines UVCS in den Fokus kam und nicht die Ausschlusslinie (rot) oder aber die Einschlusslinie (grün) des UVCS berührte. Die Felder D und E zeigen Neurone, deren Nukleolus im Fokus ist (Pfeile) und die alle Zählkriterien erfüllen. Die gelben Rahmen zeigen an, dass die Fokusebene entweder oberhalb (A) oder unterhalb (H) des UVCS lag. Die Zahlen in B bis H geben den Abstand vom oberen Rand des Schnittes an. Maßstabsbalken = 25 μm in A-H. Diese Abbildung wurde der Publikation (Gaus et al., 2022) entnommen.....27
- Abbildung 3:** Repräsentative Mikrofotografien verschiedener Schichten in der kortikalen grauen Substanz (hier beispielhaft im Brodmann-Areal 24). Die Bildtafeln zeigen die Schichten II (A, B), III (C, D), Va (E, F), Vb (G, H) und VI (I, J) in einer Hemisphäre von einer Kontrollperson (A, C, E, G, I) und einem Patienten mit Schizophrenie (B, D, F, H, J). Die Pfeile und Pfeilspitzen zeigen auf Neurone (speziell zeigen die Pfeile auf von-Economo-Neurone und die Pfeilspitzen auf Pyramidenzellen). Maßstabsbalken = 50 μm in A-J. Diese Abbildung wurde der Publikation (Gaus et al., 2022) entnommen.....28
- Abbildung 4:** Ergebnisse der stereologischen Analyse mit Adjustierung für Störvariablen. Die Panels zeigen Tukey-Box-Plots des Gesamtvolumens (A), der Gesamt-Neuronenzahl (B) und der Neuronendichte (C) in der kortikalen grauen Substanz nach Adjustierung für Störvariablen in der linken (offene Kästen) und rechten (graue Kästen) Hemisphäre der Patienten mit Schizophrenie (S) und der Kontrollpersonen (C), sowie die 95%-Konfidenzintervalle der adjustierten Cohens-d-Effektstärken (*d*_{adj}) für jedes Ergebnis (D). Statistisch signifikante Ergebnisse sind gekennzeichnet (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).....32
- Abbildung 5:** Ergebnisse der stereologischen Analyse ohne Adjustierung für Störvariablen. Die Panels zeigen Tukey-Box-Plots des Gesamtvolumens (A), der Gesamt-Neuronenzahl (B) und der Neuronendichte (C) in der kortikalen grauen Substanz in der linken (offene Kästen) und rechten (graue Kästen) Hemisphäre der Patienten mit Schizophrenie (S) und der Kontrollpersonen (C), sowie die 95%-Konfidenzintervalle der Cohens-d-Effektstärken (*d*) für jedes Ergebnis (D). Statistisch signifikante Ergebnisse sind gekennzeichnet (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).....33
- Abbildung 6:** Bayes'sches Netzwerk des angenommenen kausalen Modells. Endpunkte sind Volumen, Neuronenzahl und Neuronendichte in der kortikalen grauen Substanz der Hemisphären der Studienteilnehmer. Untersucht werden soll der Einfluss von Diagnose (Schizophrenie- vs. Kontrollgruppe) auf die Endpunkte. Da die Diagnose einen Einfluss auf PMI und Fix hat (Patienten mit Schizophrenie wurden in der vorliegenden Arbeit – möglicherweise aufgrund von höherer sozialer Isolation – deutlich später nach ihrem Tod aufgefunden als gesunde Kontrollpersonen, während die Gehirne gesunder Kontrollpersonen deutlich länger fixiert wurden), und diese wiederum Einfluss auf die Endpunkte nehmen, stellen PMI und Fix Mediatoren dar. Alter und Hemisphäre (links/rechts) nehmen unabhängig von der Diagnose einen Einfluss auf die Endpunkte.....48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Merkmale aller eingeschlossenen Fälle. Individuelle Werte von Alter, Alter bei Beginn der Schizophrenie-Erkrankung, Todesursache, <i>post mortem</i> Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie), Fixierzeit (Dauer der initialen Fixierung des Gehirns in 10% Formalin) und Diagnoseschlüssel nach DSM-IV sowie ICD-10. Fallnr: Fallnummer; Alter [yr]: Alter in Jahren; Beginn [yr]: Alter bei Erkrankungsbeginn in Jahren; PMI [h]: <i>post mortem</i> Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie) in Stunden; Fix [d]: Fixierzeit (Dauer der initialen Fixierung des Gehirns in 10% Formalin) in Tagen; Diagnose: Diagnoseschlüssel nach DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) und ICD-10 (World Health Organization, 2004).	19
Tabelle 2: Deskriptive Statistiken der Merkmale aller eingeschlossenen Fälle. Wertebereich, Mittelwert, Median und Standardabweichung von Alter, Alter bei Beginn der Schizophrenie-Erkrankung, <i>post mortem</i> Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie) und Fixierzeit (Dauer der initialen Fixierung des Gehirns in 10% Formalin). Alter [yr]: Alter in Jahren; Beginn [yr]: Alter bei Erkrankungsbeginn in Jahren; PMI [h]: <i>post mortem</i> Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie) in Stunden; Fix [d]: Fixierzeit (Dauer der initialen Fixierung des Gehirns in 10% Formalin) in Tagen.	20
Tabelle 3: Komponenten der verwendeten stereologischen Arbeitsstation.	25
Tabelle 4: Details der stereologischen Prozedur. Obj: Vergrößerung des benutzten Objektivs; B und H: Grundfläche und Höhe der unbiased virtual counting spaces (UVCS); D: Distanz zwischen den UVCS in senkrechten Richtungen X und Y; $\Sigma N_{\text{sections}}$: mittlere Zahl der untersuchten Schnitte pro Hemisphäre; ΣUVCS : mittlere Zahl der UVCS pro Hemisphäre; ΣQ : mittlere Zahl der gezählten Neurone pro Hemisphäre; CE_{pred} [n]: mittlerer vorhergesagter Coefficient of Error nach der Vorhersagemethode von Schmitz (Schmitz, 1998) und Schmitz und Hof (Schmitz & Hof, 2000); ΣP (Cavalieri): mittlere Zahl der gezählten Punkte innerhalb des KGS-Profiles pro Hemisphäre.	29
Tabelle 5: Ergebnisse der statistischen Analyse: <i>P</i> -Werte der ANCOVA-Variablen. <i>P</i> -Werte < 0,05 sind fettgedruckt. PMI: <i>post mortem</i> Intervall; Fix: Fixierzeit.	32
Tabelle 6: Ermittelte Ergebniswerte für jede Hemisphäre. Aufgelistet sind die ermittelten nicht-adjustierten Rohwerte für Volumen, Neuronenzahl und Neuronendichte in jeder untersuchten Hemisphäre.	34

Abkürzungsverzeichnis

ACC – anteriorer cingulärer Cortex

ANCOVA – Kovarianzanalyse (engl. analysis of covariance)

Fix – Fixationszeit

KGS – kortikale graue Substanz

MRT – Magnetresonanztomographie

PMI – *post mortem* Intervall

VEN – Von Economo-Neuron

1. Einleitung

1.1 Auswirkungen der Schizophrenie auf Individuum und Gesellschaft

Die Schizophrenie ist eine komplexe psychische Erkrankung, die sich typischerweise in einer Kombination von positiven (Wahn, Halluzinationen, Denkstörungen) und negativen (Affektverflachung, Interesselosigkeit, emotionaler Rückzug) Symptomen präsentiert (American Psychiatric Association, 1994; World Health Organization, 2004). Aufgrund ihrer Schwere und ihres lebenslangen, episodischen Verlaufs, der meist schon im jungen Erwachsenenalter beginnt (Gaebel et al., 2019), verursacht Schizophrenie nicht nur erhebliche persönliche Verwerfungen bei den Betroffenen und ihren Angehörigen, sondern führt auch zu beträchtlichen volkswirtschaftlichen Belastungen.

So wurde die Schizophrenie trotz ihrer relativ geringen weltweiten Prävalenz von 0,28% (Charlson et al., 2018) in der Global Burden of Disease Study als eine der Hauptursachen für globale Invalidität identifiziert und rangiert hier sogar noch vor Volkskrankheiten wie Schlaganfall und ischämischer Herzkrankheit (Vos et al., 2017). Die Lebenserwartung von Menschen mit Schizophrenie ist dabei im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um 10 bis 25 Jahre vermindert, was sich auf vor allem auf eine verspätete oder unzureichende Behandlung somatischer Erkrankungen, Nebenwirkungen antipsychotischer Medikation und einen ungesunden Lebensstil zurückführen lässt (Laursen et al., 2014). Es besteht zudem eine alarmierend hohe Suizidrate von 5% (Hor & Taylor, 2010), was einer 500-fachen Risikosteigerung im Vergleich zur globalen Allgemeinbevölkerung entspricht (World Health Organization, 2019). Aufgrund erheblicher Beeinträchtigungen in der Alltagsfunktion besteht eine enge Beziehung zwischen der Erkrankung an Schizophrenie und Arbeitslosigkeit, Obdachlosigkeit und Armut (Charlson et al., 2018). So leiden schätzungsweise etwa 10% aller Obdachlosen unter Schizophrenie (Ayano et al., 2019).

Der Großteil der volkswirtschaftlichen Kosten der Schizophrenie entsteht indirekt durch Produktivitätsausfälle, da lediglich 10-20% der Menschen mit Schizophrenie einer Erwerbstätigkeit nachgehen können (Marwaha & Johnson, 2004). In Deutschland belaufen sich diese Kosten auf schätzungsweise 4,4 bis 9,2 Milliarden Euro jährlich (Kissling et al., 1999). Dies entspricht 2-4% der Bundesgesundheitsausgaben im Jahr 2007 (Statistisches Bundesamt, 2008) und ist damit vergleichbar oder sogar höher als bei Volkskrankheiten wie Diabetes oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Gaebel & Wölwer, 2010). Weltweit belaufen sich die Kosten für Schizophrenie auf schätzungsweise 0,3 bis 0,6% des globalen Bruttoinlandsproduktes (Chong et al., 2016).

1.2 Behandlung zwischen Fortschritt und Stagnation

Bis zu den 1950er Jahren wurden PatientInnen mit Schizophrenie vorrangig mit Elektrokrampftherapie, unspezifischer Sedierung, Fixierung und psychodynamischer Psychotherapie behandelt (Meyer & Simpson, 1997). Obwohl diese Methoden manchmal zur Verbesserung der Positivsymptomatik beitrugen, war ihre Wirksamkeit unzuverlässig und schwere Nebenwirkungen überwogen oft die erwünschten Effekte. Erst mit dem Aufkommen der Antipsychotika kam es hier zu einem entscheidenden Durchbruch. 1951 stand mit der Entdeckung von Chlorpromazin erstmals ein orales Medikament zur Verfügung, das zuverlässig gegen die Positivsymptomatik wirkte (Meyer & Simpson, 1997). Aufgrund seiner neuartigen Effektivität wurde Chlorpromazin von

zeitgenössischen PsychiaterInnen als regelrechtes Wundermittel aufgenommen, das PatientInnen, die zuvor auf die dauerhafte Betreuung in psychiatrischen Krankenhäusern angewiesen waren, die Teilnahme an normalen Alltagsaktivitäten wie dem Besuch von Kunstmuseen, das Treffen von Verwandten zum Abendessen und das selbstständige Einkaufen in Geschäften ermöglichte (Rosenbloom, 2002). Es entstand ein großer Optimismus in der Psychiatrie, denn erstmalig erschien die rätselhafte Erkrankung der Schizophrenie einer wirksamen Behandlung zugänglich. Tatsächlich leitete in der Folge die Entdeckung von Chlorpromazin, zusammen mit dem ersten Antidepressivum Imipramin, eine psychopharmakologische Revolution ein, welche nicht nur zur ersten Welle der psychiatrischen Deinstitutionalisierung in den USA beitrug, sondern auch einen Wandel im Selbstverständnis von PsychiaterInnen bewirkte, die sich nach Jahrzehnten der Abkehr von der somatischen Medizin wieder mehr als medizinisch tätige ÄrztInnen denn als PsychoanalytikerInnen sahen (Rosenbloom, 2002).

Leider zeichneten sich in den Folgejahrzehnten jedoch Grenzen dieser Entwicklung ab. Nach der Entdeckung von Clozapin Ende der 1950er Jahre gab es keine grundlegenden Neuerungen in der medikamentösen Behandlung der Schizophrenie mehr, und auch heute noch ist Clozapin das wirksamste Antipsychotikum und die Reservebehandlung bei therapieresistenter Schizophrenie (Lally & MacCabe, 2015). Mit der Zeit wurde zudem deutlich, dass eine Therapie mit Antipsychotika zahlreiche und teils schwere Nebenwirkungen wie tardive Dyskinesie und starke Gewichtszunahme mit einem erhöhten Risiko für metabolische Folgeerkrankungen mit sich bringt. Antipsychotika haben außerdem kaum Wirkung auf die besonders belastenden Negativsymptome, deren Kontrolle entscheidend für den Erhalt der Lebensqualität und der Fähigkeit zur selbstständigen Lebensführung der Betroffenen ist (Scull, 2021). Diese Faktoren tragen zu der seit Anfang des 21. Jahrhunderts zunehmenden Ernüchterung um Psychopharmaka bei, die zu einem Rückzug der Pharmaindustrie aus der Entwicklung neuer Präparate führte (Hyman, 2013; Jacob, 2020).

Parallel zu dieser wendungsreichen Geschichte der Antipsychotika gewann die Entwicklung von psychotherapeutischen und psychosozialen Interventionen für Schizophrenie in den letzten Jahrzehnten an Fahrt (Lincoln et al., 2019). Als Ergänzung zur Pharmakotherapie bieten diese Methoden verschiedene Vorteile. So kann die kognitive Verhaltenstherapie die Positivsymptomatik durch einen verbesserten Umgang mit psychotischen Symptomen mindern (Wykes et al., 2008). Das Training sozialer Fertigkeiten kann zur Verbesserung der typischerweise einer medikamentösen Therapie nicht zugänglichen Negativsymptomatik beitragen (Turner et al., 2014). Familien-Psychoedukation stärkt den sozialen Rückhalt von PatientInnen durch Einbeziehung der Familie und des sozialen Umfelds (Pharoah et al., 2010). Diese Therapieansätze sind mittlerweile als „wesentliche Aspekte bei der mehrdimensionalen und multiprofessionellen Behandlung von Menschen mit einer Schizophrenie“ in der aktuellen S3-Leitlinie Schizophrenie aufgeführt und mit Empfehlungsgrad A (starke Empfehlung) hinterlegt (Gaebel et al., 2019). Psychosoziale Interventionen wie Psychoedukation (Xia et al., 2011) sind insbesondere deshalb wichtig, weil sie den Paradigmen des Shared Decision Making und der Person-Centered Care entsprechen, die eine Versorgung der PatientInnen mit wichtigen Informationen und Entscheidungsgrundlagen zu ihrer Erkrankung vorsehen, damit diese im eigenen Interesse Therapieentscheidungen treffen können (Keepers et al., 2020). Shared Decision Making wird von zahlreichen nationalen psychiatrischen Fachgesellschaften als zeitgemäße Behandlungsform empfohlen (Slade, 2017).

Die großen Fortschritte in der Therapie der Schizophrenie im Laufe der letzten hundert Jahre haben zu humaneren, effektiveren und ganzheitlicheren Behandlungen geführt. Gleichzeitig gibt es Hinweise, dass die Wirksamkeit der verfügbaren Therapien in den letzten Jahrzehnten ein

Plateau erreicht hat (Jaaskelainen et al., 2013). Die Schizophrenie bleibt daher weiterhin eine große Herausforderung in der psychiatrischen Behandlung.

1.3 Die Entschlüsselung der Krankheitsmechanismen bleibt eine offene Herausforderung

Das zentrale Hindernis in der Entwicklung neuer Therapien der Schizophrenie ist das nach wie vor mangelnde Verständnis der zugrundeliegenden Krankheitsmechanismen. Da die Ursachen und die Pathophysiologie der Schizophrenie nach wie vor weitgehend unverstanden sind (Insel, 2010), ist eine Entwicklung biologisch begründeter Therapien gegenwärtig nicht möglich. Das derzeit etablierte Verständnis der Erkrankung umfasst lediglich eine Anzahl vorgeschlagener pathophysiologischer Theorien sowie verschiedene identifizierte Risikofaktoren. Bei den Risikofaktoren der Schizophrenie unterscheidet man genetische und umweltbedingte Faktoren. Genetisch handelt es sich um eine polygene Erkrankung mit hoher Heritabilität. So sind zurzeit 120 Gene mit häufigen Varianten und niedriger individueller Risikosteigerung sowie 10 Gene mit seltenen Varianten und besonders hohem Risiko bekannt (Singh et al., 2022; Trubetsky et al., 2022). Die wichtigsten umweltbedingten Risikofaktoren sind schädigende Einwirkungen während der pränatalen Entwicklung, belastende Kindheitserfahrungen, Drogenkonsum und das Leben in Städten (Dean & Murray, 2005).

Pathophysiologische Theorien haben indes das Ziel, die Krankheitsmechanismen der Schizophrenie in einem wissenschaftlichen Modell abzubilden, um dadurch die bestehenden Befunde zu erklären. Die bedeutendste und älteste Theorie ist die Dopaminhypothese, die auf zwei komplementären Beobachtungen fußt: Einerseits können dopaminerge Substanzen Psychosen auslösen; andererseits wirken Antipsychotika antidopaminerg (Howes et al., 2017). Die Dopaminhypothese postuliert, dass die Positivsymptome der Schizophrenie durch eine überaktive dopaminerge Signaltransduktion verursacht werden. Die als Ergänzung der Dopaminhypothese aufgestellte Glutathathypothese nimmt wiederum zusätzlich eine Unterfunktion der glutamatergen NMDA-Rezeptoren als Ursache für die Negativsymptome der Schizophrenie an (Coyle, 2006).

Aufgrund der Existenz von pränatalen Risikofaktoren, Verhaltensauffälligkeiten in der Kindheit und fehlenden Hinweisen auf neurodegenerative Prozesse wurde zudem das Neuroentwicklungsmodell vorgeschlagen (Lewis & Levitt, 2002). Nach diesem Modell kommt es aufgrund einer gestörten Gehirnentwicklung zu neurobiologischen Fehlfunktionen wie einem gestörten Pruning. Diese sollen sich dann erst nach dem Versagen von Kompensationsmechanismen im jungen Erwachsenenalter durch eine Störung der exzitatorisch-inhibitorischen Balance im Phänotyp der Schizophrenie äussern (Insel, 2010). Bestrebungen, das Neuroentwicklungsmodell mit den Neurotransmitter-Hypothesen zu vereinen, haben zum heute vorherrschenden Verständnis der Schizophrenie als komplexer Störung der Neuroentwicklung geführt (Murray et al., 2017).

Die verschiedenen pathophysiologischen Theorien haben bislang jedoch nicht zu Innovationen in der Behandlung der Schizophrenie geführt. So merkte der ehemalige Vice President of Neuroscience bei Amgen und Eli Lilly, Christian Fibiger, an, dass der Psychiatrie grundlegendes Wissen zur normalen Gehirnfunktion – und wie deren Störung die Pathophysiologie von psychischen Krankheiten begründet – fehle. Dementsprechend sei der Versuch eines rationalen Wirkstoffdesigns für psychiatrische Erkrankungen verfrüht (Fibiger, 2012). Ähnlich äußerten sich zwei ehemalige Direktoren der National Institutes of Mental Health, Steven Hyman und Thomas Insel: Die sogenannte biologische Revolution in der Psychiatrie habe es nicht geschafft, komplexe Erkrankungen wie die Schizophrenie zu erklären (Insel, 2022). So zeigt sich insgesamt, dass trotz der

Identifizierung von Risikofaktoren und der Entwicklung plausibler pathophysiologischer Theorien das Verständnis der Schizophrenie und ihrer Krankheitsmechanismen noch unzureichend ist. In der Folge kommt es zu einer weitgehenden Stagnation in der Entwicklung neuer Therapien. Es bleibt in Anbetracht dessen von großer Bedeutung, die Ursachen und Pathophysiologie der Schizophrenie weiter zu erforschen und die Kenntnisse über die neurobiologischen Grundlagen der Erkrankung zu vertiefen.

1.4 Die Rolle der Neuropathologie

Innerhalb der biologischen Schizophrenieforschung gehört die Untersuchung der Gehirnmorphologie zu den Feldern mit den aussagekräftigsten Forschungsergebnissen. Bereits in den 1960er Jahren wurde in pneumoencephalographischen Untersuchungen eine Vergrößerung der Ventrikel bei PatientInnen mit Schizophrenie festgestellt (Haug, 1962). Diese gehören heute zu den am meisten replizierten morphologischen Befunden dieser Erkrankung (Svancer & Spaniel, 2021). Weitere eindeutig etablierte Befunde sind verminderte Volumina des gesamten Gehirns, der gesamten grauen Substanz, sowie spezifischer Kortexareale wie Frontallappen, anteriorer Gyrus cinguli und Hippocampus (Howes et al., 2023).

Der Fülle an Bildgebungsstudien steht allerdings nur eine kleine Zahl an neuropathologischen Studien gegenüber, die untersuchten, wie sich diese makroskopischen Befunde auf zellulärer Ebene widerspiegeln. So gibt es zwar Hinweise darauf, dass die kortikale Volumenreduktion bei Menschen mit Schizophrenie mit einer höheren kortikalen Neuronendichte (Bakhshi & Chance, 2015) bei konstanter kortikaler Neuronenzahl (Pakkenberg, 1993) einhergeht. Jedoch stammen diese Ergebnisse fast ausschließlich aus Untersuchungen an abgegrenzten Kortexarealen, was sie nur eingeschränkt auf den gesamten Kortex übertragbar macht. Studien auf Ebene des gesamten Kortex, die auch den Einfluss von in *post mortem* Studien relevanten Störvariablen berücksichtigen, fehlen bislang. Neuropathologische Untersuchungen sind zur Ergänzung von Bildgebungsstudien auch deswegen wichtig, weil beide Untersuchungsmethoden von unterschiedlichen Verzerrungen betroffen sind und eine Synthese von Ergebnissen beider Methoden im Sinne einer Triangulation (Hammerton & Munafo, 2021) einen insgesamt weniger verzerrten Blick auf die Gehirnmorphologie bieten kann. So können volumetrische Messungen mittels struktureller Magnetresonanztomographie (MRT) zum Beispiel durch den Wassergehalt des Gewebes oder die Tageszeit beeinflusst werden (Lerch et al., 2017; Weinberger & Radulescu, 2021). Entsprechend führen Messungen des Volumens von Gehirnregionen mittels MRT und neuropathologischen Untersuchungen nicht immer zu identischen Ergebnissen (Garcia-Finana et al., 2003).

Im Zusammenhang neuropathologischer *post mortem* Studien ist die design-based Stereologie als Methode zur präzisen und unverzerrten Quantifizierung von dreidimensionalen Strukturen wie Zellen in biologischen Geweben von großer Bedeutung (Gundersen & Jensen, 1987; West, 2012). Die hohe methodische Qualität wird dabei durch ein vorgegebenes Muster des Stichprobensamplings erreicht, das entlang eines Gitters durchgeführt wird und dadurch systematisch, gleichmäßig und zufällig ist. Aufgrund der hohen Validität und Reliabilität der so gewonnenen Schätzwerte hat sich die design-based Stereologie als Methode der Wahl in den Neurowissenschaften und der Histologie etabliert (Schmitz & Hof, 2000, 2005). Grundlegende neuropathologische Parameter, die wichtige Informationen über die Struktur und Funktion des Gehirns tragen, sind dabei die Zahl und Dichte der Neuronen in der kortikalen grauen Substanz (KGS) (Herculano-Houzel, 2009). Veränderungen in diesen Parametern können auf eine gestörte

Gehirnentwicklung oder einen sekundären Untergang von Neuronen hindeuten, wie sie zum Beispiel bei der Alzheimer-Demenz (Gomez-Isla et al., 1997) beobachtet wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung des Volumens, der Neuronenzahl und -dichte in der KGS in *post mortem* Gehirnen von PatientInnen mit Schizophrenie und der Vergleich dieser Parameter mit *post mortem* Gehirnen einer nicht erkrankten Kontrollgruppe. Zur Bestimmung dieser Werte wurden design-based stereologische Methoden verwendet und die Ergebnisse unter Berücksichtigung häufiger neuropathologischer Störvariablen statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse werden in Zusammenschau mit früherer Literatur diskutiert und es wird abseits der bisher vorgeschlagenen Reduced-Neuropil-Hypothese eine Erklärung der Befunde in Übereinstimmung mit dem etablierten Modell der Schizophrenie als komplexer Störung der Gehirnentwicklung angeboten. In den folgenden Kapiteln werden zunächst die verwendeten Methoden und das Studiendesign detailliert erläutert, gefolgt von einer ausführlichen Darstellung der Ergebnisse und einer abschließenden Diskussion, die die Ergebnisse im Kontext bestehender Forschung einordnet.

1.5 Die vorliegende Arbeit im größeren Kontext: Der anteriore cinguläre Cortex und Von Economo-Neurone bei Schizophrenie

Die vorliegende Arbeit war ursprünglich nur ein Bestandteil in der Untersuchung einer größeren Fragestellung um die Rolle des anterioren cingulären Cortex (ACC) und der sogenannten Von Economo-Neurone (VENs) in der Schizophrenie. Diese Fragestellung wurde durch insgesamt drei medizinische Doktorarbeiten untersucht (neben der vorliegenden Arbeit auch durch die Arbeiten von Alisa Vollhardt und Melanie Popal) und kulminierte in einer Peer-Review-geprüften Veröffentlichung (Gaus et al., 2022). Dabei erlaubte eine gestufte Untersuchung von Gehirnregionen verschiedener Hierarchieebenen (nur Lamina V in der Area 24, die gesamte Area 24, die gesamte KGS) eine Beurteilung der Spezifität der festgestellten Gruppenunterschiede.

Hinweise auf eine wichtige Rolle des ACC in der Pathophysiologie der Schizophrenie konnten durch zahlreiche Bildgebungs- und neuropathologische Befunde erhärtet werden. Zu den wichtigsten Ergebnissen gehören ein niedrigeres Volumen der grauen Substanz des ACC (Baiano et al., 2007; Brugger & Howes, 2017; Ellison-Wright & Bullmore, 2010; Fornito et al., 2009; Haijma et al., 2013) und eine niedrigere Dichte synaptischer Verbindungen im ACC (Fornito et al., 2009; Onwordi et al., 2020; Osimo et al., 2019; Roberts et al., 2015) bei PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zu Kontrollpersonen. Auch eine gestörte Konnektivität wurde wiederholt festgestellt (Adams & David, 2007; Pettersson-Yeo et al., 2011; Shukla et al., 2019). Die Hauptregion des ACC ist Area 24 (Vogt et al., 1995). Area 24 wurde in einer Reihe von Studien zur Neuropathologie der Schizophrenie als Stellvertreter für den ACC untersucht (Benes & Bird, 1987; Benes et al., 1986; Benes et al., 1991; Benes et al., 2001; Bouras et al., 2001; Brüne et al., 2010; Kalus et al., 1997; Stark et al., 2004). Dabei wurden in einzelnen Laminae im Vergleich zu Kontrollpersonen sowohl erhöhte (Chana et al., 2003) und erniedrigte (Benes et al., 1986) als auch gleiche (Benes et al., 1991; Bouras et al., 2001; Cotter et al., 2001; Höistad et al., 2013; Kalus et al., 1997) Neuronendichten festgestellt. Im Unterschied hierzu ergaben Untersuchungen der Neuronenzahl in Area 24 keine Gruppenunterschiede (Ongür et al., 1998; Stark et al., 2004). Einschränkend muss bemerkt werden, dass bisher nur wenige Untersuchungen Lamina-spezifischer Gruppenunterschiede unter Verwendung valider, design-based stereologischer Methoden

durchgeführt wurden. Für eine aussagekräftige Beurteilung von Unterschieden in Neuronenzahlen im ACC bei PatientInnen mit Schizophrenie sind daher weitere Untersuchungen nötig.

Ein besonderes Merkmal der Area 24 ist das Vorkommen der sogenannten Spindel- oder Von Economo-Neurone (VENs) in Lamina V, einer speziellen Art von großen Neuronen mit charakteristischer, spindelähnlicher Form (Allman et al., 2010). Während über die Funktion der VENs bisher wenig bekannt ist, wird angenommen, dass es sich um spezialisierte Projektionsneurone handelt (Cobos & Seeley, 2015; Hodge et al., 2020; Nimchinsky et al., 1995). Die Tatsache, dass VENs nur bei bestimmten Spezies wie Menschen, Menschenaffen (Allman et al., 2010; Nimchinsky et al., 1995) und einigen anderen Säugetierarten (Raghanti et al., 2015) gefunden wurden und auch beim Menschen nur in wenigen, phylogenetisch jungen kortikalen Arealen wie dem ACC und dem frontoinsulären Cortex vorkommen (Allman et al., 2010), führte zu der Mutmaßung, dass diese Zellen eine besondere Rolle bei höheren kognitiven Prozessen wie sozialer Kognition spielen könnten (Cauda et al., 2014). Ein wachsendes Interesse an der Beteiligung von VENs bei neuropsychiatrischen Störungen führte in den letzten Jahrzehnten zu Feststellungen von VEN-Veränderungen bei einer Reihe von Erkrankungen (Gefen et al., 2018; Kaufman et al., 2008; Nimchinsky et al., 1995; Seeley et al., 2006), darunter auch Schizophrenie (Brüne et al., 2010; Brüne et al., 2011; Krause et al., 2017) (siehe (Butti et al., 2013) für eine Übersichtsarbeit). Bezogen auf Schizophrenie wurden bisher nur Gruppenunterschiede in der VEN-Dichte, nicht aber VEN-Zahl, zwischen PatientInnen und Kontrollpersonen untersucht, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt wurde (Brüne et al., 2010; Brüne et al., 2011). Jedoch kann aus fehlenden Gruppenunterschieden in mittleren Zelldichten grundsätzlich nicht auf einen fehlenden Gruppenunterschied in Gesamtzellzahlen geschlossen werden (Schmitz et al., 2005).

Angesichts der kleinen Zahl an belastbaren Untersuchungen des ACC und speziell der VENs im ACC führte unsere Arbeitsgruppe eine design-based stereologische Schätzung der Gesamtneuronen- und VEN-Zahl und -Dichte in der Lamina V des ACC durch. Dies erfolgte in der Doktorarbeit von Alisa Vollhardt. Um dabei unterscheiden zu können, ob festgestellte Gruppenunterschiede spezifisch für die Lamina V waren, wurde zusätzlich die Neuronenzahl und -dichte in der gesamten Area 24 geschätzt. Dies war Gegenstand der Doktorarbeit von Melanie Popal. Um als Letztes auch unterscheiden zu können, ob ein festgestellter Unterschied in der Area 24 nur auf diese Region begrenzt oder vielmehr Folge einer globalen Verringerung der Anzahl kortikaler Neuronen war, bestimmten wir außerdem die Gesamtzahl der Neuronen in der KGS. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit erreicht.

