

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

***Stereologische Untersuchung der Gesamtzahl von
Nervenzellen in Brodmann Areal 24 im Gehirn von
männlichen Patienten mit Schizophrenie***

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

vorgelegt von

Melanie Popal

aus

Hamburg

Jahr

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Schmitz

Mitberichterstatter: PD Dr. Rupert Egensperger
Prof. Dr. Jonas Neher

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2024

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
Zusammenfassung	5
Abstract	7
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
Einleitung	12
Material und Methoden	29
Untersuchtes Gewebe	29
Histologische Aufarbeitung der <i>post mortem</i> Gehirne	31
Fixierung der <i>post mortem</i> Gehirne	32
Einbettung der <i>post mortem</i> Gehirne zur Anfertigung von Gehirnschnitten	32
Anfertigung von 700 µm dicken Gefrierschnitten	33
Einbettung der <i>post mortem</i> Gehirnhälften von Kontrollperson 7 in Celloidin	33
Anfertigung von 440 µm dicken Celloidinschnitten der <i>post mortem</i> Gehirnhälften von Kontrollperson 7	34
Färbung der Gewebeschnitte	35
Bestimmung der Dicke der Gewebeschnitte nach der histologischen Aufarbeitung	35
Design-based stereologische Untersuchungen zur Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen	36
Berechnung von Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in Brodmann Areal 24	48
Berechnung von Gesamtzahlen von Nervenzellen in Schicht V in Brodmann Areal 24, die keine Spindelzellen waren	48
Design-based stereologische Untersuchungen zur Bestimmung von Dichten von Nervenzellen	50
Statistische Analyse	52
Ergebnisse	53
Diskussion	64
Literatur	78
Danksagung	88
Affidavit	89

Zusammenfassung

Der anteriore Gyrus cinguli (und insbesondere das Brodmann Areal 24 (BA 24) im anterioren Gyrus cinguli) nimmt bei der Frage nach der Neuropathologie der Schizophrenie seit langer Zeit eine zentrale Rolle ein. Funktionell ist der anteriore Gyrus cinguli hauptsächlich an kognitiven und emotionalen, aber auch an motorischen und einigen autonomen Funktionen beteiligt. Veränderungen im anterioren Gyrus cinguli, die möglicherweise mit dem klinischen Bild der Schizophrenie korrelieren, wurden regelmäßig in klinischen Bildgebungsstudien und neuropathologischen Studien beobachtet. In diesem Zusammenhang wurden in der Literatur einige Studien zu Gesamtzahlen und Dichten von Nervenzellen im anterioren Gyrus cinguli im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie und neurologisch sowie psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen publiziert. Basierend auf methodischen Defiziten wurde jedoch keine dieser Studien der Neuropathologie der Schizophrenie in BA 24 gerecht. Insbesondere liegen in der Literatur bisher keine Bestimmungen der Gesamtzahl von Nervenzellen in BA 24 (oder einzelnen Schichten innerhalb von BA 24) im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode vor, die in der quantitativen Histologie als "state of the art" gilt; gleiches gilt für Bestimmungen der Dichte von Nervenzellen in BA 24 (oder einzelnen Schichten innerhalb von BA 24) im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie, die auf der systematischen Analyse der gesamten "region of interest" (ROI) basieren. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die folgende Hypothese getestet: Im Vergleich zum Gehirn von gesunden Kontrollpersonen ist im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 statistisch signifikant verringert, nicht jedoch die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI sowie die mittlere Dichte von Nervenzellen in den einzelnen Schichten von BA 24.

Diese Hypothese wurde an *post mortem* Gehirnen von 12 männlichen Patienten mit Schizophrenie und 11 neurologisch und psychiatrisch unauffälligen, männlichen Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersstruktur überprüft. Die untersuchten *post mortem* Gehirne waren bereits vor ca. 30 Jahren im Labor von Prof. Dr. med. Helmut Heinsen (Morphologische Hirnforschung der Universität Würzburg) zu vollständigen Serien von Frontalschnitten mit einer mittleren Dicke (nach vollständiger histologischer Aufarbeitung) von $496 \pm 3,7 \mu\text{m}$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts) aufgearbeitet worden; jeder zweite oder dritte Schnitt war mit Galloxyanin-Chromalaun gefärbt worden. Die gewählte Schnittdicke sowie die verwendete Färbung eignen sich sowohl zur zytoarchitektonischen Abgrenzung einzelner Brodmann-Areale des Cortex

wie auch zur Bestimmung von Gesamtzahlen und Dichten von Nervenzellen in einzelnen Schichten der abgegrenzten ROI mittels "design-based" stereologischer Verfahren. Gesamtzahlen von Nervenzellen wurden mit der "optical fractionator" Methode bestimmt; Dichten von Nervenzellen wurden durch den Quotient aus der Gesamtzahl von Nervenzellen in einer ROI und dem Volumen der entsprechenden ROI ermittelt.

Bei den Patienten mit Schizophrenie war die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 statistisch signifikant niedriger als bei den Kontrollpersonen (links: -17,2%; rechts: -20,9%; $p = 0,002$). Dieser Befund konnte nicht durch einen isolierten Verlust der sogenannten Spindelzellen in Schicht V in BA 24 erklärt werden (die im Mittel nur 1,5% der Nervenzellen in Schicht V in BA 24 ausmachten), sondern betraf statistisch signifikant ($p = 0,002$) auch diejenigen Nervenzellen in Schicht V in BA 24, die keine Spindelzellen waren. Dagegen wurden für die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI sowie für die Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI bzw. in Schicht V keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen gefunden ($p > 0,05$).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind für das Verständnis der geänderten Konnektivität von BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen von Bedeutung. Schicht V des Cortex wird allgemein als Hauptefferenz des Cortex angesehen, über die der Cortex mit anderen kortikalen und subkortikalen Gehirnregionen in Verbindung steht. Brodmann Areal 24 steht u.a. mit den lateralen und basolateralen Kerngebieten der Amygdala in Verbindung. Dies ist deswegen vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von Bedeutung, da in einer früheren Studie in denselben *post mortem* Gehirnen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, bei den Patienten mit Schizophrenie eine statistisch signifikant niedrigere Gesamtzahl von Nervenzellen im lateralen Kern der Amygdala als bei den Kontrollpersonen gefunden hatte. Diese niedrigere Gesamtzahl von Nervenzellen im lateralen Kern der Amygdala könnte in einem direkten Zusammenhang mit der niedrigeren Gesamtzahl von Nervenzellen in der „output“ Schicht V in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von Kontrollpersonen stehen und damit ein anatomisches Korrelat für die funktionelle Dyskonnektivität im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie darstellen. Somit können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Beitrag dazu leisten, eine anatomische Grundlage für die gestörte Konnektivität im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie zu etablieren, die ihrerseits wiederum Ergebnisse von funktionellen MRT-Studien zur Schizophrenie besser erklärbar machen kann.

Abstract (English):

In schizophrenia, alterations in the anterior cingulate cortex (ACC), and in particular in Brodmann area 24 (BA 24) in the ACC, may correlate with the clinical picture of the disease and have been regularly observed in clinical imaging studies and neuropathological studies on post mortem brains of patients with schizophrenia. However, despite these efforts, the neuropathology of schizophrenia in BA 24 is still largely unknown. This study tested, for the first time, the following hypothesis: compared to the brains of healthy controls, the mean total number of nerve cells in layer V in BA 24 is statistically significantly reduced in the brains of patients with schizophrenia, but not the mean total number of nerve cells in layers I-III and VI and the mean density of nerve cells in the individual layers of BA 24. This hypothesis was tested on post mortem brains of 12 male patients with schizophrenia and 11 neurologically and psychiatrically normal male controls with a comparable age structure. Total numbers of nerve cells were determined using the "optical fractionator" method; neuron densities were determined by dividing the total number of neurons in a region of interest (ROI) by the volume of the corresponding ROI. In the post mortem brains of the patients with schizophrenia, the mean total number of neurons in layer V in BA 24 was statistically significantly lower than in controls (left: -17.2%; right: -20.9%; $p=0.002$). This finding could not be explained by an isolated loss of the so-called spindle cells in layer V in BA 24 (which accounted for on average only 1.5% of the neurons in layer V in BA 24), but statistically significantly ($p = 0.002$) also affected those neurons in layer V in BA 24 that were not spindle cells. In contrast, no statistically significant differences were found between the patients with schizophrenia and the controls for the mean total number of nerve cells in layers I-III and VI and for the density of nerve cells in layers I-III and VI or in layer V ($p > 0.05$). In summary, the results of this study can contribute to establishing an anatomical basis for the disturbed connectivity in the brains of patients with schizophrenia, which in turn can make the results of functional MRI studies on schizophrenia easier to explain.

Abbildungsverzeichnis

Nr.	Bildüberschrift	Seite
1	Lage des anterioren Gyrus cinguli (gelb markiert) in einer Schemazeichnung der Ansicht einer menschlichen Gehirnhälfte von medial.	15
2	Zentrales Problem bei der Bestimmung von Zelldichten anhand der Untersuchung von dünnen Gewebeschnitten (modifiziert nach Schmitz und Hof, 2005). Die Abbildung ist im Text erläutert.	16
3	Vorgehensweise bei der Bestimmung von Gesamtzahlen von Zellen in einer "region of interest" mit der "optical fractionator" Methode, hier exemplarisch am Beispiel der Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in der Granularzellschicht des Kleinhirns einer Maus gezeigt (modifiziert nach Schmitz und Hof, 2005). Die Abbildung ist im Text erläutert.	19
4	Lage des Frontalschnitts (roter Strich) (in einer Schemazeichnung der Ansicht einer menschlichen Gehirnhälfte von medial), mittels dessen die Gehirnhälften vor dem Einfrieren jeweils in einen rostralen und einen okzipitalen Gewebelock geteilt wurden. Mit der gewählten Schnittführung verblieben die meisten für die Grundlagenforschung zur Schizophrenie relevanten Gehirnregionen (u.a. Frontalcortex, anteriorer Gyrus cinguli, Amygdala, Basalganglien) im frontalen Gewebelock.	33
5	<p>Exemplarisches Beispiel für die Zählung / Registrierung von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 in der rechten Gehirnhälfte des post mortem Gehirns von Kontrollperson K7 mit "unbiased virtual counting spaces" (UVCS) (Schmitz und Hof, 2005). Der gezeigte UVCS hatte eine Grundfläche ("unbiased counting frame"; UCF) von 1764 μm^2 (42 μm x 42 μm) und eine Höhe von 50 μm; die Oberseite des UVCS befand sich 5 μm unterhalb der Oberkante des untersuchten Gewebeschnitts, der mit Galloxyanin-Chromalaun gefärbt war. Als Zählkriterium wurde der Nukleolus der Nervenzellen verwendet.</p> <p>(A) An der Oberkante des Gewebeschnitts (Fokusebene 0 μm relativ zur Oberkante des Gewebeschnitts) ist der UCF gelb markiert, da Nukleoli, die in dieser Fokusebene gefunden worden wären, nicht im UVCS gelegen hätten.</p> <p>(B) In der Fokusebene 5 μm unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts wurden vier Nervenzellen gefunden (Pfeilspitzen), deren Nukleolus jedoch nicht sichtbar war (d.h. nicht in der untersuchten Fokusebene lagen).</p> <p>(C) In der Fokusebene 15 μm unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts wurden die Nukleoli von drei dieser vier Nervenzellen erstmals sichtbar; sie lagen jedoch noch nicht in der untersuchten Fokusebene.</p> <p>(D) In der Fokusebene 20 μm unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts lagen die Nukleoli zwei dieser vier Nervenzellen exakt in der untersuchten Fokusebene (Pfeile). Einer dieser Nukleoli lag innerhalb des UCF und wurde gezählt / registriert (rechter Pfeil), während der andere Nukleolus eine der "exclusion lines" (rote Linien) berührte (unterer Pfeil) und deswegen nicht gezählt / registriert wurde.</p> <p>(E) In der Fokusebene 30 μm unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts lag der Nukleolus einer dieser vier Nervenzellen exakt in der untersuchten Fokusebene (Pfeil). Da dieser Nukleolus innerhalb des UCF lag, wurde er gezählt / registriert.</p> <p>(F, G) In den Fokusebenen 40 μm (F) und 50 μm (G) unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts wurde kein weiterer Nukleolus gefunden; die Pfeilspitzen zeigen auf dieselben Positionen wie in (B-E).</p> <p>(H) In der Fokusebene 60 μm unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts ist der UCF wiederum gelb markiert, da Nukleoli, die in dieser Fokusebene gefunden worden wären, nicht im UVCS gelegen hätten.</p> <p>Die Zahlen in (A-H) geben den Abstand zwischen der Fokusebene und der Oberkante des Gewebeschnitts an. Der Maßstabsbalken in (H) repräsentiert 25 μm in (A-H).</p> <p>Abbildung 5 wurde der Publikation Gaus et al. (2022) entnommen; die Autorin der vorliegenden Arbeit ist Zweitautorin der Publikation Gaus et al. (2022), in der die</p>	47

	Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in der peer review Fachliteratur publiziert wurden.	
6	Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der in der vorliegenden Arbeit stereologisch ermittelten Gesamtzahlen von Nervenzellen (A-C) und Dichten von Nervenzellen (D,E) in den Schichten I-III und VI (A,D) sowie in Schicht V (B,C,E) in Brodmann Areal 24 in den untersuchten post mortem Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (rote Balken) sowie der Kontrollpersonen (grüne Balken). Die Ergebnisse der statistischen Analyse dieser Daten mittels univariater Kovarianzanalyse mit $p < 0,05$ sind angegeben.	60
7	Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in den linken Hemisphären (geschlossene Punkte) und den rechten Hemisphären (offene Punkte) in den untersuchten post mortem Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (rote Punkte) sowie der Kontrollpersonen (grüne Punkte) als Funktion der Fixationszeit. Die Analyse erfolgte zunächst mit allen ermittelten Werten (A) und anschließend ohne die Werte der Kontrollpersonen K11, K6 und K10 (B) (Details sind im Text erläutert). Die jeweiligen Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (Regressionsgerade mit 95% Konfidenzintervall; Regressionskoeffizient (R ²) und statistische Signikanz des Unterschieds der Steigung der Regressionsgeraden von Null) sind ebenfalls angegeben.	63

Tabellenverzeichnis

Nr.	Tabellenüberschrift	Seite
1	Details zu den Patienten mit Schizophrenie (alle männlich), deren <i>post mortem</i> Gehirne in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.	30
2	Details zu den neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen (alle männlich), deren <i>post mortem</i> Gehirne in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.	31
3	Parameter, die bei allen stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in den linken und rechten Gehirnhälften der <i>post mortem</i> Gehirne der Patienten mit Schizophrenie und der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.	38
4	Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in der linken Gehirnhälfte der <i>post mortem</i> Gehirne der Patienten mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.	39
5	Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in der rechten Gehirnhälfte der <i>post mortem</i> Gehirne der Patienten mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.	40
6	Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in der linken Gehirnhälfte der <i>post mortem</i> Gehirne der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.	41
7	Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in der rechten Gehirnhälfte der <i>post mortem</i> Gehirne der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden	42
8	Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in der linken Gehirnhälfte der <i>post mortem</i> Gehirne der Patienten mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.	43
9	Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in der rechten Gehirnhälfte der <i>post mortem</i> Gehirne der Patienten mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.	44
10	Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in der linken Gehirnhälfte der <i>post mortem</i> Gehirne der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.	45
11	Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in der rechten Gehirnhälfte der <i>post mortem</i> Gehirne der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.	46
12	Stereologisch ermittelte Gesamtzahlen von Spindelzellen in Schicht V in Brodmann Areal 24 im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten <i>post mortem</i> Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen	49

	(K1-K11). Die Daten wurden von Vollhardt (2023) stereologisch an denselben Gewebeschnitten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ebenfalls mit der „optical fractionator“ Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) ermittelt.	
13	Volumina von Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI sowie Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten <i>post mortem</i> Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) sowie der Kontrollpersonen (K1-K11). Die Daten wurden von Vollhardt (2023) stereologisch an denselben Gewebeschnitten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, mit dem in der Einleitung beschriebenen Cavalieri-Verfahren (Cavalieri, 1635) ermittelt.	51
14	Stereologisch ermittelte Gesamtzahlen von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-III und VI) im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten <i>post mortem</i> Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11).	54
15	Stereologisch ermittelte Gesamtzahlen von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten <i>post mortem</i> Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11).	55
16	Stereologisch ermittelte Gesamtzahlen von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli, die keine Spindelzellen waren, in den untersuchten <i>post mortem</i> Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11).	56
17	Stereologisch ermittelte Dichten von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-III und VI) im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten <i>post mortem</i> Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11). Alle Daten sind als 1 / cm ³ angegeben.	57
18	Stereologisch ermittelte Dichten von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten <i>post mortem</i> Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11). Alle Daten sind als 1 / cm ³ angegeben.	58
19	Ergebnisse der statistischen Analyse der in den Tabellen 14-18 zusammengefassten Daten mittels univariater Kovarianzanalyse, wobei jeweils die Diagnose und die Hemisphäre als feste Faktoren und das Alter der Patienten, das <i>post mortem</i> Intervall und die Fixationszeit als Kovariaten verwendet wurde. P-Werte < 0,05 sind fett gedruckt.	59
20	Zusammenfassung aller bisher publizierten Studien zu Gesamtzahlen und Dichten von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie, sowie die jeweiligen Hauptkriterien, warum diese Studien der Neuropathologie der Schizophrenie in Brodmann Areal 24 nicht gerecht wurden.	65

Einleitung

Schizophrenie ist eine schwere und wiederkehrende neuropsychiatrische Störung mit einer geschätzten durchschnittlichen Inzidenz von 15,2 Fällen pro 100.000 Menschen weltweit (McCutcheon et al., 2020). Die Krankheit stellt eine enorme Belastung für PatientInnen, ihre Familien und das Gesundheitssystem dar (Cloutier et al., 2016). Die mittlere Lebenserwartung von PatientInnen mit Schizophrenie ist fast 20 Jahre kürzer als die mittlere Lebenserwartung der Gesamtbevölkerung (Laursen et al., 2014). Dies ist zumindest teilweise auf das erhöhte Suizidrisiko von PatientInnen mit Schizophrenie (ca. 5%) zurückzuführen (Palmer et al., 2005).

Nach einer vorangegangenen Prodromalphase (Lewis und Lieberman, 2000; Insel, 2010; McCutcheon et al., 2020) manifestiert sich die Schizophrenie in den meisten Fällen mit dem Auftreten einer ersten Psychose im späten Jugend- oder frühen Erwachsenenalter. Männer sind etwas stärker betroffen als Frauen (McGrath et al., 2008) und bei Männern tritt die erste Psychose im Durchschnitt etwas früher auf (nämlich im Alter zwischen 15 und 24 Jahren) (Häfner et al., 1994; Häfner und an der Heiden, 1997; Insel, 2010). Der Verlauf der Schizophrenie ist dauerhaft oder vorübergehend, und kann bei Erstmanifestation nicht vorhergesagt werden. Die Diagnose erfolgt anhand von klinischen Symptomen, basierend auf international anerkannten Kriterien (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)* (American Psychiatric Association, 2013) sowie *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)* (World Health Organisation, 2005)). Laut ICD-10 äußern sich die verschiedenen Symptome der Schizophrenie als grundlegende und charakteristische Störungen des Denkens und der Wahrnehmung (World Health Organisation, 2005). Die Symptome der Schizophrenie werden als positive Symptome (z. B. Halluzinationen, Wahnvorstellungen, Denkstörungen) und negative Symptome (z. B. depressive Verstimmung, sozialer Rückzug, Motivationsverlust) klassifiziert (Lewis und Lieberman, 2000; National Collaborating Centre for Mental Health (UK), 2014; McCutcheon et al., 2020). Auch die Wahrnehmung kann beeinträchtigt sein. PatientInnen mit Schizophrenie kommen häufig mit positiven Symptomen in die Klinik (McCutcheon et al., 2020), während negative Symptome, einschließlich kognitiver Defizite, möglicherweise bereits die Prodromalphase charakterisieren (National Collaborating Centre for Mental Health (UK), 2014; McCutcheon et al., 2020).

Die Schizophrenie geht auf Emil Kraepelins Beschreibung der *Dementia praecox* zurück, die in Hebephrenie, katatonische und paranoide Formen unterteilt wurde

(Kraepelin, 1899). Kraepelin beschrieb das Krankheitsbild als gekennzeichnet durch „eine besondere Zerstörung des inneren Zusammenhangs der psychischen Persönlichkeit, bei der das Gefühlsleben und der Wille besonders gestört sind“ (Kraepelin, 1913). Paul Eugen Bleuler erweiterte den von Emil Kraepelin eingeführten Begriff der *Dementia praecox* und übernahm den Namen der heute bekannten neuropsychiatrischen Erkrankung (Bleuler, 1911; Noll, 2009).

Initial wurde eine biologische Ursache der Schizophrenie vermutet; die seinerzeit durchgeführten Studien brachten jedoch nur wenige erfolgreiche Ergebnisse (Shenton et al., 2001). Dies ebnete schließlich den Weg für die Übernahme der Erforschung der Schizophrenie durch die Psychoanalyse. Bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts verlief die Erforschung der Schizophrenie dabei relativ ruhig, da die Psychoanalyse mögliche biologische Ursachen außer Acht ließ. Jüngste Fortschritte in der Genetik, der Psychopharmakologie und der Bildgebung haben das Interesse an den biologischen Ursachen der Schizophrenie jedoch wiedergeweckt (Noll, 2009), insbesondere nachdem Johnstone et al. (1976) die erste Computertomographie bei PatientInnen mit Schizophrenie durchgeführt hatten (siehe auch Shenton et al., 2001; Love et al., 2018). Nur wenige Jahre zuvor beschrieb Plum (1972) die Grundlagen der neuropathologischen Forschung zur Schizophrenie mit dem heute oft zitierten Satz: „Schizophrenie ist der Friedhof des Neuropathologen“ (Shenton et al., 2001; Harrison et al., 2011). Gemeint war, dass bei der neuropathologischen Forschung zur Schizophrenie nichts Zählbares herauskommt bzw. herauskommen kann, auch weil Schlüsselmerkmale ("*hallmarks*") wie z.B. die extrazellulären Plaques wie bei der Alzheimer-Krankheit völlig fehlen. Die von Johnstone et al. (1976) beschriebene Vergrößerung der Ventrikel im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie konnte jedoch in den folgenden Jahren in mehreren klinischen Bildgebungsstudien reproduziert werden (vgl. Shenton et al., 2001; Love et al., 2018). Darüber hinaus wurden makroskopische Anomalien, wie z.B. zerebrale und kortikale Volumenreduktion, bei PatientInnen mit Schizophrenie untersucht. Volumendefizite traten häufiger im medialen Temporallappen auf, aber auch andere Regionen wie der Frontalcortex, der anteriore cinguläre Cortex, der Inselcortex und der Thalamus waren betroffen (Harrison, 1999; Wright et al., 2000; Shenton et al., 2001; Honea et al., 2005; Ellison-Wright und Bullmore, 2010; Hajma et al., 2013; Brugger und Howes, 2017).

Post mortem Studien an Gehirnen von PatientInnen mit Schizophrenie haben die Ergebnisse klinischer Bildgebungsstudien hinsichtlich möglicher mikroanatomischer Veränderungen ergänzt, und konnten die Ergebnisse der klinischen Bildgebung teilweise bestätigen oder erweitern (Harrison, 1999; Love et al., 2018). Zu den wichtigsten

Befunden gehörten Veränderungen in der Größe, Anzahl, Dichte und Verteilung von Nervenzellen und Gliazellen, sowie Veränderungen in der synaptischen und dendritischen Architektur (in der Mehrzahl dieser Untersuchungen wurden Verminderungen der untersuchten Parameter beobachtet) (Harrison, 1999; Lewis und Lieberman, 2000; Harrison et al., 2011; Bakhshi und Chance, 2015). Dabei ist wichtig, dass Anomalien in der neuronalen Zytoarchitektur als mögliche Grundlage für eine abnormale neuronale Konnektivität angesehen werden können (Harrison, 1999).

Bezüglich der Frage, ob die Schizophrenie eher einen neurodegenerativen Prozess oder aber eher eine Entwicklungsstörung des Gehirns darstellt, mehrten sich in der Literatur die Hinweise auf eine Entwicklungsstörung (Insel, 2010; Harrison et al., 2011, Bakhshi und Chance, 2015; Love et al., 2018). Insbesondere das Fehlen einer Gliose im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie gilt bis heute als starkes Argument für die Hypothese einer Entwicklungsstörung (Harrison et al., 2011). Trotz zahlreicher Studien ist die Neuropathologie der Schizophrenie aber nicht auf ein oder einige wenige spezifische und unterscheidbare Schlüsselmerkmale beschränkt, wie dies bei der Alzheimer-Krankheit der Fall ist. Darüber hinaus waren die Ergebnisse verschiedener Studien aufgrund unterschiedlicher Methoden, unterschiedlich ausgewählter Parameter und unterschiedlich ausgewählter Gehirnregionen nicht immer eindeutig. Schließlich wurden im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie keine spezifischen Veränderungen gefunden, die makroskopisch oder mikroskopisch zur Diagnose herangezogen werden könnten (Harrison et al., 2011; Love et al., 2018).