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Unterschiede in Volumen, Neuronenzahl und Neuronendichte in der KGS zwischen PatientInnen mit Schizophrenie und gesunden Kontrollpersonen zu untersuchen. Die zugrundeliegende Hypothese war, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede in diesen Parametern zwischen den beiden Gruppen gibt.

Schizophrenie ist weltweit eine der Hauptursachen für Invalidität. Ihre Pathophysiologie ist nach wie vor noch wenig verstanden, was die Entwicklung therapeutischer Innovationen erschwert. Bisher wurden Neuronenzahl und -dichte in der gesamten KGS bei PatientInnen mit Schizophrenie nicht mit robusten stereologischen Methoden und unter Berücksichtigung von wichtigen neuropathologischen Störfaktoren untersucht. Die vorliegende Arbeit zielte darauf ab, die neuropathologischen Korrelate der Schizophrenie und die histologischen Veränderungen, die mit der in der Bildgebung feststellbaren kortikalen Volumenreduktion einhergehen, besser zu verstehen. Langfristig soll dies dazu beitragen, neue Perspektiven für die Diagnostik und Therapie dieser komplexen Erkrankung zu entwickeln.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde die design-based stereologische Zellzählung als Methode der Wahl zur präzisen und unverzerrten Quantifizierung der Neuronenzahl und -dichte in *post mortem* Gehirnen von 11 männlichen Patienten mit Schizophrenie und 10 gesunden männlichen Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung angewendet. Im Studiendesign wurden mehrere Schritte berücksichtigt, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen. So erfolgte eine Verblindung aller Untersuchungen zur Vermeidung eines Untersucherbias, und es wurde eine Adjustierung aller Ergebnisse für die Störvariablen Hemisphäre, Alter, *post mortem* Intervall (PMI) und Fixationszeit (Fix) vorgenommen.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchtes Kollektiv

Das Kollektiv der vorliegenden Arbeit umfasste die *post mortem* Gehirne von 11 männlichen Patienten mit Schizophrenie und 10 männlichen Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung. Dieses Kollektiv wurde bereits in früheren Studien unserer Forschungsgruppe untersucht (Casanova et al., 2005; Höistad et al., 2013; Kreczmanski et al., 2007; Kreczmanski et al., 2005). Im Vergleich zu diesen Studien konnten jedoch die Fälle S13, C1 und C4 aufgrund von Beschädigungen einzelner Schnitte nicht untersucht werden, und wurden somit aus der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen. Ebenfalls ausgeschlossen wurden S11 und C11, da bei diesen Fällen aufgrund von fehlenden Schnitten in den frontalen und occipitalen Polen die KGS nicht vollständig repräsentativ dargestellt werden konnte. Wichtige klinische Merkmale der Fälle sind in **Tabelle 1** aufgeführt, und deskriptive Statistiken dieser Merkmale in **Tabelle 2**.

Alle 21 in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fälle wurden in deutschen Krankenhäusern behandelt. Alle 11 Patienten mit Schizophrenie waren in Langzeitbehandlung in einem von sechs Krankenhäusern, wovon fünf staatliche psychiatrische Krankenhäuser und eines ein Universitätsklinikum waren. Alle zehn Kontrollpersonen wurden in fünf Krankenhäusern behandelt, wovon vier örtliche Bezirkskrankenhäuser und eines ein Universitätsklinikum waren. Vollständige Krankenakten lagen vor für die Patienten mit Schizophrenie, und vollständige Autopsieberichte, inklusive einer Zusammenfassung der Patientengeschichte, für alle Fälle.

Alle Patienten mit Schizophrenie erfüllten die DSM-IV- und ICD-10-Kriterien für Schizophrenie. Dies wurde von zwei erfahrenen Psychiatern (M. Schüler, G. Ulmar) auf Grundlage der Krankenakten geprüft. Dabei wurde sowohl die Übereinstimmung der Patienten mit Schizophrenie mit den Schizophreniekriterien als auch die Abwesenheit von psychiatrischen Diagnosen bei den Kontrollpersonen sichergestellt. Insbesondere enthielt die Patientengruppe keine Teilnehmer mit schizoaffektiver Störung.

Alle Patienten mit Schizophrenie hatten eine Langzeitbehandlung mit hohen Dosen typischer Antipsychotika erhalten. Da jedoch die meisten Patienten nicht während der gesamten Dauer ihrer Erkrankung in stationärer Behandlung waren und die Patientenakten daher nicht die gesamte Medikationshistorie abdeckten, war eine genaue Berechnung der lebenslangen Medikationsdosen nicht möglich.

Ausschlusskriterien für die Inklusion in die vorliegende Arbeit waren:

- Neurologische Auffälligkeiten, die eine Intervention erforderten oder die Beurteilung der kognitiven Funktion beeinträchtigten (z.B. Schlaganfall mit Aphasie)
- wiederkehrende Anfallsleiden in der Vorgeschichte (z.B. Epilepsie)
- schwere Kopfverletzungen mit Bewusstlosigkeit in der Vorgeschichte
- selbst herbeigeführte Vergiftung in der Vorgeschichte
- Diabetes mellitus mit unzureichender Blutzuckereinstellung (freie Plasmaglukose > 200 mg/dl)
- selbst herbeigeführte Wasserintoxikation mit Hyponatriämie in der Vorgeschichte

Zudem wurden *post mortem* Gehirne von Patienten mit Schizophrenie ausgeschlossen, wenn sich die Patienten einer Leukotomie unterzogen hatten. Bei der Auswahl der Kontrollpersonen wurde darauf geachtet, dass ein ähnlicher sozioökonomischer Hintergrund bestand wie in der

Patientengruppe; jedoch war ein genaues Matching nach sozioökonomischen Kriterien nicht möglich, da es die Probandenauswahl übermäßig eingeschränkt hätte.

Die *post mortem* Gehirne wurden von H. Heinsen (Morphologische Hirnforschung der Universität Würzburg) in den Jahren 1988 bis 1994 gesammelt. Dabei wurden alle MitarbeiterInnen, die in die Autopsien involviert waren, von H. Heinsen instruiert und befolgten somit gleiche Abläufe in der Handhabung und Verarbeitung der *post mortem* Gehirne. Nach histologischer Verarbeitung der Gehirne wurde jeder Schnitt kodiert und auf die Abwesenheit von Tumoren, Infarkten, Heterotopien, Zeichen der Autolyse, Färbeartefakten, sowie Gliose hin geprüft. Zum Ausschluss von neurodegenerativen Veränderungen infolge einer Alzheimer-Erkrankung wurden zudem die Gehirne von allen ProbandInnen älter als 40 Jahre auf die Abwesenheit von neurofibrillären Tangles, die das Braak Stadium I (Braak & Braak, 1995) überschritten, hin geprüft. Hierzu wurden Schnitte durch den zentralen Anteil des entorhinalen und transentorhinalen Kortex mit der Gallyas-Methode (Heinsen et al., 1989) behandelt und anschliessend mikroskopisch untersucht. Die so gewonnenen Schnitte wiesen selten Braak I-kompatible neurofibrilläre Tangles im entorhinalen und transentorhinalen Kortex auf, und waren ansonsten unauffällig.

Die Autopsien wurden gemäß Gesetzgebung der Bundesrepublik Deutschland nach Zustimmung der Angehörigen durchgeführt. Die wissenschaftliche Nutzung der autopsierten Gehirne wurde durch die zuständigen institutionellen Untersuchungsausschüsse und die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt.

Tabelle 1: Klinische Merkmale aller eingeschlossenen Fälle. Individuelle Werte von Alter, Alter bei Beginn der Schizophrenie-Erkrankung, Todesursache, *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie), Fixierzeit (Dauer der initialen Fixierung des Gehirns in 10% Formalin) und Diagnoseschlüssel nach DSM-IV sowie ICD-10. Fallnr: Fallnummer; Alter [yr]: Alter in Jahren; Beginn [yr]: Alter bei Erkrankungsbeginn in Jahren; PMI [h]: *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie) in Stunden; Fix [d]: Fixierzeit (Dauer der initialen Fixierung des Gehirns in 10% Formalin) in Tagen; Diagnose: Diagnoseschlüssel nach DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) und ICD-10 (World Health Organization, 2004).

Fallnr.	Alter [yr]	Beginn [yr]	Todesursache	PMI [h]	Fix [d]	Diagnose	
						DSM-IV	ICD-10
S1	22	19	Suizid	88	130	295.30	F20.00
S2	36	28	Suizid	<72	115	295.30	F20.00
S3	46	24	Systemische Hypothermie	<24	327	295.30	F20.01
S4	50	17	Peritonitis	<24	203	295.30	F20.00
S5	50	22	Suizid	18	170	295.30	F20.00
S6	51	17	Septikämie	33	127	295.60	F20.50
S7	54	20	Septikämie	27	250	295.60	F20.50
S8	55	22	Rechtsherzversagen	25	84	295.30	F20.00
S9	57	37	Septikämie	76	163	295.30	F20.00
S10	60	24	Lungenarterienembolie	<48	311	295.30	F20.01
S12	63	22	Akuter Myokardinfarkt	15	338	295.60	F20.50
C2	36	-	Schussverletzung	24	143	-	-
C3	47	-	Akuter Myokardinfarkt	<24	133	-	-
C5	50	-	Lawinenunfall	23	498	-	-
C6	51	-	Septikämie	7	285	-	-
C7	54	-	Akuter Myokardinfarkt	18	168	-	-
C8	56	-	Akuter Myokardinfarkt	60	3570	-	-
C9	58	-	Akuter Myokardinfarkt	28	126	-	-
C10	60	-	Gastrointestinale Blutung	18	101	-	-
C12	62	-	Akuter Myokardinfarkt	<24	3696	-	-
C13	65	-	Bronchopneumonie	6	2289	-	-

Tabelle 2: Deskriptive Statistiken der Merkmale aller eingeschlossenen Fälle. Wertebereich, Mittelwert, Median und Standardabweichung von Alter, Alter bei Beginn der Schizophrenie-Erkrankung, *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie) und Fixierzeit (Dauer der initialen Fixierung des Gehirns in 10% Formalin). Alter [yr]: Alter in Jahren; Beginn [yr]: Alter bei Erkrankungsbeginn in Jahren; PMI [h]: *post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie) in Stunden; Fix [d]: Fixierzeit (Dauer der initialen Fixierung des Gehirns in 10% Formalin) in Tagen.

		Alter [yr]	Beginn [yr]	PMI [h]	Fix [d]
Patienten mit Schizophrenie (n=11)	Wertebereich	22 – 63	17 – 37	15 – 88	84 – 338
	Mittelwert	49,45	22,91	40,91	201,64
	Median	51	22	27	170
	Std.-Abweichung	11,09	5,42	24,76	86,94
Kontrollpersonen (n=10)	Wertebereich	36 – 65	-	6 – 60	101 – 3696
	Mittelwert	53,9	-	23,2	1100,9
	Median	55	-	23,5	226,5
	Std.-Abweichung	7,99	-	14,11	1412,33
Alle (n=21)	Wertebereich	22 – 65	17 – 37	6 – 88	84 – 3696
	Mittelwert	51,57	22,91	32,48	629,86
	Median	54	22	24	170
	Std.-Abweichung	9,99	5,42	22,23	1074,95

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Herstellung der histologischen Präparate

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten histologischen Präparate wurden sämtlich im Labor von H. Heinsen (Heinsen, 1991) nach dem ebenda dargestellten Prozess angefertigt. Dieser ist im Folgenden im Detail beschrieben.

3.2.1.1 Initiale Fixierung

Als erstes wurden die autopsierten vollständigen Gehirne durch Einlegen in 4%-Formalin-Lösung (bestehend aus 1 Teil 40% wässrigem Formaldehyd sowie 9 Teilen Leitungswasser) für min. 3 Monate und max. 11 Jahre fixiert. Die Fixierflüssigkeit war dabei im Überschuss vorhanden (min. 5000 ml pro Gehirn) und wurde wöchentlich erneuert. Nach dieser initialen Fixierung wurde der Hirnstamm zusammen mit dem Kleinhirn auf Höhe des rostralen Pons vom Vorderhirn getrennt, und auch die beiden Hemisphären wurden medio-sagittal voneinander getrennt. Da arteriosklerotische Plaques und fibrosierte Meningen beim Mikrotomieren Risse im Gehirngewebe verursachen können, wurden die Meningen und die kalzifizierten Gefäße des Subarachnoidalraumes nun vorsichtig entfernt.

3.2.1.2 Vorbehandlung mit Gefrierschutzmittel

Um der Bildung von Eiskristallen vorzubeugen, wurden die Hemisphären als nächstes nach Rosene et al. (Rosene et al., 1986) mit einem Gefrierschutzmittel vorbehandelt. Hierzu wurden die Hemisphären zunächst für 8 Tage in eine Mischung aus 4% Formaldehyd, 2% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 10% Glycerin eingetaucht, und anschließend ohne Unterbrechung wieder für 8 Tage in eine Mischung aus 4% Formaldehyd, 2% DMSO und 20% Glycerin eingelegt. In beiden Abschnitten wurde die Lösung nach jeweils 4 Tagen erneuert.

3.2.1.3 Einbettung in Agarose oder Gelatine

Die Hemisphären wurden vorsichtig mit Filterpapier abgetrocknet, um überschüssiges Gefrierschutzmittel zu entfernen. Als nächstes erfolgte die Einbettung in Agarose oder Gelatine. Dazu wurde entweder eine 3% Agarose- oder 15% Gelatine-Lösung durch gleichmäßiges Umrühren bei 60°C auf einer Heizplatte zubereitet. Nachdem die Lösung auf 45-50°C abgekühlt war, wurden die Hemisphären in diese eingetaucht. Um sicherzustellen, dass alle Sulci mit dem Einbettmedium ausgefüllt wurden, wurden diese beim Eintauchen vorsichtig mit den Fingern aufgespreizt. Die so eingebetteten Hemisphären wurden dann über Nacht in einem Kühlschrank bei 4°C gekühlt. Am folgenden Morgen wurde überschüssiges Einbettmedium vom erstarrten Block entfernt, sodass nur noch ein 5-10 mm dicker Saum um das Gehirngewebe herum zurückblieb. Es wurde darauf geachtet, dass die Unterseite des Gewebeblocks hierbei in ausreichender Breite belassen wurde, um später als „Sockel“ zum Anfrieren des Blocks auf den Mikrotom-Träger dienen zu können. Die mit Gelatine eingebetteten Blöcke wurden vor der weiteren Verarbeitung für bis zu 3 Tage in Formaldehyd zur Aushärtung belassen.

3.2.1.4 Nochmalige Behandlung mit Gefrierschutzmittel nach der Einbettung

Vor dem Einfrieren wurden die Gewebelöcke erneut mit Gefrierschutzmittel vorbehandelt, um auch im Einbettmedium der Bildung von Eiskristallen vorzubeugen (Eiskristalle im Einbettmedium können das Mikrotomieren verkomplizieren). Hierzu wurden die Blöcke für 2 Wochen in einer Mischung aus 4% Formaldehyd, 2% DMSO und 10% Glycerin belassen und anschließend ohne Unterbrechung wieder für 2 Wochen in einer Mischung aus 4% Formaldehyd, 2% DMSO und 20% Glycerin (im Falle einer Einbettung in Gelatine dürfen vor dieser Behandlung nicht die 3 Tage Aushärtezeit in Formaldehyd übergangen werden).

3.2.1.5 Einfrieren

Es erfolgte als nächstes das Einfrieren der Blöcke in -60°C kaltem Isopentan. Um das Einfrieren zu erleichtern, wurden die eingebetteten Hemisphären im Vorfeld jeweils in einen größeren rostralen und einen kleineren caudalen Teil aufgeteilt, wobei die Teilungsebene direkt caudal vom Splenium corporis callosi lag. Das Isopentan wurde dann in ein ausreichend großes Dewar-Gefäß eingegossen und durch langsames Hinzufügen von kleinen Stücken Trockeneis heruntergekühlt (das Isopentan kochte bei diesem Vorgang zunächst heftig auf). Dabei wurde die Temperatur stetig mit einem Thermometer kontrolliert. Innerhalb von 15 Minuten nach Erreichen der gewünschten Temperatur von -60°C wurden die Gewebelöcke vorsichtig in das Isopentan eingetaucht. Die Zeit bis zum vollständigen Einfrieren hing maßgeblich von der Größe der Blöcke ab: Kleine Blöcke konnten sofort auf -60°C heruntergekühlt werden, während ein solch schneller Temperaturabstieg bei größeren Blöcken gelegentlich mit der Bildung von Rissen im Einbettmedium einhergeht und zu artefaktischen Schäden am Gehirngewebe führen kann, sodass sich hier ein langsames Vorgehen empfahl.

Insgesamt wurden die Blöcke für 15 Minuten im Isopentan belassen. Auch hierbei wurde die Temperatur weiterhin stetig kontrolliert und bei Bedarf mittels Hinzufügens von weiterem Trockeneis gesenkt. Schließlich wurden die Gewebelöcke aus den Dewar-Gefäßen entnommen und überschüssiges Isopentan wurde mit Filterpapier entfernt. Die Blöcke wurden dann in Plastiktüten versiegelt und für mehrere Tage, mindestens aber über Nacht, in einem Gefrierschrank bei -80°C eingelagert.

3.2.1.6 Mikrotomschneiden

Die Hemisphären wurden in serielle, $700\ \mu\text{m}$ dicke koronare Schnitte mikrotomiert. Dazu wurden die tiefgefrorenen Gewebelöcke zunächst mit Wasser auf den Blockträger eines Gefriermikrotoms angeheftet. Bei dem verwendeten Mikrotom (Tetrander, Jung, Nussloch, Deutschland) handelte es sich um ein spezielles Schlittenmikrotom, das über einen großen Gefrierblockträger verfügt, der durch ein externes Aggregat gekühlt wird.

Da aufgrund der Härte der tiefgefrorenen Gewebelöcke die Gefahr bestand, beim Mikrotomieren entweder das Mikrotommesser zu beschädigen oder die Blöcke zu zerbersten, wurde die Seite der Blöcke, die in Kontakt mit dem Messer kam, vorsichtig in den obersten Schichten ($0,5\text{-}1,0\ \text{mm}$) erwärmt. Dazu wurde ein auf einer 80°C heißen Heizplatte aufgeheizter Aluminiumquader (Maße $12 \times 18 \times 2\ \text{cm}$, mit einem Griff) auf den Block gepresst. Es war eine Frage der Erfahrung, welche Temperatur auf der Heizplatte eingestellt und für wie lange und mit welchem Druck der Aluminiumquader auf den Gewebelöck gedrückt werden musste, um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen. War die oberflächliche Schicht des Blockes zu warm, so verzog und verwand sich der erhaltene Schnitt; war sie zu kalt, so bildeten sich Risse an der Oberfläche. Mit ausreichender Erfahrung konnte eine Hemisphäre schließlich innerhalb einer Stunde vollständig in eine Schnittserie mikrotomiert werden. Während oder nach dem Schneiden erfolgte auch eine makroskopische neuropathologische Inspektion der Schnitte, um grobe morphologische Auffälligkeiten auszuschließen. Die so gewonnenen $700\ \mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden schließlich in 4% Formalin-Lösung in Plastikboxen eingelagert.

In einem Ausnahmefall wurden die Hemisphären von Kontrollperson C7 nicht wie hier beschrieben in Agarose oder Gelatine, sondern in Celloidin (Heinsen et al., 2000) eingebettet und dann mittels eines anderen Schlittenmikrotoms (Polycut, Cambridge Instruments, Großbritannien) in $440\text{-}500\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte mikrotomiert. Auch diese Schnitte wurden, wie im Folgenden beschrieben, mit Gallocyanin gefärbt.

3.2.1.7 Färbung und Montierung auf Objektträger

Jeder zweite bzw. jeder dritte Schnitt wurde als nächstes unter Verwendung der Methode nach Einarson (Einarson, 1932) mit Gallocyanin-Chromalum gefärbt und dann auf mikroskopische Objektträger montiert. Zwei repräsentative Beispiele von so gefärbten und montierten Schnitten sind in **Abbildung 1** dargestellt. Die dazwischenliegenden Schnitte wurden in der 4% Formalin-Lösung belassen und fanden in der vorliegenden Arbeit keine weitere Verwendung.

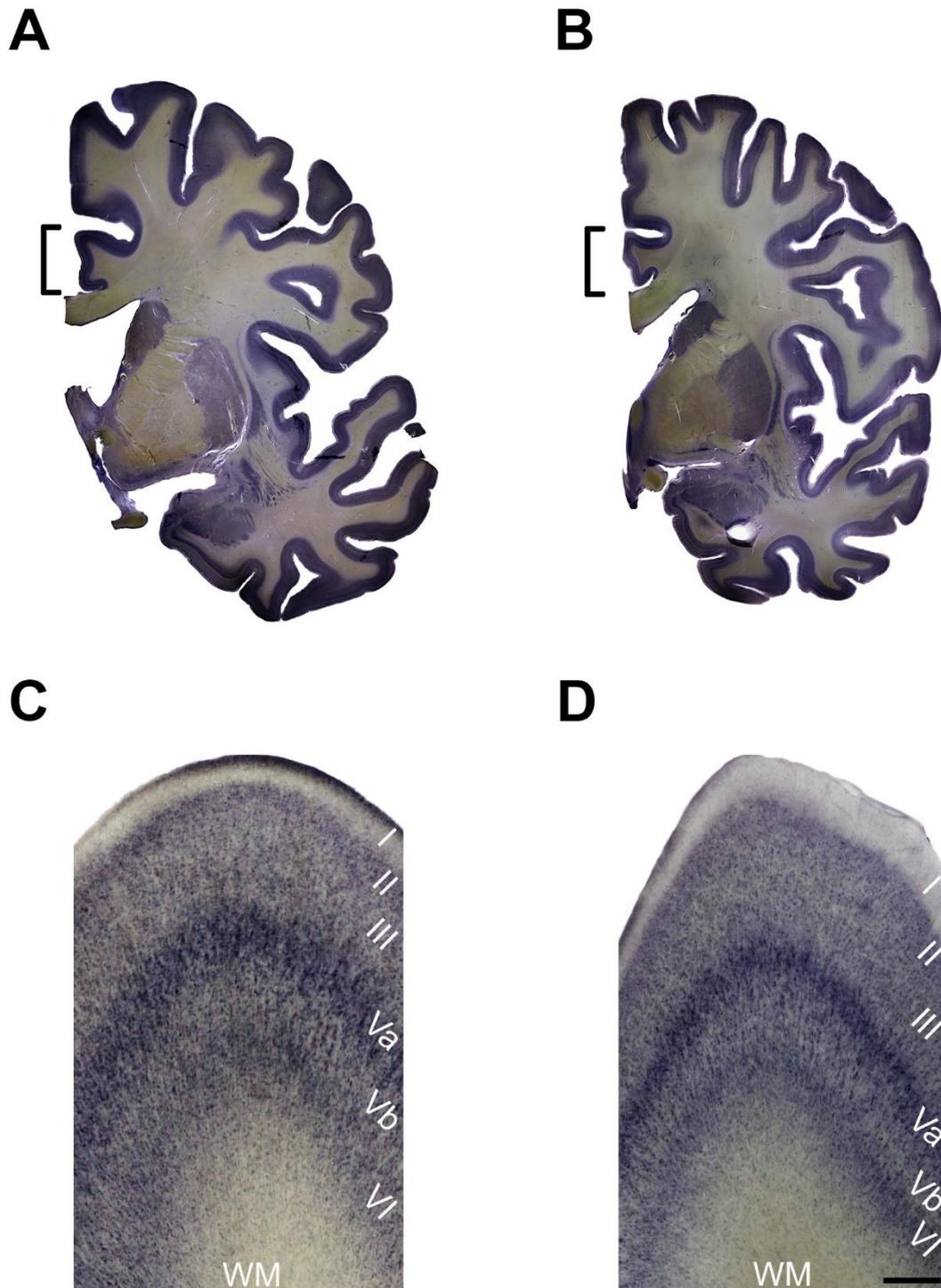


Abbildung 1: Repräsentative Koronarschnitte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *post mortem* Gehirnhemisphären. Dargestellt ist die Hemisphäre einer Kontrollperson (A, C) und eines Patienten mit Schizophrenie (B, D). Beispielhaft bezeichnen die Klammern in den Übersichtsaufnahmen (A, B) das Brodmann-Areal 24, von dem jeweils ein Teil in den Nahaufnahmen (C, D) gezeigt ist. Die Schichten sind in römischen Ziffern angegeben. Maßstabsbalken = 10 mm in A und B, 370 μ m in C und D. Diese Abbildung wurde der Publikation (Gaus et al., 2022) entnommen.

Vor der Färbung wurden die Schnitte mit Perameisensäure vorbehandelt, da dies nach Merker (Merker, 1983) die Selektivität der Galloxyanin-Färbung verbessert. Die Perameisensäure wurde

hergestellt durch Zusammenführen von 1 Teil 100% Ameisensäure, 3 Teilen 30% Wasserstoffperoxid und 6 Teilen destilliertem Wasser (um Verbrennungen durch diese aggressive Mischung zu vermeiden, wurden hierbei zwei Paar Handschuhe übereinander getragen). Die Schnitte wurden dann erst über Nacht in der frisch zubereiteten Perameisensäure in Petrischalen (185 mm Durchmesser, 40 mm Höhe) eingelegt und dabei mittels einer Schüttelmaschine in stetiger Bewegung gehalten. Ein Filterpapier auf der Oberfläche der Perameisensäure hielt die Schnitte ständig in die Flüssigkeit eingetaucht. Am folgenden Morgen wurde die Perameisensäure durch Spülung mit Leitungswasser für eine Stunde entfernt.

Für die Herstellung der Färbelösung wurden erst 1,5 g Gallocyanin (Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland) in 1000 ml 5% Chrom(III)-kaliumsulfat-Dodecahydrat (Merck) aufgelöst. Die Lösung wurde dann für min. 10 Minuten gekocht (da die Flüssigkeit beim Kochen aus dem Gefäß spritzen konnte, musste hier große Vorsicht angewandt werden). Nach dem Abkühlen wurde die Lösung filtriert und so viel destilliertes Wasser hinzugegeben, bis das Gesamtvolumen 1000 ml betrug. Der pH-Wert der Lösung maß zu diesem Zeitpunkt 1,8. Ein pH-Wert von 1,8 war in den meisten Fällen optimal; im Falle aber, dass das gefärbte Gewebe nur blass bläulich war, konnte das Ergebnis durch ein Anheben des pH-Wertes auf 2,0-2,2 verbessert werden. Die auf diese Weise hergestellte Lösung konnte zweimalig zur Färbung von Gewebe verwendet werden.

Die Färbung selbst erfolgte durch Eintauchen der Schnitte für 3 Stunden in die Färbelösung unter stetigem leichtem Umrühren. Nach dem Färben wurde das überschüssige Gallocyanin mittels Spülung über eine Stunde unter fließendem Leitungswasser entfernt. Die Schnitte wurden dann aus dem Leitungswasser in 50% Ethanol-Lösung überführt und durch Ausbreitung zwischen zwei Filterpapieren geglättet. Im Anschluss hieran wurden die einzelnen, zwischen Filterpapier gepressten Schnitte in einem Stapel aus Keramik-Exsikkatorscheiben mit 150 mm Durchmesser (Höchst CeramTec, Marktredwitz, Deutschland) gelagert. Dadurch wurden sie ausgebreitet gehalten und die Diffusion von zunehmenden Konzentrationen Alkohol wurde ermöglicht. Ein solcher Stapel aus 4 Scheiben konnte auf diese Weise in einer Petrischale mit 185 mm Durchmesser und 40 mm Höhe gelagert werden. Es erfolgte danach eine weitere Dehydrierung der Schnitte durch serielles Eintauchen in folgende alkoholische Lösungen: für eine Stunde in 80% Ethanol; für eine Stunde in bereits benutztem 100% Ethanol; für eine Stunde in unbenutztem 100% Ethanol; für zwei Stunden in einer Mischung aus 1 Teil 100% Propanol und 1 Teil Xylol; für zwei Stunden in vorher benutztem Xylol; über Nacht in unbenutztem Xylol. Beim Umgang mit Xylol wurden zu jeder Zeit zwei Paar Handschuhe übereinander getragen.

Als letztes wurden die Schnitte für 1 Minute in Permout Eindeckmedium (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA) eingetaucht und dann auf speziell angefertigte mikroskopische Objektträger montiert. Für min. 1 Woche wurde das Deckglas mit kleinen Bleiblöckchen beschwert, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden. Aufgrund der vergleichsweise dicken Schicht Eindeckmedium dauerte die Polymerisation des Mediums mehrere Monate.

3.2.2 Stereologische Untersuchung

Die stereologischen Untersuchungen beider Hemisphären aller Fälle wurden durch einen Untersucher durchgeführt. Dieser war verblindet für alle klinischen Charakteristika der Fälle, insbesondere für die Gruppeneinteilung zu der Fall- oder Kontrollgruppe. Vor der Untersuchung der Präparate für die vorliegende Arbeit wurde die Genauigkeit des Untersuchers mittels einer Vorzählung an fremden Kleinhirnpräparaten validiert, für die bereits vorbekannte Neuronenzahlen vorlagen (diese waren dem Untersucher jedoch nicht bekannt). Bei engmaschiger Instruktion des Untersuchers über die korrekte Zähltechnik wurde diese Vorzählung so oft wiederholt, bis keine

wesentliche Abweichung der Ergebnisse des Untersuchers von den vorbekannten Werten mehr bestand.

Der Aufbau der stereologischen Arbeitsstation kann der **Tabelle 3** entnommen werden. Alle stereologischen Untersuchungen wurden zwischen 2019 und 2020 durchgeführt.

Tabelle 3: Komponenten der verwendeten stereologischen Arbeitsstation.

Komponente	Modellbezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Mikroskop	Zeiss Axioskop Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy	Jena, Deutschland
Verschiedene Objektive	Zeiss Plan-Neofluar Objektive: <ul style="list-style-type: none"> • 1,25x (Numerische Apertur (NA) = 0,035) • 2,5x (NA = 0,075) • 10x (NA = 0,30) • 20x (NA = 0,50) • 40x (NA = 0,75) • 100x (NA = 1,30 Öl) 	Carl Zeiss Microscopy	Jena, Deutschland
Inkrementaler Mess-taster	Typ MT 1271	Heidenhain	Traunreut, Deutschland
Stage controller	Typ MAC 6000	Ludl Electronics Products	Hawthorne, NY, USA
12 Bit Farbkamera (1,600x1,200 Pixel)	Modell 01-MBF-2000R-F-CLR12	MBF Bioscience	Williston, VT, USA
Stereologie-Software	Stereo Investigator Version 11.01.2 64 Bit	MBF Bioscience	Williston, VT, USA

Zunächst wurde aus jeder der Hemisphären eine systematisch-einheitliche Zufallsauswahl bestehend aus 10 Schnitten zusammengestellt. Dabei waren die 10 Schnitte in regelmäßigen Abständen über die gesamte rostral-caudale Ausdehnung der Hemisphäre verteilt, und um eine Verzerrung zu vermeiden, wurde der erste Schnitt zufällig aus dem rostralen Zehntel der Hemisphäre ausgewählt. Genauer wurden alle Schnitte einer Hemisphäre erst von rostral nach caudal fortlaufend von 1 bis N durchnummeriert (die nicht-gefärbten und in Formalin eingelagerten Schnitte wurden hierbei explizit außer Acht gelassen). Die Nummer x_1 des Schnittes $i = 1$ der Zufallsauswahl wurde aus dem Wertebereich $\{1, \dots, \lfloor \frac{N}{10} \rfloor\}$ gezogen. Beginnend mit diesem ersten Schnitt wurde jeder $\frac{N}{10}$ -te weitere Schnitt der Hemisphäre zu der Zufallsauswahl hinzugefügt, d.h. die Nummern x_2, x_3, \dots, x_{10} aller folgenden Schnitte der Zufallsauswahl berechneten sich zu $x_2 = \lfloor x_1 + \frac{N}{10} \rfloor, x_3 = \lfloor x_1 + 2 \frac{N}{10} \rfloor, \dots, x_{10} = \lfloor x_1 + 9 \frac{N}{10} \rfloor$.

Zur Bestimmung des Volumens der KGS wurde in jedem der Schnitte dieser Zufallsauswahl zunächst die KGS mit niedriger Vergrößerung (1,25x Objektiv) manuell grob abgegrenzt. Unter Verwendung der Cavalieri-Methode (Cavalieri, 1635; Gundersen & Jensen, 1987) wurde nun mittels Punktzählung (Gundersen & Jensen, 1987) der jeweilige Flächeninhalt des zweidimensionalen Profils der KGS auf jedem Schnitt festgestellt. Hierzu wurde mithilfe der Stereologie-Software ein

virtuelles, zweidimensionales kartesisches Gitter mit Kantenlänge $D = 5000 \mu\text{m}$ über die grobe Abgrenzung der KGS gelegt. Anschliessend wurde die Anzahl $\sum P$ der Eckpunkte des Gitters gezählt, die sich innerhalb des zweidimensionalen Profils der KGS wiederfanden. Der erwartungstreue Schätzer VOL für das Volumen des KGS einer Hemisphäre errechnete sich dann durch:

$$VOL = \sum_{i=1}^{10} \Sigma P_i \cdot D^2 \cdot t_i \cdot d$$

wobei ΣP_i die Anzahl der Eckpunkte innerhalb des Profils der KGS im Schnitt i ist, D die Kantenlänge des kartesischen Gitters, t_i die Dicke des Schnittes i und d die Anzahl der Schnitte in der Hemisphäre von einem zum nächsten Schnitt der Zufallsauswahl (d wiederum berücksichtigte auch die nicht gefärbten und in Formalin eingelagerten Schnitte). Die Schnittdicke t_i wurde mittels der Methode von Heinsen et al. (Heinsen et al., 1994) festgestellt und schwankte zwischen 455 und 578 μm .

Zur Bestimmung der Anzahl der Neuronen in der KGS wurde die „optical fractionator“ Methode (Gundersen et al., 1988) herangezogen. Auch hierbei wurde mithilfe der Stereologie-Software ein Netz von in gleichem Abstand verteilten, quaderförmigen unbiased virtual counting spaces (UVCSs) (Schmitz und Hof, 2005) über die grobe Abgrenzung des zweidimensionalen Profils der KGS in jedem Schnitt gelegt. Bei hoher Vergrößerung (40x Objektiv) wurde nun jeder UVCS einzeln untersucht und die in ihm zu liegen kommenden Neurone gezählt. Genauer gesagt wurden die Neurone nur dann gezählt, wenn ihr Nucleolus innerhalb eines UVCSs in den Fokus kam und nicht die Ausschlusslinie (rote Linie in **Abbildung 2**) des UVCS berührte, oder alternativ aber die Einschlusslinie (grüne Linie in **Abbildung 2**) berührte. Das Zählverfahren mittels der „optical fractionator“ Methode ist beispielhaft in **Abbildung 2** dargestellt. Die Summe der Innenräume der UVCSs stellte eine repräsentative Stichprobe der KGS dar. Aus diesem Grund konnte die darin ermittelte, aufsummierte Anzahl der Neurone $\sum Q^-$ zur erwartungstreuen Schätzung der Zahl der Neurone im gesamten Schnitt und, im zweiten Schritt, in der gesamten Hemisphäre herangezogen werden:

$$NN = \sum_{i=1}^{10} \Sigma Q_i^- \cdot \frac{t_i}{H} \cdot \frac{D^2}{B} \cdot d$$

wobei NN der Schätzer für die Neuronenzahl in der gesamten Hemisphäre ist, ΣQ_i^- die gezählte, aufsummierte Zahl der Neurone in sämtlichen UVCSs im Schnitt i , t_i die Dicke des Schnittes i , H die Höhe der UVCSs, D die Distanz zwischen den UVCSs in X- und Y-Richtung, B die Grundfläche der UVCSs und d die Anzahl der Schnitte in der Hemisphäre von einem zum nächsten Schnitt der Zufallsauswahl. Im Vorfeld der stereologischen Untersuchung waren die Parameter der UVCS (Breite, Höhe, Tiefe, Distanz in X- und Y-Richtung, s. **Tabelle 4**) bereits empirisch so bestimmt worden, dass pro Hemisphäre in allen UVCSs zusammen eine ungefähre Zahl von 500 Neuronen gezählt wurde. Dieses Vorgehen resultierte in einem niedrigen Coefficient of Error ($CE < 0,1$) (Schmitz & Hof, 2000, 2005). Die Neurone selbst wurden anhand ihrer typischen Gestalt identifiziert: einem großen Perikaryon, das sich durch mehrere Dendriten kennzeichnete, und einem prominenten dunklen Nucleolus (**Abbildung 3**).

Die Neuronendichte ND der KGS einer Hemisphäre wurde zuletzt durch Division der geschätzten Neuronenzahl durch das geschätzte Volumen bestimmt. Relevante Parameter der stereologischen Untersuchung können **Tabelle 4** entnommen werden. Zur Dokumentation der Messungen

wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) genutzt.

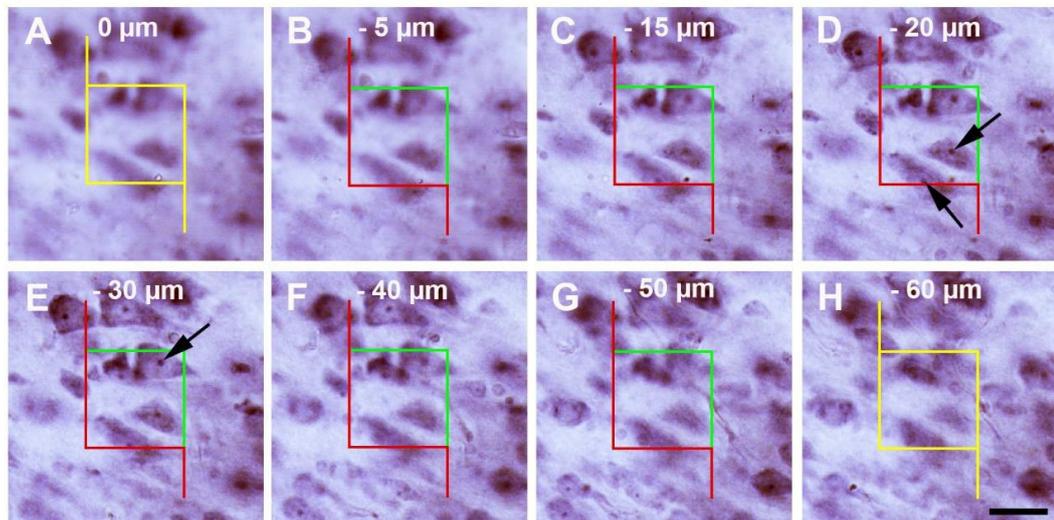


Abbildung 2: Zählverfahren mit unbiased virtual counting spaces (UVCS) im Brodmann-Areal 24 der kortikalen grauen Substanz (KGS). Die Felder zeigen beispielhaft verschiedene Fokusebenen (0 bis -60 μm) eines UVCS mit den Dimensionen Breite und Länge 42 μm sowie Höhe 50 μm . Gezählt wurden Neurone, deren Nukleolus innerhalb eines UVCS in den Fokus kam und nicht die Ausschlusslinie (rot) oder aber die Einschlusslinie (grün) des UVCS berührte. Die Felder D und E zeigen Neurone, deren Nukleolus im Fokus ist (Pfeile) und die alle Zählkriterien erfüllen. Die gelben Rahmen zeigen an, dass die Fokusebene entweder oberhalb (A) oder unterhalb (H) des UVCS lag. Die Zahlen in B bis H geben den Abstand vom oberen Rand des Schnittes an. Maßstabsbalken = 25 μm in A-H. Diese Abbildung wurde der Publikation (Gaus et al., 2022) entnommen.

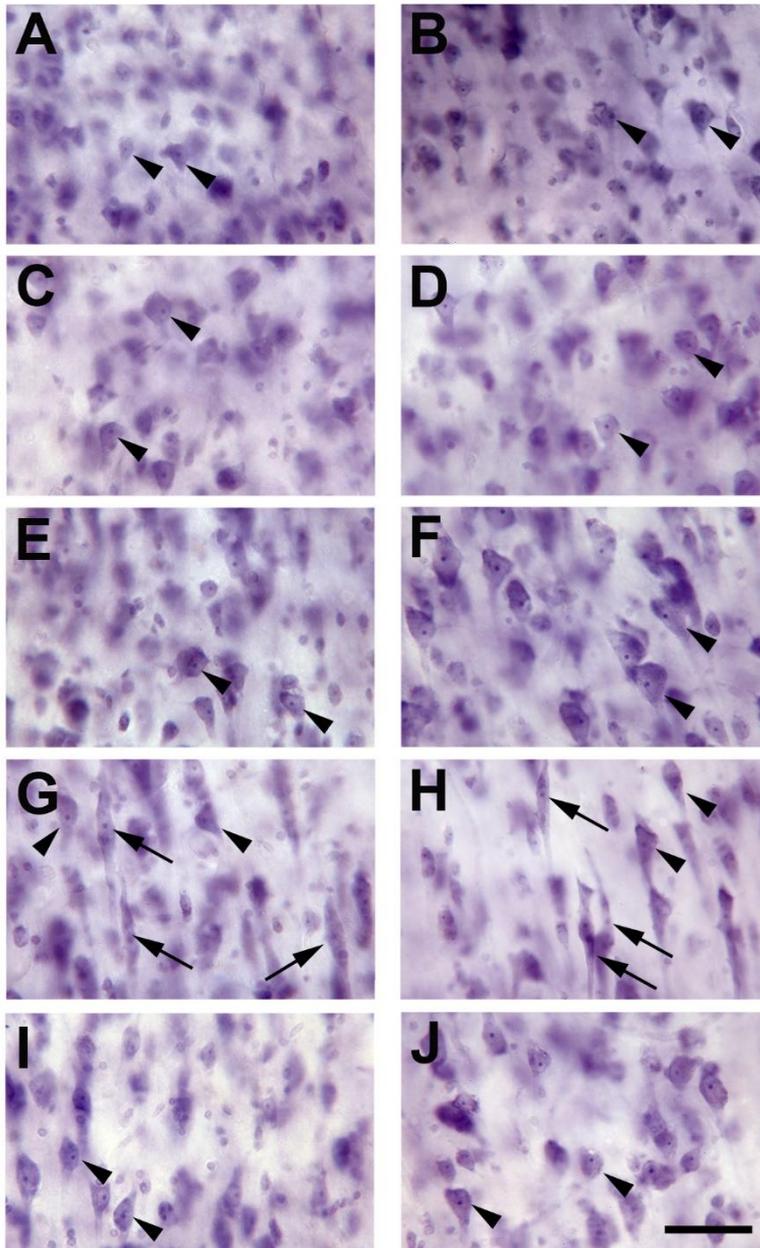


Abbildung 3: Repräsentative Mikrofotografien verschiedener Schichten in der kortikalen grauen Substanz (hier beispielhaft im Bordmann-Areal 24). Die Bildtafeln zeigen die Schichten II (A, B), III (C, D), Va (E, F), Vb (G, H) und VI (I, J) in einer Hemisphäre von einer Kontrollperson (A, C, E, G, I) und einem Patienten mit Schizophrenie (B, D, F, H, J). Die Pfeile und Pfeilspitzen zeigen auf Neurone (speziell zeigen die Pfeile auf von-Economo-Neurone und die Pfeilspitzen auf Pyramidenzellen). Maßstabsbalken = 50 μ m in A-J. Diese Abbildung wurde der Publikation (Gaus et al., 2022) entnommen.

Tabelle 4: Details der stereologischen Prozedur. Obj: Vergrößerung des benutzten Objektivs; B und H: Grundfläche und Höhe der unbiased virtual counting spaces (UVCS); D: Distanz zwischen den UVCS in senkrechten Richtungen X und Y; $\Sigma N_{\text{sections}}$: mittlere Zahl der untersuchten Schnitte pro Hemisphäre; $\Sigma UVCS$: mittlere Zahl der UVCS pro Hemisphäre; ΣQ : mittlere Zahl der gezählten Neurone pro Hemisphäre; $CE_{\text{pred}} [n]$: mittlerer vorhergesagter Coefficient of Error nach der Vorhersagemethode von Schmitz (Schmitz, 1998) und Schmitz und Hof (Schmitz & Hof, 2000); ΣP (Cavalieri): mittlere Zahl der gezählten Punkte innerhalb des KGS-Profiles pro Hemisphäre.

Obj	40x
B [μm^2]	1156
H [μm]	30
D [μm]	5000
$\Sigma N_{\text{sections}}$	10
$\Sigma UVCS$	588
ΣQ	514
$CE_{\text{pred}} [n]$	0,044
ΣP (Cavalieri)	512

3.3 Statistische Methoden

Für jede der untersuchten Ergebnisvariablen *VOL*, *NN* und *ND* wurde eine adjustierte Cohens-d-Effektstärke zwischen den Gruppen (d_{adj}) sowie ein adjustierter prozentualer Gruppenunterschied (Δ_{adj}) berechnet. Zum Vergleich wurden auch eine nicht-adjustierte Effektstärke d und ein nicht-adjustierter prozentualer Gruppenunterschied Δ ermittelt. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

3.3.1 Statistisches Modell

Die Adjustierung für Störvariablen erfolgte mittels eines linearen Modells (Kovarianzanalyse, ANCOVA (Wickens & Keppel, 2004)), das separat mit jeder der drei Ergebnisvariablen als abhängiger Variable aufgestellt wurde:

$$\hat{y}_{i,h} = \beta_0 + \beta_D \times D_i + \beta_H \times H + \beta_{Age} \times Age_i + \beta_{PMI} \times PMI_i + \beta_{Fix} \times Fix_i$$

Hierbei ist $\hat{y}_{i,h}$ der Schätzwert der jeweiligen Ergebnisvariable in der Hemisphäre $h \in \{\text{links}, \text{rechts}\}$ der Versuchsperson $i \in \{1, \dots, 21\}$ durch die ANCOVA. Die fünf unabhängigen Variablen des Modells waren die binären Variablen Diagnose (D , Kontroll- vs. Patientengruppe) und Hemisphäre (H , links vs. rechts) sowie die kontinuierlichen Variablen Alter (Age), *post mortem* Intervall (PMI) und Fixierzeit (Fix). Ein alternativer Modellentwurf mit dem zusätzlichen Interaktionsfaktor $D \times H$ wurde ebenfalls erwägt, aber verworfen, da die Einbeziehung des Interaktionsfaktors weder die Anpassungsgüte des Modells R^2 verbesserte oder die statistische Signifikanz von β_D für irgendeine Ergebnisvariable veränderte, noch der Koeffizient des Interaktionsfaktors $\beta_{D \times H}$ selbst in einem der Modelle statistisch signifikant war.

3.3.2 Überprüfung der ANCOVA-Grundannahmen

Die ANCOVA setzt eine Reihe von Grundannahmen bezüglich der Daten voraus, die vor Anwendung des Modells geprüft werden müssen (Rutherford, 2011).

Die Annahme der Normalität (Normalverteilung der abhängigen Variablen) wurde mittels Shapiro-Wilk-Test (Shapiro & Wilk, 1965) geprüft. Dieser zeigte nur bei der Neuronenzahl der rechten Hemisphären in der Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Abweichung von der Normalverteilung ($P = 0,047$) und fiel überall sonst statistisch nichtsignifikant aus (**Tabelle A1** im Anhang). Die Annahme der Homoskedastizität (Homogenität der Varianzen) wurde durch den Levene-Test (Levene, 1960) geprüft; dieser zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Varianzen der abhängigen Variablen zwischen den Diagnose-Hemisphäre-Untergruppen (**Tabelle A2** im Anhang). Die Annahme der Homogenität der Regressionssteigungen wurde mittels Fittings eines allgemeinen linearen Modells geprüft, das alle Interaktionsfaktoren Diagnose x Covariate berücksichtigte. Bis auf einen Fall (Diagnose x PMI auf Volumen der KGS, $P = 0,006$) waren alle Interaktionsfaktoren statistisch nichtsignifikant (**Tabelle A3** im Anhang). Die Annahme der Linearität (lineare Abhängigkeit der Ergebnisvariablen von den Covariaten) wurde durch die Betrachtung der Residuen der Ergebnisvariablen des finalen ANCOVA-Modells geprüft. Diese wiesen in allen Fällen keine statistisch signifikanten Abweichungen von der Normalverteilung auf (**Tabelle A4** im Anhang).

Die Annahme der Unabhängigkeit der Beobachtungen wurde dadurch verletzt, dass jeweils zwei Hemisphären (linke und rechte) vom selben Teilnehmer einbezogen wurden. Auch die Annahme, dass die „Behandlung“ (hier Diagnose) und Covariaten statistisch unabhängig voneinander sind, wurde nicht erfüllt. Vielmehr zeigten die Covariaten Fix und PMI statistisch signifikante Gruppenunterschiede ($P = 0,012$, $P = 0,008$) zwischen den Patienten mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen (**Tabelle A5** im Anhang).

3.3.3 Variablenkodierung

Zur besseren Interpretierbarkeit des Modells wurden einige Anpassungen der Variablenkodierung vorgenommen. Für D wurde Referenzkodierung verwendet, d.h. $D_i = 0$ bezeichnete die Zugehörigkeit zur Kontrollgruppe und $D_i = 1$ diejenige zur Patientengruppe. Dadurch entsprach der Interzept β_0 dem Mittelwert der Ergebnisvariable in der Kontrollgruppe nach Adjustierung für die anderen unabhängigen Variablen. Der Koeffizient der Diagnose-Variable β_D entsprach der adjustierten Gruppendifferenz von Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen. β_D konnte so im nächsten Schritt direkt zur Berechnung von d_{adj} und Δ_{adj} herangezogen werden (s. unten). Für H wurde hingegen Kontrastkodierung angewandt, d.h. die linke Hemisphäre wurde durch $H = -1$ und die rechte durch $H = 1$ identifiziert. Dadurch repräsentierte β_0 einen neutralen Mittelwert zwischen der linken und rechten Hemisphäre, und sowohl für den Effekt der linken als auch der rechten Hemisphäre musste ein Wert abgezogen bzw. hinzugefügt werden. Age , PMI und Fix wurden vor Berechnung des Modells mittelwertzentriert, damit β_0 einer Versuchsperson mit durchschnittlichem Alter, PMI und Fix entsprach.

3.3.4 Berechnung der adjustierten Effektstärken

Die d_{adj} -Werte konnten nun aus β_D und der gepoolten Standardabweichung S_{pooled} nach Cooper et al. (Cooper et al., 2019) berechnet werden. S_{pooled} wurde aus der Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers des Modells $\sqrt{MSE_{total}}$ bestimmt.

$$d_{\text{adj}} = \frac{\beta_D}{S_{\text{pooled}}} = \frac{\beta_D}{\sqrt{MSE_{\text{total}}}}$$

In Übereinstimmung mit Cooper et al. (Cooper et al., 2019) wurden Effektstärken in den Bereichen 0,2-0,5, 0,5-0,8 und über 0,8 als jeweils klein, mittel und groß interpretiert.

Die adjustierten prozentualen Gruppenunterschiede Δ_{adj} wurden durch Division von β_D durch β_0 berechnet:

$$\Delta_{\text{adj}} = \frac{\beta_D}{\beta_0}$$

Die P -Werte wurden aus der t -Statistik der ANCOVA ermittelt. Schließlich wurden die Rohwerte der drei Ergebnisvariablen (VOL , NN , ND) aller Versuchspersonen für Age , PMI und Fix adjustiert. Dies geschah durch Subtraktion des geschätzten linearen Effekts dieser Störvariablen vom Rohwert $y_{i,h}$ (die Störvariablen mussten vor dieser Berechnung wieder mittelwertzentriert werden):

$$y_{\text{adj},i,h} = y_{i,h} - (\beta_{\text{Age}} \times \text{Age}_i + \beta_{\text{PMI}} \times \text{PMI}_i + \beta_{\text{Fix}} \times \text{Fix}_i)$$

Die so bereinigten Ergebniswerte wurden für jede Diagnose- und Hemisphärengruppe mittels Boxplots dargestellt.

3.3.5 Berechnung der nicht-adjustierten Effektstärken

Die nicht-adjustierte Effektstärke d wurde aus dem Quotienten des Gruppenunterschiedes der jeweiligen Ergebnisvariable und der gepoolten Standardabweichung S_{pooled} berechnet:

$$d = \frac{\bar{y}_{D=1} - \bar{y}_{D=0}}{S_{\text{pooled}}}$$

Der nicht-adjustierte prozentuale Gruppenunterschied Δ berechnete sich durch Division des Gruppenunterschiedes der jeweiligen Ergebnisvariable durch den Mittelwert der Ergebnisvariable in der Kontrollgruppe:

$$\Delta = \frac{\bar{y}_{D=1} - \bar{y}_{D=0}}{\bar{y}_{D=0}}$$

Die P -Werte wurden hier aus der t -Statistik des Welch's t -Tests (Welch, 1947) berechnet.

Die statistische Analyse wurde durchgeführt mit den Python-Bibliotheken pandas (McKinney, 2010), statsmodels (Seabold & Perktold, 2010) und SciPy (Virtanen et al., 2020). Die grafische Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism (Version 9 für Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. Ergebnisse

Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im mittleren Volumen der KGS zwischen den Patienten mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen festgestellt. Nach Adjustierung für Hemisphäre, Alter, PMI und Fix war bei den Patienten mit Schizophrenie das mittlere Volumen der KGS um 6,3% niedriger als bei den Kontrollpersonen ($d_{\text{adj}} = -0,61$; $P = 0,095$; **Abbildung 4A**).

Dagegen fand sich eine statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronenzahl in der KGS bei den Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu den Kontrollpersonen ($\Delta_{\text{adj}} = -14,9\%$; $d_{\text{adj}} = -0,94$; $P = 0,007$; **Abbildung 4B**). Ebenso zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der mittleren Neuronendichte in der KGS bei den Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu den Kontrollpersonen ($\Delta_{\text{adj}} = -9,6\%$; $d_{\text{adj}} = -0,57$; $P = 0,041$; **Abbildung 4C**). Die zugehörigen adjustierten Cohens-d-Effektstärken mitsamt 95%-Konfidenzintervallen sind in **Abbildung 4D** gezeigt. Die Ergebnisse der statistischen Analyse (P -Werte der ANCOVA-Koeffizienten) sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

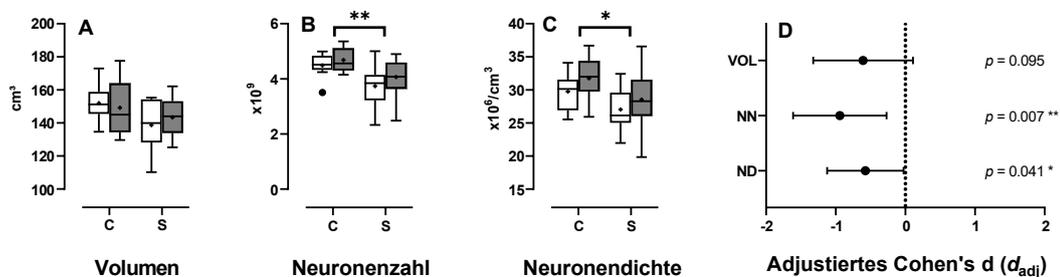


Abbildung 4: Ergebnisse der stereologischen Analyse mit Adjustierung für Störvariablen. Die Panels zeigen Tukey-Box-Plots des Gesamtvolumens (A), der Gesamt-Neuronenzahl (B) und der Neuronendichte (C) in der kortikalen grauen Substanz nach Adjustierung für Störvariablen in der linken (offene Kästen) und rechten (graue Kästen) Hemisphäre der Patienten mit Schizophrenie (S) und der Kontrollpersonen (C), sowie die 95%-Konfidenzintervalle der adjustierten Cohens-d-Effektstärken (d_{adj}) für jedes Ergebnis (D). Statistisch signifikante Ergebnisse sind gekennzeichnet (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).

Tabelle 5: Ergebnisse der statistischen Analyse: P -Werte der ANCOVA-Variablen. P -Werte $< 0,05$ sind fettgedruckt. PMI: *post mortem* Intervall; Fix: Fixierzeit.

Variable	Alter	PMI	Fix	Diagnose	Hemisphäre
Volumen	0,072	0,090	0,480	0,095	0,802
Neuronenzahl	0,035	<0,001	0,064	0,007	0,179
Neuronendichte	<0,001	<0,001	0,070	0,041	0,127

Unter den Störvariablen hatte das Alter einen statistisch signifikanten Effekt auf die Neuronenzahl ($\beta_{\text{Age}} = +0,028 \times 10^9$ pro Jahr Alter, $P = 0,035$) und auf die Neuronendichte ($\beta_{\text{Age}} = +0,313 \times \frac{10^6}{\text{cm}^3}$ pro Jahr Alter, $P < 0,001$). Auch das PMI hatte einen statistisch signifikanten Effekt auf die Neuronenzahl ($\beta_{\text{PMI}} = +0,024 \times 10^9$ pro Stunde PMI, $P < 0,001$) und auf die Neuronendichte ($\beta_{\text{PMI}} = +0,221 \times \frac{10^6}{\text{cm}^3}$ pro Stunde PMI, $P < 0,001$). Da diese Variablen als unabhängige Variablen in das ANCOVA-Modell aufgenommen und somit statistisch kontrolliert wurden, waren die oben

festgestellten, statistisch signifikanten Unterschiede in der Neuronenzahl und -dichte bei den Patienten mit Schizophrenie nicht auf Unterschiede im Alter oder im PMI zurückzuführen. Schließlich wurden keine weiteren statistisch signifikanten Effekte von Störvariablen auf die Ergebnisvariablen beobachtet; insbesondere gab es auch keine hemisphärischen Asymmetrien.

Bei Durchführung der statistischen Analyse ohne Adjustierung für Störvariablen erschien das mittlere Volumen der KGS hingegen mit $\Delta = -6,3\%$ statistisch signifikant niedriger bei den Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu den Kontrollpersonen ($d = -0,65$; $P = 0,045$; **Abbildung 5A**). Dagegen war sowohl bei der mittleren Neuronenzahl ($\Delta = -4,4\%$; $d = -0,27$; $P = 0,398$; **Abbildung 5B**) als auch bei der mittleren Neuronendichte ($\Delta = +2,3\%$; $d = +0,13$; $P = 0,681$; **Abbildung 5C**) in der unadjustierten Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar. Die zugehörigen Cohens-d-Effektstärken mitsamt 95%-Konfidenzintervallen sind in **Abbildung 5D** dargestellt.

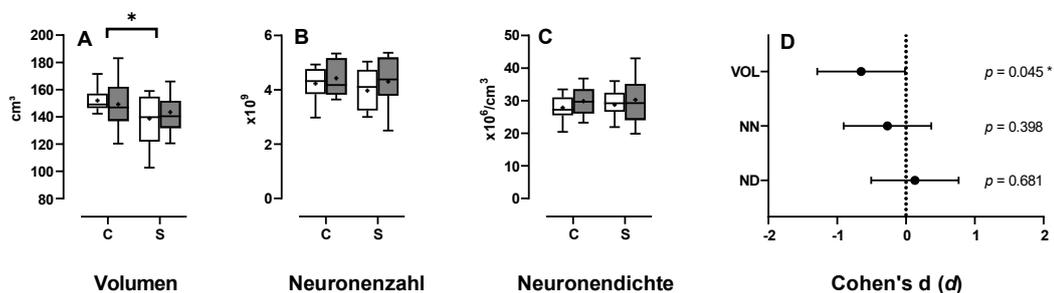


Abbildung 5: Ergebnisse der stereologischen Analyse ohne Adjustierung für Störvariablen. Die Panels zeigen Tukey-Box-Plots des Gesamtvolumens (A), der Gesamt-Neuronenzahl (B) und der Neuronendichte (C) in der kortikalen grauen Substanz in der linken (offene Kästen) und rechten (graue Kästen) Hemisphäre der Patienten mit Schizophrenie (S) und der Kontrollpersonen (C), sowie die 95%-Konfidenzintervalle der Cohens-d-Effektstärken (d) für jedes Ergebnis (D). Statistisch signifikante Ergebnisse sind gekennzeichnet (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).

Eine Auflistung der in jeder untersuchten Hemisphäre ermittelten nicht-adjustierten Rohwerte der Ergebnisvariablen findet sich in **Tabelle 6**.

Tabelle 6: Ermittelte Ergebniswerte für jede Hemisphäre. Aufgelistet sind die ermittelten nicht-adjustierten Rohwerte für Volumen, Neuronenzahl und Neuronendichte in jeder untersuchten Hemisphäre.