Der anteriore Gyrus cinguli (englisch "*anterior cingulate cortex*"; abgekürzt ACC) gilt in der Neuropathologie der Schizophrenie als Kernregion (Brugger und Howes, 2017). Als Teil des limbischen Systems (Bush et al., 2000) verläuft der ACC vom vorderen Teil des Gyrus cinguli über den vorderen Teil des Corpus callosum (Shenhav et al., 2013) (Abbildung 1).

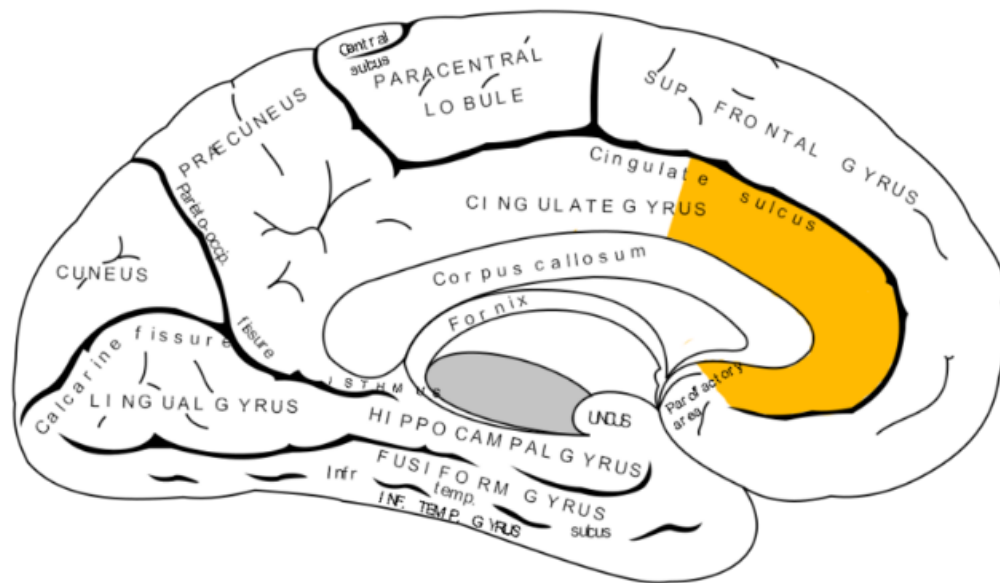


Abbildung 1: Lage des anterioren Gyrus cinguli (gelb markiert) in einer Schemazeichnung der Ansicht einer menschlichen Gehirnhälfte von medial.¹

Der ACC besteht aus mehreren Untereinheiten (Vogt et al., 1987, 1992; Vogt, 1993; Vogt et al., 1995; Vogt, 2009, 2019), darunter das Brodmann Areal 24 (BA 24). Funktionell ist der ACC hauptsächlich an kognitiven und emotionalen, aber auch an motorischen und einigen autonomen Funktionen beteiligt (Vogt et al., 1992; Bush et al., 2000; Fornito et al., 2009; Shenhav et al., 2013). Veränderungen im ACC, die möglicherweise mit dem klinischen Bild der Schizophrenie korrelieren, wurden regelmäßig in klinischen Bildgebungsstudien und neuropathologischen Studien beobachtet (Fornito et al., 2009). Wie bereits erwähnt, konnte bei PatientInnen mit Schizophrenie ein Volumendefizit im ACC beobachtet werden (Baiano et al., 2007; Haijma et al., 2013; Brugger und Howes, 2017) – und zwar insbesondere in BA 24 (Mitelman et al., 2005). Darüber hinaus war das pathomorphologische Bild auf histologischer Ebene durch Veränderungen der neuronalen, synaptischen und dendritischen Dichte gekennzeichnet (Fornito et al., 2009; Roberts et al., 2015; Onwordi et al., 2020). Auch eine Zunahme der Afferenzen zum ACC im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie wurde in der Literatur beschrieben (Benes und Bird, 1987; Fornito et al., 2009).

¹ Abbildung 1 wurde https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray727_anterior_cingulate_cortex.png entnommen. Das dort spezifizizierte Licensing lautet "*I grant anyone the right to use this work for any purpose, without any conditions, unless such conditions are required by law.*" Letzteres ist in Deutschland nicht der Fall.

Insbesondere BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie war Gegenstand zahlreicher Studien. Viele dieser Studien untersuchten dabei die Dichte von Nervenzellen und/oder Gliazellen in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie (Fornito et al., 2009), die aber nur selten aus direkt gemessenen Werten (Gesamtzahl der entsprechenden Zellen in BA 24, geteilt durch das Volumen von BA 24) abgeleitet wurde (in den meisten Fällen wurde nur die Anzahl von Zellanschnitten in einer bestimmten Fläche einzelner Gewebeschnitte aus *post mortem* Gehirnen von PatientInnen mit Schizophrenie bestimmt und dies als Zelldichte publiziert). Schmitz und Hof (2005) haben aber gezeigt, dass diese Art der Bestimmung von Zelldichten kaum als wissenschaftliche Grundlage für neuropathologische Untersuchungen dienen kann. Das zentrale Problem dabei ist in Abbildung 2 verdeutlicht:

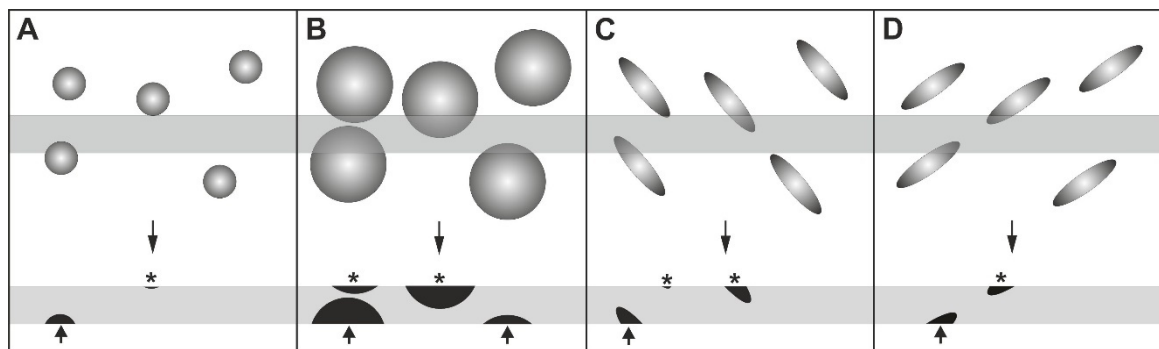


Abbildung 2: Zentrales Problem bei der Bestimmung von Zelldichten anhand der Untersuchung von dünnen Gewebeschnitten (modifiziert nach Schmitz und Hof, 2005). Die Abbildung ist im Text erläutert.

Abbildung 2A zeigt schematisch fünf Zellen in einem Gewebeverband, aus dem ein dünner Gewebeschnitt entnommen wurde (horizontaler grauer Streifen). Im Gewebeschnitt finden sich Anschnitte von zwei der fünf Zellen (im unteren Teil von Abbildung 2A mit einem Stern und einem Pfeil markiert). Je nachdem, ob man die Zellanschnitte an der Oberfläche des Gewebeschnitts (Stern), an der Unterseite des Gewebeschnitts (Pfeil) oder an jeder beliebigen Stelle innerhalb des Gewebeschnitts (Stern und Pfeil) zählt, erhält man verschiedene Ergebnisse zur Anzahl der Zellanschnitte (Pfeil: 1; Stern: 1; Pfeil und Stern: 2).

In Abbildung 2B haben die fünf Zellen im Vergleich zu Abbildung 2A ein größeres individuelles Volumen; die Anzahl, die Form und die räumliche Anordnung der Zellen unterscheidet sich aber nicht von den Verhältnissen in Abbildung 2A. Allein durch die Änderung des Volumens der Zellen ändert sich aber die Anzahl von Zellanschnitten im

untersuchten Gewebeschnitt (Pfeile: 2; Sterne: 2; Pfeile und Sterne: 4).

In Abbildung 2C haben die fünf Zellen im Vergleich zu Abbildung 2A eine andere Form; die Anzahl, das individuelle Volumen und die räumliche Anordnung der Zellen unterscheidet sich aber nicht von den Verhältnissen in Abbildung 2A. Dennoch ändert sich allein durch die veränderte Form der Zellen die Anzahl von Zellanschnitten im untersuchten Gewebeschnitt (Pfeil: 1; Sterne: 2; Pfeil und Sterne: 3).

In Abbildung 2D haben die fünf Zellen im Vergleich zu Abbildung 2C eine andere räumliche Orientierung; die Anzahl, das individuelle Volumen und die räumliche Anordnung der Zellen unterscheidet sich aber nicht von den Verhältnissen in Abbildung 2C. Dennoch ändert sich allein durch die veränderte räumlichen Orientierung der Zellen die Anzahl von Zellanschnitten im untersuchten Gewebeschnitt (Pfeil: 1; Sterne: 1; Pfeil und Sterne: 2).

Zusammenfassend erkennt man, dass Ergebnisse von Studien zu Zelldichten anhand der Untersuchung von dünnen Gewebeschnitten nicht nur von der Zellzahl, sondern auch von der Zellgröße, der Zellform und der räumlichen Orientierung der Zellen beeinflusst werden können. Es ist offensichtlich, dass ohne entsprechende Korrekturen (die aber gar nicht möglich sind; vgl. Schmitz und Hof, 2005) die Ergebnisse solcher Studien nur eine sehr begrenzte Aussagekraft haben.

Darüber hinaus ist die Relevanz von Studien zu Zelldichten weiter eingeschränkt, wenn bei solchen Studien lediglich einzelne Gewebeschnitte aus einer sogenannten "region of interest" (ROI) untersucht werden, und nicht systematisch die gesamte ROI. Besonders eindrucksvoll wurde dies in einer Studie von Schmitz et al. (2005) gezeigt, bei der im Gehirn von Mäusen nach pränataler Bestrahlung zunächst der komplette Hippokampus und das komplette Kleinhirn systematisch untersucht wurden, und anschließend nur einzelne Gewebeschnitte der genannten Gehirnregionen. Bei der Untersuchung des kompletten Hippokampus und des kompletten Kleinhirns wurde im Vergleich zu nicht pränatal bestrahlten Kontrolltieren eine Verminderung des mittleren Volumens und der mittleren Gesamtzahl von Nervenzellen in den untersuchten Gehirnregionen von jeweils ca. 50% gefunden; die Zelldichte (berechnet aus dem Quotienten aus der Gesamtzahl von Nervenzellen in der jeweiligen ROI und dem Volumen der jeweiligen ROI) blieb somit praktisch unverändert. Dementsprechend ergab auch die Bestimmung der mittleren Zelldichte anhand der Untersuchung einzelner Gewebeschnitte pro Tier praktisch keinen Unterschied zwischen den pränatal bestrahlten Tieren und nicht pränatal bestrahlten Kontrolltieren, obwohl die pränatale Bestrahlung tatsächlich zu einer massiven (ca. 50%) Verringerung der Gesamtzahl von Nervenzellen in den untersuchten Gehirnregionen geführt hatte (Schmitz et al., 2005).

Die Untersuchung der Neuropathologie nach pränataler Bestrahlung durch die Bestimmung der Zelldichte in einzelnen Gewebeschnitten der untersuchten Gehirnregionen hätte in der genannten Studie von Schmitz et al. (2005) also zu vollkommen falschen Schlussfolgerungen geführt – und zwar allein bedingt durch methodische Fehler.

Die publizierten Ergebnisse zur Dichte von Nervenzellen in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie sind recht widersprüchlich, was wahrscheinlich auf die oben beschriebenen Probleme der verwendeten Untersuchungsmethoden zurückzuführen ist. Insbesondere wurde (im Vergleich zu *post mortem* Gehirnen von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen) in *post mortem* Gehirnen von PatientInnen mit Schizophrenie weder eine signifikant erhöhte mittlere Dichte von Nervenzellen noch eine signifikant verringerte mittlere Dichte von Nervenzellen in BA 24 gefunden (Benes et al., 1986; Benes et al., 1991; Kalus et al., 1997; Bouras et al., 2001; Cotter et al., 2001; Chana et al., 2003; Höistad et al., 2013). In Bezug auf die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie liegen nur vereinzelte Berichte vor (Öngür et al., 1998; Stark et al. 2004), die ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zur mittleren Gesamtzahl von Nervenzellen in BA 24 im Gehirn von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen fanden. Allerdings handelt es sich bei diesen Studien um sehr frühe Untersuchungen, die ebenfalls mit methodischen Fehlern behaftet sein können.

Die state-of-the-art Methode zur Bestimmung der Gesamtzahl von Zellen in einer ROI ist die sogenannte "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005). Dabei wird die folgende Vorgehensweise verwendet, die hier exemplarisch am Beispiel der Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in der Granularzellschicht des Kleinhirns einer Maus beschrieben wird (Abbildung 3):

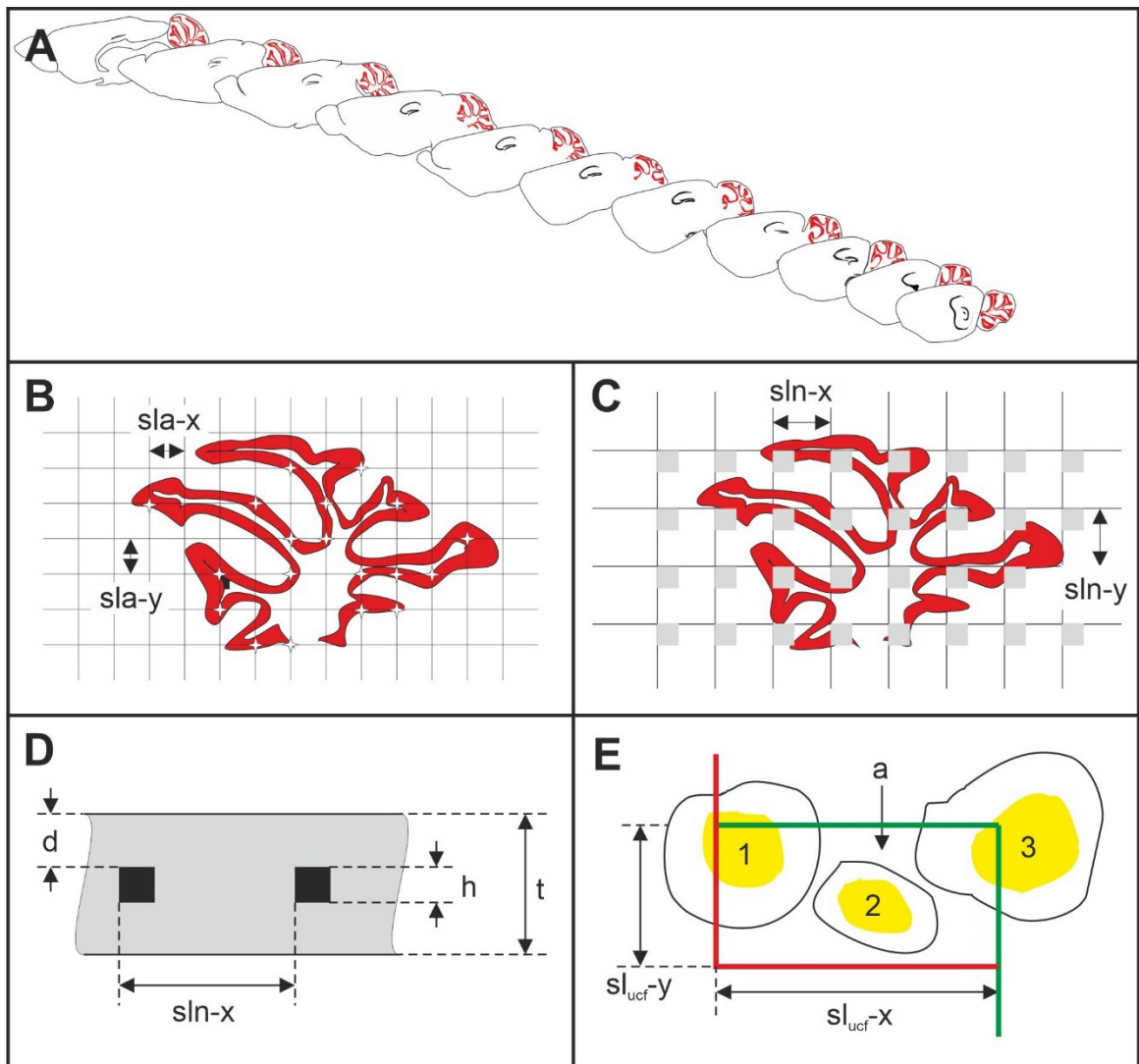


Abbildung 3: Vorgehensweise bei der Bestimmung von Gesamtzahlen von Zellen in einer "region of interest" mit der "optical fractionator" Methode, hier exemplarisch am Beispiel der Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in der Granularzellschicht des Kleinhirns einer Maus gezeigt (modifiziert nach Schmitz und Hof, 2005). Die Abbildung ist im Text erläutert.

- In einem ersten Schritt wird die gesamte ROI (im hier verwendeten Beispiel die Granularzellschicht im Kleinhirn einer Maus) zu einer vollständigen Serie von Gewebeschnitten mit gleicher Schnittdicke aufgearbeitet, aus der dann eine Schnittserie (z.B. jeder 10. Schnitt) herausgesucht wird (dies ist in Abbildung 3A für Sagittalschnitte des Gehirns einer Maus exemplarisch gezeigt; die Granularzellschicht im Kleinhirn ist rot hervorgehoben). Die Art der Auswahl der Gewebeschnitte wird "systematic and random sampling" (SRS sampling) genannt, da der Abstand

zwischen den Gewebeschnitten immer gleich ist, der erste Gewebeschnitt aber zufällig aus den ersten n Gewebeschnitten ausgewählt wird (wenn jeder 10. Gewebeschnitt ausgewählt wird, muss der erste Gewebeschnitt aus den Gewebeschnitten 1-10 ausgewählt werden; die weiteren Gewebeschnitte folgen dann in immer gleichem Abstand, z.B. in der Schnittserie 3, 13, 23,...). Das Intervall der ausgewählten Gewebeschnitte ergibt dann die sogenannte **"section sampling fraction" (ssf)** (wird z.B. jeder 10. Gewebeschnitt ausgewählt, beträgt die ssf genau 1/10).

Bei der Erstellung der Gewebeschnitte ist wichtig, dass die Schnittdicke größer ist als z.B. in der Routine-Histologie in einem Pathologie-Labor (weiter unten erklärt).

- Im zweiten Schritt wird die ausgewählte SRS-Serie von Gewebeschnitten histologisch oder immunhistochemisch so aufgearbeitet, dass die Zellen, deren Gesamtzahl bestimmt werden soll, mikroskopisch eindeutig (d.h. mit hoher Sensitivität und hoher Spezifität) erkannt werden können. Für die Granularzellen im Kleinhirn der Maus ist keine spezifische immunhistochemische Markierung bekannt (bei den Purkinjezellen im Kleinhirn der Maus könnte z.B. eine immunhistochemische Markierung mit Antikörpern gegen Calbindin-D28K zum Einsatz kommen (Wood et al., 1988)); dementsprechend bietet sich eine Färbung der Gewebeschnitte mit Nissl-Färbung an (wie im o.g. Beispiel von Schmitz et al. (2005) durchgeführt).
- Im dritten Schritt wird das Gesamtvolumen der ROI bestimmt (dies ist für die Bestimmung der Gesamtzahl von Zellen in der ROI unerheblich, für die Bestimmung der Zelldichte in der ROI aber unerlässlich). Zu diesem Zweck wird für jeden Gewebeschnitt der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten die Anschnittsfläche bestimmt; das Gesamtvolumen der ROI ergibt sich nach Cavalieri (1635) dann als

$$V_E = \sum_{n=1}^x A_n \times t \times i$$

mit

V_E = "estimated" Volumen (für den Begriff "estimated" gibt es in diesem

Zusammenhang keine direkte Übersetzung; "geschätzt" wäre keine korrekte Übersetzung),

x = Anzahl der Gewebeschnitte in der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten,

A_n = Anschnittsfläche von Gewebeschnitt n in der ausgewählten SRS-Serie von

Gewebeschnitten,
 t = Schnittdicke ("thickness") der Gewebeschnitte in der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten, und
 i = Intervall der Gewebeschnitte in der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten (z.B. jeder 10. Gewebeschnitt).

Die Anschnittsfläche der ROI kann auf zwei verschiedene Arten bestimmt werden:

1. durch Abgrenzung (zu diesem Zweck könnte man im hier gewählten Beispiel das mikroskopische Bild der Granularzellschicht im Kleinhirn einer Maus, das auf einem Gewebeschnitt der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten gefunden wird, mit einer Kamera auf einen Computermonitor übertragen und dort mit geeigneter Software "tracen", oder
2. durch ein Punktzählverfahren, das im hier gewählten Beispiel der Granularzellschicht im Kleinhirn einer Maus wegen der Komplexität der Morphologie der ROI vorzuziehen ist.

Für das Punktzählverfahren wird über jeden Gewebeschnitt der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten, der die ROI zeigt, ein immer gleiches Gitter mit festgelegten Abständen der Gitterlinien gelegt (Abbildung 3B). Die Abstände der Gitterlinien zueinander werden "side length of the grid for estimating the area of the ROI in X-direction" ($sla-x$) und "side length of the grid for estimating the area of the ROI in Y-direction" ($sla-y$) genannt. Die Position des Gitters auf der ROI wird bei jedem Gewebeschnitt der SRS-Serie von Gewebeschnitten zufällig gewählt. Gezählt werden nun alle Kreuzungspunkte der Gitterlinien, die sich über der ROI befinden (in Abbildung 3B mit kleinen, weissen Sternchen markiert). Durch den immer gleichen Abstand der Kreuzungspunkte der Gitterlinien zueinander (durch $sla-x$ und $sla-y$ eindeutig bestimmt) und die zufällige Lage des Gitters auf der ROI folgt die Bestimmung der Kreuzungspunkte der Gitterlinien, die sich über der ROI befinden, wiederum den Kriterien des SRS sampling. Gleichzeitig repräsentiert jeder Kreuzungspunkt der Gitterlinien eine Fläche mit dem Flächeninhalt

$$A_G = (sla - x) \times (sla - y)$$

und das Gesamtvolumen der ROI ergibt sich als

$$V_E = \sum_{n=1}^x \left(\sum h_n \right) \times A_G \times t \times i$$

V_E = "estimated" Volumen,

x = Anzahl der Gewebeschnitte in der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten,

h_n = "hits" (Kreuzungspunkte der Gitterlinien, die sich bei Gewebeschnitt n über der ROI befinden,

A_G = Fläche, die jeder Kreuzungspunkt der Gitterlinien repräsentiert,

t = Schnittdicke ("thickness") der Gewebeschnitte in der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten, und

i = Intervall der Gewebeschnitte in der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten (z.B. jeder 10. Gewebeschnitt).

- Im vierten Schritt wird die Gesamtzahl von Zellen in der ROI bestimmt. Zu diesem Zweck wird (wie beim oben beschriebenen Punktzählverfahren) ebenfalls über jeden Gewebeschnitt der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten, der die ROI zeigt, ein immer gleiches Gitter mit festgelegten Abständen der Gitterlinien gelegt (Abbildung 3C). Die Abstände der Gitterlinien zueinander werden "side length of the grid for estimating the cell number in the ROI in X-direction" ($sln-x$) und "side length of the grid for estimating the cell number in the ROI in Y-direction" ($sln-y$) genannt. Die Position des Gitters auf der ROI wird bei jedem Gewebeschnitt der SRS-Serie von Gewebeschnitten zufällig gewählt. Das Gitter bestimmt die Lage von Zählfeldern, deren Fläche a kleiner ist als die Fläche zwischen den Gitternetzlinien (in Abbildung 3C durch kleine graue Quadrate markiert). Dabei gilt

$$asf = \frac{a}{(sln-x) \times (sln-y)}$$

mit

asf = area sampling fraction,

a = Fläche der Zählfelder,

$sln-x$ = Abstand der Gitternetzlinien in Richtung X, und

$sln-y$ = Abstand der Gitternetzlinien in Richtung Y.

Durch den immer gleichen Abstand der Kreuzungspunkte der Gitternetzlinien zueinander (durch $sln-x$ und $sln-y$ eindeutig bestimmt) und die zufällige Lage des Gitters auf der ROI folgt die Bestimmung der Positionen der Zählfelder, die sich über der ROI befinden, wiederum den Kriterien des SRS sampling.

Um bei der Bestimmung der Gesamtzahl von Zellen in der ROI die methodischen

Fehler zu vermeiden, die in Abbildung 2 gezeigt sind, wird bei der "optical fractionator" Methode eine dreidimensionale Vorgehensweise verwendet. Konkret bilden die in Abbildung 3C gezeigten Zählfelder die Grundfläche sogenannter "unbiased virtual counting spaces" (UVCS) mit immer gleicher Fläche a (diese Fläche wird auch "unbiased counting frame" (UCF) genannt), somit immer gleichen Seitenlängen s_{ucf-x} und s_{ucf-y} (in Abbildung 3E gezeigt) und immer gleicher Höhe h (in Abbildung 3D gezeigt). Um die dreidimensionale Vorgehensweise zu realisieren, müssen die UVCS vollständig in den ausgewählten Gewebeschnitten liegen, d.h., die Höhe h der UVCS muss kleiner sein als die Schnittdicke t (vgl. Abbildung 3D). Daraus ergibt sich

$$tsf = \frac{h}{t}$$

mit

tsf = thickness sampling fraction,

h = Höhe der unbiased virtual counting frames, und

t = Schnittdicke der Gewebeschnitte in der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten nach der histologischen Aufarbeitung.

Aus Gründen der Praktikabilität sollte die Höhe h der UVCS in derselben Größenordnung wie der Durchmesser der Zellen in der ROI gewählt werden (vgl. Schmitz und Hof, 2005).

Da auch bei exakter Vorgehensweise im Labor nicht garantiert werden kann, dass die Gewebeschnitte in der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten eine absolut plane Oberfläche haben, könnten bei Durchmessern von Zellen in der Größenordnung von deutlich weniger als 100 μm Unebenheiten von wenigen Mikrometern bereits zu methodischen Fehlern führen. Um dies auszuschließen, wird zwischen der Oberkante der Gewebeschnitte in der ausgewählten SRS-Serie von Gewebeschnitten und der Oberseite der UVCS ein Abstand d eingehalten (in Abbildung 3D gezeigt).

Die Zählung / Registrierung von Zellen in den UVCS kann wiederum auf zwei verschiedene Arten erfolgen; beiden Möglichkeiten ist gemeinsam, dass jede Zelle nur genau ein einziges Mal registriert werden kann (alles andere würde wiederum zu methodischen Fehlern führen):

1. In jeder Zelle kann ein eindeutiger, singulärer Punkt bestimmt werden, z.B. der

Mittelpunkt des Nukleolus (diese Vorgehensweise setzt voraus, dass jede Zelle genau einen Nukleolus im Zellkern aufweist, also weder keinen Nukleolus noch zwei oder mehr Nukleoli). In diesem Fall werden alle Zellen gezählt, deren Nukleolus-Mittelpunkt in einem der UVCS liegt.

2. Ist es nicht möglich, in jeder Zelle einen eindeutigen, singulären Punkt zu bestimmen, zählt man für einen bestimmten UVCS alle Zellen, die
 - beim Durchfokussieren durch den UVCS nicht die Oberkante des UVCS berühren,
 - entweder vollständig im UCF liegen (dieses Kriterium ist in Abbildung 3E für Zelle 2 erfüllt), oder aber
 - die sogenannten "inclusion lines" des UCF (grüne Linien in Abbildung 3E, nicht aber die sogenannten "exclusion lines" des UCF (rote Linien in Abbildung 3E), berühren (dieses Kriterium ist in Abbildung 3E für Zelle 3 erfüllt, während Zelle 1 in Abbildung 3E die "exclusion lines" des UCF berührt und deswegen in diesem UCF nicht gezählt werden darf, unabhängig davon, ob sie beim Durchfokussieren durch den UVCS die Oberkante des UVCS berührt oder nicht).

Je nach Färbung können diese Kriterien auch auf den Zellkern anstatt auf die gesamte Zelle angewendet werden (in Abbildung 3E gelb markiert) – natürlich nur unter der Voraussetzung, dass jede Zelle genau einen Zellkern aufweist (also weder keinen Zellkern noch zwei oder mehr Zellkerne). In dem in Abbildung 3E gezeigten Beispiel würden die Zellkerne der Zellen 2 und 3 gezählt/registriert, nicht aber der Zellkern von Zelle 1 (da er die "exclusion lines" des UVCS berührt).

Bei konsequenter Anwendung dieser Zählkriterien kann jede Zelle nur genau ein einziges Mal gezählt / registriert werden, und zwar völlig unabhängig von der Größe und der Form der Zellen bzw. der räumlichen Orientierung der Zellen in der ROI. Die einzige Bedingung, die bei der Verwendung der "optical fractionator" Methode erfüllt sein muss, ist, dass die UVCS nicht größer sind als der Raum, der durch den Abstand der Kreuzungspunkte der Gitterlinien zueinander (durch $\sin-x$ und $\sin-y$ eindeutig bestimmt) sowie die Schnittdicke t definiert wird (wäre dies der Fall, müssten die UVCS überlappen, was die Möglichkeit eröffnen würde, Zellen in mehr als einem UVCS zu registrieren).

Die Gesamtzahl der Zellen in der ROI ergibt sich aus

$$N_E = \sum N_c \times \frac{1}{ssf \times asf \times tsf}$$

mit

N_E = "estimated" Gesamtzahl von Zellen,

N_C = "counted" (gezählte / registrierte) Anzahl von Zellen (summiert für alle UVCS, die ganz oder teilweise in der ROI liegen),

ssf = section sampling fraction,

asf = area sampling fraction, und

tsf = thickness sampling fraction.

Diese Form der Bestimmung der Gesamtzahl von Zellen in einer ROI fällt in die Kategorie der "design-based" Stereologie (vgl. Schmitz und Hof, 2005), da keinerlei Annahmen in Bezug auf die Größe, die Form und die räumliche Orientierung der Zellen in der ROI getroffen werden müssen.

Da die Ergebnisse der Bestimmung der Gesamtzahl von Zellen in einer ROI mit der "optical fractionator" Methode "estimates" sind, stellt sich die Frage nach der Variabilität dieser Ergebnisse, wenn die Bestimmung mehrfach erfolgen würde. Zu diesem Zweck wurde in der Literatur der Begriff des "coefficient of error" (CE) eingeführt, der nach Schmitz (1998), Glaser and Wilson (1998) und Schmitz und Hof (2005) sehr einfach bestimmt werden kann:

$$CE_{N_E} = \frac{1}{\sqrt{N_C}}$$

CE = coefficient of error,

N_E = "estimated" Gesamtzahl von Zellen, und

N_C = "counted" (gezählte/registrierte) Anzahl von Zellen (summiert für alle UVCS, die ganz oder teilweise in der ROI lagen).

Grob vereinfacht besagt der CE-Wert, dass sich bei der Bestimmung der Gesamtzahl von Zellen in einer ROI mit der "optical fractionator" Methode die tatsächliche Gesamtzahl von Zellen in der untersuchten ROI mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% in einem Bereich von $\pm 2 \times CE$ rund um N_E befindet.

Bestimmt man z.B. die Gesamtzahl von Zellen in einer ROI mit der "optical fractionator" Methode und den Parametern $ssf = 1/10$, $asf = 1/10$ und $tsf = 1/10$, und erhält $N_C = 1000$ (summiert für alle UVCS, die ganz oder teilweise in der ROI lagen), dann ergibt sich $N_E = 1.000.000$ und $CE = 0,0316$. Aus diesen Werten kann geschlossen werden, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 95% die tatsächliche

Gesamtzahl von Zellen in der untersuchten ROI grösser als 936.754 und kleiner als 1.063.246 ist

Es ist offenkundig, dass die Bestimmung der Gesamtzahl von Zellen in einer ROI mit der "optical fractionator" Methode praktisch nicht an einem einfachen Mikroskop durchgeführt werden kann und schon gar nicht an zweidimensionalen mikroskopischen Bildern von Gewebeschnitten. Vielmehr verlangt die beschriebene Vorgehensweise die Verwendung von computer-gesteuerten Mikroskopen und Spezialsoftware wie z.B. die Software "Stereo Investigator" der Firma MBF Bioscience (Williston, VT, USA; <https://www.mbfbioscience.com/products/stereo-investigator>) oder die Software "Stereologer" der Firma SRC Biosciences (Tampa, FL, USA; <https://srcbiosciences.com/stereologer-software>).

Für die Reproduzierbarkeit von Bestimmungen der Gesamtzahl von Zellen in einer ROI mit der "optical fractionator" Methode sind also neben der Beschreibung der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte insbesondere die folgenden Angaben wichtig:

- ssf (vgl. Abbildung 3A)
- $sln-x$ und $sln-y$ (vgl. Abbildung 3C)
- d , h und t (vgl. Abbildung 3D)
- a (vgl. Abbildung 3E)
- N_C

Alle weiteren Werte (asf , tsf , N_E und CE) können aus den oben genannten Angaben berechnet werden.

Bestimmungen der Gesamtzahl von Nervenzellen in BA 24 insgesamt (Schichten I-VI) oder einzelnen Schichten innerhalb von BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode liegen in der Literatur bisher nicht vor; gleiches gilt für Bestimmungen der Dichte von Nervenzellen in BA 24 (oder einzelnen Schichten innerhalb von BA 24) im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie, die auf der systematischen Analyse der gesamten ROI basieren.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals die folgenden Daten erhoben:

- mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24² im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie sowie in den Schichten I-III und VI in BA 24 im Gehirn von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen,
- mittlere Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie sowie in den Schichten I-III und VI in BA 24 im Gehirn von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen,
- mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie sowie in Schicht V in BA 24 im Gehirn von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen, sowie
- mittlere Dichte von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie sowie in Schicht V in BA 24 im Gehirn von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen.

Dabei wurde die folgende Hypothese getestet: Im Vergleich zum Gehirn von gesunden Kontrollpersonen ist im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 statistisch signifikant verringert, nicht jedoch die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI sowie die mittlere Dichte von Nervenzellen in den einzelnen Schichten von BA 24.

Es sei darauf verwiesen, dass in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen "normalen" Nervenzellen und den sogenannten von Economo Zellen (oder Spindelzellen) (Nimchinsky et al., 1995; Nimchinsky et al., 1999) in Schicht Vb in BA 24 unterschieden wurde. Nach von Economo (1926) sind diese speziellen Zellen länglich und spindelförmig, und nahezu senkrecht zur Oberfläche der weißen Substanz ausgerichtet. Sie sind aus den folgenden Gründen für die neuropsychiatrische Grundlagenforschung von besonderer Bedeutung:

- Spindelzellen wurden im menschlichen Gehirn in großen Mengen sowohl im anterioren Gyrus cinguli als auch im frontoinsulären sowie in begrenzter Zahl auch im präfrontalen Kortex gefunden (von Economo, 1926; Fajardo et al., 2008; Allman et al., 2010; Butti et al., 2013; González-Acosta et al., 2018).
- Spindelzellen wurden außer beim Menschen auch im Gehirn von Affen (Nimchinsky et al., 1999; Allman et al., 2010), Elefanten (Hakeem et al., 2009), Walen (Butti et al., 2009) und anderen Arten (Raghanti et al., 2015) nachgewiesen; im Gehirn von Mäusen und Ratten kommen sie jedoch nicht vor.

² BA 24 ist zytoarchitektonisch durch einen agranulären Cortex charakterisiert, in dem von den 6 Isocortexschichten (Schicht I-VI) die innere Körnerzellschicht IV (Schicht IV) fehlt (Vogt et al., 1987; 1995).

- Die genaue Funktion der Spindelzellen ist nach wie vor unklar (Butti et al., 2013). Es wird angenommen, dass diese Zellen spezialisierte Projektionsneurone sind (Nimchinsky et al., 1995; Allman et al., 2010; Butti et al., 2013; Cobos und Seeley, 2015; Hodge et al., 2020), wobei die genauen Zielgebiete der Projektion im Gehirn praktisch unbekannt sind.
- Es wird vermutet, dass die Spindelzellen eine Rolle bei emotionalen Prozessen und dem Selbstwertgefühl (Brüne et al., 2011) sowie der intuitiven Entscheidungsfindung (Allman et al., 2005) spielen.
- Eine geringere mittlere Gesamtzahl bzw. Dichte von Spindelzellen (sowie andere pathomorphologische Veränderungen dieser Zellen) wurde bei mehreren Krankheiten beobachtet, einschließlich der Alzheimer-Krankheit (Nimchinsky et al., 1995; Gefen et al., 2018), der frontotemporalen Demenz (Seeley et al., 2006; Kim et al., 2012; Santillo et al., 2013) und der familiären Dysautonomie (Jacot-Descombes et al., 2020).

Die Bestimmung der mittleren Gesamtzahl von Spindelzellen in Schicht Vb in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie erfolgte in einer parallelen Arbeit (Vollhardt, 2023), und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit den Ergebnissen von Vollhardt (2023) sowie einer weiteren Arbeit von Gaus (in Vorbereitung) in einer gemeinsamen Publikation (Gaus et al., 2022) zusammengeführt.

Die beschriebene Hypothese wurde an *post mortem* Gehirnen von 12 männlichen Patienten mit Schizophrenie und 11 männlichen, neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen getestet, deren Altersverteilung der Altersverteilung der Patienten mit Schizophrenie entsprach. Die Wahl der untersuchten *post mortem* Gehirne für die vorliegende Arbeit basierte größtenteils auf der Tatsache, dass genau dieselben *post mortem* Gehirne auch in früheren Studien verwendet wurden (Casanova et al., 2005; Kreczmanski et al., 2005, 2007; Casanova et al., 2008; Kreczmanski et al., 2009; Höistad et al., 2013). Insbesondere wurde bei diesen *post mortem* Gehirnen bereits die Gesamtzahl von Nervenzellen im lateralen Kern der Amygdala ebenfalls mit der "optical fractionator" Methode bestimmt (Kreczmanski et al., 2007), was deswegen von Bedeutung ist, da BA 24 direkt auf den lateralen Kern der Amygdala projiziert (Pandya et al., 1981; Stefanacci und Amaral, 2002; Calderazzo et al., 2021).

Material und Methoden

Untersuchtes Gewebe

Wie bereits erwähnt, wurde die vorliegende Arbeit an *post mortem* Gehirnen von 12 männlichen Patienten mit Schizophrenie und 11 männlichen, neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung (im Folgenden mit "Kontrollpersonen" abgekürzt) durchgeführt. Diese weltweit wohl einzigartige Sammlung menschlicher *post mortem* Gehirne wurde von 1988 bis 1994 von Prof. Dr.med. Helmut Heinsen (Morphologische Hirnforschung der Universität Würzburg) erstellt. Die entsprechenden Autopsien wurden mit Zustimmung der nächsten Angehörigen gemäß deutschem Recht durchgeführt; der Einsatz dieser *post mortem* Gehirne zu Forschungszwecken wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt.

Die Entnahme und Weiterverarbeitung dieser *post mortem* Gehirne erfolgte durch Prof. Heinsen oder von ihm beauftragte Pathologen. Die Patienten mit Schizophrenie wie auch die Kontrollpersonen hatten einen ähnlichen ethnischen Hintergrund, und wurden unmittelbar vor ihrem Tod in klinischen Einrichtungen in Deutschland stationär behandelt. Klinische Daten der Patienten mit Schizophrenie lagen aus psychiatrischen Kliniken oder Universitätskliniken in Deutschland vor. Zu allen Patienten mit Schizophrenie und allen Kontrollpersonen lagen Prof. Heinsen die Obduktionsprotokolle und Anamneseunterlagen vor. Die Diagnose der Patienten mit Schizophrenie basierte auf den international anerkannten Klassifikationssystemen für die Diagnose psychischer Störungen, ICD-10 (World Health Organisation, 2005) und DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994). Basierend auf den verfügbaren Krankenunterlagen bestätigten erfahrene PsychiaterInnen die Diagnose einer Schizophrenie anhand der DSM-IV-Kriterien, und schlossen psychopathologische Veränderungen bei den Kontrollpersonen aus. Die folgenden Kriterien galten als Ausschlusskriterien sowohl bei den Patienten mit Schizophrenie als auch den Kontrollpersonen:

- neurologische Probleme, die medizinische Behandlungen notwendig machten oder zu kognitiven Beeinträchtigungen führten,
- wiederkehrende Anfallsleiden,
- schwere traumatische Hirnverletzung mit Bewusstlosigkeit,
- selbstverschuldete Vergiftung,
- Drogenmissbrauch, sowie
- Diabetes mellitus mit Blutzucker über 200 mg/dl.

Das Durchschnittsalter der Patienten mit Schizophrenie betrug $50,5 \pm 3,4$ Jahre (alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts) und das Durchschnittsalter der Kontrollpersonen $54,5 \pm 2,5$ Jahre. Das mittlere *post mortem* Intervall (d.h. die Zeit zwischen Tod und Autopsie) der Patienten mit Schizophrenie betrug $38,1 \pm 7,7$ Stunden und das mittlere *post mortem* Intervall der Kontrollpersonen $23,6 \pm 4,3$ Stunden. Die mittlere Fixierungszeit (d.h. die Zeit zwischen der Autopsie und der histologischen Aufarbeitung) der *post mortem* Gehirne der Patienten mit Schizophrenie betrug 199 ± 25 Tage und die mittlere Fixierungszeit der *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen 1028 ± 432 Tage. Detailliertere Informationen zu den Patienten mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt.

Tabelle 1: Details zu den Patienten mit Schizophrenie (alle männlich), deren *post mortem* Gehirne in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Nr.	A	D	Todesursache	PMI	Fix	Diagnosen	
						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	Sepsis	33	127	295.60	F20.50
S7	54	20	Sepsis	27	250	295.60	F20.50
S8	55	22	Rechtsherzinsuffizienz	25	84	295.30	F20.00
S9	57	37	Sepsis	76	163	295.30	F20.00
S10	60	24	Lungenembolie	<48	311	295.30	F20.01
S11	62	19	Aspiration	7	171	295.30	F20.00
S12	63	22	akuter Myokardinfarkt	15	338	295.60	F20.50

Abkürzungen: A: Alter (in Jahren); D: Alter bei Stellung der Diagnose "Schizophrenie" (in Jahren); PMI: *post mortem* Intervall (in Stunden); Fix: Fixationszeit (in Tagen).

Tabelle 2: Details zu den neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen (alle männlich), deren *post mortem* Gehirne in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

Nr.	A	D	Todesursache	PMI	Fix	Diagnosen	
						DSM-IV	ICD-10
K1	36	---	Gewehrschuss	24	143	---	---
K2	47	---	akuter Myokardinfarkt	<24	133	---	---
K3	50	---	Lawinenunglück	23	498	---	---
K4	51	---	Sepsis	7	285	---	---
K5	54	---	akuter Myokardinfarkt	18	168	---	---
K6	56	---	akuter Myokardinfarkt	60	3570	---	---
K7	58	---	akuter Myokardinfarkt	28	126	---	---
K8	60	---	gastrointestinale Hämorrhagie	18	101	---	---
K9	60	---	gastrointestinale Hämorrhagie	27	302	---	---
K10	62	---	akuter Myokardinfarkt	<24	3696	---	---
K11	65	---	Bronchopneumonie	6	2289	---	---

Abkürzungen: A: Alter (in Jahren); D: Alter bei Stellung der Diagnose "Schizophrenie" (in Jahren); PMI: *post mortem* Intervall (in Stunden); Fix: Fixationszeit (in Tagen).

Histologische Aufarbeitung der *post mortem* Gehirne

Die histologische Aufarbeitung der *post mortem* Gehirne (Fixierung, Einbettung, Anfertigen von Serienschnitten, Färben der Gehirnschnitte, Bestimmung der Dicke der Gewebeschnitte nach der histologischen Aufarbeitung) erfolgte bereits vor ca. 30 Jahren im Labor von Prof. Heinsen gemäß publizierter Standardverfahren (Heinsen und Heinsen, 1991; Heinsen et al., 2000).

Diese Standardverfahren werden zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im folgenden Text näher beschrieben. Um jedoch zu verdeutlichen, dass die histologische Aufarbeitung der *post mortem* Gehirne nicht Teil der vorliegenden Arbeit war (sondern bereits vor ca. 30 Jahren im Labor von Prof. Heinsen erfolgte), sind alle entsprechenden Textpassagen in kursiver Schrift gehalten.

Fixierung der post mortem Gehirne

Alle post mortem Gehirne wurden mindestens 4 Wochen in 10% Formalin (1 Teil wässriges Formaldehyd und 9 Teile Leitungswasser) fixiert. Das 10% Formalin wurde in den ersten 3 Wochen wöchentlich gewechselt.

Nach der Fixierung wurde das Kleinhirn einschließlich des Hirnstamms am rostralen Ende der Pons vom restlichen Gehirn abgetrennt (während der Fixierung waren die Gehirne an einem Faden, der am Hirnstamm befestigt war, zur Vermeidung von Artefakten "kopfüber" so in die Fixierlösung gehängt, dass sie den Boden des Gefäßes nicht berührten). Anschließend wurden die beiden Hemisphären in der Mitte sagittal durchtrennt und das Septum pellucidum entfernt. Dies ermöglichte die Entfernung aller zugänglichen Teile des Plexus choroideus, die sich im lateralen Ventrikel des Gehirns befinden (mögliche Verkalkungen des Plexus choroideus, die bei PatientInnen, die älter als 25 Jahre sind, nicht ausgeschlossen werden können, können das spätere Anfertigen von Gehirnschnitten verhindern). Die tiefen Teile des Plexus choroideus wurden später bei der Serienschchnittvorbereitung entfernt.

Einbettung der post mortem Gehirnhälften zur Anfertigung von Gefrierschnitten

Zum Schutz vor Gefrierartefakten wurden die Hemisphären mit einem kryoprotektiven Medium vorbehandelt (Heinsen und Heinsen, 1991). Zu diesem Zweck wurden zwei Lösungen hergestellt, in die die Gehirnhälften jeweils 8 Tage lang eingelegt wurden. Lösung 1 bestand aus 4% Formaldehyd, 2% Dimehtylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 10 % Glycerol; Lösung 2 aus 4% Formaldehyd, 2% DMSO und 20% Glycerol. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Gehirne entweder in 3% Agarose-Lösung oder in 15% Gelatine-Lösung eingebettet. Anschließend wurden die eingebetteten Gehirnhälften zur Härtung über Nacht in einem Kühlschrank bei 4° C gelagert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Gehirnhälften an allen Seiten von 5-10 mm Einbettmedium bedeckt waren.

Vor dem Einfrieren wurden die Gehirnhälften dann erneut für jeweils 2 Wochen in die beiden oben beschriebenen Lösungen eingelegt und unmittelbar vor dem Einfrieren jeweils in einen rostralen und einen okzipitalen Gewebeblock geteilt (die Schnittstelle in Frontalebene lag knapp rostral des Splenium corporis callosi, wodurch unter anderem BA 24 vollständig im jeweils rostralen Gewebeblock lag) (Abbildung 4).

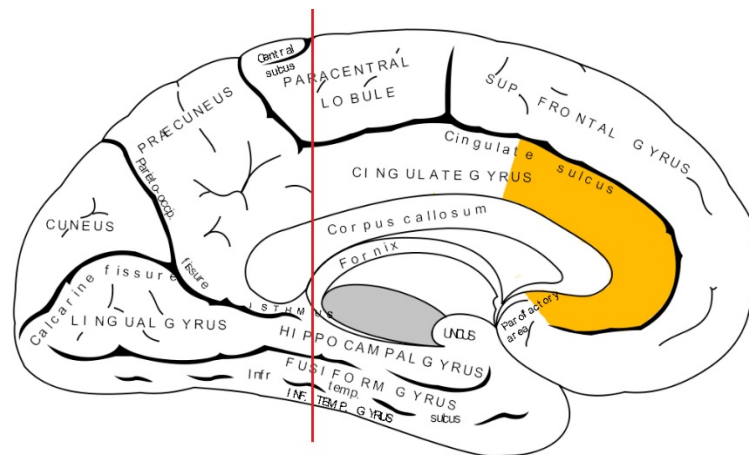


Abbildung 4: Lage des Frontalschnitts (roter Strich) (in einer Schemazeichnung der Ansicht einer menschlichen Gehirnhälfte von medial), mittels dessen die Gehirnhälften vor dem Einfrieren jeweils in einen rostralen und einen okzipitalen Gewebeblock geteilt wurden. Mit der gewählten Schnittführung verblieben die meisten für die Grundlagenforschung zur Schizophrenie relevanten Gehirnregionen (u.a. Frontalcortex, anteriorer Gyrus cinguli, Amygdala, Basalganglien) im frontalen Gewebeblock.