Fallnr.	Hemisphäre	Volumen [cm ³]	Neuronenzahl [×10 ⁹]	Neuronendichte [×10 ⁶ /cm ³]
C2	L	145,95	2,979	20,41
C2	R	146,87	3,644	24,81
C3	L	157,20	4,291	27,29
C3	R	183,02	4,253	23,23
C5	L	157,12	4,750	30,23
C5	R	134,03	3,912	29,19
C6	L	154,05	3,975	25,80
C6	R	152,17	4,104	26,97
C7	L	149,48	4,816	32,22
C7	R	159,15	5,183	32,57
C8	L	147,36	4,931	33,46
C8	R	146,80	5,337	36,36
C9	L	171,51	4,659	27,16
C9	R	171,09	5,154	30,12
C10	L	142,28	4,355	30,61
C10	R	138,17	5,081	36,77
C12	L	148,62	3,668	24,68
C12	R	120,39	3,850	31,98
C13	L	146,60	3,898	26,59
C13	R	140,78	3,730	26,49
S1	L	132,17	4,761	36,02
S1	R	149,80	5,261	35,11
S2	L	154,88	4,738	30,59
S2	R	140,48	4,108	29,24
S3	L	139,74	3,137	22,44
S3	R	165,93	3,785	22,81
S4	L	158,96	4,286	26,96
S4	R	165,75	4,382	26,43
S5	L	152,07	3,332	21,91
S5	R	139,14	3,357	24,12
S6	L	148,70	3,953	26,58
S6	R	139,13	3,892	27,97
S7	L	121,80	3,241	26,61
S7	R	125,98	2,503	19,86
S8	L	155,20	5,038	32,46
S8	R	147,13	4,935	33,54
S9	L	121,63	4,115	33,83
S9	R	131,87	5,367	40,69
S10	L	102,74	3,001	29,20
S10	R	120,62	5,188	43,01
S12	L	138,46	4,106	29,65
S12	R	151,72	4,557	30,03

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die design-based Stereologie zur Untersuchung der KGS in *post mortem* Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie und Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung verwendet. Dies ist die erste Arbeit, die Neuronenzahl und -dichte in der gesamten KGS von Patienten mit Schizophrenie unter Berücksichtigung der Störvariablen Fix und PMI untersuchte. Im Vergleich zu der Gruppe der Kontrollpersonen wurde eine statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronenzahl ($-14,9\%$) und -dichte ($-9,6\%$) bei den Patienten mit Schizophrenie gefunden, während sich das mittlere Volumen der KGS zwischen den Gruppen nicht statistisch signifikant unterschied. In der Analyse ohne Berücksichtigung von Störvariablen zeigte sich hingegen ein umgekehrtes Ergebnis mit einem statistisch signifikant niedrigeren mittleren Volumen der KGS, aber keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mittleren Neuronenzahl und -dichte. Zwischen den Störvariablen und den Ergebnisvariablen bestanden somit einige statistisch signifikante Zusammenhänge.

Methodisch wurde durch die Umsetzung bewährter Design-Empfehlungen für Gehirnbanken eine hochwertige Auswahl der Studienteilnehmer erreicht, wobei einige Limitationen in Form einer kleinen Stichprobengröße und einer mangelnden Erfassung klinischer Variablen verblieben. Die neuropathologische Präparationsmethode war gut geeignet für die in der vorliegenden Arbeit erforderliche genaue Identifikation von Neuronen und Abgrenzung kortikaler Laminae. Durch die Anwendung von design-based Stereologie, die den Goldstandard in quantitativen neuropathologischen Untersuchungen darstellt, wurde eine hohe Validität und angemessene Reliabilität der Schätzungen von Volumen und Neuronenzahl erreicht. Die statistische Auswertung mittels ANCOVA erlaubte die Berücksichtigung wichtiger neuropathologischer Störfaktoren wie PMI und Fix. Für eine ausführliche Diskussion der eingesetzten Methoden siehe **Abschnitt 5.3**.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Kein statistisch signifikanter Unterschied im mittleren Volumen der KGS zwischen den Patienten mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen

In der vorliegenden Arbeit wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im mittleren Volumen der KGS zwischen den Patienten mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen festgestellt ($p = 0,095$). Dabei war das mittlere Volumen der KGS bei den Patienten mit Schizophrenie um $6,3\%$ geringer als bei den Kontrollpersonen, und die Effektstärke entsprach $d_{adj} = -0,61$.

In der Literatur gehört ein niedrigeres mittleres kortikales Volumen zu den am besten belegten gehirnmorphologischen Befunden bei PatientInnen mit Schizophrenie (Harrison, 2008). Die Belege stammen dabei zum weit überwiegenden Teil aus klinischen Bildgebungsstudien. Bei der metaanalytischen Beurteilung von MRT-Studien, die das kortikale Volumen von PatientInnen mit Schizophrenie und Kontrollpersonen verglichen, konnten so Cohen's-d-Effektstärken von $-0,43$ (Wright et al., 2000) bzw. $-0,28/-0,27$ (für linke/rechte Hemisphären) (Haijma et al., 2013) festgestellt werden. In einer aktuelleren großen Metaanalyse (van Erp et al., 2018) wurden

Effektstärken von $-0,530/-0,516$ (für linke/rechte Hemisphären) für die kortikale Dicke und $-0,251/-0,254$ für die kortikale Oberfläche gefunden, was ebenfalls ein niedrigeres mittleres kortikales Volumen impliziert. Auch Untersuchungen von spezifischen Kortexarealen (Honea et al., 2005; Wright et al., 2000) ergaben über den gesamten Kortex verteilt und insbesondere im Bereich der Temporal- und Frontallappen niedrigere mittlere kortikale Volumina bei PatientInnen mit Schizophrenie als bei Kontrollpersonen. In neuropathologischen *post mortem* Studien konnte der Befund eines niedrigeren mittleren kortikalen Volumens bei PatientInnen mit Schizophrenie als bei Kontrollpersonen teils repliziert werden (Kreczmanski et al., 2007; Pakkenberg, 1987, 1993; Zhang et al., 2016), teils wurde jedoch auch kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden (Heckers et al., 1991).

Zur Messung des Volumens der KGS stehen grundsätzlich mehrere Methoden zur Verfügung. Die weitverbreitete Volumenmessung mittels struktureller MRT in Kombination mit automatischen Segmentierungsalgorithmen ist aufgrund technischer Weiterentwicklungen eine hochreliable Methode (Hedges et al., 2022). Gleichzeitig unterliegt sie spezifischen situativen Störvariablen wie Bewegungsartefakten und Unterschieden in der Gewebepfusion aufgrund von Medikation oder Veränderungen im Flüssigkeitsstatus (Weinberger & Radulescu, 2016). Bei ungleicher Verteilung dieser Störvariablen zwischen PatientInnen- und Kontrollgruppe (beispielsweise, wenn PatientInnen mit Schizophrenie im MRT-Gerät stärker zu Bewegungen neigen als Kontrollpersonen) kann es hier zu falschen Befunden kommen.

Zur Erhöhung der Validität der gehirnmorphologischen Befunde bei Schizophrenie ist es empfehlenswert, Ergebnisse aus Bildgebungsstudien im Sinne einer Triangulation mit Ergebnissen aus methodisch diversen Studien zu ergänzen. Die Messung des KGS-Volumens in *post mortem* Studien in Kombination mit der Cavalieri-Methode und Punktzählung an Gehirnschnitten kann hierbei als wertvolle ergänzende Methode betrachtet werden. Diese unterliegt zwar ebenfalls spezifischen Störvariablen wie dem PMI und der Fix (Agam et al., 2002), ist dafür aber nicht von MRT-spezifischen Störvariablen betroffen. Eine Stärke der vorliegenden Arbeit stellt in diesem Hinblick die Erweiterung der begrenzten neuropathologischen *post mortem* Literatur zu kortikalen Volumenunterschieden bei PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zu Kontrollpersonen um einen weiteren Datenpunkt dar. Es muss dabei selbstverständlich bedacht werden, dass MRT- und *post mortem* Studien auch gemeinsame Störvariablen wie Rauchen oder Medikation haben, die im Optimalfall auf andere Weise berücksichtigt werden sollten. Zudem ist ein gewichtiger Nachteil von *post mortem* Studien die üblicherweise geringe Stichprobengröße, die die Detektion von kleinen Gruppenunterschieden aufgrund von geringer Power evtl. unmöglich macht.

Die Effektstärke von $-0,61$ des in der vorliegenden Arbeit festgestellten Gruppenunterschieds im mittleren Volumen der KGS ist bemerkenswerterweise vergleichbar mit den Effektstärken aus der Bildgebungsliteratur, jedoch erreichte diese nicht das statistische Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Insgesamt konnte somit der Befund eines niedrigeren mittleren kortikalen Volumens bei PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zu Kontrollpersonen nicht bestätigt werden.

5.2.2 Statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronenzahl bei den Patienten mit Schizophrenie als bei den Kontrollpersonen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronenzahl in der KGS in der Gruppe der Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt ($d_{\text{adj}} = -0,94$; $P = 0,007$). In der bisherigen Literatur wurde diese Größe kaum erforscht. Tatsächlich ist nur eine weitere Studie (Pakkenberg, 1993) bekannt, die Unterschiede in der

gesamtkortikalen Neuronenzahl bei PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zu Kontrollpersonen untersuchte. Dort wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden. Allerdings verwendete diese Studie zwar einen validen stereologischen Messansatz; zum Gruppenvergleich wurde aber ein einfacher t-Test herangezogen. Über ein Altersmatching hinaus wurde keine Berücksichtigung von Störvariablen vorgenommen.

Dabei sprechen einige Argumente dafür, dass PMI bei der Bestimmung der kortikalen Neuronenzahl eine relevante Störvariable sein könnte. So legen auf der einen Seite zwar einige Daten nahe, dass PMI keinen Einfluss auf die neuropathologische Morphologie hat (Blair et al., 2016). Auf der anderen Seite weist aber das Ergebnis der vorliegenden statistischen Analyse ohne Berücksichtigung von Störvariablen (hierbei wurde wie bei (Pakkenberg, 1993) kein statistisch signifikanter Gruppenunterschied bei der mittleren Neuronenzahl in der KGS zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen gefunden) auf einen relevanten Einfluss dieser Störvariablen (Alter, PMI, Fix, Hemisphäre) auf die Neuronenzahl hin. Einen solchen Hinweis liefert auch die in der vorliegenden Arbeit festgestellte, statistisch signifikante Assoziation zwischen PMI und Neuronenzahl ($\beta_{PMI} = +0,024 \times 10^9$ pro Stunde PMI, $P < 0,001$). Unter Umständen kann die Berücksichtigung dieser Variable in der vorliegenden Arbeit deswegen als Stärke im Vergleich zur Studie von (Pakkenberg, 1993) angesehen werden und liefert möglicherweise eine weniger verzerrte Schätzung des kausalen Effekts.

Weitere Studien untersuchten die Neuronenzahl in abgegrenzten kortikalen Regionen statt dem gesamten Kortex. In einer Untersuchung des dorsolateralen präfrontalen Kortex (Akbarian et al., 1995) wurde zwischen einer Gruppe von PatientInnen mit Schizophrenie und einer bezüglich Alter, Geschlecht und Autolyse-Zeit gematchten Kontrollgruppe in dieser Region kein statistisch signifikanter Unterschied in der mittleren Neuronenzahl gefunden. Auch eine Bestimmung der Neuronenzahl im präfrontalen Kortex (Thune et al., 2001) ergab keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied. Dabei erfolgte ein Matching bezüglich Alter, es wurden statistisch signifikante Gruppenunterschiede des PMI und Fix zwischen den Gruppen ausgeschlossen, und ein valider stereologischer Ansatz wurde angewendet. Im Unterschied dazu ergab eine Untersuchung des primären visuellen Kortex (Dorph-Petersen et al., 2007) eine statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronenzahl in einer Gruppe von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zu Kontrollpersonen. Auch hier kam ein valider stereologischer Ansatz unter Zuhilfenahme der optical fractionator Methode zum Einsatz; zudem fanden PMI und zahlreiche weitere Variablen wie Gehirn-pH und die Dauer der Gewebelagerung Berücksichtigung. Da die Befunde in abgegrenzten kortikalen Regionen jedoch nicht auf den gesamten Kortex verallgemeinerbar sind, können sie nicht zur Beurteilung der Neuronenzahl in der globalen KGS herangezogen werden. Eine Stärke der vorliegenden Arbeit ist die Anwendung eines design-based stereologischen Zählverfahrens, das als Goldstandard in der quantitativen Untersuchung von *post mortem* Geweben gilt (von Bartheld et al., 2016).

Anders als bisher angenommen deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine Verringerung der mittleren Neuronenzahl in der KGS bei Schizophrenie hin. Diese kann entweder durch eine primäre Minderanlage von Neuronen im Rahmen einer gestörten Gehirnentwicklung oder durch einen Untergang zuvor angelegter Neurone im Rahmen einer Neurodegeneration bedingt sein. In der Tat weisen Daten aus genetischen und Tiermodellstudien darauf hin, dass Störungen der neuronalen Proliferation und Migration eine Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie spielen könnten (Muraki & Tanigaki, 2015). Durch eine mangelnde Entstehung oder Wanderung von kortikalen Neuronen an ihren Zielort könnten diese Mechanismen zu einer verminderten kortikalen Neuronenzahl führen.

Gleichzeitig liegen zahlreiche Hinweise vor, dass es bei PatientInnen mit Schizophrenie während der Adoleszenz aufgrund eines überaktiven synaptischen Prunings zu einem exzessiven Verlust von Synapsen kommt (Howes & Onwordi, 2023). So legen genetische Daten eine erhöhte Aktivität des C4-Komplements, das die Elimination von Synapsen durch Mikroglia mediert, im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie nahe (Sekar et al., 2016). Zudem wurde wiederholt eine niedrigere mittlere Anzahl von dendritic spines an Neuronen im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie festgestellt, welches ein Surrogatmarker für die Anzahl an Synapsen ist (Glausier & Lewis, 2013). Für eine verminderte Synapsenzahl spricht auch der Befund einer verminderten Konzentration synaptischer Proteine (Osimo et al., 2019). Da Neuronen über synaptische Verbindungen trophische Stimuli erhalten, die diese am Leben erhalten (Davies, 2003), könnte ein Verlust von Synapsen während der Gehirnentwicklung über eine vermehrte neuronale Apoptose zu einer verminderten mittleren Anzahl von kortikalen Neuronen im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie führen. Es wurde zudem in der Erforschung der Alzheimer-Demenz gezeigt, dass Mikroglia Entzündungsmediatoren sezernieren können, die zu einer Neurodegeneration führen können (Wyss-Coray & Rogers, 2012). So könnte es über eine erhöhte Mikroglia-Aktivität im Rahmen eines exzessiven Pruning durch neuroinflammatorische Prozesse ebenfalls zu einem Untergang von Neuronen und einer verringerten mittleren Neuronenzahl kommen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die niedrigere mittlere Neuronenzahl in der KGS von PatientInnen mit Schizophrenie ist eine erhöhte Vulnerabilität kortikaler Neurone gegenüber einem altersabhängigen Untergang. In diesem Fall wäre der Verlust der Neurone eine „downstream“-Konsequenz der Erkrankung an Schizophrenie und nicht Teil der für die klinische Primärmanifestation ursächlichen Pathophysiologie. Die Hypothese einer solchen erhöhten Vulnerabilität gegenüber einer altersbedingten Neurodegeneration wird auch von dem erhöhten Demenz-Risiko von PatientInnen mit Schizophrenie gestützt (Cai & Huang, 2018). Darüber hinaus gibt es jedoch keine stichhaltigen Hinweise für einen beschleunigten kognitiven Abbau bei PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zur Normalbevölkerung (McCutcheon et al., 2023). Zudem sprechen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht für eine verstärkte altersabhängige Neurodegeneration, da das Patientenalter nicht negativ, sondern statistisch signifikant positiv mit der Neuronenzahl in der KGS korrespondierte ($\beta_{Age} = +0,028 \times 10^9$ pro Jahr Alter, $P = 0,035$).

Die in den letzten Absätzen beschriebenen Prozesse entsprechen sowohl einer Störung der Gehirnentwicklung (Störungen der neuronalen Proliferation und Migration, exzessives synaptisches Pruning) als auch einer Neurodegeneration, die weiter unterteilt werden kann in Prozesse, die möglicherweise einer klinischen Erstmanifestation der Erkrankung kausal vorausgehen (neuronale Apoptose durch Verlust trophischer Stimuli und Mikroglia-assoziierte Neuroinflammation), und solche, die der Erstmanifestation nachgelagert sind und für diese keine kausale Relevanz haben (erhöhte Vulnerabilität von Neuronen gegenüber einem altersbedingten Untergang). Dabei ist das derzeit akzeptierte ätiologische Modell der Schizophrenie das einer gestörten prä- und postnatalen Gehirnentwicklung, während klassische neurodegenerative Prozesse weniger als Faktor in der Pathophysiologie angesehen werden, da eine Gliose, wie sie für klassische Neurodegeneration typisch ist, im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie nicht gefunden werden konnte (Lewis & Levitt, 2002). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Schizophrenie weder eine typische Gehirnentwicklungsstörung noch eine klassische neurodegenerative Erkrankung ist, sondern Elemente beider Störungstypen aufweist (Ashe et al., 2001). Letztendlich kann die Frage nach der Ätiologie der niedrigeren mittleren Neuronenzahl in der KGS bei PatientInnen mit Schizophrenie mit den vorliegenden Daten nicht sicher beantwortet werden. Stereologische *post mortem* Studien wie die vorliegende Arbeit erlauben immer nur einen einzigen Schnappschuss der Neuropathologie der Gehirne Erkrankter und lassen keinen Einblick in den zeitlichen Verlauf zu.

Insbesondere liegen nur Präparate von PatientInnen *nach* der klinischen Erstmanifestation der Schizophrenie vor. Mit diesen lässt sich nicht beantworten, ob neuropathologische Veränderungen bereits vor der klinischen Erstmanifestation vorlagen und somit durch ihr zeitliches Vorhergehen eine mögliche kausale Rolle bei der Ausprägung dieser spielten.

Die sehr kleine Zahl bisheriger Studien zur kortikalen Neuronenzahl bei PatientInnen mit Schizophrenie sollte durch weitere Untersuchungen ergänzt werden, um den Befund der vorliegenden Arbeit einer verminderten mittleren Neuronenzahl in den *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu den Kontrollpersonen entweder zu bestätigen oder zu widerlegen und diese Überlegungen auf ein stärkeres empirisches Fundament zu stellen.

5.2.3 Statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronendichte bei den Patienten mit Schizophrenie als bei den Kontrollpersonen

Neben der mittleren Neuronenzahl war in der vorliegenden Arbeit auch die mittlere Neuronendichte in der KGS in der Gruppe der Patienten mit Schizophrenie statistisch signifikant niedriger als bei den Kontrollpersonen ($d_{adj} = -0,57$; $P = 0,041$). Dieses Ergebnis kontrastiert mit früheren Studien, die überwiegend eine höhere mittlere kortikale Neuronendichte bei Schizophrenie feststellten (Bakhshi & Chance, 2015). Solche Befunde höherer Neuronendichten führten in Zusammenschau mit dem gut replizierten Befund eines niedrigeren kortikalen Volumens (Haijma et al., 2013; van Erp et al., 2018; Wright et al., 2000) zur Reduced-Neuropil-Hypothese der Schizophrenie (Selemon & Goldman-Rakic, 1999), die ein vermindertes Volumen des kortikalen Neuropils als pathophysiologisches Merkmal der Schizophrenie postuliert. Demnach kommt es durch eine Volumenabnahme des interzellulären Neuropils zu einer dichteren Lagerung von Neuronen im Kortex, wodurch die Neuronendichte steigt. Da synaptische Verbindungen einen großen Anteil am Neuropil ausmachen (Purves et al., 2018), korrespondiert die Reduced-Neuropil-Hypothese auch gut mit der Hypothese eines überaktiven synaptischen Pruning.

Auf der anderen Seite steht der Reduced-Neuropil-Hypothese entgegen, dass der Befund einer höheren mittleren kortikalen Neuronendichte nicht konsistent repliziert werden konnte und auch Befunde einer gleichen oder niedrigeren mittleren Dichte nicht selten sind (Bakhshi & Chance, 2015). In einer metaanalytischen Auswertung von *post mortem* Studien fanden Bakhshi und Chance (Bakhshi & Chance, 2015) eine Altersabhängigkeit des Gruppenunterschiedes der mittleren kortikalen Neuronendichte. Als Erklärung schlugen sie ein Modell vor, dass bei PatientInnen mit Schizophrenie die natürliche Zunahme der kortikalen Neuronendichte mit dem Alter langsamer als bei Gesunden verläuft, wodurch bei jüngeren PatientInnen (bis ca. 70 Jahren) zwar noch eine höhere mittlere Neuronendichte als bei Kontrollpersonen besteht, sich dieser Unterschied aber bei PatientInnen mit Schizophrenie im höherem Alter (ab etwa 70 Jahren) umkehrt und dann eine relativ niedrigere mittlere kortikale Neuronendichte bei diesen vorkommt. Der in der vorliegenden Arbeit festgestellte, statistisch signifikant positive Zusammenhang zwischen der Neuronendichte und dem Alter der Studienteilnehmer ($\beta_{Age} = +0,313 \times \frac{10^6}{cm^3}$ pro Jahr Alter, $P < 0,001$) unterstützt diese Hypothese. Dagegen spricht jedoch das eher junge Alter der untersuchten Probanden (unter 70 Jahren), das der Hypothese zufolge eher eine höhere mittlere kortikale Neuronendichte in der Gruppe der Patienten mit Schizophrenie erwarten lassen sollte.

Wichtig zu beachten ist, dass fast alle bisherigen Studien die Neuronendichte in abgegrenzten kortikalen Arealen insbesondere im Frontal- und Temporallappen statt im gesamten Kortex untersuchten (Bakhshi & Chance, 2015). Eine Verallgemeinerung von Unterschieden in mittleren Neuronendichten in diesen lokalen Bereichen auf die gesamte KGS ist aber – wenn überhaupt –

nur begrenzt möglich. Insbesondere schließt die Feststellung einer lokal höheren mittleren Neuronendichte die Möglichkeit einer global niedrigeren mittleren Neuronendichte keineswegs aus. In diesem Zusammenhang liefern auch die Ergebnisse der einzigen bekannten Studie zur Untersuchung der kortikalen Neuronendichte in allen Hirnlappen (Pakkenberg, 1993) keine eindeutige Unterstützung für eine globale Gültigkeit der Reduced-Neuropil-Hypothese. Hier wurde einzig im Temporallappen eine höhere mittlere kortikale Neuronendichte bei PatientInnen mit Schizophrenie festgestellt, jedoch keine statistisch signifikanten Dichteunterschiede in den Frontal-, Parietal- und Okzipitalappen. Komplizierend kommt jedoch hinzu, dass die Interpretierbarkeit dieser Studie durch eine fehlende Berücksichtigung von Störvariablen wie PMI und Fix limitiert ist (es erfolgte lediglich ein Matching bezüglich Alter). Da die Schätzung der Neuronendichte direkt von der Schätzung der Neuronenzahl abgeleitet ist, ist genau wie bei letzterer ein verzerrender Einfluss durch beispielsweise PMI nicht auszuschließen, insbesondere deswegen, da in der vorliegenden Arbeit ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PMI und Neuronendichte festgestellt wurde ($\beta_{PMI} = +0,221 \times \frac{10^6}{cm^3}$ pro Stunde PMI, $P < 0,001$). Eine Stärke der vorliegenden Arbeit ist, dass sie als eine der wenigen Studien zur Neuropathologie der Schizophrenie die KGS in ihrer Gesamtheit anstatt von abgegrenzten kortikalen Arealen untersuchte, und dabei mit dem design-based stereologischen Zählverfahren eine vergleichsweise hochwertige Methode verwendet wurde.

Zusammenfassend korrespondiert der Befund einer statistisch signifikant niedrigeren mittleren Neuronendichte in der KGS bei den Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu den Kontrollpersonen wie auch schon der Befund einer statistisch signifikant niedrigeren mittleren Neuronenzahl mit der Annahme eines (beispielsweise Pruning-assoziierten) Verlustes oder einer gestörten Proliferation oder Migration kortikaler Neurone im Rahmen einer gestörten Gehirnentwicklung. In Zusammenschau mit den anderen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liefert diese somit wichtige Hinweise auf eine Abnahme der mittleren Neuronenzahl und -dichte in der KGS bei einem gleichbleibenden mittleren kortikalen Volumen bei Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu Kontrollpersonen. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von quantitativen neuropathologischen Daten für den gesamten Kortex von PatientInnen mit Schizophrenie sind weitere Studien für die Stützung oder Widerlegung dieser Hypothese notwendig.

5.2.4 Einfluss der Störvariablen

In der Stichprobe, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ging höheres Alter mit einer statistisch signifikant höheren Neuronenzahl und Neuronendichte einher. Ebenso ging ein höheres PMI mit einer statistisch signifikant höheren Neuronenzahl und Neuronendichte einher.

Diese Ergebnisse scheinen zunächst überraschend, da aus der Literatur Hinweise auf eine mit dem Alter gleichbleibende (Terry et al., 1987) oder sinkende (Pakkenberg & Gundersen, 1997) kortikale Neuronenzahl und ebenso eine gleichbleibende (Pakkenberg & Gundersen, 1997) oder sinkende (Flood & Coleman, 1988) Neuronendichte bestehen. In den genannten Studien wurden allerdings TeilnehmerInnen aller Altersklassen von 24-100 (Terry et al., 1987) bzw. 20-90 (Pakkenberg & Gundersen, 1997) Jahren eingeschlossen und eine tatsächliche Abnahme der Neuronenzahl wurde erst ab einem Alter von ca. 55 Jahren beobachtet. Die geringe Zahl von Patienten in der vorliegenden Arbeit über dieser Altersgrenze macht die Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar.

Bei langem PMI kann es durch vermehrte enzymatische Autolyse-Prozesse und physikalischen Zerfall von Molekülen wie Nukleinsäuren prinzipiell zu veränderten Färbeeigenschaften von

untersuchtem Gewebe kommen. Dabei ist sowohl eine schlechtere (z. B. durch Zerfall von Bindestellen für Färbemoleküle) als auch bessere (z. B. durch bessere Zugänglichkeit von Bindestellen für Färbemoleküle aufgrund des Zerfalls von Diffusionsgrenzen wie Zellmembranen) Färbbarkeit denkbar. Empirische Untersuchungen (Blair et al., 2016) relativieren jedoch diese Überlegungen, indem sie nahelegen, dass ein längeres PMI nicht mit morphologischen Veränderungen einhergeht.

In den parallel durchgeführten Messungen der Neuronenzahl und -dichte in Area 24 im Rahmen der Dissertation von Melanie Popal und der Neuronen- und VEN-Zahl und -dichte in Lamina V der Area 24 im Rahmen der Dissertation von Alisa Vollhardt wurden keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit dem Alter oder PMI beobachtet (lediglich die Neuronendichte in Lamina V der Area 24 war statistisch signifikant mit Alter und PMI assoziiert) (Gaus et al., 2022). Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Zusammenhang der Neuronenzahl und -dichte mit dem Alter ist somit möglicherweise nicht systematisch. Weitere Untersuchungen des Zusammenhanges zwischen Alter, PMI, Färbeverhalten und Mikroanatomie sind für belastbare Schlussfolgerungen notwendig.

5.3 Diskussion der Methoden

5.3.1 Auswahl der Studienteilnehmer

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Präparate sind Teil der Gehirnbank der Universität Würzburg. Diese Gehirnbank wurde bereits in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe untersucht (Casanova et al., 2005; Höistad et al., 2013; Kreczmanski et al., 2007; Kreczmanski et al., 2005). Der Zweck von Gehirnbanken ist die Zurverfügungstellung von *post mortem* Gehirngewebe von PatientInnen, die an neuropsychiatrischen Erkrankungen gelitten hatten, an eine größere Gruppe von ForscherInnen zur Durchführung von wissenschaftlichen Untersuchungen. Zur Sicherstellung der Qualität von Gehirnbanken wurden für ihre Zusammenstellung und Organisation bewährte Vorgehensweisen ausgearbeitet (Bell et al., 2008; Schmitt et al., 2007; Vonsattel et al., 2008). So wird empfohlen, gezielt Präparate sowohl von älteren als auch jüngeren (beispielsweise an Suizid verstorbenen) PatientInnen zu sammeln, um einem Selektionsbias durch im Alter verstorbene PatientInnen entgegenzuwirken. Um eine Berücksichtigung weiterer Störvariablen zu ermöglichen, sollen verschiedene klinische und neuropathologische Daten erhoben und dokumentiert werden. Da zur Erzielung einer hohen Homogenität der Fallgruppe bezüglich des Fallstatus wie bei allen Fall-Kontroll-Studien auch bei Gehirnbanken eine Auswahl der Fälle anhand von möglichst spezifischen Inklusionskriterien nötig ist (Song & Chung, 2010), wird eine Standardisierung der Diagnosestellung anhand von DSM-IV- und ICD-10-Kriterien empfohlen.

Die Gehirnbank der Universität Würzburg entspricht zum großen Teil diesen Richtlinien. Die Homogenität der Fallgruppe wurde durch eine Prüfung der Krankenakten auf Übereinstimmung mit den DSM-IV- und ICD-10-Kriterien der Schizophrenie sichergestellt. Kontrollpersonen wurden nur dann eingeschlossen, wenn bei Ihnen anhand der Krankenakten das Vorliegen psychiatrischer Erkrankungen ausgeschlossen werden konnte. Groben neuroanatomischen Verzerrungen wurde vorgebeugt, indem das Vorhandensein manifester neurologischer Erkrankungen oder Eingriffe als Ausschlusskriterium definiert wurde. Fälle und Kontrollpersonen wurden auf Geschlecht und Alter gematcht. Eine spätere statistische Kontrolle der neuropathologischen Variablen PMI und Fix, beides potenzielle Störvariablen in neuropathologischen Untersuchungen (Agam et al., 2002), wurde durch ihre Dokumentation ermöglicht. Der Ausschluss von mehreren Teilnehmern

(S11, S13, C1, C4, C11) aufgrund von fehlenden Schnitten führte wohl nicht zu einem Bias, da nicht angenommen werden kann, dass die Wahrscheinlichkeit für das Verlorengehen von Schnitten von klinischen oder neuropathologischen Variablen abhängig ist.

Die Auswahl der Studienteilnehmer in der vorliegenden Arbeit hat jedoch auch Limitationen. Die offensichtlichste ist dabei die kleine Stichprobengröße von $n = 21$. Aufgrund des hohen Aufwandes, der für die Zusammenstellung und Untersuchung neuropathologischer Studienmaterialien erforderlich ist, haben die meisten humanen *post mortem* Studien diese Limitation einer kleinen Stichprobengröße gemeinsam. Diese hat mehrere Implikationen. Zum einen sinkt die statistische Power, also die Wahrscheinlichkeit, in der Realität vorhandene Effekte zu entdecken, wodurch kleinere Effektstärken in Gruppenunterschieden nicht auf einem niedrigeren Signifikanzniveau (kleines α) detektiert werden können. Entsprechend erreichte selbst die hier festgestellte Effektstärke von $d_{\text{adj}} = -0,61$ für das Volumen der KGS trotz Übertrogen von metaanalytisch gesicherten und hochsignifikanten Effektstärken für kortikale Volumenunterschiede bei PatientInnen mit Schizophrenie (Haijma et al., 2013; van Erp et al., 2018; Wright et al., 2000) keine statistische Signifikanz. Zum anderen bringt eine kleine Stichprobengröße weitere Komplikationen wie einen niedrigen positiven prädiktiven Wert statistisch signifikanter Ergebnisse und eine Überschätzung festgestellter Effekte mit sich (Button et al., 2013). Wird ein Forschungsfeld von Studien mit kleiner Stichprobengröße dominiert, können diese Phänomene zu gewichtigen Verzerrungen der gesamten Forschungslandschaft beitragen (Ioannidis, 2005).

Eine zweite Limitation ist die mangelnde Erfassung klinischer Variablen wie Medikamenteneinnahme und Rauchen als potenzielle Störvariablen. Ein zentraler Parameter, in dem sich Fall- und Kontrollgruppe gravierend unterscheiden, ist hierbei antipsychotische Medikation. Obwohl keine Hinweise auf substanzielle neuropathologische Veränderungen durch Antipsychotika bestehen (Harrison, 1999), kann ein Einfluss auf die Gehirnmorphologie nicht völlig ausgeschlossen werden. So könnten diese Wirkstoffe zu einer Abnahme von Gehirnvolumina beitragen (Moncrieff & Leo, 2010), was aber für die Bestimmung von Gesamt-Neuronenzahlen mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten design-based stereologischen Methoden irrelevant ist. Der Befund gehirnmorphologischer Effekte des Tabakrauchens (Karama et al., 2015) ist insbesondere deswegen bedeutsam, weil eine starke epidemiologische Assoziation zwischen Schizophrenie und Rauchverhalten mit einer mittleren Odds Ratio von 5,9 besteht (de Leon & Diaz, 2005). Auch eine Kontrolle für den sozioökonomischen Status konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgen, da zwar auf eine vergleichbare Verteilung sozioökonomischer Parameter zwischen den Gruppen achtgegeben, gleichzeitig aber kein genaues Matching durchgeführt wurde. Die nicht durchgehend genaue Angabe des PMI (bei manchen Teilnehmern war das genaue PMI unbekannt und nur eine obere Grenze konnte angegeben werden, z.B. <24 h) stellt eine Unschärfequelle bei der Modellierbarkeit dieser Störvariable dar.

Die Auswahl ausschließlich männlicher Studienteilnehmer stellt eine dritte Limitation dar. Insbesondere, da es bei Schizophrenie Geschlechterunterschiede zu geben scheint (Abel et al., 2010; Leung & Chue, 2000), ist eine Übertragung unserer Ergebnisse auf weibliche Patienten mit Schizophrenie nur eingeschränkt möglich. Dabei macht auch die historische Unterrepräsentation von Frauen in biomedizinischen Studien (Holdcroft, 2007) eine Sammlung von Daten in weiblichen oder geschlechterausgeglichenen Populationen wichtig.

Eine vierte, kleinere Limitation ist, dass komorbide psychische Erkrankungen abgesehen von der schizoaffektiven Störung kein explizites Ausschlusskriterium in der Fallgruppe darstellten. Vor dem Hintergrund der hohen Komorbidität von Schizophrenie mit anderen psychiatrischen Erkrankungen (Buckley et al., 2009) ermöglicht dies potenzielle Verzerrungen aufgrund von

neuroanatomischen Unterschieden, die auf undokumentierte Komorbiditäten statt auf Schizophrenie zurückgehen.

Der Prozess der Teilnehmerauswahl in der hier untersuchten Gehirnbank der Universität Würzburg ist mit dem aus anderen Gehirnbanken vergleichbar. So erfolgte die Auswahl der Fälle in der Düsseldorfer Gehirnbank (Falkai et al., 2016) nach den ICD-9-Kriterien für Schizophrenie; Ausschlusskriterium für Kontrollpersonen war eine Geschichte von neuropsychiatrischen Erkrankungen und es erfolgte ein Matching bezüglich Alter, Geschlecht und PMI. Das Matching bezüglich PMI in der Düsseldorfer Gehirnbank ermöglichte eine direktere Kontrolle dieser Störvariable und stellt gegebenenfalls einen Vorteil gegenüber der Würzburger Gehirnbank dar. Auch in der Gehirnbank aus Essex, Belfast und Oxford (Highley et al., 1999) wurde jede Art der Psychopathologie aufseiten der Kontrollpersonen als Ausschlusskriterium angelegt; Voraussetzung für den Einschluss in die Fallgruppe war ein Übereinstimmen mit den DSM-IV-Kriterien für Schizophrenie. Im Unterschied zur Würzburger Gehirnbank war das Erfüllen der Kriterien der schizoaffektiven Störung kein Ausschluss-, sondern ebenfalls ein Einschlusskriterium, was eventuell die Homogenität der Fallgruppe bezüglich des Fallstatus senkt und gegebenenfalls einen Nachteil darstellt. Im Unterschied zur Würzburger Gehirnbank wurde jedoch die Lebenszeit-Antipsychotikaeinnahme in einer dreistufigen Kodierung erfasst, was eine Kontrolle dieser Variable erlaubte. Bei der Gehirnbank des Stanley Foundation Neuropathology Consortium (Torrey et al., 2000) wurden auf der Grundlage von medizinischen und psychiatrischen Unterlagen und Informationen zum sozialen Umfeld anhand von DSM-IV-Kriterien die Diagnose einer Schizophrenie gestellt. Im Unterschied zur Würzburger Gehirnbank wurden zahlreiche sozioökonomische und neuropathologische Daten erhoben und dokumentiert, darunter auch eine Schätzung der Lebenszeit-Antipsychotikaeinnahme. Bei den Kontrollpersonen erfolgte zum Ausschluss von psychiatrischen Erkrankungen allerdings lediglich ein Telefoninterview mit Angehörigen statt einer Beurteilung der Krankenakten. Eine Besonderheit der Gehirnbank des Stanley Foundation Neuropathology Consortium besteht in der unterschiedlichen Verarbeitung der beiden Hemisphären jedes Teilnehmers, da bei jedem Teilnehmer per Zufallsauswahl eine der Hemisphären in Formalin fixiert und die andere direkt eingefroren wurde. Aus diesem Grund hatten einige auf dieser Gehirnbank basierende Studien nur jeweils eine Hemisphäre pro Teilnehmer zur Verfügung (Uranova et al., 2004), was einen Vergleich zwischen linker und rechter Hemisphäre praktisch unmöglich macht.

Für die Weiterentwicklung neuropathologischer *post mortem* Forschung wird in zukünftigen Untersuchungen die erfolgreiche Adressierung der Hauptlimitation des Feldes, nämlich der kleinen Stichprobengrößen, eine entscheidende Rolle spielen. Da die Zusammenstellung von Gehirnbanken aus ethischen und technischen Gründen immer eine organisatorische Herausforderung bleiben wird, liegt hierbei eine große Hoffnung auf der Veröffentlichung und Zugänglichmachung von bestehenden Gehirnbanken. Als Vorbild hierfür kann die Neurobildgebungs-Forschung gelten, in der Data-Sharing-Praktiken bereits die Norm sind (Poldrack & Gorgolewski, 2014). Da die Veröffentlichung von physischen Materialien im Vergleich zu digitalen Bildgebungs-Datensätzen einen deutlich höheren organisatorischen Aufwand erfordert, ist eine Zugänglichmachung von Gehirnbanken eine vergleichsweise große Herausforderung. Demgegenüber steht jedoch der hohe Gewinn für das Forschungsfeld, der durch zusätzliche, methodisch hochwertige Untersuchungen bestehender Gehirnbanken durch institutsfremde Forschungsgruppen oder gar durch Untersuchungen an mehreren gepoolten Gehirnbanken mit einer entsprechend großen und gut gepowerten Stichprobengröße erreicht werden kann. In diesem Fall könnten auch kleine Effektstärken in Gruppenunterschieden detektiert werden, und festgestellte Ergebnisse hätten einen höheren positiven prädiktiven Wert und damit eine höhere Zuverlässigkeit. Um dies zu erreichen, sollten für interessierte ForscherInnen einfache und effiziente Zugangswege zu Gehirnbanken

geschafft werden. Zulassungsprozesse sollten funktional sein und soweit vertretbar mit geringen bürokratischen Hürden einhergehen. Zu zusätzlichen Untersuchungen an bestehenden Gehirnbanken sollte explizit ermutigt und diese unterstützt werden. Perspektivisch sollte auch eine Standardisierung der Präparationsmethoden in Gehirnbanken angestrebt werden, damit Präparate aus verschiedenen Gehirnbanken zur Durchführung von Untersuchungen an gepoolten Samples möglichst vergleichbar sind. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde bereits von unserem und anderen Instituten mit der Veröffentlichung von Empfehlungen zur Planung und Durchführung von Gehirnbanken getan (Bell et al., 2008; Schmitt et al., 2007; Vonsattel et al., 2008).

5.3.2 Präparation

Allgemein besteht bei der neuropathologischen Präparation von Gehirnen folgendes Dilemma (Heinsen, 1991): Die oft empfohlene und durchgeführte Erstellung von 20-40 μm dünnen Schnitten der gesamten Hemisphäre kostet viel Zeit und Aufwand. Demgegenüber verbietet die technisch bedeutend einfachere Anfertigung sehr dicker (bis zu 20 mm) Schnitte oftmals eine Identifikation kleiner mikroskopischer Veränderungen. Eine alternative Aufteilung des Gehirns in Gewebewürfel mit anschließender Anfertigung dünner Schnitte dieser Würfel anstatt der gesamten Hemisphäre erleichtert zwar die Präparation, zerstört aber gleichzeitig die strukturelle Integrität des Gehirns und erschwert erheblich die Identifikation von Arealgrenzen.

Eine alternative Methode, bei der mitteldicke (700 μm) koronare Schnitte der gesamten Hemisphäre angefertigt und mit Galloxyanin gefärbt werden, wurde in der Literatur (Heinsen, 1991) vorgeschlagen und zur Präparation der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *post mortem* Gehirne angewandt. Wie ebenfalls in der Literatur (Schmitt et al., 2007) für die neuropathologische Untersuchung im Rahmen von Gehirnbanken empfohlen, sieht diese Methode eine Fixierung mit Formalin vor.

Die im Vergleich zur Standardmethode höhere Schnittdicke hat nicht nur den Vorteil eines geringeren Aufwandes und einer höheren Verarbeitungsgeschwindigkeit. Sie ermöglicht auch die spezifische Untersuchung von Neuronen und Gliazellen, da Galloxyanin selektiv an Zellkern-DNA und die Nissl-Substanz neuronaler Perikarya bindet (Sandritter et al., 1954), während myelinisierte Fasertrakte ausgespart bleiben. Da durch die hohe Schnittdicke zudem mehrere Reihen übereinanderliegender Neurone zur Darstellung kommen, kann die Zytoarchitektur größerer Zellverbände wie kortikaler Laminae besonders gut beurteilt und Gehirnareale genau voneinander abgegrenzt werden (vgl. **Abbildung 1C,D**). Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist, dass durch die Einbettung in Gelatine eine unlösliche und haltbare Hülle entsteht, durch die die Schnitte gegenüber physikalischen Artefakten wie Rissen oder Verformungen widerstandsfähig werden. Tangential angeschnittene Gyri bleiben durch die Gelatine mit dem Rest des Gehirns verbunden und gehen nicht verloren, wodurch der Kortex in seiner gesamten dreidimensionalen Ausdehnung erfasst werden kann. Da Axone nicht gefärbt werden, ist ein allgemeiner Nachteil dieser Methode, dass myelinisierte Fasertrakte und die weiße Substanz nicht untersucht werden können. Ein Vorteil, der den Zwecken der kortikalen Volumenmessung und Zellzählung in der vorliegenden Arbeit besonders zugutekam, war die gute Beurteilbarkeit sowohl von einzelnen Neuronen als auch der Grenze zwischen KGS und weißer Substanz.

In vergleichbaren Arbeiten wurden oftmals Standardmethoden mit Anfertigung dünner (ca. 20 μm), in Paraffin eingebetteter koronarer Schnitte ganzer Hemisphären (oder nur kleinen Gewebelöcken aus Hemisphären) verwendet. Für die Gehirnbank der Universität Düsseldorf (Falkai et al., 2016) wurden 20 μm dünne Paraffinschnitte erstellt, die mittels Nissl- und Myelin-Färbung gefärbt wurden. Die Präparate der Gehirnbank des Stanley Foundation Neuropathology

Consortium (Torrey et al., 2000) bestehen aus 10-14 μm dünnen Paraffinschnitten der ganzen Hemisphäre. Die Schnitte sind zunächst ungefärbt, und die Färbung wird den untersuchenden Forschungsgruppen überlassen. Mitunter wird von diesen ebenfalls die Nissl-Färbung benutzt (Uranova et al., 2004).

Eine kleine Limitation der vorliegenden Arbeit ist, dass das *post mortem* Gehirn eines Teilnehmers (C7) nicht wie die der anderen in Agarose oder Gelatine, sondern in Celloidin eingebettet wurde. Da allerdings auch die Schnitte dieses *post mortem* Gehirns anschließend mit Gallocyaning gefärbt wurden, ist eine signifikante Verzerrung der neuropathologischen Beurteilbarkeit wenig wahrscheinlich.

5.3.3 Schätzung von Volumen und Neuronenzahl

Eine ideale Messmethode zeichnet sich durch zwei Gütekriterien aus: Die produzierten Messwerte liegen im Mittel möglichst nahe an dem wahren, gemessenen Wert (hohe Validität/niedriges Bias) und haben von Messwert zu Messwert eine möglichst niedrige Streuung um ihren Mittelwert herum (hohe Reliabilität/niedrige Varianz).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der design-based Stereologie ist prinzipiell unbiased (also von optimaler Validität), solange keine Biases durch die vorhergehende Verarbeitung des Gewebes eingeführt werden (z.B. durch Gewebeschrumpfung, Artefakte durch das Schneiden, unzureichende Penetration des Gewebes durch die Färbemittel) und die Struktur in ihrer vollen dreidimensionalen Ausdehnung untersucht wird (Schmitz & Hof, 2005). Da die in der vorliegenden Arbeit verwendete Präparationstechnik (Heinsen, 1991) durch die Einbettung von *post mortem* Gehirnen in Gelatine eine geringe Artefaktbelastung und durch die Färbung mit Gallocyanin eine selektive und eindeutige Darstellung von Neuronen verspricht, ist von dieser Seite nur eine geringe Verzerrung zu erwarten. Die Hemisphären wurden in ihrer gesamten Ausdehnung untersucht, und *post mortem* Gehirne, von denen nicht alle Schnitte verfügbar waren (S11, S13, C1, C4, C11), wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Darüber hinaus erfolgte vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Training des Untersuchers zur Bestimmung von Gesamt-Neuronenzahlen mittels design-based stereologischer Methoden an fremden Kleinhirnpräparaten, bis der Untersucher bereits bekannte Gesamt-Neuronenzahlen valide reproduzieren konnte. Diese zusätzliche Maßnahme verminderte einen möglichen Bias vonseiten des Untersuchers zusätzlich.

Handelt es sich bei einer Messung wie im vorliegenden Fall um eine Übertragung von Messergebnissen anhand einer Stichprobe auf eine Grundgesamtheit, so steigt ihre Reliabilität mit der Größe der Stichprobe. Im Falle der Volumenschätzung mittels Cavalieri-Methode und Punktzählung entspricht die Stichprobe der Anzahl der untersuchten Punkte pro Objekt (hier Hemisphäre). Diese kann durch eine Verkleinerung der Gitterabstände sowie eine Erhöhung der Zahl der untersuchten Schnitte pro Objekt vergrößert werden. Im Falle der Neuronenzählung mit der „optical fractionator“ Methode entspricht die Stichprobe der Summe der Volumina aller untersuchten unbiased virtual counting spaces. Diese kann durch eine Erhöhung der Anzahl und Größe der unbiased virtual counting spaces oder der Anzahl der untersuchten Schnitte vergrößert werden. Als Maßzahl der Variabilität der Messungen wird in der Stereologie anstelle der Varianz typischerweise der Coefficient of Error (CE) benutzt (ein niedriger CE bedeutet eine hohe Reliabilität). Auf Grundlage bestehender Erfahrungswerte genügen zur stereologischen Volumenbestimmung auch bei Objekten mit einer komplexen dreidimensionalen Struktur ca. 200 Punkte auf 10-15 Schnitten pro Objekt für eine Schätzung mit einem akzeptablen CE von 5-10% (Howard & Reed,

2004). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Werte von durchschnittlich $\Sigma UVCS = 588$ gezählten Punkten auf 10 Schnitten pro Hemisphäre liegen deutlich darüber, sodass von einem niedrigen CE und einer hohen Reliabilität ausgegangen werden kann. Bei der Neuronenzählung entspricht der CE dem Quotienten von Standardabweichung und Mittelwert wiederholter Schätzungen an demselben Objekt (Schmitz & Hof, 2000). Liegt nur eine Schätzung am Objekt vor, so kann der CE nicht genau berechnet werden, wohl kann er aber selbst geschätzt werden. Auf Basis von Computersimulationen konnte gezeigt werden, dass eine gute Schätzung des CE durch den Kehrwert der Quadratwurzel der Anzahl der gezählten Neurone gegeben ist (Schmitz, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden durchschnittlich $\Sigma Q^- = 514$ Neurone pro Hemisphäre gezählt, was einem geschätzten $CE = \frac{1}{\sqrt{514}} \approx 0,044$ entspricht. Dies bedeutet, dass, wenn man die Schätzung der Neurone in einer Hemisphäre unendlich oft wiederholen würde, die Standardabweichung dieser Schätzungen 4,4% des Mittelwertes dieser Schätzungen entsprechen würde. Eine solche Standardabweichung von 4,4% des Mittelwertes könnte angesichts des gefundenen Gruppenunterschiedes von -14,9% bei den Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu den Kontrollpersonen für die Neuronenzahl durchaus als eine Limitation der vorliegenden Arbeit betrachtet werden, da sie eine nicht unwesentliche Fehlerquelle in die Quantifizierung der Gruppenunterschiede einführt. Zugleich gilt ein CE um 0,044 im Hinblick auf die Notwendigkeit, den CE mit dem großen Arbeitsaufwand zusätzlicher Zellzählungen zu balancieren, als vertretbar (Schmitz & Hof, 2000). Für die Schätzung der Neuronendichte sollte zudem bedacht werden, dass sich durch die Kombination zweier verschiedener Schätzungen (Neuronenzahl und Volumen in der KGS) die Variabilität noch weiter erhöht. Auf Grundlage dieser Überlegungen ist anzunehmen, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der design-based Stereologie zur Messung des Volumens und der Neuronenzahl in der KGS eine sehr hohe Validität bei einer akzeptablen Reliabilität aufweist. Aufgrund dieser Vorteile ist design-based Stereologie als Standard in quantitativen neurohistologischen Studien etabliert (von Bartheld et al., 2016).

Für die Zukunft der quantitativen neuropathologischen Forschung an *post mortem* Gehirnen sollte die design-basierte Stereologie das Verfahren der Wahl darstellen. Zur adäquaten Beurteilung von Gehirnregionen sollten diese in ihrer gesamten Ausdehnung untersucht werden. Eine teilweise Untersuchung mit Übertragung der Ergebnisse auf die gesamte Region (wie z.B. in (Brüne et al., 2010)) sollte vermieden werden.

Eine kritische Herausforderung bei der Durchführung stereologischer Studien ist der hohe Arbeitsaufwand. Für jedes Präparat müssen mindestens zehn Schnitte manuell mikroskopisch untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit dauerte die mikroskopische Untersuchung einer Hemisphäre durch den Untersucher beispielsweise 8-10 Stunden. Eine Automatisierung dieses Prozesses würde nicht nur mit dem Vorteil einer beträchtlichen Arbeitersparnis einhergehen, sondern auch das Element des menschlichen Fehlers durch eine technische Standardisierung der Identifikation mikroskopischer Strukturen eliminieren, was die Validität steigern würde. Durch die Erhöhung der Anzahl der unbiased virtual counting spaces könnte zudem die Reliabilität gesteigert werden. Die Entwicklung einer zuverlässigen automatisierten Methode für stereologische *post mortem* Untersuchungen war bisher eine Herausforderung. Ältere, auf traditioneller Computer Vision basierende Techniken zeigten keine ausreichend hohe Zuverlässigkeit in der Identifikation von einzelnen Zellen (Schmitz et al., 2014). Demgegenüber stehen jedoch große Fortschritte in der Deep-Learning-basierten Computer Vision in den letzten Jahren (Khan et al., 2020), die dazu geführt haben, dass in vielen Bilderkennungsaufgaben künstliche Computer-Vision-Modelle bereits deutlich genauer sind als der Mensch (Eckersley & Nasser, 2017). Diese Fortschritte haben auch die Entwicklung automatisierter stereologischer Systeme inspiriert (Alahmari et al.,

2022), die trotz noch ungelöster Herausforderungen großes Potenzial für die Zukunft zeigen. Die Idealvorstellung einer vollautomatisierten, rapiden und hochvaliden sowie hochreliablen stereologischen Ausmessung bestimmter Werte in Gehirnbanken ist mit den heutigen technischen Methoden bereits in greifbarer Nähe. Tatsächlich werden bereits entsprechende, auf Deep-Learning basierende Softwareprodukte für automatische Stereologie angeboten (SRC Biosciences, 2023) bzw. sind angekündigt (MBF Bioscience, 2023). Die Validität und Reliabilität von mit diesen Softwareprodukten erzielten Ergebnissen ist bisher jedoch praktisch unbekannt. Darüber hinaus wurde bisher nicht untersucht, ob mit diesen Softwareprodukten an existierenden, dicken und mit Gallocyanin gefärbten Gewebeschnitten von menschlichen *post mortem* Gehirnen (so wie in der vorliegenden Arbeit untersucht) überhaupt valide Ergebnisse erzielt werden können. Da die Dauer der Entwicklung einer Software für die valide Analyse entsprechender Gewebeschnitte die Dauer einer manuellen Analyse (so wie in der vorliegenden Arbeit realisiert) deutlich übersteigen würde, bleiben vollautomatisierte stereologische Systeme aktuell noch ein längerfristiges Forschungsvorhaben.

5.3.4 Statistische Methoden

Ziel der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie war die Untersuchung von Unterschieden in bestimmten Ergebnisvariablen (Volumen, Neuronenzahl, Neuronendichte in der KGS) zwischen einer Fallgruppe von Patienten mit Schizophrenie und einer Kontrollgruppe. Über diese Untersuchung sollten Hinweise auf eine relevantere Fragestellung abgeleitet werden: Führt der Fallstatus (Erkrankung an Schizophrenie) kausal zu Veränderungen in den Ergebnisvariablen? Fragestellungen wie diese nach Kausalbeziehungen können zweifelsfrei einzig durch experimentelle Studien (im Idealfall als Goldstandard der randomisiert-kontrollierten Studie) nachgewiesen werden, bei denen in einer von zwei gleichartigen Gruppen von TeilnehmerInnen (Interventions- und Kontrollgruppe) eine Intervention durchgeführt und anschließend Unterschiede zwischen beiden Gruppen gemessen werden. Beobachtungsstudien wie Fall-Kontroll-Studien sind für die Feststellung von Kausalbeziehungen grundsätzlich nicht geeignet, da niemals alle Störvariablen beobachtet werden können und ein festgestellter Unterschied zwischen den Gruppen somit immer durch solche unbeobachteten Störvariablen verursacht sein könnte. Darüber hinaus ist bei vielen Fragestellungen die Durchführung experimenteller Studien aus praktischen oder ethischen Gründen nicht möglich, was dazu führt, dass für die Untersuchung von Kausalbeziehungen oftmals trotzdem nur Beobachtungsdaten zur Verfügung stehen. So ist die kausale Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht experimentell untersuchbar, da die Intervention (Erkrankung an Schizophrenie) nicht experimentell induziert werden kann; ganz abgesehen davon, dass dies auch ethisch in keinsten Weise vertretbar wäre.

Ein prominentes historisches Beispiel für das Dilemma der Ableitung von Kausalbeziehungen aus Beobachtungsdaten ist die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Tabakrauchen und Lungenkrebs. Da eine gezielte Exposition von Versuchspersonen mit Tabakrauch ethisch nicht vertretbar ist, standen hierfür nur epidemiologische Beobachtungsdaten zur Verfügung. Dies gab in den 1950er und 1960er Jahren Anlass zu intensiven Diskussionen unter Epidemiologen, in denen gar führende Statistiker die Schlussfolgerung auf einen kausalen Zusammenhang aus diesen Daten vehement in Zweifel zogen (Parascandola, 2004). Besonders deutlich machte Ronald Fisher, der als Begründer der modernen Statistik gilt (Hald, 1998), seine Ablehnung: Die Gefahr, der die rauchende Bevölkerung ausgesetzt war, schrieb Fisher, war „nicht das milde und beruhigende Kraut, sondern die systematische Erzeugung von Zuständen der Panik“ (Fisher, 1959). Heute gilt die Kausalbeziehung zwischen Tabakrauchen und Lungenkrebs als soweit gesichert

(Loeb et al., 1984), dass fast alle Staaten Public-Policy-Entscheidungen zu öffentlichen Rauchverboten danach ausrichten (Schmidt, 2007). Dieses Beispiel illustriert, dass die Ableitung von Hinweisen auf Kausalbeziehungen auch aus Beobachtungsdaten prinzipiell möglich ist (Pearl, 2009).

Für die Gewinnung entsprechender Hinweise wurde eine Reihe von statistischen Techniken entwickelt (Schafer & Kang, 2008). Eine einfache und wirkungsvolle, allerdings nicht immer umsetzbare Methode ist ein Matching der Teilnehmer in der Fall- und Kontrollgruppe nach den Störvariablen bereits im Schritt der Teilnehmerauswahl, um die Gruppen bezüglich der Verteilung dieser Störvariablen vergleichbar zu machen. Eine mathematische Kontrolle des Einflusses der Störvariablen kann durch allgemeine lineare Modelle wie die (Ko-)Varianzanalyse (ANOVA und ANCOVA) oder durch Ansätze, die auf Propensity Scores basieren, erreicht werden. Möglich sind auch hybride Ansätze aus beiden Methoden. Vermehrt wird auch die Triangulation, also der Vergleich der Auswertungen der Daten mittels unterschiedlicher Methoden, empfohlen (Hammerton & Munafo, 2021). Um die in einer Untersuchung angenommenen Kausalzusammenhänge explizit zu machen und zu formalisieren, kann zudem die Aufzeichnung von gerichteten azyklischen Graphen wie Bayes'schen Netzwerken empfehlenswert sein (Tennant et al., 2021) (s. **Abbildung 6**). Speziell die Anwendung einer Kovarianzanalyse (ANCOVA) findet in Beobachtungsstudien weite Verbreitung (Schafer & Kang, 2008) und findet sich auch oftmals in stereologischen *post mortem* Studien (Falkai et al., 2016; Lee et al., 2017; Rubinow et al., 2016), in denen häufig Störvariablen wie Alter oder PMI als Covariaten berücksichtigt wurden. Eine ANCOVA wurde auch in früher publizierten Untersuchungen unserer Forschungsgruppe herangezogen (Kreczmanski et al., 2007; Kreczmanski et al., 2005). Der Einsatz der ANCOVA in Beobachtungsstudien soll in der Regel abbilden, wie der Gruppenunterschied gewesen wäre, wenn Störvariablen zwischen den Gruppen gleich gewesen wären. Daher kann die ANCOVA als statistisches Matching-Verfahren angesehen werden (Tabachnick et al., 2013).

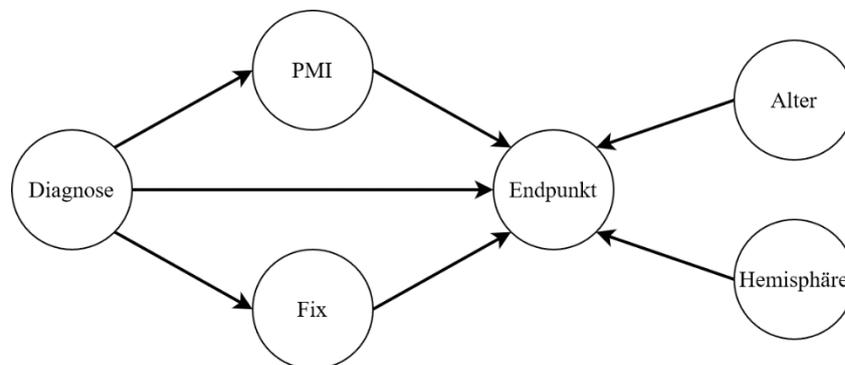


Abbildung 6: Bayes'sches Netzwerk des angenommenen kausalen Modells. Endpunkte sind Volumen, Neuronenzahl und Neuronendichte in der kortikalen grauen Substanz der Hemisphären der Studienteilnehmer. Untersucht werden soll der Einfluss von Diagnose (Schizophrenie- vs. Kontrollgruppe) auf die Endpunkte. Da die Diagnose einen Einfluss auf PMI und Fix hat (Patienten mit Schizophrenie wurden in der vorliegenden Arbeit – möglicherweise aufgrund von höherer sozialer Isolation – deutlich später nach ihrem Tod aufgefunden als gesunde Kontrollpersonen, während die Gehirne gesunder Kontrollpersonen deutlich länger fixiert wurden), und diese wiederum Einfluss auf die Endpunkte nehmen, stellen PMI und Fix Mediatoren dar. Alter und Hemisphäre (links/rechts) nehmen unabhängig von der Diagnose einen Einfluss auf die Endpunkte.

Die ANCOVA wurde in den 1930er Jahren ursprünglich nicht zur Analyse von Beobachtungsstudien, sondern als statistisches Werkzeug für randomisierte experimentelle Studien entwickelt

(Schafer & Kang, 2008). Ihr Einsatz in Beobachtungsstudien ist allgemein umstritten (Schneider et al., 2015) und manche Forscher raten sogar generell von ihm ab (Miller & Chapman, 2001). Kritiker weisen darauf hin, dass eine Überkorrektur auftreten kann, die zur Auslöschung des Gruppeneffektes führt, wenn die als Covariaten einbezogenen Störvariablen in den Gruppen unterschiedlich verteilt sind, also keine statistische Unabhängigkeit zwischen der Behandlung und den Covariaten besteht (Rutherford, 2011; Schneider et al., 2015). Analysen simulierter Daten zeigten jedoch, dass die ANCOVA bei sorgfältiger Konstruktion gute Schätzungen der Kausalzusammenhänge liefern kann und ihre Anwendung in Beobachtungsstudien nicht grundsätzlich verfehlt ist (Schafer & Kang, 2008; Schneider et al., 2015). Schafer & Kang (Schafer & Kang, 2008) argumentieren in einer vertieften mathematischen Betrachtung der ANCOVA und anderer Modellierungsverfahren zudem, dass die Unabhängigkeit der Behandlung von den Covariaten nicht zwingend gegeben sein muss. Eine Voraussetzung für die Schätzung von Kausalbeziehungen aus Beobachtungsdaten sei vielmehr eine Erfüllung der Annahme der "Unconfoundedness". Diese Annahme besagt, dass bei gegebenen Werten der Störvariablen der Fallstatus (Fall vs. Kontrolle) unabhängig von den potenziellen Realisationen der abhängigen Variablen ist. Die Anwendung dieser Annahme auf Fall-Kontroll-Studien ist nicht direkt intuitiv, kann jedoch anhand eines Beispiels veranschaulicht werden.