Anfertigung von 700 µm dicken Gefrierschnitten

Zum Einfrieren der Gewebelöcke wurde Isopentan durch Zugabe von Trockeneisblöcken auf -60°C heruntergekühlt (die Temperatur von Trockeneis liegt bei Normaldruck (1,013 bar) bei $-78,5^{\circ}\text{C}$; der Gefrierpunkt von Isopentan liegt bei -160°C). Anschließend wurden die Gewebelöcke in das gekühlte Isopentan eingelegt und gefroren, das überschüssige Isopentan mit Filterpapier von den gefrorenen Gewebelöcken entfernt, die Gewebelöcke in Plastikbeutel verpackt und über Nacht (in einigen Fällen auch für mehrere Tage) bei -80° in einer Tiefkühltruhe gelagert.

Zum Anfertigen von Serienschnitten (frontale Schnittrichtung) wurden die jeweils rostralen Gewebelöcke mit Wasser auf den Objekthalter eines Kryomikrotoms (Jung, Nussloch, Deutschland) gefroren und anschließend in 700 µm dicke Schnitte geschnitten. Alle Schnitte wurden in der korrekten Reihenfolge in mit 4% Formalin gefüllte Plastikbehälter gelegt; nach jedem 5. Schnitt wurde ein Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) eingebracht.

Einbettung der post mortem Gehirnhälften von Kontrollperson 7 in Celloidin

Bei der histologischen Aufarbeitung des post mortem Gehirns von Kontrollperson 7 (K7 in Tabelle 2) wurde aus technischen Gründen eine andere Vorgehensweise (Einbettung in Celloidin) gewählt. Zu diesem Zweck wurden die beiden Gehirnhälften zunächst in

einer aufsteigenden Alkoholreihe (Einlegen in 70%, 80% und 96% Ethanol für je eine Woche) entwässert. Am Ende der dritten Woche wurden dann die Hirnhäute aus den Bereichen der großen und tiefen Sulci (z. B. Sulcus centralis, Sulcus lateralis) so weit wie möglich entfernt. Anschließend wurden die beiden Gehirnhälften jeweils in eine transparente Kunststoffbox (240 x 140 x 135 mm) gelegt, die mit 8% Celloidin gefüllt wurden. Zur Herstellung des Celloidins wurden zunächst 750 ml 100% Ethanol mit 750 ml Diethylether vermischt; anschließend wurden 180 Gramm Celloidin (Cedukol Nr. 1.04363; Merck) in der Ethanol-Diethylethermischung gelöst. Um das Celloidin von 8% auf 16% zu konzentrieren, wurden die Kunststoffboxen für 48 Stunden in einen Exsikkator gestellt und die Alkohol- und Diethyletherdämpfe mit einer Vakuumpumpe entfernt. Diese Vorgehensweise verhinderte nicht nur die Bildung von Gasblasen im Einbettmedium, sondern sorgte auch dafür, dass das Celloidin tief in die Sulci und Ventrikel eindringen konnte, ohne in das Gehirngewebe selber einzudringen. Zur Aushärtung des Celloidins wurden die Kunststoffboxen anschließend in ein Aquarium aus Glas gestellt, in dem sich eine mit Chloroform gefüllte Petrischale (Durchmesser 185 mm) befand. Das Aquarium wurde verschlossen. Der Celloidinblock wurde täglich auf überschüssigen Alkoholether überprüft, der gegebenenfalls entfernt wurde. Nach 14-16 Tagen hatte sich der Celloidinblock von der Wand der Kunststoffbox gelöst. Als der Celloidinblock schließlich eine gummiartige Konsistenz angenommen hatte, wurde der Aushärtprozess des Celloidins durch Einlegen in 70% Ethanol für zwei Tage abgeschlossen.

Anfertigung von 440 µm dicken Celloidinschnitten der post mortem Gehirnhälften von Kontrollperson 7

Die in Celloidin eingebetteten post mortem Gehirnhälften von Kontrollperson 7 wurden ebenfalls wie in Abbildung 4 gezeigt in je einen rostralen und einen okzipitalen Gewebelock geteilt und anschließend mittels 8% Celloidin auf den Objekthalter eines Schlittenmikrotoms (Polycut, Cambridge Instruments, London, UK) montiert; dazu wurden die Gewebelöcke nach Aufbringen auf den Objekthalter für 3-4 Stunden in 70% Ethanol eingelegt. Anschließend wurden die Gewebelöcke in 440 µm dicke Schnitte geschnitten. Während des Schneidevorgangs wurden der Celloidinblock und die Klinge des Mikrotoms mit 70% Ethanol feucht gehalten. Wiederum wurden alle Schnitte in der korrekten Reihenfolge in Plastikbehälter gelegt und nach jedem 5. Schnitt ein Filterpapier (Schleicher & Schuell) eingebracht; in den Plastikbehältern befand sich jedoch 70% Ethanol und nicht 4% Formalin wie bei den Gefrierschnitten.

Färbung der Gewebeschnitte

Jeder zweite oder dritte Gewebeschnitt aller Hemisphären wurde mit Gallocyanin-Chromalaun gefärbt (Heinsen und Heinsen, 1991). Gallocyanin-Chromalaun markiert Nukleinsäuren in einem tiefem Blau (Terner und Clark, 1960). Gallocyanin ist ein basischer, anorganischer Farbstoff; Chromalaun (Kaliumaluminiumsulfat) ist ein sogenanntes Mordant, das die Bindung des Farbstoffs an die zu färbenden Strukturen verbessert.

Die Gewebeschnitte wurden zunächst über Nacht mit Perameisensäure inkubiert, um die Selektivität der Färbung zu verbessern (Heinsen und Heinsen, 1991). Um eine optimale Inkubation der Schnitte mit der Perameisensäure zu gewährleisten, wurde Filterpapier auf die Oberfläche der Perameisensäure gelegt und die Gewebeschnitte unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Perameisensäure bestand aus 1 Teil 100% Ameisensäure, 3 Teilen 30% H₂O₂ und 6 Teilen destilliertem Wasser.

Am folgenden Tag wurden die Gewebeschnitte eine Stunde lang unter fließendem Wasser gewaschen, und anschließend für 3 Stunden in einer Gallocyanin-Chromalaun-Lösung gefärbt. Für die Herstellung der Gallocyanin-Chromalaun-Lösung wurde zunächst 1,5 Gramm Gallocyanin (Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland) in 1000 ml 5% Kaliumchrom(III)-Sulfat-Dodecahydrat (Merck) gelöst und diese Lösung für 10 Minuten gekocht. Anschließend wurde die Lösung gefiltert, das Volumen mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, und der pH-Wert auf 1,8 eingestellt. Nach der Färbung der Gewebeschnitte in der Gallocyanin-Chromalaun-Lösung wurden diese eine Stunde lang gewaschen, anschließend zwischen zwei Filterpapieren und keramischen Trockenplatten getrocknet, und schließlich in 50 % Ethanol überführt.

Zum Aufziehen der gefärbten Gewebeschnitte auf spezielle Objektträger wurden die Gewebeschnitte in einer Petrischale (Durchmesser: 185 mm; Höhe: 40 mm) dehydriert (80% Ethanol für 1 Stunde; 100% Ethanol für 1 Stunde; 100% Ethanol über Nacht; 100% Propanol : Xylol (Verhältnis 1:1) für zwei Stunden; Xylol für 2 Stunden; Xylol über Nacht), und anschließend für eine Minute in Permout (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf Objektträger aufgezogen.

Bestimmung der Dicke der Gewebeschnitte nach der histologischen Aufarbeitung

Durch den histologischen Bearbeitungsprozess kann es zu einer Schrumpfung der Gewebeschnitte entlang der Z-Achse kommen; die gefärbten und auf Objektträger aufgezogenen Gewebeschnitte können also dünner sein als beim Schneiden der Gewebeblöcke eingestellt (Dorph-Petersen et al., 2001; Schmitz und Hof, 2005). Wie bei der Beschreibung der stereologischen Methoden in der Einleitung bereits erwähnt, muss

zur Bestimmung der Gesamtzahl von Zellen in einer ROI (wie auch zur Bestimmung des Volumens der ROI) die Dicke der Gewebeschnitte nach der histologischen Aufarbeitung bekannt sein. Die Dicke der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gewebeschnitte nach der histologischen Aufarbeitung wurde im Labor von Prof. Heinsen mit einem Olympus BH2-Mikroskop (Olympus, Tokio, Japan) bei 200-facher Vergrößerung bestimmt (Heinsen et al., 1994).

Design-based stereologische Untersuchungen zur Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen

Die stereologischen Untersuchungen erfolgten vollständig verblindet, d.h., die Untersucherin (also die Autorin der vorliegenden Arbeit) wusste bis zum vollständigen Abschluss der Arbeiten am Mikroskop nicht, ob gerade Gewebeschnitte aus dem *post mortem* Gehirn eines Patienten mit Schizophrenie oder einer Kontrollperson untersucht wurden. Da die Untersucherin auch die Reihenfolge der zu untersuchenden *post mortem* Gehirne frei wählte, erfolgte keinerlei Einflussnahme durch andere Personen in Bezug auf eine mögliche Entblindung der Untersucherin.

In einem ersten Schritt galt es, die ROI (BA 24 bzw. Schicht V in BA 24) in den untersuchten Gewebeschnitten mikroskopisch abzugrenzen. Die zytoarchitektonischen Kriterien zur Abgrenzung von BA 24 sind in der Literatur gut dokumentiert (Vogt et al., 1995); dennoch ist diese Abgrenzung schwierig und gelingt eindeutig und reproduzierbar erst nach langjähriger Erfahrung mit zytoarchitektonischen Studien zur Grosshirnrinde des Menschen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf bereits vorliegende Abgrenzungen von BA 24 und Schicht V in BA 24 in den Gewebeschnitten der hier untersuchten *post mortem* Gehirne zurückgegriffen, die von Prof. Heinsen zusammen mit einer anderen Untersucherin gemeinsam etabliert worden waren (Vollhardt, 2023). Diese Abgrenzungen lagen in digitaler Form als XML files vor, die mit der Software "Stereo Investigator" der Firma MBF Bioscience generiert worden waren (Sullivan et al., 2022). Die genaue Beschreibung der zytoarchitektonischen Kriterien, die bei der Abgrenzung von BA 24 und Schicht V in BA 24 in den Gewebeschnitten der hier untersuchten *post mortem* Gehirne zur Anwendung kamen, findet sich in Vollhardt (2023).

Die stereologischen Untersuchungen erfolgten mit der in der Einleitung im Detail beschriebenen "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005); dabei kam das folgende, computer-gesteuerte Mikroskop zum Einsatz:

- Zeiss Axio Imager.M2 Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland), ausgestattet mit den folgenden Zeiss Objektiven:
 - EC Plan-Neofluar 1,25 x / 0,03 ∞ / 0,17,
 - EC Plan-Neofluar 2,5 x / 0,085 ∞ / 0,17,
 - Plan-Apochromat 5 x / 0,16 ∞ / 0,16,
 - Plan-Apochromat 10 x / 0,45 ∞ / 0,17,
 - Plan-Apochromat 20 x / 0,8 ∞ / 0,17,
 - Plan-Apochromat 40 x / 0,95 ∞ / 0,13-0,21 und
 - Plan-Neofluar 100 x / 1,3 Öl ∞ / 0,17

(die jeweils erste Zahl (z.B. 1,25 x) gibt die Vergrößerung an; die jeweils zweite Zahl (z.B. 0,03) die numerische Apertur; das Symbol ∞ signalisiert, dass das entsprechende Objektiv unendlich korrigiert war; und die jeweils dritte Zahl (z.B. 0,17) die Dicke des Deckglases in Millimeter),
- Objektträgertisch STG 4" x 3" Stepper MBF (Artikelnummer: 963LM100-I F2-MB; Ludl Electronics Products, Hawthorne, NY, USA) mit Steuereinheit MAC 6000 (Ludl Electronics Products),
- Luminar HR Kamera (2.752 x 2.192 Pixel, Modell Lt665RC-MBF, MBF Bioscience)
- Dell Precision 5820 Tower Computer (Dell GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) mit Intel(R) Xeon(R) W-2123 CPU @ 3.60 GHz, 64 GB RAM, Betriebssystem Windows 10 Pro (64-bit), Monitor Dell P2715Q 27" (Dell GmbH), und
- Stereo Investigator Software 2018.2.2 64-bit (MBF Bioscience).

Die Parameter, die bei den stereologischen Untersuchungen konkret zum Einsatz kamen, sind in den Tabellen 3-11 zusammengefasst. Dabei sind in Tabelle 3 diejenigen Parameter zusammengefasst, die bei allen stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in den linken und rechten Gehirnhälften der *post mortem* Gehirne der Patienten mit Schizophrenie und der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden, und in den Tabellen 4-11 die jeweils speziellen Parameter zur Untersuchung der einzelnen Gehirnhälften.

Abbildung 5 zeigt ein konkretes Beispiel bei der Vorgehensweise der Zählung / Registrierung von Nervenzellen mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten "unbiased virtual counting spaces". Diese Abbildung unterstreicht auch die Validität der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da sie eindeutig zeigt, dass die verwendeten

Gewebeschnitte und das verwendete computer-gesteuerte Mikroskop geeignet waren, Nervenzellen in Brodmann Areal 24 im menschlichen Gehirn mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) zu bestimmen.

Tabelle 3: Parameter, die bei allen stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 im anterioren Gyrus cinguli in den linken und rechten Gehirnhälften der *post mortem* Gehirne der Patienten mit Schizophrenie und der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.

Parameter	Schichten I-VI in BA 24	Schicht V in BA 24
Verwendetes Objektiv	20×	20×
Abstand der UVCS zueinander in X- und Y-Richtung (<i>sln-x</i> und <i>sln-y</i> in Abbildung 3C)	1200 μm	600 μm
Höhe der UVCS (<i>h</i> in Abbildung 3D)	50 μm	50 μm
Abstand der Oberseite der UVCS zur Oberkante der Gewebeschnitte (<i>d</i> in Abbildung 3D)	5 μm	5 μm

Abkürzungen: BA 24: Brodmann Areal 24; UVCS: unbiased virtual counting space.

Tabelle 4: Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in der linken Gehirnhälfte der *post mortem* Gehirne der Patienten mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.

Nr.	ssf ¹	t [µm]	sl _{ucf-x} [µm]	sl _{ucf-y} [µm]	a [µm ²]	asf ¹	tsf ¹	Σ N _c	CE	Σ UVCS	Σ S
S1	6	478,1	42	42	1764	816,3	9,6	438	0,048	442	10
S2	6	481,5	42	42	1764	816,3	9,6	479	0,046	443	11
S3	6	496,2	42	42	1764	816,3	9,9	658	0,039	536	10
S4	6	460,1	42	42	1764	816,3	9,2	545	0,043	519	10
S5	6	473,2	42	42	1764	816,3	9,5	435	0,048	431	11
S6	6	502,9	42	42	1764	816,3	10,1	502	0,045	527	11
S7	6	496,8	42	42	1764	816,3	9,9	437	0,048	414	10
S8	4	508,2	42	42	1764	816,3	10,2	680	0,038	643	18
S9	4	521,8	42	42	1764	816,3	10,4	623	0,040	608	12
S10	6	458,5	42	42	1764	816,3	9,2	549	0,043	472	11
S11	4	543,8	42	42	1764	816,3	10,9	584	0,041	543	14
S12	6	468,1	42	42	1764	816,3	9,4	560	0,042	499	10
Mittelwert	5,5	490,8	42	42	1764,0	816,3	9,8	540,8	0,043	506,4	11,5

Abkürzungen: ssf¹: reziproker Wert der section sampling fraction; t: Schnittdicke nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte; sl_{ucf-x} und sl_{ucf-y}: Seitenlänge der unbiased counting frames in X- und Y-Richtung (vgl. Abbildung 3E); a: Flächeninhalt der unbiased counting frames (vgl. Abbildung 3E); asf¹: reziproker Wert der area sampling fraction; tsf¹: reziproker Wert der thickness sampling fraction; Σ N_c: Summe der gezählten / registrierten Nervenzellen; CE: coefficient of error; Σ UVCS: Summe der unbiased virtual counting frames, die ganz oder teilweise in der abgegrenzten region of interest (ROI) lagen und analysiert wurden; Σ S: Summe der untersuchten Gewebeschnitte.

Tabelle 5: Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in der rechten Gehirnhälfte der *post mortem* Gehirne der Patienten mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.

Nr.	ssf ¹	t [µm]	sl _{ucf-x} [µm]	sl _{ucf-y} [µm]	a [µm ²]	asf ¹	tsf ¹	Σ N _c	CE	Σ UVCS	Σ S
S1	6	469	42	42	1764	816,3	9,4	668	0,039	541	13
S2	6	486,1	42	42	1764	816,3	9,7	816	0,035	860	13
S3	3	485,7	42	42	1764	816,3	9,7	1123	0,030	1318	18
S4	6	481,5	42	42	1764	816,3	9,6	640	0,040	592	10
S5	6	450,7	42	42	1764	816,3	9,0	611	0,040	546	10
S6	6	479,9	42	42	1764	816,3	9,6	536	0,043	418	11
S7	3	483,8	42	42	1764	816,3	9,7	868	0,034	797	18
S8	4	513	42	42	1764	816,3	10,3	719	0,037	640	15
S9	4	526,6	42	42	1764	816,3	10,5	604	0,041	528	14
S10	6	496,1	42	42	1764	816,3	9,9	524	0,044	402	10
S11	4	535,2	42	42	1764	816,3	10,7	632	0,040	477	12
S12	6	478	42	42	1764	816,3	9,6	505	0,044	425	10
Mittelwert	5,0	490,5	42	42	1764,0	816,3	9,8	687,2	0,039	628,7	12,8

Abkürzungen: ssf¹: reziproker Wert der section sampling fraction; t: Schnittdicke nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte; sl_{ucf-x} und sl_{ucf-y}: Seitenlänge der unbiased counting frames in X- und Y-Richtung (vgl. Abbildung 3E); a: Flächeninhalt der unbiased counting frames (vgl. Abbildung 3E); asf¹: reziproker Wert der area sampling fraction; tsf¹: reziproker Wert der thickness sampling fraction; Σ N_c: Summe der gezählten / registrierten Nervenzellen; CE: coefficient of error; Σ UVCS: Summe der unbiased virtual counting frames, die ganz oder teilweise in der abgegrenzten region of interest (ROI) lagen und analysiert wurden; Σ S: Summe der untersuchten Gewebeschnitte.

Tabelle 6: Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in der linken Gehirnhälfte der *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.

Nr.	ssf ¹	t [µm]	sl _{ucf-x} [µm]	sl _{ucf-y} [µm]	a [µm ²]	asf ¹	tsf ¹	Σ N _c	CE	Σ UVCS	Σ S
K1	6	497,4	42	42	1764	816,3	9,9	470	0,046	462,0	11
K2	6	469,7	42	42	1764	816,3	9,4	567	0,042	581	13
K3	4	553,1	42	42	1764	816,3	11,1	837	0,035	814	16
K4	4	546	42	42	1764	816,3	10,9	488	0,045	546	13
K5	3	486,1	30	30	900	1600	9,7	555	0,042	802	22
K6	2	469,6	30	30	900	1600	9,4	706	0,038	1669	31
K7	12	507,9	42	42	1764	816,3	10,2	340	0,054	403	7
K8	4	518	42	42	1764	816,3	10,4	801	0,035	669	19
K9	4	511,9	42	42	1764	816,3	10,2	754	0,036	858	15
K10	6	501,1	42	42	1764	816,3	10,0	683	0,038	664	13
K11	6	493,5	42	42	1764	816,3	9,9	379	0,051	359	12
Mittelwert	5,2	504,9	39,8	39,8	1606,9	958,8	10,1	598,2	0,042	711,5	15,6

Abkürzungen: ssf¹: reziproker Wert der section sampling fraction; t: Schnittdicke nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte; sl_{ucf-x} und sl_{ucf-y}: Seitenlänge der unbiased counting frames in X- und Y-Richtung (vgl. Abbildung 3E); a: Flächeninhalt der unbiased counting frames (vgl. Abbildung 3E); asf¹: reziproker Wert der area sampling fraction; tsf¹: reziproker Wert der thickness sampling fraction; Σ N_c: Summe der gezählten/registrierten Nervenzellen; CE: coefficient of error; Σ UVCS: Summe der unbiased virtual counting frames, die ganz oder teilweise in der abgegrenzten region of interest (ROI) lagen und analysiert wurden; Σ S: Summe der untersuchten Gewebeschnitte.

Tabelle 7: Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI) im anterioren Gyrus cinguli in der rechten Gehirnhälfte der *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.

Nr.	ssf ¹	t [µm]	sl _{ucf-x} [µm]	sl _{ucf-y} [µm]	a [µm ²]	asf ¹	tsf ¹	Σ N _c	CE	Σ UVCS	Σ S
K1	6	493,8	42	42	1764	816,3	9,9	502	0,045	476	10
K2	6	462,1	42	42	1764	816,3	9,2	663	0,039	625	13
K3	4	471,4	42	42	1764	816,3	9,4	663	0,039	624	15
K4	4	544,1	42	42	1764	816,3	10,9	573	0,042	567	15
K5	6	509,5	42	42	1764	816,3	10,2	802	0,035	653	13
K6	8	469,6	42	42	1764	816,3	9,4	331	0,055	418	8
K7	6	520	42	42	1764	816,3	10,4	612	0,040	642	12
K8	4	487,9	42	42	1764	816,3	9,8	861	0,034	743	17
K9	4	515,5	30	30	900	1600,0	10,3	803	0,035	990	16
K10	6	504,7	42	42	1764	816,3	10,1	639	0,040	539	12
K11	6	487,8	42	42	1764	816,3	9,8	457	0,047	577	15
Mittelwert	5,5	496,9	40,9	40,9	1685,5	887,6	9,9	627,8	0,041	623,1	13,3

Abkürzungen: ssf¹: reziproker Wert der section sampling fraction; t: Schnittdicke nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte; sl_{ucf-x} und sl_{ucf-y}: Seitenlänge der unbiased counting frames in X- und Y-Richtung (vgl. Abbildung 3E); a: Flächeninhalt der unbiased counting frames (vgl. Abbildung 3E); asf¹: reziproker Wert der area sampling fraction; tsf¹: reziproker Wert der thickness sampling fraction; Σ N_c: Summe der gezählten/registrierten Nervenzellen; CE: coefficient of error; Σ UVCS: Summe der unbiased virtual counting frames, die ganz oder teilweise in der abgegrenzten region of interest (ROI) lagen und analysiert wurden; Σ S: Summe der untersuchten Gewebeschnitte.

Tabelle 8: Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in der linken Gehirnhälfte der *post mortem* Gehirne der Patienten mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.

Nr.	ssf ¹	t [µm]	sl _{ucf-x} [µm]	sl _{ucf-y} [µm]	a [µm ²]	asf ¹	tsf ¹	Σ N _c	CE	Σ UVCS	Σ S
S1	6	478,1	42	42	1764	204,1	9,6	538	0,043	504	10
S2	6	481,5	42	42	1764	204,1	9,6	531	0,043	496	11
S3	6	496,2	42	42	1764	204,1	9,9	577	0,042	626	10
S4	6	460,1	42	42	1764	204,1	9,2	694	0,038	630	10
S5	6	473,2	42	42	1764	204,1	9,5	538	0,043	491	11
S6	6	502,9	42	42	1764	204,1	10,1	621	0,040	498	11
S7	6	496,8	42	42	1764	204,1	9,9	587	0,041	453	10
S8	4	508,2	42	42	1764	204,1	10,2	851	0,034	728	18
S9	4	521,8	42	42	1764	204,1	10,4	821	0,035	703	12
S10	6	458,5	42	42	1764	204,1	9,2	528	0,044	574	11
S11	4	543,8	42	42	1764	204,1	10,9	510	0,044	620	14
S12	6	468,1	42	42	1764	204,1	9,4	636	0,040	555	10
Mittelwert	5,5	490,8	42,0	42,0	1764,0	204,1	9,8	619,3	0,041	573,2	11,5

Abkürzungen: ssf¹: reziproker Wert der section sampling fraction; t: Schnittdicke nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte; sl_{ucf-x} und sl_{ucf-y}: Seitenlänge der unbiased counting frames in X- und Y-Richtung (vgl. Abbildung 3E); a: Flächeninhalt der unbiased counting frames (vgl. Abbildung 3E); asf¹: reziproker Wert der area sampling fraction; tsf¹: reziproker Wert der thickness sampling fraction; Σ N_c: Summe der gezählten/registrierten Nervenzellen; CE: coefficient of error; Σ UVCS: Summe der unbiased virtual counting frames, die ganz oder teilweise in der abgegrenzten region of interest (ROI) lagen und analysiert wurden; Σ S: Summe der untersuchten Gewebeschnitte.

Tabelle 9: Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in der rechten Gehirnhälfte der *post mortem* Gehirne der Patienten mit Schizophrenie mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.