Für alle Teilnehmer mit gleichen Werten für Alter, PMI und Fix sollte die Wahrscheinlichkeit, an Schizophrenie zu erkranken, unabhängig von der Neuronenzahl in der KGS sein, die sie (hypothetisch) mit und ohne Schizophrenie hätten. So könnte man annehmen, dass Fallstatus und Neuronenzahl durch den sozioökonomischen Status der Eltern konfundiert sind, das heißt, der sozioökonomische Status beeinflusst sowohl die Wahrscheinlichkeit, an Schizophrenie zu erkranken, als auch, über andere Wege, die Neuronenzahl. In diesem Fall wäre die Annahme der Unconfoundedness verletzt. Eine niedrigere mittlere Neuronenzahl bei PatientInnen mit Schizophrenie könnte dann selbst nach Kontrolle von Alter, PMI und Fix vollständig durch Unterschiede im sozioökonomischen Status erklärt werden, und der beobachtete Zusammenhang wäre ein Scheinzusammenhang. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Bemühung angestellt, Teilnehmer mit vergleichbarem sozioökonomischem Hintergrund auszuwählen. Unconfoundedness ist eine primär theoretische Größe und in der Praxis schwer zu überprüfen, da nie alle Störvariablen bekannt sind (Schafer & Kang, 2008). Diese Tatsache stellt die zentrale Schwachstelle von Beobachtungsstudien in der Untersuchung kausaler Zusammenhänge dar und führt zu der Gefahr, dass jeder gefundene Gruppenunterschied prinzipiell durch unbeobachtete Störvariablen bedingt sein könnte. Aus diesem Grund kann bei der Beschreibung von Ergebnissen aus Beobachtungsstudien grundsätzlich nicht von Kausalbeziehungen gesprochen werden, sondern es muss eine rein deskriptive Beschreibung von „Gruppenunterschieden“ erfolgen (Tabachnick et al., 2013). Letztendlich kann auch in der vorliegenden Arbeit die Annahme der Unconfoundedness nicht bewiesen werden. Daher können die hier festgestellten, für verschiedene Störvariablen kontrollierten Gruppenunterschiede lediglich als schwache Hinweise auf eine Kausalbeziehung (Schizophrenie auf Volumen, Neuronenzahl, Neuronendichte in der KGS) betrachtet werden, weisen diese jedoch keinesfalls nach.

Für kausale Fragestellungen, die am Menschen nicht experimentell untersuchbar sind, können bei Erfüllung ethischer Voraussetzungen tierexperimentelle Studien herangezogen werden. So sind Testungen an Tieren ein wichtiger Bestandteil präklinischer Studien in der Entwicklung neuer Pharmaka (Steinmetz & Spack, 2009). Auch in der psychiatrischen Forschung gewinnen Tiermodelle aufgrund wichtiger Vorteile an Bedeutung. Unter anderem erlauben sie eine deutlich beschleunigte Beobachtung von Krankheitsverläufen, eine invasive Überwachung von strukturellen und molekularen Krankheitskorrelaten und eine Testung neuer Therapeutika (Jones et al., 2011).

Speziell der Untersuchung kausaler Zusammenhänge zugute kommt die Möglichkeit einer „stringenten experimentellen Kontrolle von Studiensubjekten in genetisch homogenen Populationen“ (Meyer & Feldon, 2010), was den Einfluss von Störfaktoren auf ein Minimum reduziert. Eine zentrale Limitation von Tiermodellen psychiatrischer Erkrankungen ist allerdings die Schwierigkeit, ihre Validität zu verifizieren (Insel, 2010; Nestler & Hyman, 2010). Die Feststellung psychiatrischer Erkrankungen in Individuen ruht ganz überwiegend auf phänomenologischen Merkmalen, also auf Symptomen, klinischen Anzeichen und dem Krankheitsverlauf. Viele dieser Merkmale können aufgrund ihrer subjektiven Natur nicht überzeugend in Tieren festgestellt werden, wodurch eine Validierung anhand der beobachteten Klinik erschwert ist. Da psychiatrische Erkrankungen nur stochastisch und nicht deterministisch mit genetischen und umweltbedingten Risikoprofilen assoziiert sind, ist auch eine Validierung durch die Reproduktion solcher Risikoprofile in Tieren nur begrenzt möglich. Schließlich kann auch eine Validierung über das Ansprechen auf Medikamente nicht unmittelbar erreicht werden, da die physiologischen Wirkpfade psychiatrischer Behandlungen nicht hinreichend klar sind. Beobachtungsstudien am Menschen zur Untersuchung psychiatrischer Erkrankungen sind daher trotz ihrer begrenzten Aussagekraft für kausale Zusammenhänge zum jetzigen Zeitpunkt alternativlos, denn nur in diesen kann sicher davon ausgegangen werden, dass eigentliche psychiatrische Erkrankungen untersucht werden.

Neben der Überprüfung der Unconfoundedness müssen vor der Anwendung einer ANCOVA die untersuchten Daten sorgfältig auf Übereinstimmung ihrer Grundannahmen geprüft werden, um Verzerrungen zu vermeiden (Rutherford, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden viele dieser Annahmen erfüllt (**3.3.2 Überprüfung der ANCOVA-Grundannahmen**). Es wurden keine Anzeichen für Verstöße gegen die Annahmen der Homoskedastizität (**Tabelle A2**) und Linearität (**Tabelle A4**) festgestellt. Die Annahmen der Normalverteilung (**Tabelle A1**) und der Homogenität der Regressionssteigungen (**Tabelle A3**) wurden nur in Einzelfällen verletzt. Die Annahme der Unabhängigkeit der Behandlung von den Covariaten wurde verletzt (es bestanden signifikante Unterschiede bei den Störvariablen PMI und Fix zwischen den Gruppen, **Tabelle A5**), stellt aber nach (Schafer & Kang, 2008) im Vergleich zur Annahme der Unconfoundedness keine Notwendigkeit dar (s.o.). Zudem wurde die Annahme der Unabhängigkeit der Beobachtungen verletzt (um eine Verletzung dieser Annahme zu verhindern, hätte Hemisphäre als within-subject Faktor in einem Mixed-Design berücksichtigt werden können). Neben der Anwendung einer ANCOVA erfolgte in der vorliegenden Arbeit ein Matching bezüglich Alter und Geschlecht, sodass diese Variablen nicht mehr notwendigerweise als Covariaten berücksichtigt hätten werden müssen.

Die weite Verbreitung von allgemeinen linearen Modellen (zu denen auch die ANCOVA gehört) in Beobachtungsstudien spiegelt sich auch in der Beliebtheit der Methode in stereologischen *post mortem* Studien wieder. Bezüglich kortikaler Volumina untersuchten Selemon und Kollegen (Selemon et al., 2002) zunächst mittels Pearson-Korrelation die Beziehungen zwischen verschiedenen Störvariablen und kortikalen Volumina. Bei signifikanten Korrelationen wurde die ANCOVA mit diesen Störvariablen als Covariaten verwendet. Chen und Kollegen (Chen et al., 2020) untersuchten Volumina und Zellzahlen im Hippocampus. Zur Bestimmung von Gruppenunterschieden wurde eine ANOVA eingesetzt, und bei signifikanten Ergebnissen wurde eine Post-hoc-Bonferroni-Korrektur angewendet. Eine Untersuchung mittels Pearson-Korrelation zwischen abhängigen Variablen und Alter sowie PMI kam zum Einsatz, um Assoziationen zu Störvariablen festzustellen. Es wurde keine weitere Korrektur für die Störvariablen durchgeführt, obwohl sich die Störvariablen deutlich zwischen den Gruppen unterschieden. Zahlreiche Studien schätzten die Neuronendichte in kortikalen Subregionen. Smiley und Kollegen (Smiley et al., 2012) matchten zunächst ihre Fall- und Kontrollgruppen genau bezüglich zahlreicher Störvariablen wie PMI, und führten dann eine ANOVA durch. Woo und Kollegen (Woo et al., 2004) wählten einen

komplexeren Ansatz, indem sie Matching bezüglich verschiedener Störvariablen durchführten und dann eine ANOVA mit Bonferroni-Korrektur durchführten. Erst danach überprüften sie mittels Pearson-Korrelation den Einfluss verschiedener Störvariablen auf die abhängigen Variablen. Die signifikant korrelierten Störvariablen berücksichtigten sie in einem neuen ANCOVA-Modell, dessen Ergebnisse sie mit den Ergebnissen der ANOVA verglichen. Cullen und Kollegen (Cullen et al., 2006) matchten ebenfalls bezüglich zahlreicher Störvariablen, und führten dann eine ANOVA mit einem within-subject Faktor Hemisphäre durch. Auch hier wurde eine Bonferroni-Korrektur angewendet, da mehrere Schichten verglichen wurden. Einflüsse von Störfaktoren wurden ebenfalls mittels Pearson-Korrelation überprüft. Rosa und Kollegen (Di Rosa et al., 2009) wandten eine ANCOVA an (in der Studie wird der Einbezug von Covariaten in eine ANOVA beschrieben, was jedoch am ehesten als ANCOVA zu deuten ist) und berücksichtigten wie in der vorliegenden Arbeit Alter und Fix als Covariaten. Zur Überprüfung der Normalverteilung und Homogenität der Varianz führten sie zudem Kolmogorov-Smirnov- und Levene-Tests durch. Die einzige andere Studie, die die Neuronenzahl in der KGS von Patienten mit Schizophrenie untersuchte (Pakkenberg, 1993), benutzte einen einfachen t-Test für unabhängige Stichproben und berücksichtigte den Einfluss von Störvariablen nur hinsichtlich eines Altersmatchings. Dies ist kritisch zu bewerten, da ein solcher Einfluss keinesfalls ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vergleichbaren Literatur das Matching von Fall- und Kontrollgruppen hinsichtlich Störvariablen und die anschließende Anwendung der ANOVA zur Testung von Gruppenunterschieden das etablierte Verfahren darstellt. Wo Störvariablen zwar bekannt sind, aber kein Matching möglich ist, kam regelmäßig eine Adjustierung bezüglich dieser Störvariablen durch Berücksichtigung als Covariaten in einer ANCOVA zum Einsatz. Im Falle der Anwendung einer ANCOVA kommt der vorherigen Überprüfung der Grundannahmen eine besondere Bedeutung zu, was viele Studien berücksichtigten.

5.4 Die vorliegende Arbeit im größeren Kontext: Der anteriore cinguläre Cortex und Von Economo-Neurone bei Schizophrenie

In der zur vorliegenden Arbeit parallel durchgeführten Untersuchung der gesamten Area 24 im Rahmen der Dissertation von Melanie Popal wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede im mittleren Volumen ($\Delta_{\text{adj}} = -11,6\%$; $d_{\text{adj}} = -0,54$; $P = 0,111$), der mittleren Neuronenzahl ($\Delta_{\text{adj}} = -14,5\%$; $d_{\text{adj}} = -0,63$; $P = 0,078$) oder der mittleren Neuronendichte ($\Delta_{\text{adj}} = -1,6\%$; $d_{\text{adj}} = -0,10$; $P = 0,773$) in Area 24 zwischen Patienten mit Schizophrenie und gesunden Kontrollpersonen festgestellt (Gaus et al., 2022). Dieses Ergebnis reiht sich in frühere Befunde unveränderter mittlerer Neuronendichten in Area 24 bei PatientInnen mit Schizophrenie ein (Benes et al., 1986; Bouras et al., 2001; Cotter et al., 2001; Höistad et al., 2013; Ongür et al., 1998). Zwei weitere Studien (Benes et al., 1991; Kalus et al., 1997) fanden ebenfalls keinen Unterschied in der mittleren Dichte der Pyramidenneuronen und statistisch signifikante, aber entgegengesetzte Unterschiede in der mittleren Interneuronendichte. Auch unsere Feststellung keines Unterschiedes in der mittleren Neuronenzahl in Area 24 zwischen Patienten mit Schizophrenie und gesunden Kontrollpersonen steht im Einklang mit früheren Arbeiten (Ongür et al., 1998; Stark et al., 2004). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Area 24 als Ganzes nicht von dem pathologischen, möglicherweise Pruning-bedingten Prozess betroffen ist, der zu einer verminderten mittleren Neuronenzahl in der globalen KGS führt.

Dagegen wurde in einer separaten Untersuchung der Lamina V in Area 24 im Rahmen der Dissertationen von Melanie Popal und Alisa Vollhardt zwar ebenso kein statistisch signifikanter Unterschied im mittleren Volumen ($\Delta_{\text{adj}} = -13,2\%$; $d_{\text{adj}} = -0,64$; $P = 0,065$), aber eine statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronenzahl ($\Delta_{\text{adj}} = -21,1\%$; $d_{\text{adj}} = -1,00$; $P = 0,002$) und Neuronendichte ($\Delta_{\text{adj}} = -9,1\%$; $d_{\text{adj}} = -0,78$; $P = 0,024$) in der Gruppe der Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu den Kontrollpersonen festgestellt (Gaus et al., 2022). Mit dieser Reduktion von mittlerer Neuronenzahl und -dichte hob sich Lamina V in Area 24 von der insgesamt nicht betroffenen Area 24 ab. Dabei führte die selektive Verringerung der mittleren Neuronenzahl in Schicht V der Area 24 nicht zu einer statistisch signifikant niedrigeren Neuronenzahl in der gesamten Area 24, da die Neuronenzahl in Lamina V nur 30% der Neuronenzahl in der gesamten Area 24 ausmachte. Dieses Ergebnis repliziert den Befund einer früheren Studie (Benes et al., 1986), in der bei PatientInnen mit Schizophrenie in Area 24 eine niedrigere mittlere Neuronendichte spezifisch in Lamina V, nicht jedoch in allen anderen Laminae gefunden wurde. So legt das Ergebnis nahe, dass Lamina V in Area 24 eine spezifische Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie spielt. Area 24 ist an der Regulation emotionaler und kognitiver Funktionen beteiligt (Ebitz & Hayden, 2016; Heilbronner & Hayden, 2016; Shenhav et al., 2013) und ist mit vielen kortikalen, subkortikalen und spinalen Regionen verbunden (Beckmann et al., 2009; Margulies et al., 2007; Pandya et al., 1981; Vogt, 2019; Vogt & Pandya, 1987). Ein großer Teil des efferenten Anteils dieser Verbindungen stammt aus Lamina V in Area 24 (Calderazzo et al., 2021; Carmichael & Price, 1995). Es ist daher wahrscheinlich, dass eine geringere mittlere Neuronenzahl in dieser Lamina eine Ursache für die in einigen funktionellen Gehirnbildgebungsstudien (Adams & David, 2007; Pettersson-Yeo et al., 2011; Shukla et al., 2019) festgestellte Beeinträchtigung der funktionellen Konnektivität von Area 24 bei Schizophrenie darstellt. In der Tat gibt es starke Hinweise auf Abnormalitäten des Cingulumbündels bei PatientInnen mit Schizophrenie (Fujiwara et al., 2007; Sun et al., 2003; Wang et al., 2004), einer großen Faserbahn, die den größten Teil der afferenten und efferenten Verbindungen von Area 24 führt (Bubb et al., 2018). Ein wichtiges Ziel der efferenten Projektionen von Area 24 ist zudem die Amygdala, und zwar insbesondere ihre lateralen und basolateralen Kerne (Calderazzo et al., 2021; Pandya et al., 1981; Stefanacci & Amaral, 2002). Eine frühere Untersuchung (Kreczmanski et al., 2007) derselben Gehirne, die in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, ergab eine statistisch signifikant niedrigere mittlere Neuronenzahl im lateralen Nukleus der Amygdala bei den Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Dies deutet darauf hin, dass die Projektionen von Area 24 zur Amygdala bei Schizophrenie beeinträchtigt sind, was auch durch Gehirnbildgebungs-Befunde einer abnormen Konnektivität zwischen der Amygdala und dem ACC bestätigt wird (Aleman & Kahn, 2005).

Die ebenfalls im Rahmen der Dissertation von Alisa Vollhardt durchgeführte Untersuchung der VENs in Lamina V in Area 24 ergab eine statistisch signifikant niedrigere mittlere VEN-Zahl ($\Delta_{\text{adj}} = -28,3\%$; $d_{\text{adj}} = -0,72$; $P = 0,027$), aber keine statistisch signifikant niedrigere mittlere VEN-Dichte ($\Delta_{\text{adj}} = -19,1\%$; $d_{\text{adj}} = -0,52$; $P = 0,128$), bei den Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu den Kontrollpersonen (Gaus et al., 2022). Bisherige Forschung zur Neuropathologie der VENs in der Schizophrenie ist spärlich. Eine Studie (Krause et al., 2017) stellte bei PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen mehr lysosomale Aggregate in VENs fest, was auf pathologische Prozesse auf der Ebene einzelner Zellen hindeutet. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fanden Brüne et al. (Brüne et al., 2010) keinen Unterschied in der mittleren VEN-Dichte in Lamina V in Area 24 zwischen PatientInnen mit Schizophrenie und gesunden Kontrollpersonen, berichteten aber über eine statistisch signifikant niedrigere mittlere VEN-Dichte speziell im rechten ACC von vier Patienten mit early-onset Schizophrenie. Da Brüne

et al. (Brüne et al., 2010) keinen design-based stereologischen Ansatz anwandten, konnte ein möglicher Unterschied in der mittleren VEN-Zahl zwischen den Gruppen nicht untersucht werden. Es gibt Hinweise auf eine selektive Verringerung der VEN-Zahl im ACC bei neuropsychiatrischen Erkrankungen, die mit deutlichen Defiziten in der sozialen Kognition einhergehen, wie frontotemporale Demenz (Seeley et al., 2006), Agenesie des Corpus callosum (Kaufman et al., 2008) und Autismus-Spektrum-Störungen (Allman et al., 2010; Santos et al., 2011), während bei Erkrankungen, bei denen sozial-kognitive Defizite keine zentrale Rolle spielen, wie bei der Alzheimer-Krankheit (Seeley et al., 2006), keine solche selektive Verringerung auftritt. Diese Befunde führten zu der Hypothese, dass im ACC angesiedelte VENs eine wichtige Rolle bei sozial-kognitiven Funktionen übernehmen (Allman et al., 2010), was zu den zahlreichen Hinweisen auf eine Involvierung des ACC in der sozialen Kognition passt (Amodio & Frith, 2006; Apps et al., 2016). Defizite in der sozialen Kognition sind auch ein bekanntes Symptom der Schizophrenie (Green et al., 2015), sodass Veränderungen in der Anzahl der VENs wesentlich mit der klinischen Präsentation der Schizophrenie verbunden sein könnten (Allman et al., 2010).

Für eine genaue Darstellung und Diskussion dieser Ergebnisse siehe Gaus et al. (Gaus et al., 2022).

5.5 Ausblick: Neuropathologie der Schizophrenie

Eine Fülle an Befunden mikro- und makroskopischer Veränderungen im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie weist auf eine organische Assoziation dieser Erkrankung hin. Dabei ist die genaue Natur der gehirnmorphologischen Veränderungen nach wie vor unklar, da viele dieser Befunde entweder widersprüchlich oder für sich genommen wenig aussagekräftig sind. Insbesondere das mikroanatomische Profil der Schizophrenie ist weiterhin unklar, was bereits 1972 zur Benennung der Erkrankung als „Friedhof der Neuropathologen“ führte (Plum, 1972). Um dieses Profil zu schärfen, werden in Zukunft einige Faktoren eine entscheidende Rolle spielen.

Zur Detektion auch kleiner Gruppenunterschiede sowie zur Aufdeckung von neuroanatomischen Untergruppen der Erkrankung ist eine größere Stichprobengröße unabdingbar. Hierfür wird eine größere Verbreitung und Zugänglichkeit von Gehirnbanken besonders wichtig sein. Als Vorbild hierfür können die Data-Sharing-Prinzipien aus der Neurobildungs-Forschung dienen (Poldrack & Gorgolewski, 2014). Der Flaschenhals des hohen manuellen Arbeitsaufwandes kann durch eine Automatisierung des Untersuchungsprozesses mittels moderner technischer Methoden adressiert werden. Durch eine schnellere und genauere stereologische Messung könnten viele Parameter einer Gehirnbank wie Neuronenzahlen und -dichten in verschiedenen kortikalen und subkortikalen Regionen nacheinander erfasst und dadurch umfangreiche neuropathologische Abbilder von ganzen Gehirnbanken oder auch Zusammenschlüssen von Gehirnbanken erstellt werden.

Neuropathologische Untersuchungen von *post mortem* Gehirnen waren bisher meist auf optische Mikroskopie angewiesen. Dabei könnten neuere bildgebende Verfahren neue Methoden zur Untersuchung von *post mortem* Geweben auf Zellebene eröffnen und somit die Erfassung und digitale Auswertung anatomischer Strukturen wie ganzer Gehirne ohne die Notwendigkeit einer histologischen Präparation und Färbung (die mit eigenen Störvariablen einhergehen) ermöglichen. So hat das Mikro-CT bereits eine Auflösung auf Zellebene und kann zur Darstellung von Neuronen herangezogen werden (Depannemaecker et al., 2019). Auf diese Weise könnte auch eine Digitalisierung ganzer Gehirnbanken stattfinden, die dann mit anderen Gehirnbanken kombiniert

und mit auf maschinellem Lernen basierenden Methoden unterschiedlichsten Auswertungen zu-
geführt werden könnten.

6. Publikation

Gaus, R., Popal, M., Heinsen, H., Schmitt, A., Falkai, P., Hof, P. R., Schmitz, C., & Vollhardt, A. (2022, Nov 9). Reduced cortical neuron number and neuron density in schizophrenia with focus on area 24: a post-mortem case-control study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. <https://doi.org/10.1007/s00406-022-01513-6>

Literaturverzeichnis

- Abel, K. M., Drake, R., & Goldstein, J. M. (2010). Sex differences in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry*, 22(5), 417-428. <https://doi.org/10.3109/09540261.2010.515205>
- Adams, R., & David, A. S. (2007, Feb). Patterns of anterior cingulate activation in schizophrenia: a selective review. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 3(1), 87-101. <https://doi.org/10.2147/ndt.2007.3.1.87>
- Agam, G., Everall, I. P., & Belmaker, R. H. (2002). *The postmortem brain in psychiatric research* (Vol. 4). Springer Science & Business Media.
- Akbarian, S., Kim, J. J., Potkin, S. G., Hagman, J. O., Tafazzoli, A., Bunney, W. E., Jr., & Jones, E. G. (1995, Apr). Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*, 52(4), 258-266. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950160008002>
- Alahmari, S. S., Goldgof, D., Hall, L. O., & Mouton, P. R. (2022, Nov 3). A Review of Nuclei Detection and Segmentation on Microscopy Images Using Deep Learning With Applications to Unbiased Stereology Counting. *IEEE Trans Neural Netw Learn Syst*, PP. <https://doi.org/10.1109/TNNLS.2022.3213407>
- Aleman, A., & Kahn, R. S. (2005, Dec). Strange feelings: do amygdala abnormalities dysregulate the emotional brain in schizophrenia? *Prog Neurobiol*, 77(5), 283-298. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.11.005>
- Allman, J. M., Tetreault, N. A., Hakeem, A. Y., Manaye, K. F., Semendeferi, K., Erwin, J. M., Park, S., Goubert, V., & Hof, P. R. (2010, Jun). The von Economo neurons in frontoinsular and anterior cingulate cortex in great apes and humans. *Brain Struct Funct*, 214(5-6), 495-517. <https://doi.org/10.1007/s00429-010-0254-0>
- American Psychiatric Association. (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4th ed.). American Psychiatric Association. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999733358502121>
- Amodio, D. M., & Frith, C. D. (2006, Apr). Meeting of minds: the medial frontal cortex and social cognition. *Nat Rev Neurosci*, 7(4), 268-277. <https://doi.org/10.1038/nrn1884>
- Apps, M. A., Rushworth, M. F., & Chang, S. W. (2016, May 18). The anterior cingulate gyrus and social cognition: Tracking the motivation of others. *Neuron*, 90(4), 692-707. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.018>
- Ashe, P. C., Berry, M. D., & Boulton, A. A. (2001, May). Schizophrenia, a neurodegenerative disorder with neurodevelopmental antecedents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 25(4), 691-707. [https://doi.org/10.1016/s0278-5846\(01\)00159-2](https://doi.org/10.1016/s0278-5846(01)00159-2)
- Ayano, G., Tesfaw, G., & Shumet, S. (2019, Nov 27). The prevalence of schizophrenia and other psychotic disorders among homeless people: a systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*, 19(1), 370. <https://doi.org/10.1186/s12888-019-2361-7>

- Baiano, M., David, A., Versace, A., Churchill, R., Balestrieri, M., & Brambilla, P. (2007, Jul). Anterior cingulate volumes in schizophrenia: a systematic review and a meta-analysis of MRI studies. *Schizophr Res*, 93(1-3), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2007.02.012>
- Bakhshi, K., & Chance, S. A. (2015, Sep 10). The neuropathology of schizophrenia: A selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture. *Neuroscience*, 303, 82-102. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.028>
- Beckmann, M., Johansen-Berg, H., & Rushworth, M. F. (2009, Jan 28). Connectivity-based parcellation of human cingulate cortex and its relation to functional specialization. *J Neurosci*, 29(4), 1175-1190. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3328-08.2009>
- Bell, J. E., Alafuzoff, I., Al-Sarraj, S., Arzberger, T., Bogdanovic, N., Budka, H., Dexter, D. T., Falkai, P., Ferrer, I., Gelpi, E., Gentleman, S. M., Giaccone, G., Huitinga, I., Ironside, J. W., Klyoueva, N., Kovacs, G. G., Meyronet, D., Palkovits, M., Parchi, P., Patsouris, E., Reynolds, R., Riederer, P., Roggendorf, W., Seilhean, D., Schmitt, A., Schmitz, P., Streichenberger, N., Schwalber, A., & Kretschmar, H. (2008, May). Management of a twenty-first century brain bank: experience in the BrainNet Europe consortium. *Acta Neuropathol*, 115(5), 497-507. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0360-8>
- Benes, F. M., & Bird, E. D. (1987, Jul). An analysis of the arrangement of neurons in the cingulate cortex of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry*, 44(7), 608-616. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1987.01800190024004>
- Benes, F. M., Davidson, J., & Bird, E. D. (1986, Jan). Quantitative cytoarchitectural studies of the cerebral cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*, 43(1), 31-35. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1986.01800010033004>
- Benes, F. M., McSparren, J., Bird, E. D., SanGiovanni, J. P., & Vincent, S. L. (1991, Nov). Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry*, 48(11), 996-1001. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1991.01810350036005>
- Benes, F. M., Vincent, S. L., & Todtenkopf, M. (2001, Sep 15). The density of pyramidal and nonpyramidal neurons in anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar subjects. *Biol Psychiatry*, 50(6), 395-406. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01084-8](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01084-8)
- Blair, J. A., Wang, C., Hernandez, D., Siedlak, S. L., Rodgers, M. S., Achar, R. K., Fahmy, L. M., Torres, S. L., Petersen, R. B., Zhu, X., Casadesus, G., & Lee, H. G. (2016). Individual Case Analysis of Postmortem Interval Time on Brain Tissue Preservation. *PLoS One*, 11(3), e0151615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151615>
- Bouras, C., Kovari, E., Hof, P. R., Riederer, B. M., & Giannakopoulos, P. (2001, Oct). Anterior cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathol*, 102(4), 373-379. <https://doi.org/10.1007/s004010100392>
- Braak, H., & Braak, E. (1995, May-Jun). Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*, 16(3), 271-278; discussion 278-284. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00021-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00021-6)

- Brugger, S. P., & Howes, O. D. (2017, Nov 1). Heterogeneity and homogeneity of regional brain structure in schizophrenia: a meta-analysis. *JAMA psychiatry*, 74(11), 1104-1111. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.2663>
- Brüne, M., Schöbel, A., Karau, R., Benali, A., Faustmann, P. M., Juckel, G., & Petrasch-Parwez, E. (2010, Jun). Von Economo neuron density in the anterior cingulate cortex is reduced in early onset schizophrenia. *Acta Neuropathol*, 119(6), 771-778. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0673-2>
- Brüne, M., Schöbel, A., Karau, R., Faustmann, P. M., Dermietzel, R., Juckel, G., & Petrasch-Parwez, E. (2011). Neuroanatomical correlates of suicide in psychosis: the possible role of von Economo neurons. *PLoS One*, 6(6), e20936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020936>
- Bubb, E. J., Metzler-Baddeley, C., & Aggleton, J. P. (2018, Sep). The cingulum bundle: Anatomy, function, and dysfunction. *Neurosci Biobehav Rev*, 92, 104-127. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.008>
- Buckley, P. F., Miller, B. J., Lehrer, D. S., & Castle, D. J. (2009, Mar). Psychiatric comorbidities and schizophrenia. *Schizophr Bull*, 35(2), 383-402. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn135>
- Butti, C., Santos, M., Uppal, N., & Hof, P. R. (2013, Jan). Von Economo neurons: clinical and evolutionary perspectives. *Cortex*, 49(1), 312-326. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2011.10.004>
- Button, K. S., Ioannidis, J. P., Mokrysz, C., Nosek, B. A., Flint, J., Robinson, E. S., & Munafò, M. R. (2013, May). Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 14(5), 365-376. <https://doi.org/10.1038/nrn3475>
- Cai, L., & Huang, J. (2018). Schizophrenia and risk of dementia: a meta-analysis study. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 14, 2047-2055. <https://doi.org/10.2147/NDT.S172933>
- Calderazzo, S. M., Busch, S. E., Moore, T. L., Rosene, D. L., & Medalla, M. (2021, Mar). Distribution and overlap of entorhinal, premotor, and amygdalar connections in the monkey anterior cingulate cortex. *J Comp Neurol*, 529(4), 885-904. <https://doi.org/10.1002/cne.24986>
- Carmichael, S. T., & Price, J. L. (1995, Dec 25). Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol*, 363(4), 615-641. <https://doi.org/10.1002/cne.903630408>
- Casanova, M. F., de Zeeuw, L., Switala, A., Kreczmanski, P., Korr, H., Ulfing, N., Heinsen, H., Steinbusch, H. W., & Schmitz, C. (2005, Jan 30). Mean cell spacing abnormalities in the neocortex of patients with schizophrenia. *Psychiatry Res*, 133(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2004.11.004>

- Cauda, F., Geminiani, G. C., & Vercelli, A. (2014). Evolutionary appearance of von Economo's neurons in the mammalian cerebral cortex. *Front Hum Neurosci*, 8, 104. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00104>
- Cavalieri, B. (1635). *Geometria Indivisibilibus Continuatorum Nova Quadam Ratione Promota*.
- Chana, G., Landau, S., Beasley, C., Everall, I. P., & Cotter, D. (2003, Jun 15). Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density. *Biol Psychiatry*, 53(12), 1086-1098. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(03\)00114-8](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(03)00114-8)
- Charlson, F. J., Ferrari, A. J., Santomauro, D. F., Diminic, S., Stockings, E., Scott, J. G., McGrath, J. J., & Whiteford, H. A. (2018, Oct 17). Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia: Findings From the Global Burden of Disease Study 2016. *Schizophr Bull*, 44(6), 1195-1203. <https://doi.org/10.1093/schbul/sby058>
- Chen, F., Bertelsen, A. B., Holm, I. E., Nyengaard, J. R., Rosenberg, R., & Dorph-Petersen, K. A. (2020, Jan 15). Hippocampal volume and cell number in depression, schizophrenia, and suicide subjects. *Brain Res*, 1727, 146546. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146546>
- Chong, H. Y., Teoh, S. L., Wu, D. B., Kotirum, S., Chiou, C. F., & Chaiyakunapruk, N. (2016). Global economic burden of schizophrenia: a systematic review. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12, 357-373. <https://doi.org/10.2147/NDT.S96649>
- Cobos, I., & Seeley, W. W. (2015, Jan). Human von Economo neurons express transcription factors associated with Layer V subcerebral projection neurons. *Cereb Cortex*, 25(1), 213-220. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht219>
- Cooper, H., Hedges, L. V., & Valentine, J. C. (2019). *The handbook of research synthesis and meta-analysis* (3rd ed.). Russell sage foundation.
- Cotter, D., Mackay, D., Landau, S., Kerwin, R., & Everall, I. (2001, Jun). Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 58(6), 545-553. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.6.545>
- Coyle, J. T. (2006, Jul-Aug). Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol Neurobiol*, 26(4-6), 365-384. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9062-8>
- Cullen, T. J., Walker, M. A., Eastwood, S. L., Esiri, M. M., Harrison, P. J., & Crow, T. J. (2006, Jan). Anomalies of asymmetry of pyramidal cell density and structure in dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 188, 26-31. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.104.008169>
- Davies, A. M. (2003, Jun 2). Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J*, 22(11), 2537-2545. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg254>

- de Leon, J., & Diaz, F. J. (2005, Jul 15). A meta-analysis of worldwide studies demonstrates an association between schizophrenia and tobacco smoking behaviors. *Schizophr Res*, 76(2-3), 135-157. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2005.02.010>
- Dean, K., & Murray, R. M. (2005). Environmental risk factors for psychosis. *Dialogues Clin Neurosci*, 7(1), 69-80. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2005.7.1/kdean>
- Depannemaecker, D., Santos, L. E. C., de Almeida, A. G., Ferreira, G. B. S., Baraldi, G. L., Miqueles, E. X., de Carvalho, M., Costa, G. S. R., Marques, M. J. G., Scorza, C. A., & Rinkel, J. (2019, Aug 21). Gold Nanoparticles for X-ray Microtomography of Neurons. *ACS Chem Neurosci*, 10(8), 3404-3408. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00290>
- Di Rosa, E., Crow, T. J., Walker, M. A., Black, G., & Chance, S. A. (2009, Apr 30). Reduced neuron density, enlarged minicolumn spacing and altered ageing effects in fusiform cortex in schizophrenia. *Psychiatry Res*, 166(2-3), 102-115. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.04.007>
- Dorph-Petersen, K. A., Pierri, J. N., Wu, Q., Sampson, A. R., & Lewis, D. A. (2007, Mar 10). Primary visual cortex volume and total neuron number are reduced in schizophrenia. *J Comp Neurol*, 501(2), 290-301. <https://doi.org/10.1002/cne.21243>
- Ebitz, R. B., & Hayden, B. Y. (2016, Sep 27). Dorsal anterior cingulate: a Rorschach test for cognitive neuroscience. *Nat Neurosci*, 19(10), 1278-1279. <https://doi.org/10.1038/nn.4387>
- Eckersley, P., & Nasser, Y. (2017). *EFF AI Progress Measurement Project*. Retrieved 09.07.2023 from <https://eff.org/ai/metrics>
- Einarson, L. (1932, May). A Method for Progressive Selective Staining of Nissl and Nuclear Substance in Nerve Cells. *Am J Pathol*, 8(3), 295-308 295. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19970018>
- Ellison-Wright, I., & Bullmore, E. (2010, Mar). Anatomy of bipolar disorder and schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res*, 117(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.12.022>
- Falkai, P., Malchow, B., Wetzstein, K., Nowastowski, V., Bernstein, H. G., Steiner, J., Schneider-Axmann, T., Kraus, T., Hasan, A., Bogerts, B., Schmitz, C., & Schmitt, A. (2016, Jul). Decreased Oligodendrocyte and Neuron Number in Anterior Hippocampal Areas and the Entire Hippocampus in Schizophrenia: A Stereological Postmortem Study. *Schizophr Bull*, 42 Suppl 1(Suppl 1), S4-S12. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv157>
- Fibiger, H. C. (2012, Jun). Psychiatry, the pharmaceutical industry, and the road to better therapeutics. *Schizophr Bull*, 38(4), 649-650. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs073>
- Fisher, S. R. A. (1959). *Smoking: the cancer controversy: some attempts to assess the evidence*. Oliver and Boyd Edinburgh.

- Flood, D. G., & Coleman, P. D. (1988, Sep-Dec). Neuron numbers and sizes in aging brain: comparisons of human, monkey, and rodent data. *Neurobiol Aging*, 9(5-6), 453-463. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(88\)80098-8](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(88)80098-8)
- Fornito, A., Yucel, M., Dean, B., Wood, S. J., & Pantelis, C. (2009, Sep). Anatomical abnormalities of the anterior cingulate cortex in schizophrenia: bridging the gap between neuroimaging and neuropathology. *Schizophr Bull*, 35(5), 973-993. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn025>
- Fujiwara, H., Namiki, C., Hirao, K., Miyata, J., Shimizu, M., Fukuyama, H., Sawamoto, N., Hayashi, T., & Murai, T. (2007, Sep). Anterior and posterior cingulum abnormalities and their association with psychopathology in schizophrenia: a diffusion tensor imaging study. *Schizophr Res*, 95(1-3), 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2007.05.044>
- Gaebel, W., Hasan, A., & Falkai, P. (2019). *S3-Leitlinie Schizophrenie*. Springer-Verlag.
- Gaebel, W., & Wölwer, W. (2010). Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 50. *Berlin: Robert Koch Institut*.
- Garcia-Finana, M., Cruz-Orive, L. M., Mackay, C. E., Pakkenberg, B., & Roberts, N. (2003, Feb). Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. *Neuroimage*, 18(2), 505-516. [https://doi.org/10.1016/s1053-8119\(02\)00021-6](https://doi.org/10.1016/s1053-8119(02)00021-6)
- Gaus, R., Popal, M., Heinsen, H., Schmitt, A., Falkai, P., Hof, P. R., Schmitz, C., & Vollhardt, A. (2022, Nov 9). Reduced cortical neuron number and neuron density in schizophrenia with focus on area 24: a post-mortem case-control study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. <https://doi.org/10.1007/s00406-022-01513-6>
- Gefen, T., Papastefan, S. T., Rezvani, A., Bigio, E. H., Weintraub, S., Rogalski, E., Mesulam, M. M., & Geula, C. (2018, Feb). Von Economo neurons of the anterior cingulate across the lifespan and in Alzheimer's disease. *Cortex*, 99, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.10.015>
- Glausier, J. R., & Lewis, D. A. (2013, Oct 22). Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience*, 251, 90-107. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.044>
- Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E., & Hyman, B. T. (1997, Jan). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 41(1), 17-24. <https://doi.org/10.1002/ana.410410106>
- Green, M. F., Horan, W. P., & Lee, J. (2015, Oct). Social cognition in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 16(10), 620-631. <https://doi.org/10.1038/nrn4005>
- Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., & et al. (1988, Oct). The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*, 96(10), 857-881. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988.tb00954.x>

- Gundersen, H. J., & Jensen, E. B. (1987, Sep). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147(Pt 3), 229-263. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x>
- Haijma, S. V., Van Haren, N., Cahn, W., Koolschijn, P. C., Hulshoff Pol, H. E., & Kahn, R. S. (2013, Sep). Brain volumes in schizophrenia: a meta-analysis in over 18 000 subjects. *Schizophr Bull*, 39(5), 1129-1138. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs118>
- Hald, A. (1998). *A History of Mathematical Statistics from 1750 to 1930*. New York: Wiley.
- Hammerton, G., & Munafo, M. R. (2021, Jul). Causal inference with observational data: the need for triangulation of evidence - CORRIGENDUM. *Psychol Med*, 51(9), 1591. <https://doi.org/10.1017/S0033291721002634>
- Harrison, P. J. (1999, Nov 30). The neuropathological effects of antipsychotic drugs. *Schizophr Res*, 40(2), 87-99. [https://doi.org/10.1016/s0920-9964\(99\)00065-1](https://doi.org/10.1016/s0920-9964(99)00065-1)
- Harrison, P. J. (2008). Neuropathology of schizophrenia. *Psychiatry*, 7(10), 421-424. <https://doi.org/10.1016/j.mppsy.2008.07.013>
- Haug, J. O. (1962). Pneumoencephalographic studies in mental disease. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 38(165), 1-104. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13960992>
- Heckers, S., Heinsen, H., Heinsen, Y., & Beckmann, H. (1991, Mar 15). Cortex, white matter, and basal ganglia in schizophrenia: a volumetric postmortem study. *Biol Psychiatry*, 29(6), 556-566. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(91\)90091-y](https://doi.org/10.1016/0006-3223(91)90091-y)
- Hedges, E. P., Dimitrov, M., Zahid, U., Brito Vega, B., Si, S., Dickson, H., McGuire, P., Williams, S., Barker, G. J., & Kempton, M. J. (2022, Feb 1). Reliability of structural MRI measurements: The effects of scan session, head tilt, inter-scan interval, acquisition sequence, FreeSurfer version and processing stream. *Neuroimage*, 246, 118751. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.118751>
- Heilbronner, S. R., & Hayden, B. Y. (2016, Jul 8). Dorsal anterior cingulate cortex: A bottom-up view. *Annu Rev Neurosci*, 39, 149-170. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070815-013952>
- Heinsen, H. (1991). Serial thick, frozen, gallocyenin stained sections of human central nervous system. *J Histotechnol*, 14(3), 167-173.
- Heinsen, H., Arzberger, T., & Schmitz, C. (2000, Oct). Celloidin mounting (embedding without infiltration) - a new, simple and reliable method for producing serial sections of high thickness through complete human brains and its application to stereological and immunohistochemical investigations. *J Chem Neuroanat*, 20(1), 49-59. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(00)00067-3)

- Heinsen, H., Beckmann, H., Heinsen, Y. L., Gallyas, F., Haas, S., & Scharff, G. (1989, Sep). Laminar neuropathology in Alzheimer's disease by a modified Gallyas impregnation. *Psychiatry Res*, 29(3), 463-465. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(89\)90124-8](https://doi.org/10.1016/0165-1781(89)90124-8)
- Heinsen, H., Henn, R., Eisenmenger, W., Gotz, M., Bohl, J., Bethke, B., Lockemann, U., & Puschel, K. (1994, Aug). Quantitative investigations on the human entorhinal area: left-right asymmetry and age-related changes. *Anat Embryol (Berl)*, 190(2), 181-194. <https://doi.org/10.1007/BF00193414>
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci*, 3, 31. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>
- Highley, J. R., McDonald, B., Walker, M. A., Esiri, M. M., & Crow, T. J. (1999, Aug). Schizophrenia and temporal lobe asymmetry. A post-mortem stereological study of tissue volume. *Br J Psychiatry*, 175, 127-134. <https://doi.org/10.1192/bjp.175.2.127>
- Hodge, R. D., Miller, J. A., Novotny, M., Kalmbach, B. E., Ting, J. T., Bakken, T. E., Aevermann, B. D., Barkan, E. R., Berkowitz-Cerasano, M. L., Cobbs, C., Diez-Fuertes, F., Ding, S. L., McCorrison, J., Schork, N. J., Shehata, S. I., Smith, K. A., Sunkin, S. M., Tran, D. N., Venepally, P., Yanny, A. M., Steemers, F. J., Phillips, J. W., Bernard, A., Koch, C., Lasken, R. S., Scheuermann, R. H., & Lein, E. S. (2020, Mar 3). Transcriptomic evidence that von Economo neurons are regionally specialized extratelencephalic-projecting excitatory neurons. *Nat Commun*, 11(1), 1172. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14952-3>
- Höistad, M., Heinsen, H., Wicinski, B., Schmitz, C., & Hof, P. R. (2013, Jun). Stereological assessment of the dorsal anterior cingulate cortex in schizophrenia: absence of changes in neuronal and glial densities. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 39(4), 348-361. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01296.x>
- Holdcroft, A. (2007, Jan). Gender bias in research: how does it affect evidence based medicine? *J R Soc Med*, 100(1), 2-3. <https://doi.org/10.1177/014107680710000102>
- Honea, R., Crow, T. J., Passingham, D., & Mackay, C. E. (2005, Dec). Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry*, 162(12), 2233-2245. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.12.2233>
- Hor, K., & Taylor, M. (2010, Nov). Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *J Psychopharmacol*, 24(4 Suppl), 81-90. <https://doi.org/10.1177/1359786810385490>
- Howard, V., & Reed, M. (2004). *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*. Garland Science.
- Howes, O. D., Cummings, C., Chapman, G. E., & Shatalina, E. (2023, Jan). Neuroimaging in schizophrenia: an overview of findings and their implications for synaptic changes. *Neuropsychopharmacology*, 48(1), 151-167. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01426-x>

- Howes, O. D., McCutcheon, R., Owen, M. J., & Murray, R. M. (2017, Jan 1). The Role of Genes, Stress, and Dopamine in the Development of Schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 81(1), 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.07.014>
- Howes, O. D., & Onwordi, E. C. (2023, Apr 11). The synaptic hypothesis of schizophrenia version III: a master mechanism. *Mol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02043-w>
- Hyman, S. E. (2013, Mar). Psychiatric drug development: diagnosing a crisis. *Cerebrum*, 2013, 5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720708>
- Insel, T. R. (2010, Nov 11). Rethinking schizophrenia. *Nature*, 468(7321), 187-193. <https://doi.org/10.1038/nature09552>
- Insel, T. R. (2022). *Healing: Our path from mental illness to mental health*. Penguin.
- Ioannidis, J. P. (2005). Why most published research findings are false. *PLoS medicine*, 2(8), e124.
- Jaaskelainen, E., Juola, P., Hirvonen, N., McGrath, J. J., Saha, S., Isohanni, M., Veijola, J., & Miettunen, J. (2013, Nov). A systematic review and meta-analysis of recovery in schizophrenia. *Schizophr Bull*, 39(6), 1296-1306. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs130>
- Jacob, B. (2020). Big pharma backed away from brain drugs. Is a return in sight. *BioPharma Dive*.
- Jones, C. A., Watson, D. J., & Fone, K. C. (2011, Oct). Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol*, 164(4), 1162-1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>
- Kalus, P., Senitz, D., & Beckmann, H. (1997, Aug 8). Altered distribution of parvalbumin-immunoreactive local circuit neurons in the anterior cingulate cortex of schizophrenic patients. *Psychiatry Res*, 75(1), 49-59. [https://doi.org/10.1016/s0925-4927\(97\)00020-6](https://doi.org/10.1016/s0925-4927(97)00020-6)
- Karama, S., Ducharme, S., Corley, J., Chouinard-Decorte, F., Starr, J. M., Wardlaw, J. M., Bastin, M. E., & Deary, I. J. (2015, Jun). Cigarette smoking and thinning of the brain's cortex. *Mol Psychiatry*, 20(6), 778-785. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.187>
- Kaufman, J. A., Paul, L. K., Manaye, K. F., Granstedt, A. E., Hof, P. R., Hakeem, A. Y., & Allman, J. M. (2008, Nov). Selective reduction of Von Economo neuron number in agenesis of the corpus callosum. *Acta Neuropathol*, 116(5), 479-489. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0434-7>
- Keepers, G. A., Fochtmann, L. J., Anzia, J. M., Benjamin, S., Lyness, J. M., Mojtabei, R., Servis, M., Walaszek, A., Buckley, P., & Lenzenweger, M. F. (2020). The American Psychiatric Association practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 177(9), 868-872.
- Khan, A., Sohail, A., Zahoor, U., & Qureshi, A. S. (2020). A survey of the recent architectures of deep convolutional neural networks. *Artificial Intelligence Review*, 53(8), 5455-5516. <https://doi.org/10.1007/s10462-020-09825-6>

- Kissling, W., Höffler, J., Seemann, U., Müller, P., Rütger, E., Trenckmann, U., Über, A., vd Schulenburg, J.-M. G., Glaser, P., & Glaser, T. (1999). Die direkten und indirekten Kosten der Schizophrenie. *Fortschritte der Neurologie· Psychiatrie*, 67(01), 29-36.
- Krause, M., Theiss, C., & Brune, M. (2017, Nov). Ultrastructural alterations of von Economo neurons in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Anat Rec (Hoboken)*, 300(11), 2017-2024. <https://doi.org/10.1002/ar.23635>
- Kreczmanski, P., Heinsen, H., Mantua, V., Woltersdorf, F., Masson, T., Ulfing, N., Schmidt-Kastner, R., Korr, H., Steinbusch, H. W., Hof, P. R., & Schmitz, C. (2007, Mar). Volume, neuron density and total neuron number in five subcortical regions in schizophrenia. *Brain*, 130(Pt 3), 678-692. <https://doi.org/10.1093/brain/awl386>
- Kreczmanski, P., Schmidt-Kastner, R., Heinsen, H., Steinbusch, H. W., Hof, P. R., & Schmitz, C. (2005, May). Stereological studies of capillary length density in the frontal cortex of schizophrenics. *Acta Neuropathol*, 109(5), 510-518. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-1003-y>
- Lally, J., & MacCabe, J. H. (2015, Jun). Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *Br Med Bull*, 114(1), 169-179. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv017>
- Laursen, T. M., Nordentoft, M., & Mortensen, P. B. (2014). Excess early mortality in schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol*, 10, 425-448. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032813-153657>
- Lee, A. S., Azmitia, E. C., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2017, May). Developmental microglial priming in postmortem autism spectrum disorder temporal cortex. *Brain Behav Immun*, 62, 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.019>
- Lerch, J. P., van der Kouwe, A. J., Raznahan, A., Paus, T., Johansen-Berg, H., Miller, K. L., Smith, S. M., Fischl, B., & Sotiropoulos, S. N. (2017, Feb 23). Studying neuroanatomy using MRI. *Nat Neurosci*, 20(3), 314-326. <https://doi.org/10.1038/nn.4501>
- Leung, A., & Chue, P. (2000). Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 401, 3-38. <https://doi.org/10.1111/j.0065-1591.2000.0ap25.x>
- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances. *Contributions to probability and statistics*, 278-292.
- Lewis, D. A., & Levitt, P. (2002). Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci*, 25, 409-432. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142754>
- Lincoln, T., Pedersen, A., Hahlweg, K., Wiedl, K.-H., & Frantz, I. (2019). *Evidenzbasierte Leitlinie zur Psychotherapie von Schizophrenie und anderen psychotischen Störungen* (Vol. 5). Hogrefe Verlag GmbH & Company KG.

- Loeb, L. A., Ernster, V. L., Warner, K. E., Abbotts, J., & Laszlo, J. (1984, Dec). Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Res*, 44(12 Pt 1), 5940-5958. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6388830>
- Margulies, D. S., Kelly, A. M., Uddin, L. Q., Biswal, B. B., Castellanos, F. X., & Milham, M. P. (2007, Aug 15). Mapping the functional connectivity of anterior cingulate cortex. *Neuroimage*, 37(2), 579-588. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.05.019>
- Marwaha, S., & Johnson, S. (2004, May). Schizophrenia and employment - a review. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 39(5), 337-349. <https://doi.org/10.1007/s00127-004-0762-4>
- MBF Bioscience. (2023). ****Coming Soon** Cellairus®**. Retrieved Aug 12, 2023 from <https://www.mbfbioscience.com/products/cellairus>
- McCutcheon, R. A., Keefe, R. S. E., & McGuire, P. K. (2023, Jan 23). Cognitive impairment in schizophrenia: aetiology, pathophysiology, and treatment. *Mol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-01949-9>
- McKinney, W. (2010). Data structures for statistical computing in python. Proceedings of the 9th Python in Science Conference, Austin, TX.
- Merker, B. (1983, Nov). Silver staining of cell bodies by means of physical development. *J Neurosci Methods*, 9(3), 235-241. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(83\)90086-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(83)90086-9)
- Meyer, J. M., & Simpson, G. M. (1997, Sep). From chlorpromazine to olanzapine: a brief history of antipsychotics. *Psychiatr Serv*, 48(9), 1137-1139. <https://doi.org/10.1176/ps.48.9.1137>
- Meyer, U., & Feldon, J. (2010, Mar). Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol*, 90(3), 285-326. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.018>
- Miller, G. A., & Chapman, J. P. (2001, Feb). Misunderstanding analysis of covariance. *J Abnorm Psychol*, 110(1), 40-48. <https://doi.org/10.1037//0021-843x.110.1.40>
- Moncrieff, J., & Leo, J. (2010, Sep). A systematic review of the effects of antipsychotic drugs on brain volume. *Psychol Med*, 40(9), 1409-1422. <https://doi.org/10.1017/S0033291709992297>
- Muraki, K., & Tanigaki, K. (2015). Neuronal migration abnormalities and its possible implications for schizophrenia. *Front Neurosci*, 9, 74. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00074>
- Murray, R. M., Bhavsar, V., Tripoli, G., & Howes, O. (2017, Oct 21). 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed Into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. *Schizophr Bull*, 43(6), 1190-1196. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx121>

- Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010, Oct). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 13(10), 1161-1169. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>
- Nimchinsky, E. A., Vogt, B. A., Morrison, J. H., & Hof, P. R. (1995, Apr 24). Spindle neurons of the human anterior cingulate cortex. *J Comp Neurol*, 355(1), 27-37. <https://doi.org/10.1002/cne.903550106>
- Ongür, D., Drevets, W. C., & Price, J. L. (1998, Oct 27). Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(22), 13290-13295. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.13290>
- Onwordi, E. C., Halff, E. F., Whitehurst, T., Mansur, A., Cotel, M. C., Wells, L., Creaney, H., Bonsall, D., Rogdaki, M., Shatalina, E., Reis Marques, T., Rabiner, E. A., Gunn, R. N., Natesan, S., Vernon, A. C., & Howes, O. D. (2020, Jan 14). Synaptic density marker SV2A is reduced in schizophrenia patients and unaffected by antipsychotics in rats. *Nat Commun*, 11(1), 246. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14122-0>
- Osimo, E. F., Beck, K., Reis Marques, T., & Howes, O. D. (2019, Apr). Synaptic loss in schizophrenia: a meta-analysis and systematic review of synaptic protein and mRNA measures. *Mol Psychiatry*, 24(4), 549-561. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0041-5>
- Pakkenberg, B. (1987, Dec). Post-mortem study of chronic schizophrenic brains. *Br J Psychiatry*, 151, 744-752. <https://doi.org/10.1192/bjp.151.6.744>
- Pakkenberg, B. (1993, Dec 1). Total nerve cell number in neocortex in chronic schizophrenics and controls estimated using optical disectors. *Biol Psychiatry*, 34(11), 768-772. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(93\)90065-l](https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90065-l)
- Pakkenberg, B., & Gundersen, H. J. (1997, Jul 28). Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol*, 384(2), 312-320. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9215725>
- Pandya, D. N., Van Hoesen, G. W., & Mesulam, M. M. (1981). Efferent connections of the cingulate gyrus in the rhesus monkey. *Exp Brain Res*, 42(3-4), 319-330. <https://doi.org/10.1007/BF00237497>
- Parascandola, M. (2004, Spring). Skepticism, statistical methods, and the cigarette: a historical analysis of a methodological debate. *Perspect Biol Med*, 47(2), 244-261. <https://doi.org/10.1353/pbm.2004.0032>
- Pearl, J. (2009). Causal inference in statistics: An overview. *Statistics Surveys*, 3(none), 96-146, 151. <https://doi.org/10.1214/09-SS057>
- Pettersson-Yeo, W., Allen, P., Benetti, S., McGuire, P., & Mechelli, A. (2011, Apr). Dysconnectivity in schizophrenia: where are we now? *Neurosci Biobehav Rev*, 35(5), 1110-1124. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.11.004>

- Pharoah, F., Mari, J., Rathbone, J., & Wong, W. (2010, Dec 8). Family intervention for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev*(12), CD000088. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000088.pub2>
- Plum, F. (1972, Nov). Prospects for research on schizophrenia. 3. Neurophysiology. Neuropathological findings. *Neurosci Res Program Bull*, 10(4), 384-388. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4663816>
- Poldrack, R. A., & Gorgolewski, K. J. (2014, Nov). Making big data open: data sharing in neuroimaging. *Nat Neurosci*, 17(11), 1510-1517. <https://doi.org/10.1038/nn.3818>
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., Mooney, R., & White, L. E. (2018). *Neuroscience*. Sinauer. <https://books.google.de/books?id=4xoGDQEACAAJ>
- Raghanti, M. A., Spurlock, L. B., Treichler, F. R., Weigel, S. E., Stimmelmayer, R., Butti, C., Thewissen, J. G., & Hof, P. R. (2015, Jul). An analysis of von Economo neurons in the cerebral cortex of cetaceans, artiodactyls, and perissodactyls. *Brain Struct Funct*, 220(4), 2303-2314. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0792-y>
- Roberts, R. C., Barksdale, K. A., Roche, J. K., & Lahti, A. C. (2015, Oct). Decreased synaptic and mitochondrial density in the postmortem anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Schizophr Res*, 168(1-2), 543-553. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.07.016>
- Rosenbloom, M. (2002, Apr 10). Chlorpromazine and the psychopharmacologic revolution. *JAMA*, 287(14), 1860-1861. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11939878>
- Rosene, D. L., Roy, N. J., & Davis, B. J. (1986, Oct). A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *J Histochem Cytochem*, 34(10), 1301-1315. <https://doi.org/10.1177/34.10.3745909>
- Rubinow, M. J., Mahajan, G., May, W., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Dieter, L., Herbst, N., Steffens, D. C., Miguel-Hidalgo, J. J., Rajkowska, G., & Stockmeier, C. A. (2016, Jan). Basolateral amygdala volume and cell numbers in major depressive disorder: a postmortem stereological study. *Brain Struct Funct*, 221(1), 171-184. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0900-z>
- Rutherford, A. (2011). *ANOVA and ANCOVA: a GLM approach*. John Wiley & Sons.
- Sandritter, W., Diefenbach, H., & Krantz, F. (1954). Über die quantitative Bindung von Ribonukleinsäure mit Gallozyaninchromalaun. *Experientia*, 10, 210-212.
- Santos, M., Uppal, N., Butti, C., Wicinski, B., Schmeidler, J., Giannakopoulos, P., Heinsen, H., Schmitz, C., & Hof, P. R. (2011, Mar 22). Von Economo neurons in autism: a stereologic study of the fronto-insular cortex in children. *Brain Res*, 1380, 206-217. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.067>

- Schafer, J. L., & Kang, J. (2008, Dec). Average causal effects from nonrandomized studies: a practical guide and simulated example. *Psychol Methods*, 13(4), 279-313. <https://doi.org/10.1037/a0014268>
- Schmidt, C. W. (2007). A change in the air: smoking bans gain momentum worldwide. *World Hosp Health Serv*, 43(3), 37-39. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18269108>
- Schmitt, A., Bauer, M., Heinsen, H., Feiden, W., Consortium of Brainnet, E., II, Falkai, P., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Al-Sarraj, S., Bell, J. E., Bogdanovic, N., Bruck, W., Budka, H., Ferrer, I., Giaccone, G., Kovacs, G. G., Meyronet, D., Palkovits, M., Parchi, P., Patsouris, E., Ravid, R., Reynolds, R., Riederer, P., Roggendorf, W., Schwalber, A., Seilhean, D., & Kretschmar, H. (2007). How a neuropsychiatric brain bank should be run: a consensus paper of Brainnet Europe II. *J Neural Transm (Vienna)*, 114(5), 527-537. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0601-8>
- Schmitz, C. (1998, Nov). Variation of fractionator estimates and its prediction. *Anat Embryol (Berl)*, 198(5), 371-397. <https://doi.org/10.1007/s004290050191>
- Schmitz, C., Born, M., Dolezel, P., Rutten, B. P., de Saint-Georges, L., Hof, P. R., & Korr, H. (2005). Prenatal protracted irradiation at very low dose rate induces severe neuronal loss in rat hippocampus and cerebellum. *Neuroscience*, 130(4), 935-948. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.034>
- Schmitz, C., Eastwood, B. S., Tappan, S. J., Glaser, J. R., Peterson, D. A., & Hof, P. R. (2014). Current automated 3D cell detection methods are not a suitable replacement for manual stereologic cell counting. *Front Neuroanat*, 8, 27. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00027>
- Schmitz, C., & Hof, P. R. (2000, Oct). Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. *J Chem Neuroanat*, 20(1), 93-114. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(00\)00066-1](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(00)00066-1)
- Schmitz, C., & Hof, P. R. (2005). Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130(4), 813-831. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.050>
- Schneider, B. A., Avivi-Reich, M., & Mozuraitis, M. (2015). A cautionary note on the use of the Analysis of Covariance (ANCOVA) in classification designs with and without within-subject factors. *Front Psychol*, 6, 474. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.00474>
- Scull, A. (2021, Dec). American psychiatry in the new millennium: a critical appraisal. *Psychol Med*, 51(16), 2762-2770. <https://doi.org/10.1017/S0033291721001975>
- Seabold, S., & Perktold, J. (2010). Statsmodels: Econometric and statistical modeling with python. Proceedings of the 9th Python in Science Conference, Austin, TX.
- Seeley, W. W., Carlin, D. A., Allman, J. M., Macedo, M. N., Bush, C., Miller, B. L., & Dearmond, S. J. (2006, Dec). Early frontotemporal dementia targets neurons unique to apes and humans. *Ann Neurol*, 60(6), 660-667. <https://doi.org/10.1002/ana.21055>

- Sekar, A., Bialas, A. R., de Rivera, H., Davis, A., Hammond, T. R., Kamitaki, N., Tooley, K., Presumey, J., Baum, M., Van Doren, V., Genovese, G., Rose, S. A., Handsaker, R. E., Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C., Daly, M. J., Carroll, M. C., Stevens, B., & McCarroll, S. A. (2016, Feb 11). Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*, *530*(7589), 177-183. <https://doi.org/10.1038/nature16549>
- Selemon, L. D., & Goldman-Rakic, P. S. (1999, Jan 1). The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, *45*(1), 17-25. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00281-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00281-9)
- Selemon, L. D., Kleinman, J. E., Herman, M. M., & Goldman-Rakic, P. S. (2002, Dec). Smaller frontal gray matter volume in postmortem schizophrenic brains. *Am J Psychiatry*, *159*(12), 1983-1991. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.12.1983>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, *52*(3/4), 591-611.
- Shenhav, A., Botvinick, M. M., & Cohen, J. D. (2013, Jul 24). The expected value of control: an integrative theory of anterior cingulate cortex function. *Neuron*, *79*(2), 217-240. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.007>
- Shukla, D. K., Wijtenburg, S. A., Chen, H., Chiappelli, J. J., Kochunov, P., Hong, L. E., & Rowland, L. M. (2019, Apr 25). Anterior cingulate glutamate and GABA associations on functional connectivity in schizophrenia. *Schizophr Bull*, *45*(3), 647-658. <https://doi.org/10.1093/schbul/sby075>
- Singh, T., Poterba, T., Curtis, D., Akil, H., Al Eissa, M., Barchas, J. D., Bass, N., Bigdeli, T. B., Breen, G., Bromet, E. J., Buckley, P. F., Bunney, W. E., Bybjerg-Grauholm, J., Byerley, W. F., Chapman, S. B., Chen, W. J., Churchhouse, C., Craddock, N., Cusick, C. M., DeLisi, L., Dodge, S., Escamilla, M. A., Eskelinen, S., Fanous, A. H., Faraone, S. V., Fiorentino, A., Francioli, L., Gabriel, S. B., Gage, D., Gagliano Taliun, S. A., Ganna, A., Genovese, G., Glahn, D. C., Grove, J., Hall, M. H., Hamalainen, E., Heyne, H. O., Holi, M., Hougaard, D. M., Howrigan, D. P., Huang, H., Hwu, H. G., Kahn, R. S., Kang, H. M., Karczewski, K. J., Kirov, G., Knowles, J. A., Lee, F. S., Lehrer, D. S., Lescai, F., Malaspina, D., Marder, S. R., McCarroll, S. A., McIntosh, A. M., Medeiros, H., Milani, L., Morley, C. P., Morris, D. W., Mortensen, P. B., Myers, R. M., Nordentoft, M., O'Brien, N. L., Olivares, A. M., Ongur, D., Ouwehand, W. H., Palmer, D. S., Paunio, T., Quedsted, D., Rapaport, M. H., Rees, E., Rollins, B., Satterstrom, F. K., Schatzberg, A., Scolnick, E., Scott, L. J., Sharp, S. I., Sklar, P., Smoller, J. W., Sobell, J. L., Solomonson, M., Stahl, E. A., Stevens, C. R., Suvisaari, J., Tiao, G., Watson, S. J., Watts, N. A., Blackwood, D. H., Borglum, A. D., Cohen, B. M., Corvin, A. P., Esko, T., Freimer, N. B., Glatt, S. J., Hultman, C. M., McQuillin, A., Palotie, A., Pato, C. N., Pato, M. T., Pulver, A. E., St Clair, D., Tsuang, M. T., Vawter, M. P., Walters, J. T., Werge, T. M., Ophoff, R. A., Sullivan, P. F., Owen, M. J., Boehnke, M., O'Donovan, M. C., Neale, B. M., & Daly, M. J. (2022, Apr). Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia. *Nature*, *604*(7906), 509-516. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04556-w>
- Slade, M. (2017, Jun). Implementing shared decision making in routine mental health care. *World Psychiatry*, *16*(2), 146-153. <https://doi.org/10.1002/wps.20412>

- Smiley, J. F., Konnova, K., & Bleiwas, C. (2012, Apr). Cortical thickness, neuron density and size in the inferior parietal lobe in schizophrenia. *Schizophr Res*, 136(1-3), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2012.01.006>
- Song, J. W., & Chung, K. C. (2010, Dec). Observational studies: cohort and case-control studies. *Plast Reconstr Surg*, 126(6), 2234-2242. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181f44abc>
- SRC Biosciences. (2023). *Stereologer® Software*. Retrieved Aug 12, 2023 from <https://srcbiosciences.com/stereologer-software>
- Stark, A. K., Uylings, H. B., Sanz-Arigita, E., & Pakkenberg, B. (2004, May). Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 161(5), 882-888. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.5.882>
- Statistisches Bundesamt. (2008). *Gesundheitsausgabenrechnung 2007*
- Stefanacci, L., & Amaral, D. G. (2002, Sep 30). Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol*, 451(4), 301-323. <https://doi.org/10.1002/cne.10339>
- Steinmetz, K. L., & Spack, E. G. (2009, Jun 12). The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. *BMC Neurol*, 9 Suppl 1(Suppl 1), S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-9-S1-S2>
- Sun, Z., Wang, F., Cui, L., Breeze, J., Du, X., Wang, X., Cong, Z., Zhang, H., Li, B., Hong, N., & Zhang, D. (2003, Oct 6). Abnormal anterior cingulum in patients with schizophrenia: a diffusion tensor imaging study. *Neuroreport*, 14(14), 1833-1836. <https://doi.org/10.1097/00001756-200310060-00015>
- Svancer, P., & Spaniel, F. (2021, Aug 10). Brain ventricular volume changes in schizophrenia. A narrative review. *Neurosci Lett*, 759, 136065. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136065>
- Tabachnick, B. G., Fidell, L. S., & Ullman, J. B. (2013). *Using multivariate statistics* (Vol. 6). Pearson Boston, MA.
- Tennant, P. W. G., Murray, E. J., Arnold, K. F., Berrie, L., Fox, M. P., Gadd, S. C., Harrison, W. J., Keeble, C., Ranker, L. R., Textor, J., Tomova, G. D., Gilthorpe, M. S., & Ellison, G. T. H. (2021, May 17). Use of directed acyclic graphs (DAGs) to identify confounders in applied health research: review and recommendations. *Int J Epidemiol*, 50(2), 620-632. <https://doi.org/10.1093/ije/dyaa213>
- Terry, R. D., DeTeresa, R., & Hansen, L. A. (1987, Jun). Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Ann Neurol*, 21(6), 530-539. <https://doi.org/10.1002/ana.410210603>

- Thune, J. J., Uylings, H. B., & Pakkenberg, B. (2001, Jan-Feb). No deficit in total number of neurons in the prefrontal cortex in schizophrenics. *J Psychiatr Res*, *35*(1), 15-21. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(00\)00043-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(00)00043-1)
- Torrey, E. F., Webster, M., Knable, M., Johnston, N., & Yolken, R. H. (2000, Aug 3). The stanley foundation brain collection and neuropathology consortium. *Schizophr Res*, *44*(2), 151-155. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(99\)00192-9](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(99)00192-9)
- Trubetsky, V., Pardinas, A. F., Qi, T., Panagiotaropoulou, G., Awasthi, S., Bigdeli, T. B., Bryois, J., Chen, C. Y., Dennison, C. A., Hall, L. S., Lam, M., Watanabe, K., Frei, O., Ge, T., Harwood, J. C., Koopmans, F., Magnusson, S., Richards, A. L., Sidorenko, J., Wu, Y., Zeng, J., Grove, J., Kim, M., Li, Z., Voloudakis, G., Zhang, W., Adams, M., Agartz, I., Atkinson, E. G., Agerbo, E., Al Eissa, M., Albus, M., Alexander, M., Alizadeh, B. Z., Alptekin, K., Als, T. D., Amin, F., Arolt, V., Arrojo, M., Athanasiu, L., Azevedo, M. H., Bacanu, S. A., Bass, N. J., Begemann, M., Belliveau, R. A., Bene, J., Benyamin, B., Bergen, S. E., Blasi, G., Bobes, J., Bonassi, S., Braun, A., Bressan, R. A., Bromet, E. J., Bruggeman, R., Buckley, P. F., Buckner, R. L., Bybjerg-Grauholm, J., Cahn, W., Cairns, M. J., Calkins, M. E., Carr, V. J., Castle, D., Catts, S. V., Chambert, K. D., Chan, R. C. K., Chaumette, B., Cheng, W., Cheung, E. F. C., Chong, S. A., Cohen, D., Consoli, A., Cordeiro, Q., Costas, J., Curtis, C., Davidson, M., Davis, K. L., de Haan, L., Degenhardt, F., DeLisi, L. E., Demontis, D., Dickerson, F., Dikeos, D., Dinan, T., Djurovic, S., Duan, J., Ducci, G., Dudbridge, F., Eriksson, J. G., Fananas, L., Faraone, S. V., Fiorentino, A., Forstner, A., Frank, J., Freimer, N. B., Fromer, M., Frustaci, A., Gadelha, A., Genovese, G., Gershon, E. S., Giannitelli, M., Giegling, I., Giusti-Rodriguez, P., Godard, S., Goldstein, J. I., Gonzalez Penas, J., Gonzalez-Pinto, A., Gopal, S., Gratten, J., Green, M. F., Greenwood, T. A., Guillin, O., Guloksuz, S., Gur, R. E., Gur, R. C., Gutierrez, B., Hahn, E., Hakonarson, H., Haroutunian, V., Hartmann, A. M., Harvey, C., Hayward, C., Henskens, F. A., Herms, S., Hoffmann, P., Howrigan, D. P., Ikeda, M., Iyegbe, C., Joa, I., Julia, A., Kahler, A. K., Kam-Thong, T., Kamatani, Y., Karachanak-Yankova, S., Kebir, O., Keller, M. C., Kelly, B. J., Khrunin, A., Kim, S. W., Klovins, J., Kondratiev, N., Konte, B., Kraft, J., Kubo, M., Kucinkas, V., Kucinskiene, Z. A., Kusumawardhani, A., Kuzelova-Ptackova, H., Landi, S., Lazzeroni, L. C., Lee, P. H., Legge, S. E., Lehrer, D. S., Lencer, R., Lerer, B., Li, M., Lieberman, J., Light, G. A., Limborska, S., Liu, C. M., Lonnqvist, J., Loughland, C. M., Lubinski, J., Luykx, J. J., Lynham, A., Macek, M., Jr., Mackinnon, A., Magnusson, P. K. E., Maher, B. S., Maier, W., Malaspina, D., Mallet, J., Marder, S. R., Marsal, S., Martin, A. R., Martorell, L., Mattheisen, M., McCarley, R. W., McDonald, C., McGrath, J. J., Medeiros, H., Meier, S., Melegh, B., Melle, I., Meshulam-Gately, R. I., Metspalu, A., Michie, P. T., Milani, L., Milanova, V., Mitjans, M., Molden, E., Molina, E., Molto, M. D., Mondelli, V., Moreno, C., Morley, C. P., Muntane, G., Murphy, K. C., Myin-Germeys, I., Nenadic, I., Nestadt, G., Nikitina-Zake, L., Noto, C., Nuechterlein, K. H., O'Brien, N. L., O'Neill, F. A., Oh, S. Y., Olincy, A., Ota, V. K., Pantelis, C., Papadimitriou, G. N., Parellada, M., Paunio, T., Pellegrino, R., Periyasamy, S., Perkins, D. O., Pfuhlmann, B., Pietilainen, O., Pimm, J., Porteous, D., Powell, J., Quattrone, D., Queded, D., Radant, A. D., Rampino, A., Rapaport, M. H., Rautanen, A., Reichenberg, A., Roe, C., Roffman, J. L., Roth, J., Rothermundt, M., Rutten, B. P. F., Saker-Delye, S., Salomaa, V., Sanjuan, J., Santoro, M. L., Savitz, A., Schall, U., Scott, R. J., Seidman, L. J., Sharp, S. I., Shi, J., Siever, L. J., Sigurdsson, E., Sim, K., Skarabis, N., Slominsky, P., So, H. C., Sobell, J. L., Soderman, E., Stain, H. J., Steen, N. E., Steixner-Kumar, A. A., Stogmann, E., Stone, W. S., Straub, R. E., Streit, F., Strengman, E., Stroup, T. S., Subramaniam, M., Sugar, C. A., Suvisaari, J., Svrakic, D. M., Swerdlow, N. R., Szatkiewicz, J. P., Ta, T. M. T., Takahashi, A., Terao, C., Thibaut, F., Toncheva, D., Tooney, P. A., Torretta, S., Tosato, S., Tura, G. B., Turetsky, B. I., Uçok, A., Vaaler, A., van Amelsvoort, T., van Winkel, R., Veijola, J., Waddington, J., Walter, H., Waterreus, A., Webb, B. T., Weiser, M., Williams, N. M., Witt, S. H., Wormley, B. K., Wu, J. Q., Xu, Z., Yolken, R., Zai, C. C., Zhou, W., Zhu, F., Zimprich, F., Atbasoglu, E. C., Ayub, M., Benner, C., Bertolino, A., Black, D. W., Bray, N. J., Breen, G., Buccola, N. G., Byerley, W. F., Chen, W. J., Cloninger, C. R., Crespo-Facorro, B., Donohoe, G., Freedman, R., Galletly, C., Gandal, M. J., Gennarelli, M., Hougaard, D. M., Hwu, H. G., Jablensky, A. V., McCarroll, S. A., Moran, J. L., Mors, O., Mortensen, P. B., Muller-Myhsok, B., Neil, A. L., Nordentoft, M., Pato, M. T., Petryshen, T. L., Pirinen, M., Pulver, A. E., Schulze, T. G., Silverman, J. M.,

- Smoller, J. W., Stahl, E. A., Tsuang, D. W., Vilella, E., Wang, S. H., Xu, S., Indonesia Schizophrenia, C., PsychEncode, Psychosis Endophenotypes International, C., Syn, G. O. C., Adolfsson, R., Arango, C., Baune, B. T., Belanger, S. I., Borglum, A. D., Braff, D., Bramon, E., Buxbaum, J. D., Campion, D., Cervilla, J. A., Cichon, S., Collier, D. A., Corvin, A., Curtis, D., Forti, M. D., Domenici, E., Ehrenreich, H., Escott-Price, V., Esko, T., Fanous, A. H., Gareeva, A., Gawlik, M., Gejman, P. V., Gill, M., Glatt, S. J., Golimbet, V., Hong, K. S., Hultman, C. M., Hyman, S. E., Iwata, N., Jonsson, E. G., Kahn, R. S., Kennedy, J. L., Khusnutdinova, E., Kirov, G., Knowles, J. A., Krebs, M. O., Laurent-Levinson, C., Lee, J., Lencz, T., Levinson, D. F., Li, Q. S., Liu, J., Malhotra, A. K., Malhotra, D., McIntosh, A., McQuillin, A., Menezes, P. R., Morgan, V. A., Morris, D. W., Mowry, B. J., Murray, R. M., Nimgaonkar, V., Nothen, M. M., Ophoff, R. A., Paciga, S. A., Palotie, A., Pato, C. N., Qin, S., Rietschel, M., Riley, B. P., Rivera, M., Rujescu, D., Saka, M. C., Sanders, A. R., Schwab, S. G., Serretti, A., Sham, P. C., Shi, Y., St Clair, D., Stefansson, H., Stefansson, K., Tsuang, M. T., van Os, J., Vawter, M. P., Weinberger, D. R., Werge, T., Wildenauer, D. B., Yu, X., Yue, W., Holmans, P. A., Pocklington, A. J., Roussos, P., Vassos, E., Verhage, M., Visscher, P. M., Yang, J., Posthuma, D., Andreassen, O. A., Kendler, K. S., Owen, M. J., Wray, N. R., Daly, M. J., Huang, H., Neale, B. M., Sullivan, P. F., Ripke, S., Walters, J. T. R., O'Donovan, M. C., & Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C. (2022, Apr). Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature*, *604*(7906), 502-508. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5>
- Turner, D. T., van der Gaag, M., Karyotaki, E., & Cuijpers, P. (2014, May). Psychological interventions for psychosis: a meta-analysis of comparative outcome studies. *Am J Psychiatry*, *171*(5), 523-538. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.13081159>
- Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Orlovskaya, D. D., & Rachmanova, V. I. (2004, Apr 1). Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res*, *67*(2-3), 269-275. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(03\)00181-6](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(03)00181-6)
- van Erp, T. G. M., Walton, E., Hibar, D. P., Schmaal, L., Jiang, W., Glahn, D. C., Pearlson, G. D., Yao, N., Fukunaga, M., Hashimoto, R., Okada, N., Yamamori, H., Bustillo, J. R., Clark, V. P., Agartz, I., Mueller, B. A., Cahn, W., de Zwarte, S. M. C., Hulshoff Pol, H. E., Kahn, R. S., Ophoff, R. A., van Haren, N. E. M., Andreassen, O. A., Dale, A. M., Doan, N. T., Gurholt, T. P., Hartberg, C. B., Haukvik, U. K., Jorgensen, K. N., Lagerberg, T. V., Melle, I., Westlye, L. T., Gruber, O., Kraemer, B., Richter, A., Zilles, D., Calhoun, V. D., Crespo-Facorro, B., Roiz-Santianez, R., Tordesillas-Gutierrez, D., Loughland, C., Carr, V. J., Catts, S., Cropley, V. L., Fullerton, J. M., Green, M. J., Henskens, F. A., Jablensky, A., Lenroot, R. K., Mowry, B. J., Michie, P. T., Pantelis, C., Quide, Y., Schall, U., Scott, R. J., Cairns, M. J., Seal, M., Tooney, P. A., Rasser, P. E., Cooper, G., Shannon Weickert, C., Weickert, T. W., Morris, D. W., Hong, E., Kochunov, P., Beard, L. M., Gur, R. E., Gur, R. C., Satterthwaite, T. D., Wolf, D. H., Belger, A., Brown, G. G., Ford, J. M., Macciardi, F., Mathalon, D. H., O'Leary, D. S., Potkin, S. G., Preda, A., Voyvodic, J., Lim, K. O., McEwen, S., Yang, F., Tan, Y., Tan, S., Wang, Z., Fan, F., Chen, J., Xiang, H., Tang, S., Guo, H., Wan, P., Wei, D., Bockholt, H. J., Ehrlich, S., Wolthuisen, R. P. F., King, M. D., Shoemaker, J. M., Sponheim, S. R., De Haan, L., Koenders, L., Machielsen, M. W., van Amelsvoort, T., Veltman, D. J., Assogna, F., Banaj, N., de Rossi, P., Iorio, M., Piras, F., Spalletta, G., McKenna, P. J., Pomarol-Clotet, E., Salvador, R., Corvin, A., Donohoe, G., Kelly, S., Whelan, C. D., Dickie, E. W., Rotenberg, D., Voineskos, A. N., Ciufolini, S., Radua, J., Dazzan, P., Murray, R., Reis Marques, T., Simmons, A., Borgwardt, S., Egloff, L., Harrisberger, F., Riecher-Rossler, A., Smieskova, R., Alpert, K. I., Wang, L., Jonsson, E. G., Koops, S., Sommer, I. E. C., Bertolino, A., Bonvino, A., Di Giorgio, A., Neilson, E., Mayer, A. R., Stephen, J. M., Kwon, J. S., Yun, J. Y., Cannon, D. M., McDonald, C., Lebedeva, I., Tomyshev, A. S., Akhador, T., Kaleda, V., Fatouros-Bergman, H., Flyckt, L., Karolinska Schizophrenia, P., Busatto, G. F., Rosa, P. G. P., Serpa, M. H., Zanetti, M. V., Hoschl, C., Skoch, A., Spaniel, F., Tomecek, D., Hagenaars, S. P., McIntosh, A. M., Whalley, H. C., Lawrie, S. M., Knochel, C., Oertel-Knochel, V., Stablein, M., Howells, F.

- M., Stein, D. J., Temmingh, H. S., Uhlmann, A., Lopez-Jaramillo, C., Dima, D., McMahon, A., Faskowitz, J. I., Gutman, B. A., Jahanshad, N., Thompson, P. M., & Turner, J. A. (2018, Nov 1). Cortical brain abnormalities in 4474 individuals with schizophrenia and 5098 control subjects via the Enhancing Neuro Imaging Genetics Through Meta Analysis (ENIGMA) Consortium. *Biol Psychiatry*, 84(9), 644-654. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.04.023>
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., Carey, C. J., Polat, I., Feng, Y., Moore, E. W., VanderPlas, J., Laxalde, D., Perktold, J., Cimrman, R., Henriksen, I., Quintero, E. A., Harris, C. R., Archibald, A. M., Ribeiro, A. H., Pedregosa, F., van Mulbregt, P., & SciPy, C. (2020, Mar). SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods*, 17(3), 261-272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
- Vogt, B. A. (2019). Cingulate cortex in the three limbic subsystems. *Handb Clin Neurol*, 166, 39-51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64196-0.00003-0>
- Vogt, B. A., Nimchinsky, E. A., Vogt, L. J., & Hof, P. R. (1995, Aug 28). Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. *J Comp Neurol*, 359(3), 490-506. <https://doi.org/10.1002/cne.903590310>
- Vogt, B. A., & Pandya, D. N. (1987, Aug 8). Cingulate cortex of the rhesus monkey: II. Cortical afferents. *J Comp Neurol*, 262(2), 271-289. <https://doi.org/10.1002/cne.902620208>
- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016, Dec 15). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*, 524(18), 3865-3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- Vonsattel, J. P., Del Amaya, M. P., & Keller, C. E. (2008, May). Twenty-first century brain banking. Processing brains for research: the Columbia University methods. *Acta Neuropathol*, 115(5), 509-532. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0311-9>
- Vos, T., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., Abdulkader, R. S., Abdulle, A. M., Abebo, T. A., & Abera, S. F. (2017). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*, 390(10100), 1211-1259.
- Wang, F., Sun, Z., Cui, L., Du, X., Wang, X., Zhang, H., Cong, Z., Hong, N., & Zhang, D. (2004, Mar). Anterior cingulum abnormalities in male patients with schizophrenia determined through diffusion tensor imaging. *Am J Psychiatry*, 161(3), 573-575. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.3.573>
- Weinberger, D. R., & Radulescu, E. (2016, Jan). Finding the Elusive Psychiatric "Lesion" With 21st-Century Neuroanatomy: A Note of Caution. *Am J Psychiatry*, 173(1), 27-33. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.15060753>

- Weinberger, D. R., & Radulescu, E. (2021, Jan 1). Structural Magnetic Resonance Imaging All Over Again. *JAMA psychiatry*, 78(1), 11-12. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2020.1941>
- Welch, B. L. (1947). The generalization of 'STUDENT'S' problem when several different population variances are involved. *Biometrika*, 34(1-2), 28-35.
- West, M. J. (2012). Basic stereology for biologists and neuroscientists.
- Wickens, T. D., & Keppel, G. (2004). *Design and analysis: A researcher's handbook*. Pearson Prentice-Hall Upper Saddle River, NJ.
- Woo, T. U., Walsh, J. P., & Benes, F. M. (2004, Jul). Density of glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA-containing neurons that express the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 61(7), 649-657. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.7.649>
- World Health Organization. (2004). *International statistical classification of diseases and related health problems* (10th revision, 2nd ed.). World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42980>
- World Health Organization. (2019). *Suicide in the world: global health estimates*.
- Wright, I. C., Rabe-Hesketh, S., Woodruff, P. W., David, A. S., Murray, R. M., & Bullmore, E. T. (2000, Jan). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157(1), 16-25. <https://doi.org/10.1176/ajp.157.1.16>
- Wykes, T., Steel, C., Everitt, B., & Tarrier, N. (2008, May). Cognitive behavior therapy for schizophrenia: effect sizes, clinical models, and methodological rigor. *Schizophr Bull*, 34(3), 523-537. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbm114>
- Wyss-Coray, T., & Rogers, J. (2012, Jan). Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(1), a006346. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006346>
- Xia, J., Merinder, L. B., & Belgamwar, M. R. (2011, Jun 15). Psychoeducation for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011(6), CD002831. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002831.pub2>
- Zhang, Y., Catts, V. S., Sheedy, D., McCrossin, T., Kril, J. J., & Shannon Weickert, C. (2016, Dec 13). Cortical grey matter volume reduction in people with schizophrenia is associated with neuro-inflammation. *Transl Psychiatry*, 6(12), e982. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.238>

Anhang A

Tabelle A1: Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung der Ergebnisvariablen. *P*-Werte < 0,05 sind fettgedruckt.

Variable	Hemisphäre	Diagnose	W-Statistik	<i>P</i> -Wert
Volumen	L	C	0,872	0,106
	L	S	0,918	0,300
	R	C	0,975	0,929
	R	S	0,956	0,716
Neuronenzahl	L	C	0,928	0,427
	L	S	0,926	0,367
	R	C	0,842	0,047
	R	S	0,944	0,566
Neuronendichte	L	C	0,965	0,845
	L	S	0,967	0,857
	R	C	0,955	0,726
	R	S	0,962	0,797

Tabelle A2: Levene-Test auf Homoskedastizität. Getestet wurde für über die vier kombinatorischen Diagnose-Hemisphäre-Gruppen hinweg.

Variable	W-Statistik	<i>P</i> -Wert
Volumen	1,453	0,243
Neuronenzahl	0,489	0,692
Neuronendichte	1,439	0,247

Tabelle A3: Test der Homogenität der Regressionssteigungen. Dargestellt sind die *P*-Werte der Koeffizienten eines allgemeinen linearen Modells, das auch Interaktionsfaktoren berücksichtigt: $\hat{y}_{i,h} = \beta_0 + \beta_1 \times D_i + \beta_2 \times H + \beta_3 \times \text{Age}_i + \beta_4 \times \text{PMI}_i + \beta_5 \times \text{Fix}_i + \beta_6 \times \text{Age}_i + \beta_7 \times D_i \times \text{PMI}_i + \beta_8 \times D_i \times \text{Fix}_i + \beta_9 \times D_i \times \text{Age}_i$. Zu beachten ist, dass die Koeffizienten der Variablen Alter, PMI, Fix hier nicht ihrem spezifischen Effekt entsprechen, da ein Teil ihres Effektes über die Interaktionsfaktoren wirkt. *P*-Werte < 0,05 sind fettgedruckt. PMI: *post mortem* Intervall; Fix: Fixierzeit; D: Diagnose; H: Hemisphäre.

Variable	Alter	PMI	Fix	D	H	D x Alter	D x PMI	D x Fix
Volumen	0,542	0,165	0,028	0,037	0,802	0,054	0,006	0,239
Neuronenzahl	0,003	0,001	0,005	0,016	0,179	0,052	0,057	0,181
Neuronendichte	0,006	0,008	0,116	0,302	0,127	0,550	0,898	0,648

Tabelle A4: Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung der Residuen der Ergebnisvariablen nach Fitting der ANCOVA.

Variable	Hemisphäre	Diagnose	W-Statistik	<i>P</i> -Wert
Volumen	L	C	0,965	0,837
		S	0,928	0,388
	R	C	0,936	0,510
		S	0,927	0,378
Neuronenzahl	L	C	0,928	0,425
		S	0,967	0,852
	R	C	0,971	0,899
		S	0,914	0,271
Neuronendichte	L	C	0,978	0,951
		S	0,939	0,505
	R	C	0,947	0,635
		S	0,979	0,958

Tabelle A5: Welchs t-Test auf Gruppenunterschiede der Covariaten. *P*-Werte < 0,05 sind fettgedruckt. PMI: *post mortem* Intervall; Fix: Fixierzeit.

Covariate	t-Statistik	<i>P</i> -Wert
Alter	1,464	0,165
PMI	2,771	0,012
Fix	-2,812	0,008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist ein Gemeinschaftswerk und hätte nicht ohne die tatkräftige Unterstützung vieler ebenso engagierter wie talentierter KollegInnen entstehen können.

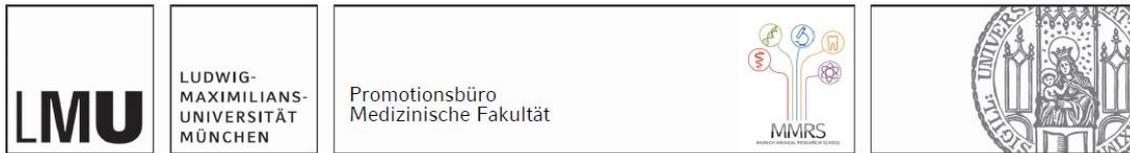
Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. Christoph Schmitz bedanken, ohne dessen wissenschaftliche Erfahrung und kontinuierliche Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Seine Einsicht bei der Konzeption der Studie, seine ständige, niederschwellige Erreichbarkeit und seine kostbaren fachlichen Ratschläge waren von entscheidender Bedeutung für den Erfolg dieser Dissertation. Als Betreuer war er es, der durch exzellente Führung eine effektive Zusammenarbeit des gesamten Teams sicherstellte und mich immer dazu ermutigte, hervorragende wissenschaftliche Arbeit zu leisten.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Mitdoktorandinnen Alisa Vollhardt und Melanie Popal. Ihre Zuverlässigkeit, Engagement und konstruktive Zusammenarbeit haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Alisa Vollhardt bin ich zudem dankbar für die vielen Stunden des fachlichen Austausches zum Manuskript unserer gemeinsamen Publikation, die wir miteinander geteilt haben, und für ihre Bereitschaft, immer ein offenes Ohr für Fragen und Anregungen zu haben. Mit Nachdruck bedanken möchte ich mich auch bei Dr. rer. biol. hum. Maren Kiessling für ihre Unterweisung in der wichtigsten Methodik der vorliegenden Arbeit: Der praktisch-stereologischen Untersuchung.

Einen großen Dank möchte ich auch Prof. Dr. med. Helmut Heinsen aussprechen, ohne dessen Vorarbeit in Form der Zusammenstellung der untersuchten Gehirnbank diese Doktorarbeit überhaupt nicht denkbar gewesen wäre. Auch seine professionelle Anleitung beim mikroskopischen Arbeiten mit den zurverfügunggestellten Präparaten waren von zentraler Bedeutung für den Erfolg dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Patrick R. Hof, Prof. Dr. med. Peter Falkai und Prof. Dr. med. Andrea Schmitt für kostbares fachliches Feedback zum Manuskript unserer gemeinsamen Publikation und Unterstützung beim Veröffentlichungsprozess. An dieser Stelle sei ein besonderer Dank an Prof. Dr. Patrick R. Hof für seine wertvolle redaktionelle Arbeit am Manuskript ausgesprochen.

Abschließend möchte ich auch allen anderen Personen, die direkt oder indirekt zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, meinen tiefsten Dank aussprechen. Wissenschaft ist Teamarbeit und ich bin stolz darauf, mit jedem von Ihnen zusammengearbeitet zu haben.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Gaus, Richard

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Design-based stereologische post mortem Studien zur Bestimmung von kortikalem Volumen, Neuronenzahl und Neuronendichte im Gehirn von Patienten mit Schizophrenie und gesunden Kontrollpersonen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25.03.2024

Ort, Datum

Richard Gaus

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationsliste

- Gaus, R., Popal, M., Heinsen, H., Schmitt, A., Falkai, P., Hof, P. R., Schmitz, C., & Vollhardt, A. (2022, Nov 9). Reduced cortical neuron number and neuron density in schizophrenia with focus on area 24: a post-mortem case-control study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. <https://doi.org/10.1007/s00406-022-01513-6>
- Gaus, R., Pölsterl, S., Greimel, E., Schulte-Körne, G., & Wachinger, C. (2023, Jun 28). Can we diagnose mental disorders in children? A large-scale assessment of machine learning on structural neuroimaging of 6916 children in the adolescent brain cognitive development study. *JCPP Adv*. <https://doi.org/10.1002/jcv2.12184>
- Yeganeh, Y., Farshad, A., Boschmann, J., Gaus, R., Frantzen, M., & Navab, N. (2022, September). FedAP: Adaptive Personalization in Federated Learning for Non-IID Data. In *International Workshop on Distributed, Collaborative, and Federated Learning* (pp. 17-27). https://doi.org/10.1007/978-3-031-18523-6_2