Nr.	ssf ¹	t [µm]	sl _{ucf-x} [µm]	sl _{ucf-y} [µm]	a [µm ²]	asf ¹	tsf ¹	Σ N _c	CE	Σ UVCS	Σ S
S1	6	469	42	42	1764	204,1	9,4	733	0,037	606	13
S2	6	486,1	42	42	1764	204,1	9,7	895	0,033	849	13
S3	3	485,7	42	42	1764	204,1	9,7	1285	0,028	1287	18
S4	6	481,5	42	42	1764	204,1	9,6	808	0,035	662	10
S5	6	450,7	42	42	1764	204,1	9,0	581	0,041	601	10
S6	6	479,9	42	42	1764	204,1	9,6	487	0,045	450	11
S7	3	483,8	42	42	1764	204,1	9,7	935	0,033	830	17
S8	4	513	42	42	1764	204,1	10,3	982	0,032	698	15
S9	4	526,6	42	42	1764	204,1	10,5	785	0,036	610	14
S10	6	496,1	42	42	1764	204,1	9,9	503	0,045	440	10
S11	4	535,2	42	42	1764	204,1	10,7	639	0,040	520	12
S12	6	478	42	42	1764	204,1	9,6	484	0,045	471	10
Mittelwert	5,0	490,5	42,0	42,0	1764,0	204,1	9,8	759,8	0,038	668,7	12,8

Abkürzungen: ssf¹: reziproker Wert der section sampling fraction; t: Schnittdicke nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte; sl_{ucf-x} und sl_{ucf-y}: Seitenlänge der unbiased counting frames in X- und Y-Richtung (vgl. Abbildung 3E); a: Flächeninhalt der unbiased counting frames (vgl. Abbildung 3E); asf¹: reziproker Wert der area sampling fraction; tsf¹: reziproker Wert der thickness sampling fraction; Σ N_c: Summe der gezählten/registrierten Nervenzellen; CE: coefficient of error; Σ UVCS: Summe der unbiased virtual counting frames, die ganz oder teilweise in der abgegrenzten region of interest (ROI) lagen und analysiert wurden; Σ S: Summe der untersuchten Gewebeschnitte.

Tabelle 10: Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in der linken Gehirnhälfte der *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.

Nr.	ssf ¹	t [µm]	sl _{ucf-x} [µm]	sl _{ucf-y} [µm]	a [µm ²]	asf ¹	tsf ¹	∑ N _c	CE	∑ UVCS	∑ S
K1	6	497,4	42	42	1764	204,1	9,9	467	0,046	535,0	11
K2	6	469,7	42	42	1764	204,1	9,4	694	0,038	668	13
K3	4	553,1	42	42	1764	204,1	11,1	1103	0,030	874	16
K4	4	546	42	42	1764	204,1	10,9	650	0,039	594	13
K5	6	486,1	42	42	1764	204,1	9,7	606	0,041	444	11
K6	4	469,6	42	42	1764	204,1	9,4	1068	0,031	967	16
K7	6	507,9	42	42	1764	204,1	10,2	940	0,033	786	13
K8	4	518	42	42	1764	204,1	10,4	954	0,032	784	19
K9	4	511,9	42	42	1764	204,1	10,2	912	0,033	950	15
K10	6	501,1	42	42	1764	204,1	10,0	797	0,035	698	13
K11	6	493,5	42	42	1764	204,1	9,9	560	0,042	430	12
Mittelwert	5,1	504,9	42,0	42,0	1764,0	204,1	10,1	795,5	0,036	702,7	13,8

Abkürzungen: ssf¹: reziproker Wert der section sampling fraction; t: Schnittdicke nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte; sl_{ucf-x} und sl_{ucf-y}: Seitenlänge der unbiased counting frames in X- und Y-Richtung (vgl. Abbildung 3E); a: Flächeninhalt der unbiased counting frames (vgl. Abbildung 3E); asf¹: reziproker Wert der area sampling fraction; tsf¹: reziproker Wert der thickness sampling fraction; ∑ N_c: Summe der gezählten/registrierten Nervenzellen; CE: coefficient of error; ∑ UVCS: Summe der unbiased virtual counting frames, die ganz oder teilweise in der abgegrenzten region of interest (ROI) lagen und analysiert wurden; ∑ S: Summe der untersuchten Gewebeschnitte.

Tabelle 11: Parameter, die speziell bei den stereologischen Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in der rechten Gehirnhälfte der *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen mit der "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) verwendet wurden.

Nr.	ssf ¹	t [µm]	sl _{ucf-x} [µm]	sl _{ucf-y} [µm]	a [µm ²]	asf ¹	tsf ¹	Σ N _c	CE	Σ UVCS	Σ S
K1	6	493,8	42	42	1764	204,1	9,9	549	0,043	527	10
K2	6	462,1	42	42	1764	204,1	9,2	818	0,035	773	13
K3	4	471,4	42	42	1764	204,1	9,4	793	0,036	667	15
K4	4	544,1	42	42	1764	204,1	10,9	761	0,036	637	15
K5	6	509,5	42	42	1764	204,1	10,2	897	0,033	770	13
K6	4	469,6	42	42	1764	204,1	9,4	1591	0,025	1401	19
K7	6	520	42	42	1764	204,1	10,4	773	0,036	722	12
K8	4	487,9	42	42	1764	204,1	9,8	1120	0,030	794	17
K9	4	515,5	42	42	1764	204,1	10,3	1281	0,028	1147	16
K10	6	504,7	42	42	1764	204,1	10,1	723	0,037	579	12
K11	6	487,8	42	42	1764	204,1	9,8	784	0,036	598	15
Mittelwert	5,1	496,9	42,0	42,0	1764,0	204,1	9,9	917,3	0,034	783,2	14,3

Abkürzungen: ssf¹: reziproker Wert der section sampling fraction; t: Schnittdicke nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte; sl_{ucf-x} und sl_{ucf-y}: Seitenlänge der unbiased counting frames in X- und Y-Richtung (vgl. Abbildung 3E); a: Flächeninhalt der unbiased counting frames (vgl. Abbildung 3E); asf¹: reziproker Wert der area sampling fraction; tsf¹: reziproker Wert der thickness sampling fraction; Σ N_c: Summe der gezählten/registrierten Nervenzellen; CE: coefficient of error; Σ UVCS: Summe der unbiased virtual counting frames, die ganz oder teilweise in der abgegrenzten region of interest (ROI) lagen und analysiert wurden; Σ S: Summe der untersuchten Gewebeschnitte.

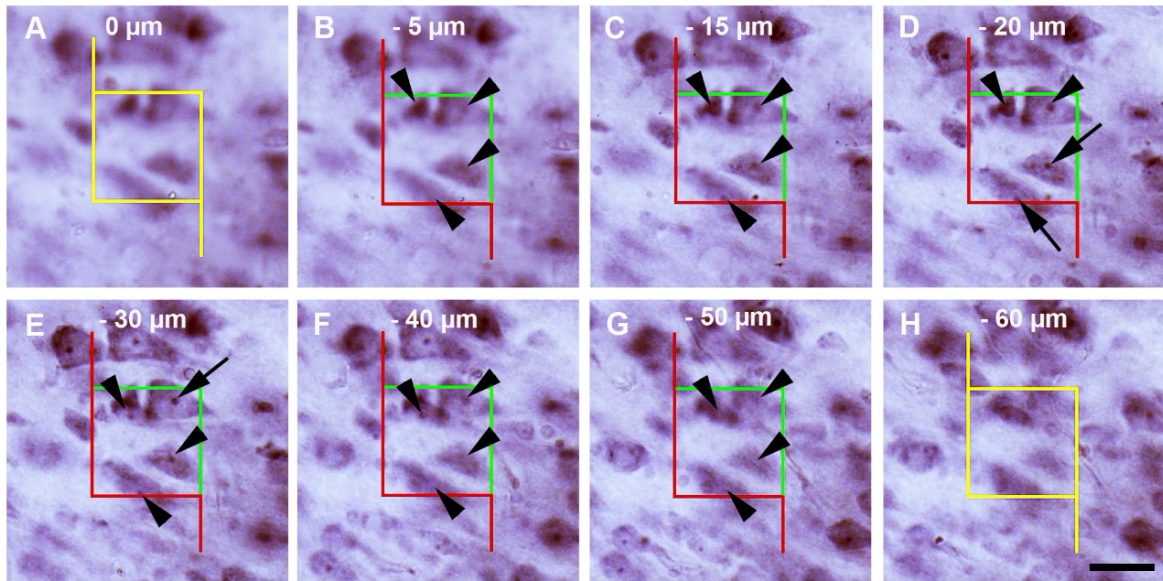


Abbildung 5: Exemplarisches Beispiel für die Zählung / Registrierung von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 in der rechten Gehirnhälfte des *post mortem* Gehirns von Kontrollperson K7 mit "unbiased virtual counting spaces" (UVCS) (Schmitz und Hof, 2005). Der gezeigte UVCS hatte eine Grundfläche ("unbiased counting frame"; UCF) von $1764 \mu\text{m}^2$ ($42 \mu\text{m} \times 42 \mu\text{m}$) und eine Höhe von $50 \mu\text{m}$; die Oberseite des UVCS befand sich $5 \mu\text{m}$ unterhalb der Oberkante des untersuchten Gewebeschnitts, der mit Gallocyanin-Chromalaun gefärbt war. Als Zählkriterium wurde der Nukleolus der Nervenzellen verwendet.

- (A) An der Oberkante des Gewebeschnitts (Fokusebene $0 \mu\text{m}$ relativ zur Oberkante des Gewebeschnitts) ist der UCF gelb markiert, da Nukleoli, die in dieser Fokusebene gefunden worden wären, nicht im UVCS gelegen hätten.
- (B) In der Fokusebene $5 \mu\text{m}$ unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts wurden vier Nervenzellen gefunden (Pfeilspitzen), deren Nukleolus jedoch nicht sichtbar war (d.h. nicht in der untersuchten Fokusebene lag).
- (C) In der Fokusebene $15 \mu\text{m}$ unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts wurden die Nukleoli von drei dieser vier Nervenzellen erstmals sichtbar; sie lagen jedoch noch nicht in der untersuchten Fokusebene.
- (D) In der Fokusebene $20 \mu\text{m}$ unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts lagen die Nukleoli zwei dieser vier Nervenzellen exakt in der untersuchten Fokusebene (Pfeile). Einer dieser Nukleoli lag innerhalb des UCF und wurde gezählt / registriert (rechter Pfeil), während der andere Nukleolus eine der "exclusion lines" (rote Linien) berührte (unterer Pfeil) und deswegen nicht gezählt / registriert wurde.

(E) In der Fokusebene 30 μm unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts lag der Nukleolus einer dieser vier Nervenzellen exakt in der untersuchten Fokusebene (Pfeil). Da dieser Nukleolus innerhalb des UCF lag, wurde er gezählt / registriert.

(F, G) In den Fokusebenen 40 μm (F) und 50 μm (G) unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts wurde kein weiterer Nukleolus gefunden; die Pfeilspitzen zeigen auf dieselben Positionen wie in (B-E).

(H) In der Fokusebene 60 μm unterhalb der Oberkante des Gewebeschnitts ist der UCF wiederum gelb markiert, da Nukleoli, die in dieser Fokusebene gefunden worden wären, nicht im UVCS gelegen hätten.

Die Zahlen in (A-H) geben den Abstand zwischen der Fokusebene und der Oberkante des Gewebeschnitts an. Der Maßstabsbalken in (H) repräsentiert 25 μm in (A-H).

Abbildung 5 wurde der Publikation Gaus et al. (2022) entnommen; die Autorin der vorliegenden Arbeit ist Zweitautorin der Publikation Gaus et al. (2022), in der die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in der peer review Fachliteratur publiziert wurden.

Berechnung von Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in Brodmann Areal 24

Die Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 in den untersuchten Gehirnhälften erfolgte jeweils durch Subtraktion der Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 von der Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-VI in BA 24 derselben Gehirnhälfte.

Berechnung von Gesamtzahlen von Nervenzellen in Schicht V in Brodmann Areal 24, die keine Spindelzellen waren

Die Gesamtzahlen von Nervenzellen in Schicht V in BA 24, die keine Spindelzellen waren, erfolgte unter Zuhilfenahme von Gesamtzahlen von Spindelzellen in Schicht V in BA 24, die durch Vollhardt (2023) stereologisch an denselben Gewebeschnitten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ebenfalls mit der „optical fractionator“ Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) ermittelt worden waren. Konkret wurden die Gesamtzahlen von Spindelzellen in Schicht V in BA 24 von den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Gesamtzahlen von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 abgezogen. Die von Vollhardt (2023) ermittelten Gesamtzahlen von Spindelzellen in Schicht V in BA 24 sind in Tabelle 12 zusammengefasst (um zu verdeutlichen, dass die Erhebung der in Tabelle 12 zusammengefassten Daten nicht Teil

der vorliegenden Arbeit war (sondern durch Vollhardt (2023) erfolgte), ist Tabelle 12 in kursiver Schrift gehalten).

Tabelle 12: *Stereologisch ermittelte Gesamtzahlen von Spindelzellen in Schicht V in Brodmann Areal 24 im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten post mortem Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11). Die Daten wurden von Vollhardt (2023) stereologisch an denselben Gewebeschnitten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ebenfalls mit der „optical fractionator“ Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) ermittelt.*

<i>Nr.</i>	<i>Links</i>	<i>Rechts</i>	<i>Nr.</i>	<i>Links</i>	<i>Rechts</i>
<i>S1</i>	<i>64.371</i>	<i>151.731</i>	<i>K1</i>	<i>128.210</i>	<i>112.112</i>
<i>S2</i>	<i>135.797</i>	<i>66.732</i>	<i>K2</i>	<i>108.670</i>	<i>169.905</i>
<i>S3</i>	<i>75.987</i>	<i>41.382</i>	<i>K3</i>	<i>156.815</i>	<i>87.190</i>
<i>S4</i>	<i>106.754</i>	<i>110.013</i>	<i>K4</i>	<i>126.148</i>	<i>160.879</i>
<i>S5</i>	<i>109.965</i>	<i>253.438</i>	<i>K5</i>	<i>71.635</i>	<i>142.278</i>
<i>S6</i>	<i>98.971</i>	<i>41.519</i>	<i>K6</i>	<i>241.036</i>	<i>135.996</i>
<i>S7</i>	<i>35.233</i>	<i>47.606</i>	<i>K7</i>	<i>209.284</i>	<i>120.557</i>
<i>S8</i>	<i>129.774</i>	<i>142.327</i>	<i>K8</i>	<i>161.284</i>	<i>83.528</i>
<i>S9</i>	<i>55.937</i>	<i>56.114</i>	<i>K9</i>	<i>236.746</i>	<i>153.743</i>
<i>S10</i>	<i>96.835</i>	<i>127.875</i>	<i>K10</i>	<i>163.078</i>	<i>285.862</i>
<i>S11</i>	<i>96.445</i>	<i>85.461</i>	<i>K11</i>	<i>105.175</i>	<i>116.135</i>
<i>S12</i>	<i>88.302</i>	<i>77.895</i>			
<i>Mittelwert</i>	<i>91.198</i>	<i>100.174</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>135.899</i>	<i>135.429</i>
<i>SEM</i>	<i>8.495</i>	<i>17.885</i>	<i>SEM</i>	<i>24.192</i>	<i>20.166</i>

Abkürzungen: S: Patient mit Schizophrenie; K: neurologisch und psychiatrisch unauffällige Kontrollperson; SEM: "standard error of the mean" (Standardfehler des Mittelwerts).

Design-based stereologische Untersuchungen zur Bestimmung von Dichten von Nervenzellen

Die Dichten von Nervenzellen in den untersuchten ROI (Schichten I-III und VI in BA 24 sowie Schicht V in BA 24) wurden als Quotient aus der jeweiligen Gesamtzahl von Nervenzellen in der ROI und dem Volumen der ROI berechnet. Die entsprechenden Daten zu den Volumina der ROI wurden durch Vollhardt (2023) stereologisch an denselben Gewebeschnitten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, mit dem in der Einleitung beschriebenen Cavalieri-Verfahren (Cavalieri, 1635) erhoben und sind in Tabelle 13 zusammengefasst (um zu verdeutlichen, dass die Erhebung der in Tabelle 13 zusammengefassten Daten nicht Teil der vorliegenden Arbeit war (sondern durch Vollhardt (2023) erfolgte), ist Tabelle 13 in kursiver Schrift gehalten).

Tabelle 13: Volumina von Brodmann Areal 24 (Schichten I-VI sowie Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten post mortem Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) sowie der Kontrollpersonen (K1-K11). Die Daten wurden von Vollhardt (2023) stereologisch an denselben Gewebeschnitten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, mit dem in der Einleitung beschriebenen Cavalieri-Verfahren (Cavalieri, 1635) ermittelt.

Nr.	Schichten I-VI [cm ³]		Schicht V [cm ³]			Schichten I-VI [cm ³]		Schicht V [cm ³]	
	Links	Rechts	Links	Rechts		Links	Rechts	Links	Rechts
S1	1,10	2,04	0,46	0,55	K1	1,97	1,99	0,53	0,51
S2	1,84	3,31	0,43	0,82	K2	2,38	2,73	0,63	0,69
S3	2,25	2,73	0,58	0,62	K3	2,42	1,56	0,60	0,38
S4	2,11	2,66	0,60	0,70	K4	1,66	1,77	0,42	0,45
S5	1,75	2,30	0,51	0,61	K5	1,70	2,79	0,90	0,79
S6	2,08	1,64	0,51	0,39	K6	2,20	3,02	0,61	0,83
S7	1,90	1,65	0,46	0,44	K7	2,79	2,85	0,74	0,74
S8	1,92	1,87	0,48	0,49	K8	1,86	2,10	0,51	0,52
S9	1,65	1,57	0,46	0,41	K9	2,23	2,67	0,58	0,72
S10	1,83	1,70	0,53	0,42	K10	3,09	2,23	0,67	0,58
S11	1,64	1,40	0,45	0,38	K11	1,50	2,52	0,41	0,65
S12	2,05	1,73	0,54	0,46					

Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde für alle untersuchten abhängigen Variablen

- mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 in den *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie sowie der Kontrollpersonen,
- mittlere Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 in den *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie sowie der Kontrollpersonen,
- mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 in den *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie sowie der Kontrollpersonen,
- mittlere Dichte von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 in den *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie sowie der Kontrollpersonen, und
- mittlere Anzahl von Nervenzellen in Schicht V in BA 24, die keine Spindelzellen waren, in den *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie sowie der Kontrollpersonen

die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte ("standard error of the mean"; SEM) berechnet und zwar getrennt nach Diagnose (Schizophrenie, Kontrolle) und Hemisphäre (links, rechts).

Die anschließende statistische Analyse erfolgte für jede abhängige Variable separat mittels univariater Kovarianzanalyse, wobei die Diagnose und die Hemisphäre als feste Faktoren und das Alter der Patienten, das *post mortem* Interval und die Fixationszeit als Kovariaten verwendet wurden. Auf die Testung der abhängigen Variablen auf Normalverteilung (z.B. mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test) wurde verzichtet, da es für die univariate Kovarianzanalyse kein nicht-parametrisches Gegenstück gibt.

Zusätzlich wurde eine lineare Regressionsanalyse für die Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 der untersuchten *post mortem* Gehirne in Bezug auf die Fixationszeit durchgeführt.

P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Die Berechnungen der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte sowie die lineare Regressionsanalyse erfolgte mit der Software "GraphPad Prism" für Windows 64 bit (Version 10.0.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA), und die Berechnung der univariaten Kovarianzanalysen mit der Software "IBM SPSS Statistics" für Windows 64 bit (Version 28.0.0.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

Die Abbildungen 6 und 7 wurden ebenfalls mit der Software "GraphPad Prism" für Windows 64 bit (Version 10.0.0; GraphPad Software) erstellt.

Ergebnisse

In den Tabellen 14-18 sind die Ergebnisse der stereologischen Untersuchungen zu Gesamtzahlen von Nervenzellen und Dichten von Nervenzellen in BA 24 in den *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie sowie der Kontrollpersonen wie folgt zusammengefasst (jeweils Einzelwerte, Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte):

- Tabelle 14: Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24,
- Tabelle 15: Gesamtzahlen von Nervenzellen in Schicht V in BA 24,
- Tabelle 16: Gesamtzahlen von Nervenzellen in Schicht V in BA 24, die keine Spindelzellen waren,
- Tabelle 17: Dichten von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24, und
- Tabelle 18: Dichten von Nervenzellen in Schicht V in BA 24.

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der statistischen Analyse dieser Daten zusammengefasst, und die Abbildungen 6 und 7 zeigen die Ergebnisse der stereologischen Untersuchungen grafisch.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

- Bei den Patienten mit Schizophrenie war die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 statistisch signifikant niedriger als bei den Kontrollpersonen (links: -17,2%; rechts: -20,9%; $p = 0,002$) (Abbildung 6B).
- Dieser Befund konnte nicht durch einen isolierten Verlust von Spindelzellen erklärt werden (die im Mittel nur 1,5% der Nervenzellen in Schicht V in BA 24 ausmachten), sondern betraf statistisch signifikant ($p = 0,002$) auch diejenigen Nervenzellen in Schicht V in BA 24, die keine Spindelzellen waren (Abbildung 6C).
- Dagegen wurden für die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI sowie für die Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI bzw. in Schicht V keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen gefunden ($p > 0,05$).
- Die Fixationszeit der untersuchten *post mortem* Gehirne hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI ($p = 0,037$) (Abbildung 7).

Tabelle 14: Stereologisch ermittelte Gesamtzahlen von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-III und VI) im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11).

Nr.	Links	Rechts	Nr.	Links	Rechts
S1	14.214.206	22.270.800	K1	17.212.070	17.643.776
S2	16.331.694	28.201.736	K2	18.105.497	20.754.891
S3	24.972.024	19.073.142	K3	20.272.808	14.307.471
S4	16.743.884	20.659.298	K4	11.606.400	13.600.279
S5	13.929.463	20.562.958	K5	18.685.287	28.835.620
S6	17.082.179	19.474.146	K6	13.030.116	8.103.954
S7	14.125.342	15.029.395	K7	22.140.294	21.330.612
S8	15.507.360	15.863.216	K8	19.028.571	18.512.320
S9	14.235.556	14.022.606	K9	17.584.287	42.203.838
S10	18.729.257	19.353.975	K10	23.746.004	22.655.880
S11	16.211.899	16.506.005	K11	11.553.943	12.471.752
S12	18.387.732	17.980.604		17.212.070	17.643.776
Mittelwert	16.705.883	19.083.157	Mittelwert	17.542.298	20.038.218
SEM	887.173	1.095.713	SEM	1.215.363	2.795.733

Abkürzungen: S: Patient mit Schizophrenie; K: neurologisch und psychiatrisch unauffällige Kontrollperson; SEM: "standard error of the mean" (Standardfehler des Mittelwerts).

Tabelle 15: Stereologisch ermittelte Gesamtzahlen von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11).

Nr.	Links	Rechts	Nr.	Links	Rechts
S1	6.299.211	8.419.029	K1	5.688.632	6.639.091
S2	6.261.465	10.654.518	K2	7.982.983	9.257.089
S3	7.011.610	7.642.341	K3	9.960.315	6.103.187
S4	7.819.822	9.527.804	K4	5.794.286	6.760.165
S5	6.234.651	6.412.817	K5	7.214.121	11.192.363
S6	7.648.185	5.723.542	K6	8.188.291	12.198.100
S7	7.141.753	5.539.016	K7	11.692.065	9.843.918
S8	7.060.869	8.224.751	K8	8.068.114	8.921.600
S9	6.994.250	6.749.078	K9	7.622.087	10.781.314
S10	5.928.686	6.111.142	K10	9.780.654	8.936.280
S11	4.527.967	5.583.556	K11	6.768.000	9.365.760
S12	7.290.896	5.665.763			
Mittelwert	6.684.947	7.187.780	Mittelwert	8.069.050	9.090.806
SEM	259.526	492.339	SEM	548707	587.918

Abkürzungen: S: Patient mit Schizophrenie; K: neurologisch und psychiatrisch unauffällige Kontrollperson; SEM: "standard error of the mean" (Standardfehler des Mittelwerts).

Tabelle 16: Stereologisch ermittelte Gesamtzahlen von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli, die keine Spindelzellen waren, in den untersuchten *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11).

Nr.	Links	Rechts	Nr.	Links	Rechts
S1	6.234.840	8.267.298	K1	5.675.811	6.526.979
S2	6.125.668	10.587.786	K2	7.972.116	9.087.184
S3	6.935.623	7.600.959	K3	9.803.500	6.094.468
S4	7.713.068	9.417.791	K4	5.668.138	6.599.286
S5	6.124.686	6.159.379	K5	7.142.486	11.050.085
S6	7.549.214	5.682.023	K6	7.947.255	12.062.104
S7	7.106.520	5.491.410	K7	11.482.781	9.723.361
S8	6.931.095	8.082.424	K8	7.906.830	8.838.072
S9	6.938.313	6.692.964	K9	7.385.341	10.627.571
S10	5.831.851	5.983.267	K10	9.617.576	8.650.418
S11	4.431.522	5.498.095	K11	6.662.825	9.249.625
S12	7.202.594	5.587.868			
Mittelwert	6.593.750	7.087.605	Mittelwert	7.933.151	8.955.378
SEM	260.717	491.304	SEM	536.848	582.076

Abkürzungen: S: Patient mit Schizophrenie; K: neurologisch und psychiatrisch unauffällige Kontrollperson; SEM: "standard error of the mean" (Standardfehler des Mittelwerts).

Tabelle 17: Stereologisch ermittelte Dichten von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schichten I-III und VI) im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11). Alle Daten sind als 1 / cm³ angegeben.

Nr.	Links	Rechts	Nr.	Links	Rechts
S1	22.209.696	14.946.846	K1	11.952.827	11.921.470
S2	11.582.762	11.325.999	K2	10.345.998	10.173.966
S3	14.953.308	9.039.404	K3	11.138.906	12.124.975
S4	11.088.665	10.540.458	K4	9.360.000	10.303.242
S5	11.233.438	12.167.431	K5	23.356.609	14.417.810
S6	10.880.369	15.579.317	K6	8.195.041	3.700.436
S7	9.809.265	12.420.988	K7	10.800.143	10.109.295
S8	10.769.000	11.495.084	K8	14.095.238	11.716.658
S9	11.962.652	12.088.453	K9	10.657.144	21.642.994
S10	14.407.121	15.120.293	K10	9.812.398	13.730.836
S11	13.623.444	16.182.358	K11	10.599.948	6.669.386
S12	12.177.306	14.157.956			
Mittelwert	12.891.419	12.922.049	Mittelwert	11.846.750	11.501.006
SEM	957.615	645.475	SEM	1.235.901	1.369.401

Abkürzungen: S: Patient mit Schizophrenie; K: neurologisch und psychiatrisch unauffällige Kontrollperson; SEM: "standard error of the mean" (Standardfehler des Mittelwerts).

Tabelle 18: Stereologisch ermittelte Dichten von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 (Schicht V) im anterioren Gyrus cinguli in den untersuchten *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (S1-S12) und der Kontrollpersonen (K1-K11). Alle Daten sind als $1 / \text{cm}^3$ angegeben.

Nr.	Links	Rechts	Nr.	Links	Rechts
S1	13.693.938	15.307.325	K1	10.733.268	13.017.825
S2	14.561.547	12.993.315	K2	12.671.401	13.416.071
S3	12.088.982	12.326.356	K3	16.600.525	16.061.018
S4	13.033.037	13.611.149	K4	13.795.918	15.022.589
S5	12.224.807	10.512.815	K5	8.015.690	14.167.548
S6	14.996.442	14.675.749	K6	13.423.427	14.696.506
S7	15.525.551	12.588.673	K7	15.800.088	13.302.592
S8	14.710.143	16.785.206	K8	15.819.832	17.156.923
S9	15.204.891	16.461.165	K9	13.141.529	14.974.048
S10	11.186.199	14.550.338	K10	14.597.991	15.407.379
S11	10.062.150	14.693.568	K11	16.507.317	14.408.862
S12	13.501.660	12.316.877			
Mittelwert	13.399.112	13.901.878	Mittelwert	13.736.999	14.693.760
SEM	498.203	533.710	SEM	789.464	373.767

Abkürzungen: S: Patient mit Schizophrenie; K: neurologisch und psychiatrisch unauffällige Kontrollperson; SEM: "standard error of the mean" (Standardfehler des Mittelwerts).

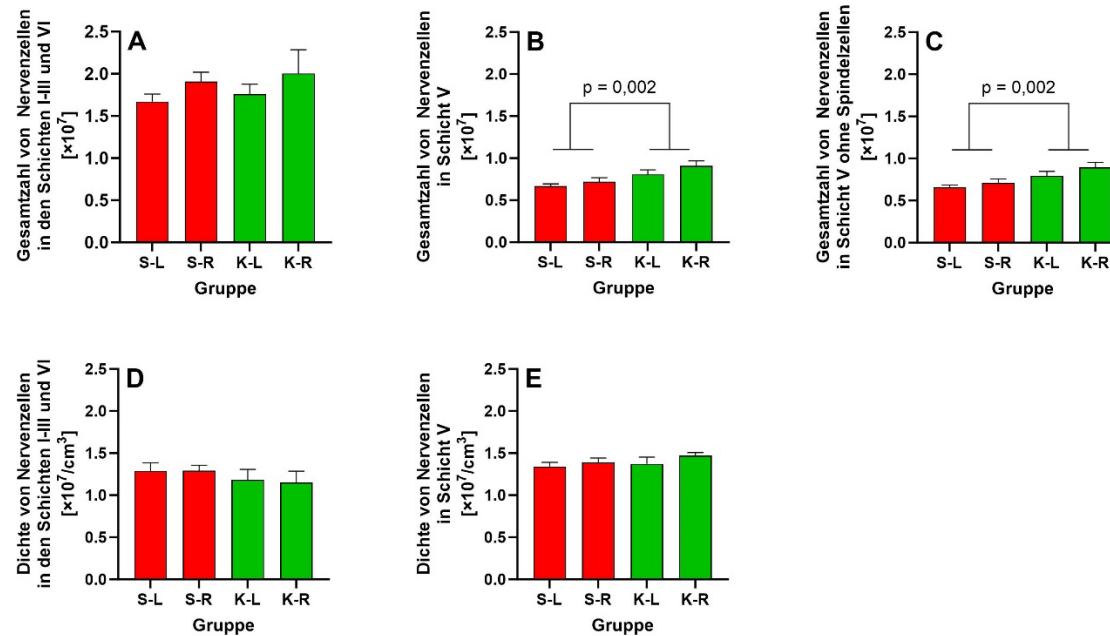
Tabelle 19: Ergebnisse der statistischen Analyse der in den Tabellen 14-18 zusammengefassten Daten mittels univariater Kovarianzanalyse, wobei jeweils die Diagnose und die Hemisphäre als feste Faktoren und das Alter der Patienten, das *post mortem* Intervall und die Fixationszeit als Kovariaten verwendet wurden. P-Werte < 0,05 sind fett gedruckt.

ROI	Schichten I-III und VI		Schicht V		
Variable	N	D	N	D	N (ohne Spindelzellen)
Alter	0,816	0,937	0,446	0,099	0,456
PMI	0,684	0,492	0,059	0,050	0,058
Fixationszeit	0,155	0,037	0,607	0,839	0,649
Diagnose	0,256	0,899	0,002	0,194	0,002
Hemisphäre	0,147	0,880	0,111	0,194	0,110
Diagnose x Hemisphäre	0,971	0,857	0,582	0,683	0,572

Abkürzungen: N: Gesamtzahl von Nervenzellen; D: Dichte von Nervenzellen; PMI *post mortem* Intervall.

Abbildung 6: Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der in der vorliegenden Arbeit stereologisch ermittelten Gesamtzahlen von Nervenzellen (A-C) und Dichten von Nervenzellen (D,E) in den Schichten I-III und VI (A,D) sowie in Schicht V (B,C,E) in Brodmann Areal 24 in den untersuchten *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (rote Balken) sowie der Kontrollpersonen (grüne Balken). Die Ergebnisse der statistischen Analyse dieser Daten mittels univariater Kovarianzanalyse mit $p < 0,05$ sind angegeben.

Abkürzungen: S-L: linke Hemisphären der untersuchten *post mortem* Gehirne der Patienten mit Schizophrenie; S-R: rechte Hemisphären der untersuchten *post mortem* Gehirne der Patienten mit Schizophrenie; K-L: linke Hemisphären der untersuchten *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen; K-R: rechte Hemisphären der untersuchten *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen.



In Bezug auf den statistisch signifikanten Einfluss der Fixationszeit auf die Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 der untersuchten *post mortem* Gehirne ergab die lineare Regressionsanalyse eine negative Korrelation zwischen der Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 und der Fixationszeit ($R^2 = 0,139$; $p = 0,011$; Abbildung 7A), wobei diese negative Korrelation im Wesentlichen von den sehr langen Fixationszeiten der *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen K11 (2289 Tage), K6 (3570 Tage) und K10 (3696 Tage) beeinflusst wurde; alle anderen untersuchten *post mortem* Gehirne hatten eine Fixationszeit zwischen 84 Tagen (*post mortem* Gehirn des Patienten mit Schizophrenie S8) und 498 Tagen (*post mortem* Gehirn der Kontrollperson K3). Ohne Berücksichtigung der Werte der Kontrollpersonen K11, K6 und K10 ergab sich kein statistisch signifikanter Einfluss der Fixationszeit auf die Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 der untersuchten *post mortem* Gehirne ($R^2 < 0,001$; $p = 0,907$; Abbildung 7B).

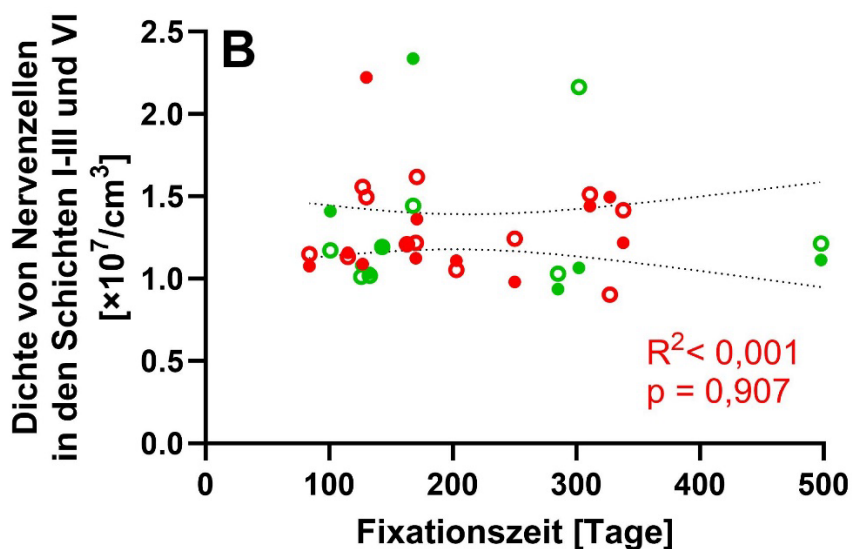
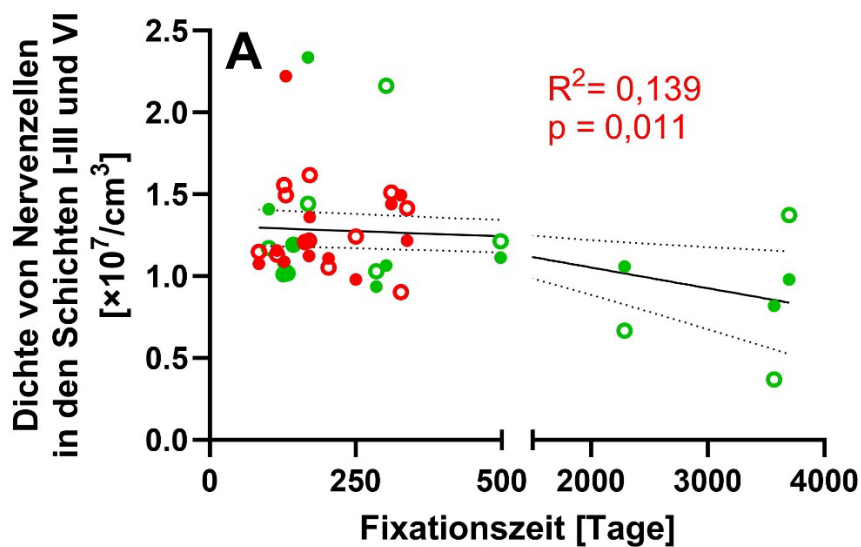
Da die Fixationszeit der untersuchten *post mortem* Gehirne keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 hatte (vgl. die Tabellen 14 und 19), kann davon ausgegangen werden, dass die sehr langen Fixationszeiten der *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen K11, K6 und K10 in erster Linie Einfluss auf das Volumen der entsprechenden *post mortem* Gehirne hatte. Darüber hinaus ist in Abbildung 6D gezeigt, dass die mittlere Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 in den *post mortem* Gehirnen der Kontrollpersonen geringfügig (aber nicht statistisch signifikant) niedriger war als in den *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie. Zusammen mit den Ergebnissen der linearen Regressionsanalyse (Abbildung 7A) kann somit die Hypothese aufgestellt werden, dass sich die mittleren Dichten von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 in den *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie und der Kontrollpersonen noch weniger voneinander unterschieden hätten wie in der vorliegenden Arbeit gefunden (Abbildung 6D), wenn die Fixationszeiten der *post mortem* Gehirne der Kontrollpersonen K11, K6 und K10 im gleichen Bereich (84-498 Tage) gelegen hätten wie die Fixationszeiten aller anderen in der vorliegenden Arbeit untersuchten *post mortem* Gehirne.

Somit schränkt der statistisch signifikante Einfluss der Fixationszeit auf die Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 der untersuchten *post mortem* Gehirne das Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit (statistisch signifikant geringere mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V in BA 24 im Gehirn von Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen; dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mittleren

Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in BA 24 sowie in den mittleren Dichten von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI sowie in Schicht V in BA 24 zwischen dem Gehirn von Patienten mit Schizophrenie und dem Gehirn von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen) nicht ein.

Es sei ausdrücklich darauf verwiesen, dass ein Hauptvorteil der verwendeten "optical fractionator" Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) zur Bestimmung von Gesamtzahlen von Zellen in einer ROI darin besteht, dass die Ergebnisse vollkommen unabhängig sind von möglichen Veränderungen des Volumens der untersuchten ROI durch die histologische Aufarbeitung des untersuchten Gewebes, einschließlich der Fixationzeit (Details in Schmitz und Hof, 2005).

Abbildung 7: Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI in den linken Hemisphären (geschlossene Punkte) und den rechten Hemisphären (offene Punkte) in den untersuchten *post mortem* Gehirnen der Patienten mit Schizophrenie (rote Punkte) sowie der Kontrollpersonen (grüne Punkte) als Funktion der Fixationszeit. Die Analyse erfolgte zunächst mit allen ermittelten Werten (**A**) und anschließend ohne die Werte der Kontrollpersonen K11, K6 und K10 (**B**) (Details sind im Text erläutert). Die jeweiligen Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse (Regressionsgerade mit 95% Konfidenzintervall; Regressionskoeffizient (R^2) und statistische Signikanz des Unterschieds der Steigung der Regressionsgeraden von Null) sind ebenfalls angegeben.



Diskussion

Der wichtigste Befund der vorliegenden Arbeit war eine statistisch signifikant niedrigere mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V – aber nicht in den anderen Schichten I-III und VI - in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie (in der vorliegenden Arbeit nur männliche Patienten) im Vergleich zu neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen, ohne gleichzeitige Änderung der mittleren Dichte von Nervenzellen in Schicht V. Dieser Befund ist für die Konnektivität von BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zu Kontrollpersonen von Bedeutung.

In der Literatur wurden einige Studien zu Gesamtzahlen und Dichten von Nervenzellen im anterioren Gyrus cinguli im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie und neurologisch sowie psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen publiziert (Benes et al., 1986; Benes et al., 1991; Kalus et al., 1997; Öngür et al., 1998; Bouras et al., 2001; Cotter et al., 2001; Chana et al., 2003; Stark et al. 2004; Höistad et al., 2013). Wie im folgenden Text gezeigt und in Tabelle 20 zusammengefasst, wurde jedoch keine dieser Studien der Neuropathologie der Schizophrenie in BA 24 gerecht.

Tabelle 20: Zusammenfassung aller bisher publizierten Studien zu Gesamtzahlen und Dichten von Nervenzellen in Brodmann Areal 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie, sowie die jeweiligen Hauptkriterien, warum diese Studien der Neuropathologie der Schizophrenie in Brodmann Areal 24 nicht gerecht wurden.

Studie	Hauptkriterien, warum die genannte Studie der Neuropathologie der Schizophrenie in Brodmann Areal 24 nicht gerecht wurde
Benes et al. (1986)	<ul style="list-style-type: none"> Keine Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen (nur Dichten von Nervenzellen) Beschreibung von Zelldichten in Schicht IV des Cortex, die es gemäß Vogt et al. (1987; 1995) in Brodmann Areal 24 gar nicht gibt
Benes et al. (1991)	<ul style="list-style-type: none"> Keine Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen (nur Dichten von Nervenzellen)
Kalus et al. (1997)	<ul style="list-style-type: none"> Keine Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen (nur Dichten von Nervenzellen)
Öngür et al. (1998)	<ul style="list-style-type: none"> Bestimmung von kumulierten Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-VI des Cortex, d.h. keine separate Analyse von Schicht V
Bouras et al. (2001)	<ul style="list-style-type: none"> Keine Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen (nur Dichten von Nervenzellen)
Cotter et al. (2001)	<ul style="list-style-type: none"> Keine Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen (nur Dichten von Nervenzellen)
Chana et al. (2003)	<ul style="list-style-type: none"> Keine Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen (nur Dichten von Nervenzellen)
Stark et al. (2004)	<ul style="list-style-type: none"> Bestimmung von kumulierten Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-VI des Cortex, d.h. keine separate Analyse von Schicht V
Höistad et al. (2013)	<ul style="list-style-type: none"> Keine separate Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen in Schicht V (stattdessen Bestimmung von Gesamtzahlen von Nervenzellen in den kombinierten Schichten II-III und V-VI)

- Benes et al. (1986) bestimmten für jede Schicht des Cortex getrennt die Dichte von Nervenzellen im anterioren Gyrus cinguli in einzelnen Gewebeschnitten von *post mortem* Gehirnen von 10 PatientInnen mit Schizophrenie und 10 Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung (Geschlechterverteilung nicht angegeben); die Kriterien zum Zählen / Registrieren von Nervenzellen (vgl. Abbildung 2 bzw. 3E) sind

in der Studie von Benes et al. (1986) nicht beschrieben. Im Vergleich zu den *post mortem* Gehirnen der Kontrollpersonen fanden Benes et al. (1986) in Schicht V des anterioren Gyrus cinguli (jedoch in keiner anderen Schicht) der *post mortem* Gehirne der PatientInnen mit Schizophrenie eine statistisch signifikant niedrigere Dichte von Nervenzellen (PatientInnen mit Schizophrenie: $27,6 \pm 1,8 \times 10^3/\text{mm}^3$; Kontrollpersonen: $36,5 \pm 2,4 \times 10^3/\text{mm}^3$; Student's T-Test; $p = 0,008$).

Diese Werte sind um den Faktor 2,6 (PatientInnen mit Schizophrenie) bzw. 3,2 (Kontrollpersonen) größer als die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Dichten von Nervenzellen in Schicht V in BA 24, was am ehesten auf methodische Unterschiede beim Zählen / Registrieren von Nervenzellen zurückzuführen ist. Benes et al. (1986) beschrieben keine Kriterien zur zytoarchitektonischen Identifizierung der von ihnen untersuchten ROI. Die Tatsache, dass Benes et al. (1986) die höchsten Dichten von Nervenzellen in Schicht IV beschrieben, die es gemäß Vogt et al. (1987; 1995) in BA 24 gar nicht gibt, lässt darauf schließen, dass Benes et al. (1986) im anterioren Gyrus cinguli möglicherweise eine andere Region als BA 24 untersuchten. Darüber hinaus könnte die von Benes et al. (1986) beschriebene geringere Dichte von Nervenzellen in Schicht V im anterioren Gyrus cinguli im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von Kontrollpersonen, die in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden wurde, gemäß Abbildung 2 auf Unterschiede in der Größe, der Form oder der räumlichen Orientierung der Nervenzellen zurückzuführen sein. In jedem Fall erlauben die Daten von Benes et al. (1986) nicht die Beantwortung der Frage, ob in den untersuchten *post mortem* Gehirnen der PatientInnen mit Schizophrenie auch die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in Schicht V im anterioren Gyrus cinguli signifikant niedriger war als in den untersuchten *post mortem* Gehirnen der Kontrollpersonen.

- Benes et al. (1991) bestimmten für jede Schicht des Cortex getrennt die Dichte von Nervenzellen in BA 24 in einzelnen Gewebeschnitten von *post mortem* Gehirnen von 9 PatientInnen mit Schizophrenie ohne affektive Störungen, 9 PatientInnen mit Schizophrenie und affektiven Störungen sowie 12 Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung (Geschlechterverteilung nicht angegeben); die Kriterien zum Zählen / Registrieren von Nervenzellen (vgl. Abbildung 2 bzw. 3E) sind in der Studie von Benes et al. (1991) nicht beschrieben. Im Vergleich zu den *post mortem* Gehirnen der Kontrollpersonen fanden Benes et al. (1991) – mit Ausnahme von Schicht I – in allen Schichten in BA 24 der *post mortem* Gehirne der PatientInnen mit Schizophrenie und affektiven Störungen eine statistisch signifikant niedrigere Dichte von kleinen Nervenzellen, nicht jedoch von Pyramidenzellen (PatientInnen mit

Schizophrenie und affektiven Störungen vs. Kontrollpersonen (alle Daten beziehen sich auf Anzahlen von kleinen Nervenzellen pro mikroskopischem Zählfeld): Schicht II: 61,5 vs. 101,4; Schicht III: 38,6 vs. 56,1; Schicht IV: 49,4 vs. 85,2; Schicht V: 39,6 vs. 71,0; Schicht VI: 41,6 vs. 66,6; alle Daten aus Balkendiagrammen abgelesen).

Diese Daten von Benes et al. (1991) würden eher auf eine generelle Neuropathologie von BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie hindeuten als auf eine isolierte Neuropathologie von Schicht V, wie in der vorliegenden Arbeit gefunden. Darüber hinaus gelten für die Studie von Benes et al. (1991), deren Ergebnisse nicht zur früheren, oben beschriebenen Studie von Benes et al. (1986) passen, alle oben für die Studie von Benes et al. (1986) beschriebenen methodischen Einschränkungen. Lediglich in Bezug auf die mögliche Existenz einer Schicht IV in BA 24 findet sich bei Benes et al. (1991) die folgende Beschreibung, die hier wörtlich wiedergegeben wird: „*Layer IV shows only a rudimentary development, but stellate neurons can be identified*“. Allerdings passt diese Beschreibung nicht zur Bestimmung von Dichten von Pyramidenzellen in Schicht IV in BA 24 in der Studie von Benes et al. (1991) und die erste, grundlegende Studie von Vogt et al. (1985) zur Zytoarchitektur von BA 24 wurde von Benes et al. (1991) nicht zitiert.

- Kalus et al. (1997) bestimmten für die Schichten II-VI jeweils die Dichte von Nervenzellen in BA 24c (eine Untereinheit von BA 24, in der die zytoarchitektonische Abgrenzung der einzelnen Schichten gemäß Vogt et al. (1995) am besten gelingt) in SRS-Serien von Gewebeschnitten von *post mortem* Gehirnen von 5 PatientInnen mit Schizophrenie (2 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 3 *post mortem* Gehirne von männlichen PatientInnen; insgesamt 5 linke Hemisphären) und 5 Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung (2 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 3 *post mortem* Gehirne von männliche Kontrollpersonen; ebenfalls insgesamt 5 linke Hemisphären). Wie in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kalus et al. (1997) „unbiased virtual counting spaces“ (vgl. Abbildung 3D,E), grenzten die ROI jedoch nicht vollständig ab und konnten deswegen keine Gesamtzahlen von Nervenzellen in BA 24c bestimmen. Kalus et al. (1997) fanden außer in Schicht II praktisch keine (und somit auch keine statistisch signifikanten) Unterschiede in der mittleren Dichte von Nervenzellen in den Schichten III-VI im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von Kontrollpersonen (PatientInnen mit Schizophrenie vs. Kontrollpersonen (alle Daten beziehen sich auf Anzahlen von Anschnitten von Nervenzellen pro mm²): Schicht II: 1994 ± 94 vs. 1650 ± 106 (p = 0,041); Schicht III: 1434 ± 78 vs. 1342 ± 63 (p = 0,386); Schicht Va: 1296 ± 102 vs.

1272 ± 116 (p = 0,881); Schicht Vb: 1214 ± 84 vs. 1230 ± 58 (p = 0,879); Schicht VI: 1130 ± 49 vs. 1156 ± 79 (p = 0,787)).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Neuropathologie von Schicht V in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie wurde in der Studie von Kalus et al. (1997) somit nicht gefunden, was am ehesten auf methodische Einschränkungen (Bestimmungen von Dichten statt von Gesamtzahlen von Nervenzellen) zurückzuführen ist. Die von Kalus et al. (1997) zusätzlich berichtete, statistisch signifikant höhere Dichte von Parvalbumin-immunpositiven Nervenzellen in Schicht V in BA 24c im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zu Kontrollpersonen soll an dieser Stelle nur dahingehend kommentiert werden, dass Parvalbumin-immunpositive Nervenzellen Interneurone und keine Pyramidenzellen sind (Lewis et al., 2012) und diese zusätzlichen Daten von Kalus et al. (1997) somit nicht direkt zu den oben beschriebenen Daten von Benes et al. (1991) passen. Darüber hinaus sei angemerkt, dass mittlerweile im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie von einer verringerten Hemmung durch Parvalbumin-haltige, inhibitorische Interneurone ausgegangen wird, um ein vorgelagertes Defizit bei der Erregung von Pyramidenzellen auszugleichen (Lewis et al., 2012). Diese neuere Interpretation steht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit besser im Einklang als mit dem beschriebenen Befund von Kalus et al. (1997), der eher auf eine erhöhte Hemmung durch Parvalbumin-haltige, inhibitorische Interneurone hindeuten würde.

- Öngür et al. (1998) untersuchten die Gesamtzahl und Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-VI im subgenualen Teil von BA 24 in *post mortem* Gehirnen von 11 PatientInnen mit Schizophrenie (4 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 7 *post mortem* Gehirne von männlichen PatientInnen; insgesamt 5 rechte und 6 linke Hemisphären) und 11 Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung (3 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 8 *post mortem* Gehirne von männliche Kontrollpersonen; ebenfalls insgesamt 5 rechte und 6 linke Hemisphären) mit der „optical fractionator“ Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005) und dem in der Einleitung beschriebenen Cavalieri-Verfahren (Cavalieri, 1635) zur Bestimmung des Volumens einer ROI. Als Begründung für die Wahl des subgenualen Teil von BA 24 als ROI verwiesen Öngür et al. (1998) auf eine Studie von Drevets et al. (1997), die mittels Positronen-Emissions-Tomografie (PET) und Magnetresonanz-Tomografie (MRT) im präfrontalen Cortex ventral des Genu corporis callosi im Gehirn von PatientInnen mit familiärer, unipolarer und bipolarer Depression Abnormalitäten im Vergleich zu Kontrollpersonen berichtet hatten (in der Studie von Drevets et al. (1997) waren keine PatientInnen mit

Schizophrenie untersucht worden). Öngür et al. (1998) fanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den PatientInnen mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen in Bezug auf die mittlere Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-VI im subgenualen Teil von BA 24 (PatientInnen mit Schizophrenie: $5,22 \pm 0,57 \times 10^6$; Kontrollpersonen: $5,59 \pm 0,47 \times 10^6$; jeweils Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts; kein P-Wert angegeben) sowie die mittlere Dichte von Nervenzellen in dieser Gehirnregion (PatientInnen mit Schizophrenie: $25,3 \pm 1,4 \times 10^3/\text{mm}^3$; Kontrollpersonen: $25,2 \pm 1,4 \times 10^3/\text{mm}^3$; ebenfalls kein P-Wert angegeben).

Wegen der unterschiedlich gewählten ROIs können die mittleren Gesamtzahlen von Nervenzellen von Öngür et al. (1998) nicht mit den in der vorliegenden Arbeit berichteten mittleren Gesamtzahlen von Nervenzellen verglichen werden. Die von Öngür et al. (1998) angegebenen mittleren Dichten von Nervenzellen waren etwa doppelt so groß wie die in der vorliegenden Arbeit berichteten mittleren Dichten von Nervenzellen, was möglicherweise auf regionale Unterschiede in der Dichte von Nervenzellen in den unterschiedlichen ROIs zurückzuführen ist; es können jedoch auch methodische Unterschiede insbesondere bei der Ermittlung des Volumens der ROI nicht ausgeschlossen werden.

- Bouras et al. (2001) untersuchten die Dichte von Nervenzellen in den Schichten II, III, V und VI in BA 24 sowie dem subgenualen Teil von BA 24 (Areal 24sg) in einzelnen Gewebeschnitten von *post mortem* Gehirnen von 44 PatientInnen mit Schizophrenie (25 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 19 *post mortem* Gehirne von männlichen PatientInnen; jeweils die linke Hemisphäre) und 55 Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung (33 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 22 *post mortem* Gehirne von männlichen Kontrollpersonen; ebenfalls jeweils die linke Hemisphäre) mit „unbiased virtual counting frames“ (vgl. Abbildung 3D,E). Die Abgrenzung der ROI erfolgte nach den Kriterien von Vogt et al. (1995). Bouras et al. (2001) fanden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mittleren Dichte von Nervenzellen in den untersuchten Schichten von BA 24 bzw. BA 24sg zwischen den PatientInnen mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen (alle Daten als $\times 10^3/\text{mm}^3$ angegeben: Schicht II: $54,9 \pm 14,1$ vs. $57,2 \pm 15,5$; Schicht III: $38,1 \pm 7,0$ vs. $38,6 \pm 8,8$; Schicht V: $39,1 \pm 9,7$ vs. $38,7 \pm 9,4$; Schicht VI: $43,0 \pm 8,4$ vs. $42,2 \pm 9,9$; P-Werte nicht angegeben).

Die von Bouras et al. (2001) angegebenen mittleren Dichten von Nervenzellen waren noch größer als die von Öngür et al. (1988) berichteten mittleren Dichten von Nervenzellen, was möglicherweise auf regionale Unterschiede in der Dichte von Nervenzellen in den unterschiedlichen ROIs zurückzuführen ist.

- Cotter et al. (2001) untersuchten die Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-VI im supracallosen Teil von BA 24 (BA 24b) in *post mortem* Gehirnen von 15 PatientInnen mit Schizophrenie (6 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 9 *post mortem* Gehirne von männlichen PatientInnen; insgesamt 6 rechte und 9 linke Hemisphären) und 15 Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung (6 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 9 *post mortem* Gehirne von männlichen Kontrollpersonen; insgesamt 7 rechte und 8 linke Hemisphären) mit „unbiased virtual counting frames“ (vgl. Abbildung 3D,E). Die Abgrenzung der ROI erfolgte nach Kriterien von Vogt (1993). Cotter et al. (2001) fanden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mittleren Dichte von Nervenzellen in den untersuchten Schichten von BA 24b zwischen den PatientInnen mit Schizophrenie und den Kontrollpersonen (PatientInnen mit Schizophrenie vs. Kontrollpersonen (alle Daten entsprechen Medianwerten $\times 10^3$ pro mm^2 ; Mittelwerte und Streumaße wurden von Cotter et al. (2001) nicht angegeben): Schicht I: 53,6 (rechts) bzw. 51,8 (links) vs. 58,3 (rechts) bzw. 53,0 (links); Schicht II: 158,7 (rechts) bzw. 203,3 (links) vs. 184,8 (rechts) bzw. 199,7 (links); Schicht III: 93,1 (rechts) bzw. 92,4 (links) vs. 92,4 (rechts) bzw. 101,1 (links); Schicht Va: 118,7 (rechts) bzw. 123,0 (links) vs. 118,0 (rechts) vs. 117,4 (links); Schicht Vb: 85,8 (rechts) bzw. 84,3 (links) vs. 89,2 (rechts) vs. 85,1 (links); Schicht VI: 62,1 (rechts) bzw. 61,2 (links) vs. 58,7 (rechts) bzw. 62,4 (links); P-Werte nicht angegeben).

Die von Cotter et al. (2001) angegebenen medianen Dichten von Nervenzellen waren noch einmal deutlich größer als die von Öngür et al. (1988) bzw. Bouras et al. (2001) berichteten mittleren Dichten von Nervenzellen, ohne dass dafür eine Erklärung gefunden werden konnte.

- Chana et al. (2003) untersuchten die Dichte von Nervenzellen in den Schichten I-VI in BA 24c in denselben *post mortem* Gehirnen von PatientInnen mit Schizophrenie und Kontrollpersonen, die auch von Cotter et al. (2001) untersucht worden waren. Die Abgrenzung der ROI erfolgte ebenfalls nach den Kriterien von Vogt (1993); die Bestimmung von Dichten von Nervenzellen erfolgte mittels einer zweidimensionalen Zählmethode (vgl. Abbildung 2) und der sogenannten Abercrombie-Korrektur (Abercrombie, 1946). Chana et al. (2003) fanden in BA 24c im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von Kontrollpersonen statistisch signifikant höhere Dichten von Nervenzellen in Schicht V (alle Daten entsprechen mittleren Anzahlen von Nervenzellen pro mm^2 ; Streumaße wurden von Chana et al. (2003) nicht angegeben: Schicht V (274 vs. 245 ($p = 0,028$)) und

Schicht VI (165 vs. 137; $p = 0,017$), nicht jedoch in Schicht I (82 vs. 91; $p = 0,740$), Schicht II (406 vs. 338; $p = 0,620$) und Schicht III (297 vs. 262; $p = 0,017$).

Diese Daten von Chana et al. (2003) sind von der Größenordnung (Angabe in Nervenzellen pro mm^2) nicht mit den anderen hier vorgestellten Daten vergleichbar. Die Abercrombie-Korrektur führt nur dann zu korrekten Ergebnissen, wenn alle Zellen rund sind und dasselbe Volumen aufweisen (vgl. Schmitz und Hof, 2005). Unklar muss bleiben, warum Chana et al. (2003) in den Schichten V und VI in BA 24c im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie statistisch signifikant höhere Dichten von Nervenzellen gefunden haben als im Gehirn von Kontrollpersonen. Diese Daten passen zumindest nicht zu den Daten von Benes et al. (1986, 1991), Kalus et al. (1997), Bouras et al. (2001) und Cotter et al. (2003), auch wenn Chana et al. (2003) isoliert BA 24c untersuchten.

- Stark et al. (2004) untersuchten die Gesamtzahl von Nervenzellen in den Schichten I-VI in BA 24 in *post mortem* Gehirnen von 12 PatientInnen mit Schizophrenie (5 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 7 *post mortem* Gehirne von männlichen PatientInnen; insgesamt 7 rechte und 5 linke Hemisphären) und 14 Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung (7 *post mortem* Gehirne von weiblichen und 7 *post mortem* Gehirne von männlichen Kontrollpersonen; insgesamt 5 rechte und 9 linke Hemisphären) mit der „optical fractionator“ Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005). Die von Stark et al. (2004) ermittelten mittleren Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-VI in BA 24 unterschieden sich nicht statistisch signifikant zwischen den PatientInnen mit Schizophrenie ($13,0 \pm 1,4 \times 10^7$) und den Kontrollpersonen ($13,7 \pm 1,0 \times 10^7$) (P-Wert nicht angegeben; $p = 0,674$ bei Nachrechnen mit dem von Stark et al. (2004) verwendeten Student's T-Test).

Die von Stark et al. (2004) ermittelten Gesamtzahlen von Nervenzellen in BA 24 bezogen sich auf beide Hemisphären (Stark et al., 2004; S. 885, linke Spalte, dritter Absatz: „*Bilateral cell number was estimated as the unilateral number multiplied by two*“). Addiert man die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Gesamtzahlen von Nervenzellen in Schicht V zu den jeweiligen Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-III und VI und anschließend die Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-VI der jeweils linken und rechten Hemisphäre, erhält man die folgenden mittleren Gesamtzahlen von Nervenzellen in BA 24: Patienten mit Schizophrenie: $4,97 \pm 0,18 \times 10^7$; Kontrollpersonen: $5,47 \pm 0,39 \times 10^7$). Somit liegen die von Stark et al. (2004) ermittelten Gesamtzahlen von Nervenzellen in den Schichten I-VI in BA 24 etwa um den Faktor 2,5 höher als die in der vorliegenden Arbeit ermittelten

Gesamtzahlen von Nervenzellen; eine Erklärung für diesen Unterschied kann nicht gegeben werden. Es sei jedoch darauf verwiesen, dass die von Stark et al. (2004) ermittelten mittleren Volumina der Schichten I-VI in BA 24 (PatientInnen mit Schizophrenie: 3,8 cm³; Kontrollpersonen: 4,2 cm³; kein Streumaß angegeben; Werte jeweils auf beide Hemisphären bezogen) sehr gut mit den von Vollhardt (2023) ermittelten Volumina der Schichten I-VI in BA 24 (PatientInnen mit Schizophrenie: 3,89 ± 0,21 cm³; Kontrollpersonen: 4,55 ± 0,22 cm³; vgl. Tabelle 13; Werte ebenfalls jeweils auf beide Hemisphären bezogen) übereinstimmen. Da (i) Vollhardt (2023) dieselben *post mortem* Gehirne untersuchte, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, (ii) die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abgrenzungen von BA 24 von Vollhardt (2023) übernommen wurden und (iii) sich die von Vollhardt (2023) ermittelten Werte auf die ROI beziehen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, kann davon ausgegangen werden, dass von Stark et al. (2004) und in der vorliegenden Arbeit dieselbe ROI untersucht wurde.

- Höistad et al. (2013) untersuchten die Gesamtzahl und Dichte von Nervenzellen in den kombinierten Schichten II-III sowie V-VI in BA 24 in *post mortem* Gehirnen von 13 männlichen Patienten mit Schizophrenie (jeweils die linke Hemisphäre) und 13 männlichen Kontrollpersonen mit vergleichbarer Altersverteilung (ebenfalls jeweils die linke Hemisphäre) mit der „optical fractionator“ Methode (Gundersen et al., 1988; West et al., 1991; Schmitz und Hof, 2005). Bis auf das *post mortem* Gehirn eines Patienten mit Schizophrenie und den *post mortem* Gehirnen von zwei Kontrollpersonen waren die von Höistad et al. (2013) untersuchten *post mortem* Gehirne dieselben *post mortem* Gehirne, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden; die Gewebeschnitte der drei in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Höistad et al. (2013) nicht untersuchten *post mortem* Gehirne waren beim Transport der Schnitte vom Labor von Dr. Patrick R. Hof (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA) nach München leider zerstört worden. Höistad et al. (2013) fanden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der mittleren Gesamtzahl von Nervenzellen im Gehirn von Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von Kontrollpersonen (alle Daten entsprechen mittleren Anzahlen von Nervenzellen x10⁶; Streumaße wurden von Höistad et al. (2013) nicht angegeben; alle Daten wurden aus Abbildungen mit der Angabe von Einzelwerten und Mittelwerten abgelesen: Schichten II-III: 7,59 vs. 7,85; Schichten V-VI: 7,23 vs. 8,18; kombinierte Schichten II-VI: 14,82 vs. 16,03) und auch keine statistisch signifikanten Unterschiede in den mittleren Dichten von Nervenzellen im Gehirn von Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von Kontrollpersonen (alle Daten

entsprechen mittleren Dichten von Nervenzellen $\times 10^3/\text{mm}^3$; Streumaße wurden von Höistad et al. (2013) nicht angegeben; alle Daten wurden aus Abbildungen mit der Angabe von Einzelwerten und Mittelwerten abgelesen: Schichten II-III: 27,2 vs. 25,5; Schichten V-VI: 19,4 vs. 19,5).

Die von Höistad et al. (2013) ermittelten mittleren Gesamtzahlen von Nervenzellen passen gut zu den in der vorliegenden Arbeit berichteten mittleren Gesamtzahlen, auch wenn ein direkter Vergleich nicht möglich ist (Höistad et al. (2013) schlossen Schicht I nicht in ihre Analysen ein). Darüber hinaus waren in Bezug auf die mittlere Dichte von Nervenzellen die von Höistad et al. (2013) für die Schichten V-VI ermittelten Werte (Patienten mit Schizophrenie: $19,4 \times 10^3/\text{mm}^3$; Kontrollpersonen $19,5 \times 10^3/\text{mm}^3$) gut vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit für die Schicht V ermittelten Werte (Patienten mit Schizophrenie: $13,4 \times 10^3/\text{mm}^3$; Kontrollpersonen $13,7 \times 10^3/\text{mm}^3$). Diese Daten unterstreichen die Validität der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die von Höistad et al. (2013) vorgenommene kombinierte Analyse der Schichten V-VI konnte die isolierte Neuropathologie von Schicht V in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie jedoch nicht finden.

Insgesamt zeigt der Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Daten aus der Literatur zu Gesamtzahlen und Dichten von Nervenzellen in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie und Kontrollpersonen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit valide und neu sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind für das Verständnis der geänderten Konnektivität von BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von neurologisch und psychiatrisch unauffälligen Kontrollpersonen von Bedeutung. Schicht V des Cortex wird allgemein als Hauptefferenz des Cortex angesehen, über die der Cortex mit anderen kortikalen und subkortikalen Gehirnregionen in Verbindung steht (Feldmeyer und Sakmann, 2000; Palomero-Gallagher et al., 2015). Dabei besitzt der anteriore Gyrus cinguli nach Vogt (2009) vielfältige Verbindungen mit allen anderen Anteilen des Cortex (frontal, parietal, okzipital und temporal). Bei Rhesusaffen erhält BA 24 Afferenzen aus frontalen Anteilen des Cortex (BA 9 und BA 12) sowie aus temporalen Anteilen des Cortex (Amygdala und posterior parahippocampaler Cortex) (Pandya et al., 1981; Vogt et al., 1987). Umgekehrt steht BA 24 mit den lateralen und basolateralen Kerngebieten der Amygdala in Verbindung (Pandya et al., 1981; Stefanacci & Amaral, 2002; Benes, 2010; Vogt, 2019; Calderazzo et al., 2021). Dies ist deswegen vor dem Hintergrund der Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit von Bedeutung, da Kreczmanski et al. (2007) in denselben *post mortem* Gehirnen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, im lateralen Kern der Amygdala bei den Patienten mit Schizophrenie eine statistisch signifikant niedrigere Gesamtzahl von Nervenzellen als bei den Kontrollpersonen gefunden hatten. Diese niedrigere Gesamtzahl von Nervenzellen im lateralen Kern der Amygdala könnte in einem direkten Zusammenhang mit der niedrigeren Gesamtzahl von Nervenzellen in der „output“ Schicht V in BA 24 im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von Kontrollpersonen stehen, die in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde und damit ein anatomisches Korrelat für die funktionelle Dyskonnektivität im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie (Harrison, 1999) darstellen. Tatsächlich zeigten sowohl der anteriore Gyrus cinguli wie auch die Amygdala in funktionellen MRT-Studien bei PatientInnen mit Schizophrenie Unterschiede in der funktionellen Konnektivität im Vergleich zu Kontrollpersonen (Aleman und Kahn, 2005) und ganz konkret eine verringerte Interaktion zwischen diesen beiden Gehirnregionen (Comte et al., 2018).

Der anteriore Gyrus cinguli ist an emotionalen und kognitiven Prozessen des Gehirns unmittelbar beteiligt (Vogt et al., 1992; Bush et al., 2000; Fornito et al., 2009; Vogt, 2009; Shenhav et al., 2013), wobei ein "ventrales" Vermittlungssystem (mit der Amygdala als wichtige zugehörige Gehirnregion) sowie ein "dorsales" Vermittlungssystem (mit dem anterioren Gyrus cinguli als wichtige zugehörige Gehirnregion) diskutiert werden (Etkin et al., 2006; Comte et al., 2018). In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, dass es bei der Schizophrenie zu Beeinträchtigungen der Kognition (Fioravanti et al., 2012), der sozialen Kognition (Green et al., 2015) sowie der emotionalen Verarbeitung z.B. der Wahrnehmung, dem Erkennen und Ausdrücken von Emotionen (Trémeau, 2006; Kring und Moran, 2008) kommt. Eine beeinträchtigte Konnektivität im kortiko-limbischen System könnte somit unmittelbar mit Defiziten in der emotionalen Verarbeitung (Comte et al., 2018), kognitiven Defiziten allgemein (Wang et al., 2004; Fitzsimmons et al., 2013) und Verhaltensdefiziten (Nath et al., 2021) zusammenhängen.

Basierend auf funktionellen MRT-Studien, die bei PatientInnen mit Schizophrenie u.a. eine verminderte Amygdala-Aktivität als Reaktion auf emotionale Reize gezeigt haben, wurde in der Literatur die Hypothese aufgestellt, dass eine Störung der Amygdala bzw. eine eingeschränkte Konnektivität zwischen der Amygdala und dem präfrontalen Kortex die Grundlage für negative Symptome bei der Schizophrenie sein könnte (Aleman & Kahn, 2005; Das et al., 2007; Mukherjee et al., 2014). Benes (2010) schlug darüber hinaus vor, dass eine Störung des Informationsflusses zwischen dem basolateralen Kern der Amygdala und dem anterioren Gyrus cinguli ursächlich mit der Affektverflachung bei der Schizophrenie zusammenhängt. In Bezug auf den kognitiven Teil des anterioren

Gyrus cinguli fanden Yan et al. (2012) bei einer funktionellen MRT-Studie einen Zusammenhang zwischen falscher Assoziation bzw. der Symptomschwere bei der Schizophrenie sowie der Leistungsfähigkeit im sogenannten Stroop-Test (der Stroop-Test ist ein Experiment, bei dem Probanden Aufgaben ausführen, die die Verarbeitung mentaler Konflikte widerspiegeln (Stroop, 1935)).

Zusammenfassend können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Beitrag dazu leisten, eine anatomische Grundlage für die gestörte Konnektivität im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie zu etablieren, die ihrerseits wiederum Ergebnisse von funktionellen MRT-Studien besser erklärbar machen kann.

Selbstverständlich muss dabei berücksichtigt werden, dass die Dyskonnektivität im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie nicht auf den anterioren Gyrus cinguli und die Amygdala beschränkt ist. In diesem Zusammenhang sei nur der Thalamus als ein weiteres Beispiel genannt, für den bei PatientInnen mit Schizophrenie Abweichungen von der normalen Konnektivität beschrieben wurden, die ihrerseits mit Defiziten im Verhalten und der Kognition assoziiert sind (Mier et al., 2017; Chen et al., 2019; Athanassiou et al., 2022). In diesem Zusammenhang hatte Pakkenberg (1990) im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie im Vergleich zum Gehirn von Kontrollpersonen deutlich niedrigere Gesamtzahlen von Nervenzellen im Nucleus mediodorsalis berichtet (im Mittel -40%); dieser Befund konnte jedoch von Kreczmanski et al. (2007) an den auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten *post mortem* Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie und Kontrollpersonen jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr konnten Kreczmanski et al. (2007) zeigen, dass die Ergebnisse von Pakkenberg (1990) möglicherweise auf methodische Fehler zurückzuführen waren.

Die vorliegende Arbeit weist eine Anzahl von Limitierungen auf:

- Während die Auswirkungen einer Reihe wichtiger Variablen (Alter, *post mortem* Intervall, Fixationszeit) bei der statistischen Analyse der Ergebnisse berücksichtigt wurden, wurden die Ergebnisse nicht an die Exposition gegenüber antipsychotischen Medikamenten angepasst, da die entsprechenden Daten nicht verfügbar waren. Gleiches galt für andere klinische Merkmale wie den Intelligenzquotienten der Patienten mit Schizophrenie und der Kontrollpersonen sowie andere Medikamente.
- Wie die meisten Studien zur Neuropathologie der Schizophrenie weist die vorliegende Arbeit eine relativ kleine Stichprobengröße auf, was zu großen Konfidenzintervallen für die Effektgrößen führt. Darüber hinaus war die Bestimmung von Untergruppen bei den Patienten mit Schizophrenie nicht möglich, da dies zu zu

kleinen Stichprobengrößen geführt hätte (z. B. begingen drei von zwölf Patienten mit Schizophrenie Selbstmord).

- Eine weitere Limitierung besteht darin, dass die vorliegende Arbeit nur Männer umfasste und mögliche Geschlechtsunterschiede bei der Schizophrenie somit nicht berücksichtigte. Tatsächlich wurden Geschlechtsunterschiede für mehrere Variablen bei der Schizophrenie berichtet, darunter Häufigkeit, Erkrankungsalter, Symptome und Gehirnstruktur. Insgesamt weisen Männer jedoch eine höhere Inzidenz auf als Frauen (Männer:Frau-Inzidenz 1,4:1; McGrath et al., 2008). Darüber hinaus treten bei Männern im Vergleich zu Frauen tendenziell frühere und in der Intensität heftigere negative Symptome auf (Abel et al., 2010). Schließlich gibt es Berichte über geschlechtsspezifische Auswirkungen auf die Gehirnentwicklung und wenn auch inkonsistent, über geschlechtsspezifische strukturelle Unterschiede im Gehirn bei Schizophrenie, wobei Männer insgesamt größere strukturelle Anomalien aufweisen als Frauen (Pakkenberg, 1993; Leung et al., 2000; Abel et al., 2010). Eine unterschiedliche Geschlechtsdifferenzierung des Gehirns kann mit geschlechtsspezifischen Anomalien bei Schizophrenie verbunden sein. Aufgrund der vermuteten schützenden Wirkung von Östrogen auf das Gehirn von Frauen sind Frauen möglicherweise besser vor der Entwicklung einer Schizophrenie geschützt als Männer (Leung et al., 2000; Abel et al., 2010). Zukünftige neuropathologische Studien mit größeren Stichprobengrößen, die beide Geschlechter berücksichtigen, werden die Wissenslücke über Geschlechtsunterschiede auf zellulärer Ebene bei der Schizophrenie schließen.
- In der vorliegenden Arbeit wurden keine separaten Unteranalysen der Brodmann Areale 24a, 24b und 24c durchgeführt. Letzteres würde ideale senkrechte Schnitte durch den Gyrus cinguli erfordern, da die zytoarchitektonische Parzellierung auf einer subjektiven Schätzung der Größe, Dichte, Form und relativen laminaren Dicke der kortikalen Schichten neuronaler Zellen basiert und tangentielle Schnitte die Parzellierung zwangsläufig verzerren würden. Ideale senkrechte Schnitte zur pialen Oberfläche des Gehirns sind in seriellen Frontalschnitten ganzer menschlicher Gehirnhemisphären aber nur selten anzutreffen und erschweren eine valide Unterteilung von BA 24 (dies war auch der Grund, warum Höistad et al. (2013) an denselben Gehirnen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ebenfalls BA 24 in seiner Gesamtheit analysierten).
- Schließlich schloss die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit alle Gehirnhälften von *post mortem* Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie und Kontrollpersonen in Form vollständiger Serien von Frontalschnitten vorlagen, die direkte Überprüfung der

Hypothese einer beeinträchtigten Konnektivität zwischen BA 24 und der Amygdala z.B. mit Tract-Tracing Methoden aus (bei Tract-Tracing Studien wird eine Substanz bzw. ein Tracer in eine Gehirnregion injiziert, axonal transportiert und im Zielgebiet nachgewiesen; vgl. z.B. Pandya et al., 1981).

Alle diese Limitierungen schmälern jedoch nicht die Relevanz der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für ein besseres Verständnis der Neuropathologie der Schizophrenie, insbesondere in Bezug auf die Etablierung einer anatomischen Grundlage für die gestörte Konnektivität im Gehirn von PatientInnen mit Schizophrenie.

Literatur

- Abel KM, Drake R, Goldstein JM. Sex differences in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry* 2010;22(5):417-428.
- Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtomic sections. *Anat Review* 1946;94:239.
- Aleman A, Kahn RS. Strange feelings: do amygdala abnormalities dysregulate the emotional brain in schizophrenia? *Prog Neurobiol* 2005;77(5):283-298.
- Allman JM, Watson KK, Tetreault NA, Hakeem AY. Intuition and autism: a possible role for Von Economo neurons. *Trends Cogn Sci* 2005;9(8):367-373.
- Allman JM, Tetreault NA, Hakeem AY, Manaye KF, Semendeferi K, Erwin JM, Park S, Goubert V, Hof PR. The von Economo neurons in frontoinsula and anterior cingulate cortex in great apes and humans. *Brain Struct Funct* 2010;214(5-6):495-517.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4. Edition). Amer Psychiatric Pub Inc, Washington, DC, USA, 1994.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5. Edition). Amer Psychiatric Pub Inc, Washington, DC, USA, 2013.
- Athanassiou M, Dumais A, Tikasz A, Lipp O, Dubreucq JL, Potvin S. Increased cingulo-orbital connectivity is associated with violent behaviours in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2022;147:183-189.
- Baiano M, David A, Versace A, Churchill R, Balestrieri M, Brambilla P. Anterior cingulate volumes in schizophrenia: a systematic review and a meta-analysis of MRI studies. *Schizophr Res* 2007;93(1-3):1-12.
- Bakhshi K, Chance SA. The neuropathology of schizophrenia: A selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture. *Neuroscience* 2015;303:82-102.
- Benes FM. Amygdalocortical circuitry in schizophrenia: from circuits to molecules. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(1):239-257.
- Benes FM, Davidson J, Bird ED. Quantitative cytoarchitectural studies of the cerebral cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 1986;43(1):31-35.
- Benes FM, Bird ED. An analysis of the arrangement of neurons in the cingulate cortex of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 1987;44(7):608-616.
- Benes FM, McSparren J, Bird ED, SanGiovanni JP, Vincent SL. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry* 1991;48(11):996-1001.

- Bleuler, E. *Dementia praecox, oder Gruppe der Schizophrenien*. Franz Deuticke, Leipzig, Deutschland und Wien, Österreich, 1911.
- Bouras C, Kövari E, Hof PR, Riederer BM, Giannakopoulos P. Anterior cingulate cortex pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *Acta Neuropathol* 2001;102(4):373-379.
- Brugger SP, Howes OD. Heterogeneity and homogeneity of regional brain structure in schizophrenia: a meta-analysis. *JAMA Psychiatry* 2017;74(11):1104-1111.
- Brüne M, Schöbel A, Karau R, Faustmann PM, Dermietzel R, Juckel G, Petrasch-Parwez E. Neuroanatomical correlates of suicide in psychosis: the possible role of von Economo neurons. *PLoS One* 2011;6(6):e20936.
- Bush G, Luu P, Posner MI. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci* 2000;4(6):215-222.
- Butti C, Sherwood CC, Hakeem AY, Allman JM, Hof PR. Total number and volume of Von Economo neurons in the cerebral cortex of cetaceans. *J Comp Neurol* 2009;515(2):243-259.
- Butti C, Santos M, Uppal N, Hof PR. Von Economo neurons: clinical and evolutionary perspectives. *Cortex* 2013;49(1):312-326.
- Calderazzo SM, Busch SE, Moore TL, Rosene DL, Medalla M. Distribution and overlap of entorhinal, premotor, and amygdalar connections in the monkey anterior cingulate cortex. *J Comp Neurol* 2021;529(4):885-904.
- Casanova MF, de Zeeuw L, Switala A, Kreczmanski P, Korr H, Ulfing N, Heinsen H, Steinbusch HW, Schmitz C. Mean cell spacing abnormalities in the neocortex of patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 2005;133(1):1-12.
- Casanova MF, Kreczmanski P, Trippe J 2nd, Switala A, Heinsen H, Steinbusch HW, Schmitz C. Neuronal distribution in the neocortex of schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 2008;158(3):267-277.
- Cavalieri B. *Geometria Indivisibilibus Continuorum*. Bononiae: Typis Clementis Ferronij, 1635 (reprinted 1966 as *Geometria Degli Indivisibili*. Torino: Unione Tipografico-Editrice Torinese).
- Chana G, Landau S, Beasley C, Everall IP, Cotter D. 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* 2003;53(12):1086-1098.
- Chen P, Ye E, Jin X, Zhu Y, Wang L. Association between thalamocortical functional connectivity abnormalities and cognitive deficits in schizophrenia. *Sci Rep* 2019;9(1):2952.

- Cloutier M, Aigbogun MS, Guerin A, Nitulescu R, Ramanakumar AV, Kamat SA, DeLucia M, Duffy R, Legacy SN, Henderson C, Francois C, Wu E. The economic burden of schizophrenia in the United States in 2013. *J Clin Psychiatry* 2016;77(6):764-771.
- Cobos I, Seeley WW. Human von Economo neurons express transcription factors associated with Layer V subcerebral projection neurons. *Cereb Cortex* 2015;25(1):213-220.
- Comte M, Zendjidjian XY, Coull JT, Cancel A, Boutet C, Schneider FC, Sage T, Lazerges PE, Jaafari N, Ibrahim EC, Azorin JM, Blin O, Fakra E. Impaired cortico- limbic functional connectivity in schizophrenia patients during emotion processing. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2018;13(4):381-390.
- Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2001;58(6):545-553.
- Das P, Kemp AH, Flynn G, Harris AW, Liddell BJ, Whitford TJ, Peduto A, Gordon E, Williams LM. Functional disconnections in the direct and indirect amygdala pathways for fear processing in schizophrenia. *Schizophr Res* 2007;90(1-3):284-294.
- Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc* 2001;204(Pt 3):232-246.
- Drevets WC, Price JL, Simpson JR Jr, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 1997;386(6627):824-827.
- Ellison-Wright I, Bullmore E. Anatomy of bipolar disorder and schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* 2010;117(1):1-12.
- Etkin A, Egner T, Peraza DM, Kandel ER, Hirsch J. Resolving emotional conflict: a role for the rostral anterior cingulate cortex in modulating activity in the amygdala. *Neuron*. 2006;51(6):871-882.
- Fajardo C, Escobar MI, Buriticá E, Arteaga G, Umbarila J, Casanova MF, Pimienta H. Von Economo neurons are present in the dorsolateral (dysgranular) prefrontal cortex of humans. *Neurosci Lett* 2008;435(3):215-218.
- Feldmeyer D, Sakmann B. Synaptic efficacy and reliability of excitatory connections between the principal neurones of the input (layer 4) and output layer (layer 5) of the neocortex. *J Physiol* 2000;525 Pt 1(Pt 1):31-39.
- Fioravanti M, Bianchi V, Cinti ME. Cognitive deficits in schizophrenia: an updated metanalysis of the scientific evidence. *BMC Psychiatry* 2012;12:64.

- Fitzsimmons J, Kubicki M, Shenton ME. Review of functional and anatomical brain connectivity findings in schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 2013;26(2):172-187.
- Fornito A, Yücel M, Dean B, Wood SJ, Pantelis C. Anatomical abnormalities of the anterior cingulate cortex in schizophrenia: bridging the gap between neuroimaging and neuropathology. *Schizophr Bull* 2009;35(5):973-993.
- Gaus R, Popal M, Heinsen H, Schmitt A, Falkai P, Hof PR, Schmitz C, Vollhardt A. 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* 2022 Nov 9. doi: 10.1007/s00406-022-01513-6. Epub ahead of print.
- Gefen T, Papastefan ST, Rezvanian A, Bigio EH, Weintraub S, Rogalski E, Mesulam MM, Geula C. Von Economo neurons of the anterior cingulate across the lifespan and in Alzheimer's disease. *Cortex* 2018;99:69-77.
- Glaser EM, Wilson PD. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. *J Microsc* 1998;192(Pt 2):163-171.
- González-Acosta CA, Escobar MI, Casanova MF, Pimienta HJ, Buriticá E. Von Economo neurons in the human medial frontopolar cortex. *Front Neuroanat* 2018;12:64.
- Green MF, Horan WP, Lee J. Social cognition in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2015;16(10):620-631.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96(10):857-881.
- Häfner H, Maurer K, Löffler W, Fätkenheuer B, an der Heiden W, Riecher-Rössler A, Behrens S, Gattaz WF. The epidemiology of early schizophrenia. Influence of age and gender on onset and early course. *Br J Psychiatry Suppl* 1994;(23):29-38.
- Häfner H, an der Heiden W. Epidemiology of schizophrenia. *Can J Psychiatry* 1997;42(2):139-151.
- Haijma SV, Van Haren N, Cahn W, Koolschijn PC, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Brain volumes in schizophrenia: a meta-analysis in over 18 000 subjects. *Schizophr Bull* 2013;39(5):1129-1138.
- Hakeem AY, Sherwood CC, Bonar CJ, Butti C, Hof PR, Allman JM. Von Economo neurons in the elephant brain. *Anat Rec* 2009;292(2):242-248.
- Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 1999;122(Pt 4):593-624.

- Harrison PJ, Lewis DA, Kleinman JE. Neuropathology of Schizophrenia. In Weinberger DR, Harrison PJ (Herausgeber): Schizophrenia. Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA, 2011, pp. 372-392.
- Heinsen H, Heinsen, YL. Serial thick, frozen, galloxyanin stained sections of human central nervous system. *J Histotechnol* 1991;14(3):167-173.
- Heinsen H, Henn R, Eisenmenger W, Götz M, Bohl J, Bethke B, Lockemann U, Püschel K. Quantitative investigations on the human entorhinal area: left-right asymmetry and age-related changes. *Anat Embryol* 1994;190(2):181-194.
- Heinsen H, Arzberger T, Schmitz C. 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* 2000;20(1):49-59.
- Hodge RD, Miller JA, Novotny M, Kalmbach BE, Ting JT, Bakken TE, Aevermann BD, Barkan ER, Berkowitz-Cerasano ML, Cobbs C, Diez-Fuertes F, Ding SL, McCarrison J, Schork NJ, Shehata SI, Smith KA, Sunkin SM, Tran DN, Venepally P, Yanny AM, Steemers FJ, Phillips JW, Bernard A, Koch C, Lasken RS, Scheuermann RH, Lein ES. Transcriptomic evidence that von Economo neurons are regionally specialized extratelencephalic-projecting excitatory neurons. *Nat Commun* 2020;11(1):1172.
- Höistad M, Heinsen H, Wicinski B, Schmitz C, Hof PR. Stereological assessment of the dorsal anterior cingulate cortex in schizophrenia: absence of changes in neuronal and glial densities. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013;39(4):348-361.
- Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry* 2005;162(12):2233-2245.
- Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature* 2010;468(7321):187-193.
- Jacot-Descombes S, Keshav N, Brosch CMS, Wicinski B, Warda T, Norcliffe-Kaufmann L, Kaufmann H, Varghese M, Hof PR. Von Economo neuron pathology in familial dysautonomia: quantitative assessment and possible implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 2020;79(10):1072-1083.
- Johnstone EC, Crow TJ, Frith CD, Husband J, Kreel L. Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet* 1976;2(7992):924-926.
- Kalus P, Senitz D, Beckmann H. Altered distribution of parvalbumin-immunoreactive local circuit neurons in the anterior cingulate cortex of schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 1997;75(1):49-59.

- Kim EJ, Sidhu M, Gaus SE, Huang EJ, Hof PR, Miller BL, DeArmond SJ, Seeley WW. Selective frontoinsular von Economo neuron and fork cell loss in early behavioral variant frontotemporal dementia. *Cereb Cortex* 2012;22(2):251-259.
- Kraepelin E. *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Aerzte*, II. Band (6. Edition): J. A. Barth, Leipzig, Deutschland, 1899.
- Kraepelin E. *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Aerzte*, III. Band, II. Teil (8. Edition). J. A. Barth, Leipzig, Deutschland, 1913.
- Kreczmanski P, Schmidt-Kastner R, Heinsen H, Steinbusch HW, Hof PR, Schmitz C. Stereological studies of capillary length density in the frontal cortex of schizophrenics. *Acta Neuropathol.* 2005;109(5):510-518.
- Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, Woltersdorf F, Masson T, Ulfing N, Schmidt-Kastner R, Korr H, Steinbusch HW, Hof PR, Schmitz C. Volume, neuron density and total neuron number in five subcortical regions in schizophrenia. *Brain* 2007;130(Pt 3):678-692.
- Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, Woltersdorf F, Masson T, Ulfing N, Schmidt-Kastner R, Korr H, Steinbusch HW, Hof PR, Schmitz C. Microvessel length density, total length, and length per neuron in five subcortical regions in schizophrenia. *Acta Neuropathol* 2009;117(4):409-421.
- Kring AM, Moran EK. Emotional response deficits in schizophrenia: insights from affective science. *Schizophr Bull* 2008;34(5):819-834.
- Laursen TM, Nordentoft M, Mortensen PB. Excess early mortality in schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol* 2014;10:425-448.
- Leung A, Chue P. Sex differences in schizophrenia, a review of the literature. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 2000;401:3-38.
- Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci* 2012;35(1):57-67.
- Lewis DA, Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 2000;28(2):325-334.
- Love S, Perry A, Ironside J, Budka H. *Greenfield's Neuropathology – Two Volume Set* (9. Edition). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2018.
- McCutcheon RA, Reis Marques T, Howes OD. Schizophrenia – an overview. *JAMA Psychiatry* 2020;77(2):201-210.
- McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 2008;30:67-76.
- Mier D, Eisenacher S, Rausch F, Englisch S, Gerchen MF, Zamoscik V, Meyer-Lindenberg A, Zink M, Kirsch P. Aberrant activity and connectivity of the posterior

- superior temporal sulcus during social cognition in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2017;267(7):597-610.
- Mitelman SA, Shihabuddin L, Brickman AM, Hazlett EA, Buchsbaum MS. Volume of the cingulate and outcome in schizophrenia. *Schizophr Res* 2005;72(2-3):91-108.
- Mukherjee P, Whalley HC, McKirdy JW, Sprengelmeyer R, Young AW, McIntosh AM, Lawrie SM, Hall J. Altered amygdala connectivity within the social brain in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2014;40(1):152-160.
- National Collaborating Centre for Mental Health (UK). Psychosis and schizophrenia in adults: treatment and management: updated edition 2014. National Institute for Health and Care Excellence (UK), London, UK, 2014.
- Nath M, Wong TP, Srivastava LK. Neurodevelopmental insights into circuit dysconnectivity in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2021;104:110047.
- Nimchinsky EA, Vogt BA, Morrison JH, Hof PR. Spindle neurons of the human anterior cingulate cortex. *J Comp Neurol* 1995;355(1):27-37.
- Nimchinsky EA, Gilissen E, Allman JM, Perl DP, Erwin JM, Hof PR. A neuronal morphologic type unique to humans and great apes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(9):5268-5273.
- Noll R. The encyclopedia of schizophrenia and other psychotic disorders (3. Edition). Facts On File Inc, New York, New York, USA, 2009.
- Öngür D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(22):13290-13295.
- Onwordi EC, Half EF, Whitehurst T, Mansur A, Cotel MC, Wells L, Creaney H, Bonsall D, Rogdaki M, Shatalina E, Reis Marques T, Rabiner EA, Gunn RN, Natesan S, Vernon AC, Howes OD. Synaptic density marker SV2A is reduced in schizophrenia patients and unaffected by antipsychotics in rats. *Nat Commun* 2020;11(1):246.
- Pakkenberg B. Pronounced reduction of total neuron number in mediodorsal thalamic nucleus and nucleus accumbens in schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 1990;47(11):1023-1028.
- Pakkenberg B. Total nerve cell number in neocortex in chronic schizophrenics and controls estimated using optical disectors. *Biol Psychiatry* 1993;34(11):768-772.
- Palmer BA, Pankratz VS, Bostwick JM. The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a reexamination. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62(3):247-253.
- Palomero-Gallagher N, Mohlberg H, Zilles K, Vogt B. Cytology and receptor architecture of human anterior cingulate cortex. *J Comp Neurol* 2008;508(6):906-926.

- Pandya DN, Van Hoesen GW, Mesulam MM. Efferent connections of the cingulate gyrus in the rhesus monkey. *Exp Brain Res* 1981;42(3-4):319-330.
- Plum F. Prospects for research on schizophrenia. 3. Neurophysiology. Neuropathological findings. *Neurosci Res Program Bull* 1972;10(4):384-388.
- Raghanti MA, Spurlock LB, Treichler FR, Weigel SE, Stimmelmayer R, Butti C, Thewissen JG, Hof PR. An analysis of von Economo neurons in the cerebral cortex of cetaceans, artiodactyls, and perissodactyls. *Brain Struct Funct* 2015;220(4):2303-2314.
- Roberts RC, Barksdale KA, Roche JK, Lahti AC. Decreased synaptic and mitochondrial density in the postmortem anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Schizophr Res* 2015;168(1-2):543-553.
- Santillo AF, Nilsson C, Englund E. von Economo neurones are selectively targeted in frontotemporal dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013;39(5):572-579.
- Schmitz C. Variation of fractionator estimates and its prediction. *Anat Embryol* 1998;198(5):371-397.
- Schmitz C, Born M, Dolezel P, Rutten BP, de Saint-Georges L, Hof PR, Korr H. Prenatal protracted irradiation at very low dose rate induces severe neuronal loss in rat hippocampus and cerebellum. *Neuroscience* 2005;130(4):935-948.
- Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 2005;130(4):813-831.
- Seeley WW, Carlin DA, Allman JM, Macedo MN, Bush C, Miller BL, Dearmond SJ. Early frontotemporal dementia targets neurons unique to apes and humans. *Ann Neurol* 2006;60(6):660-667.
- Shenhav A, Botvinick MM, Cohen JD. The expected value of control: an integrative theory of anterior cingulate cortex function. *Neuron* 2013;79(2):217-240.
- Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res* 2001;49(1-2):1-52.
- Stark AK, Uylings HB, Sanz-Arigita E, Pakkenberg B. Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2004;161(5):882-888.
- Stefanacci L, Amaral DG. Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol* 2002;451(4):301-323.
- Stroop JR. Studies of interference in serial verbal reactions. *J Exp Psychol* 1935;18:643-662.

- Sullivan AE, Tappan SJ, Angstman PJ, Rodriguez A, Thomas GC, Hoppes DM, Abdul-Karim MA, Heal ML, Glaser JR. A comprehensive, FAIR file format for neuroanatomical structure modeling. *Neuroinformatics* 2022;20(1):221-240.
- Terner JY, Clark G. Galloxyanin-chrome alum: II. Histochemistry and specificity. *Stain Technol* 1960;35:305-311.
- Trémeau F. A review of emotion deficits in schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci* 2006;8(1):59-70.
- Vogt BA. Structural organisation of cingulate cortex: areas, neurons, and somatodendritic transmitter receptors. In: Vogt BA, Gabriel M (Herausgeber): *Neurobiology of the cingulate cortex and limbic thalamus: a comprehensive handbook*. Birkhäuser, Boston, MA, USA, 1993.
- Vogt BA. Regions and subregions of the cingulate cortex. In: Vogt BA. *Cingulate Neurobiology and Disease*. Oxford University Press, London, UK, 2009, pp. 3-30.
- Vogt BA. Cingulate cortex in the three limbic subsystems. *Handb Clin Neurol* 2019;166:39-51.
- Vogt BA, Pandya DN, Rosene DL. Cingulate cortex of the rhesus monkey: I. Cytoarchitecture and thalamic afferents. *J Comp Neurol*. 1987 Aug 8;262(2):256-70. doi: 10.1002/cne.902620207. PMID: 3624554.
- Vogt BA, Finch DM, Olson CR. Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cereb Cortex* 1992;2(6):435-443.
- Vogt BA, Nimchinsky EA, Vogt LJ, Hof PR. Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. *J Comp Neurol* 1995;359(3):490-506.
- Vollhardt A. Stereologische Untersuchung der von Economo Zellen in Schicht V in Brodmann Area 24 im Gehirn von männlichen Patienten mit Schizophrenie. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München (eingereicht 2023).
- von Economo CF. Eine neue Art Spezialzellen des Lobus cinguli und Lobus insulae. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 1926;100(1):706-712.
- Wang F, Sun Z, Cui L, Du X, Wang X, Zhang H, Cong Z, Hong N, Zhang D. Anterior cingulum abnormalities in male patients with schizophrenia determined through diffusion tensor imaging. *Am J Psychiatry* 2004;161(3):573-575.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991;231(4):482-497.
- Wood TL, Kobayashi Y, Frantz G, Varghese S, Christakos S, Tobin AJ. Molecular cloning of mammalian 28,000 Mr vitamin D-dependent calcium binding protein

(calbindin-D28K): expression of calbindin-D28K RNAs in rodent brain and kidney. DNA 1988;7(9):585-593.

World Health Organization. ICD-10 : international statistical classification of diseases and related health problems: tenth revision. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2005.

Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. Am J Psychiatry 2000;157(1):16-25.

Yan H, Tian L, Yan J, Sun W, Liu Q, Zhang YB, Li XM, Zang YF, Zhang D. Functional and anatomical connectivity abnormalities in cognitive division of anterior cingulate cortex in schizophrenia. PLoS One 2012;7(9):e45659

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Professor Schmitz bedanken. Zunächst für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas sowie auch der ständigen Unterstützung und Anleitung während der Forschungszeit zur Fertigstellung meiner Dissertation. Ohne die Expertise basierend auf jahrelanger Erfahrung auf dem Gebiet, wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit adäquat fertig zu stellen.

Ein weiterer großer Dank geht natürlich auch an Herrn Professor Heinsen für die jahrelange Forschung und der Bereitstellung dieser wertvollen Gehirn-Sammlung. Basierend auf seinem Werk, war es nicht nur mir sondern auch anderen Kollegen und Doktoranden im Bereich der Gehirnforschung und Neuropathologie möglich, interessante und wegweisende Erkenntnisse zu sammeln. Ohne Ihren unermüdlichen und über Jahre bestehenden Einsatz wäre es nicht möglich gewesen, neue und interessante Denkansätze zu verfolgen und zu erforschen.

Natürlich gilt auch mein Dank dem Neuroanatomischen Institut der LMU einschließlich aller Mitarbeiter und Doktoranden. Durch die Bereitstellung der Mikroskope, Software und Räumlichkeiten und der guten Zusammenarbeit, war es mir möglich meiner Forschungsarbeit intensiv nachzukommen.

Auch möchte ich meine tiefste Dankbarkeit meiner Familie und meiner guten Freundin Manuela Arztberg aussprechen. Diese Menschen haben mich während meines gesamten Studiums und während meiner Forschungsarbeit begleitet und stets unterstützt, motiviert und an mich geglaubt.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Popal, Melanie

Name, Vorname

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

„Stereologische Untersuchung der Gesamtzahl von Nervenzellen in Brodmann Areal 24
im Gehirn von männlichen Patienten mit Schizophrenie“

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.

Kiel, 25.04.2024

Ort, Datum

Melanie Popal

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand