

Aus der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**T- und B-Lymphozyten
im Frontal- und vorderen Temporalhirn bei Schizophrenie und affektiven
Störungen als Indikatoren neuroinflammatorischer Prozesse**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von	Sophia Büchner
aus	Berlin
Magdeburg	2022

Dokumentationsblatt

Bibliografische Beschreibung

Büchner, Sophia:

„T- und B-Lymphozyten im Frontal- und vorderen Temporalhirn bei Schizophrenie und affektiven Störungen als Indikatoren neuroinflammatorischer Prozesse“ - 2022. - 73 Bl., 15 Tab., 10 Abb.; Anhang: 3 Tab.

Kurzreferat

Immunologische Ursachen für psychiatrische Erkrankungen geraten zunehmend in den Fokus der aktuellen Forschung. Entsprechend konnten proinflammatorische Zellen und Botenstoffe im Hirnparenchym aber auch im peripheren Blut und Liquor von Schizophrenen und Patienten mit affektiven Störungen nachgewiesen werden. Ähnlich anderer neuroimmunologischer Erkrankungen scheint dabei die Permeabilität der Bluthirnschranke für immunreaktive Zellen relevant zu sein. In der vorliegenden Post-mortem-Studie wurden koronare Ganzhirnschnitte des Frontal- und vorderen Temporalhirns von 20 Schizophrenen (paranoid und residual), 19 Depressiven (unipolar und bipolar), sowie 19 psychisch gesunden Kontrollfällen untersucht. Nach immunhistochemischer Einfärbung der Hirnschnitte wurden diese auf Vorhandensein von T- und B-Lymphozyten, als Hinweis auf neuroinflammatorische Prozesse, überprüft. Es kamen zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung: ein semiquantitativer Ansatz, bei der eine manuelle mikroskopische Durchsicht aller Hirnschnitte mit anschließender Einordnung in mengenmäßige Kategorien erfolgte, und ein quantitatives Verfahren, mit automatisierter Registrierung von Zellzahlen mittels Bildanalyseprogramm. Beide Methoden zeigten signifikante oder nahezu signifikante Erhöhungen von CD20-positiven (B-) Zellen bei Depressiven im Vergleich zu Gesunden im orbitalen und hochfrontalen Kortex, sowie im temporalen Marklager. Auch nach Analyse des Einflusses möglicher konfundierender Variablen wie Fixationszeit, Krankheitsdauer und Suizid durch Strangulation deuten die Ergebnisse auf einen immunologischen Faktor, als neuroinflammatorische Teilursache, von affektiven Erkrankungen bei gestörter Bluthirnschranke hin.

Schlüsselwörter

Schizophrenie; Depression; B-Zelle; T-Zelle; Lymphozyten; Neuroinflammation

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Vorstellung der untersuchten psychiatrischen Krankheiten	1
1.1.1 Schizophrenie.....	1
1.1.2 Affektive Störungen	2
1.2 Psychoneuroimmunologische Befunde bei schizophrenen und affektiven Störungen	3
1.3 Immunologische Bedeutung der T- und B-Lymphozyten.....	4
1.4 Gegenstand der vorliegenden Arbeit.....	6
2 Material und Methode	7
2.1 Material.....	7
2.1.1 Merkmale der untersuchten Gruppen	7
2.2 Methode.....	9
2.2.1 Aufbereitung des Hirngewebes.....	9
2.2.2 Immunhistochemie	9
2.2.3 Semiquantitative Bewertung immunreaktiver Zellen	11
2.2.3.1 Statistische Datenanalyse der semiquantitativen Methode.....	15
2.2.4 Quantitative Bewertung immunreaktiver Zellen.....	15
2.2.4.1 Gewebsschrumpfung	15
2.2.4.2 Mikroskopische Aufnahmen	16
2.2.4.3 Bildbearbeitung und Zellzählung	19
2.2.4.4 Farbcodierung.....	19
2.2.4.5 Statistische Datenanalyse der quantitativen Methode	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Semiquantitative Auswertung.....	21
3.1.1 Interraterreliabilität.....	21
3.1.2 Unterschiede in den Hauptgruppen der semiquantitativen Methode	22

3.1.3	Unterschiede in den diagnostischen Untergruppen der semiquantitativen Methode	26
3.1.4	Auswirkungen konfundierender Variablen	30
3.2	Quantitative Auswertung	34
3.2.1	Validierung der automatisierten Zellzählung	34
3.2.2	Unterschiede in den Hauptgruppen der quantitativen Methode.....	35
3.2.3	Unterschiede in den diagnostischen Untergruppen der quantitativen Methode	37
3.2.4	Auswirkungen konfundierender Variablen	40
3.3	Vergleich der Ergebnisse der semiquantitativen und quantitativen Methode.....	41
3.4	Visualisierung der regionalen Verteilungsmuster	43
4	Diskussion.....	46
4.1	Interpretation der Ergebnisse	46
4.2	Einordnung in den derzeitigen Literaturstand	48
4.3	Limitationen	49
4.4	Stärken	50
5	Zusammenfassung	51
	Literaturverzeichnis.....	52
	Danksagung	57
	Ehrenerklärung	58
	Bildungsweg	59
	Anhang	60

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Amm. NiSO₄	Ammoniumnickelsulfat
APCC	anteriorer Pol des Corpus Callosum
Aqua dest.	Aqua destillata
bip	bipolar
CD[...]	Cluster of differentiation (immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen) [...]
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease / Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	Capsel-reaktives Protein / C-reaktives Protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DE GS1	Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland, Welle 1
Dep	Depression
d.h.	das heißt
DLFC	dorsolateraler frontaler Kortex
DSM-IV-TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders / Diagnostische und statistisches Manual psychischer Störungen, 4. Version, Textrevision
FDR	False discovery rate / Falscherkennungsrate
g	Gramm
Ges	Gesund
h	Stunde
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRS	Horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule / Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1

ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems / Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Version
IFN-γ	Interferon-gamma
IFG	inferiorer frontaler Gyrus
IL-[...]	Interleukin-[...]
kg	Kilogramm
li	links
m	Meter
M	Mittelwert
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein / Monozyten-chemotaktisches Protein-1
Md	Median
MHC	Major histocompatibility complex / Haupthistokompatibilitätskomplex
μm	Mikrometer
n	Größe der Stichprobe
n.a.	nicht anwendbar
NK	Natürliche Killerzelle
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
p	Probability-value / Signifikanzwert
para	paranoid
PBS	Phosphate-buffered saline / Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion
periph	peripher
perivask	perivaskulär
PHQ-9	Patient Health Questionnaire / Gesundheitsfragebogen für Patienten-9
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
px	Pixel

re	rechts
resid	residual
RGB	Farbmodell (Rot Grün Blau)
r_s	Spearman-Korrelationskoeffizient
q	quantitativ
sq	semiquantitativ
Std.	Stunden
Sz	Schizophrenie
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
uni	unipolar
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule / Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VF	Volumenschrumpfungsfaktor
WHO	World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Demografische Daten.....	8
Tabelle 2:	Technische Daten.....	18
Tabelle 3:	Ratings und p-Werte der diagnostischen Hauptgruppen für T-Zellen in der semiquantitativen Methode	23
Tabelle 4:	Ratings und p-Werte der diagnostischen Hauptgruppen für B-Zellen in der semiquantitativen Methode.....	24
Tabelle 5:	Signifikante Differenzen zwischen Gesunden und allen affektiv Erkrankten für T- und B-Zellen in der semiquantitativen Methode.....	25
Tabelle 6:	Ratings und p-Werte der diagnostischen Untergruppen für T-Zellen in der semiquantitativen Methode	27
Tabelle 7:	Ratings und p-Werte der diagnostischen Untergruppen für B-Zellen in der semiquantitativen Methode	28
Tabelle 8:	Signifikante Differenzen zwischen Gesunden und affektiven Untergruppen für T- und B-Zellen in der semiquantitativen Methode....	30
Tabelle 9:	Ratings und p-Werte bezüglich Strangulation für T-Zellen in der semiquantitativen Methode.....	31
Tabelle 10:	Ratings und p-Werte bezüglich Strangulation für B-Zellen in der semiquantitativen Methode.....	32
Tabelle 11:	Mediane und p-Werte der diagnostischen Hauptgruppen für T- und B-Zellen in der quantitativen Methode.....	36
Tabelle 12:	Signifikante Differenzen zwischen Gesunden und allen affektiv Erkrankten für T- und B-Zellen in der quantitativen Methode.....	37
Tabelle 13:	Mediane und p-Werte der diagnostischen Untergruppen für T- und B-Zellen in der quantitativen Methode.....	39
Tabelle 14:	Signifikante Differenzen zwischen Gesunden und affektiven Untergruppen für T- und B-Zellen in der quantitativen Methode.....	40
Tabelle 15:	Vergleich beider Methoden.....	43
Im Anhang:		
Tabelle A.1:	Spearman-Korrelationen konfundierender Variablen mit T-Zell- Erhöhungen in der semiquantitativen Methode.....	60
Tabelle A.2:	Spearman-Korrelationen konfundierender Variablen mit B-Zell- Erhöhungen in der semiquantitativen Methode.....	62
Tabelle A.3:	Spearman-Korrelationen konfundierender Variablen mit T- und B-Zell-Erhöhungen in der quantitativen Methode.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersicht untersuchter Hirnregionen.....	12
Abbildung 2:	Beispiele perivaskulärer Effekte.....	13
Abbildung 3:	Beispiele semiquantitativer Ratings.....	14
Abbildung 4:	Schematische Platzierung von Zählfeldern.	17
Abbildung 5:	Interraterkorrelation.....	21
Abbildung 6:	Hirngewichte Strangulierter, Nichtstrangulierter und Gesunder.....	33
Abbildung 7:	Validierung der automatisierten Zellzählung.	34
Abbildung 8:	Spearman-Korrelationen zwischen semiquantitativer und quantitativer Zellerfassung	41
Abbildung 9:	Visualisierung regionaler Verteilungsmuster CD3-positiver Zellen	44
Abbildung 10:	Visualisierung regionaler Verteilungsmuster CD20-positiver Zellen.	45

1 Einleitung

1.1 Vorstellung der untersuchten psychiatrischen Krankheiten

1.1.1 Schizophrenie

Nach Bleuler, der den Begriff Schizophrenie prägte, kennzeichnet die Störung, die zumeist in später Adoleszenz oder frühem Erwachsenenalter auftritt, insbesondere Halluzinationen und Wahnsymptomatik sowie Störungen des Denkens und der Affektivität (1, 2). Für die Betroffenen ergeben sich nicht nur starke Einschränkungen in der Lebensqualität, sondern auch eine signifikant verminderte Lebenserwartung (3). Die Schizophrenie wird dementsprechend zu den Krankheitsbildern gezählt, die am häufigsten zu einer Behinderung beitragen (2). Es finden sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Verteilung schizophrener Erkrankungen, wobei Symptome bei männlichen Patienten tendenziell lebensbiografisch früher auftreten und einen schwereren Verlauf nehmen als bei weiblichen Betroffenen (4).

Ätiopathogenetisch wird von verschiedenen Faktoren ausgegangen, deren Zusammenkommen zur Entstehung von Schizophrenie beitragen. Hierbei spielen eine genetische Disposition sowie exogene Faktoren (z.B. perinatale Komplikationen oder Stress) eine entscheidende Rolle. Die dadurch zum Teil schon vorgeburtlich angelegten genetisch mit determinierten hirnbioologischen Korrelate können durch epigenetische Prozesse dabei zu einer erhöhten Vulnerabilität für diese Krankheit führen (4). In diesem Sinne konnten morphologische Besonderheiten, wie Verlust von Hirngewebe im Bereich des limbischen Systems wie Hippocampus und Gyrus Cinguli, mit Hilfe von Post-mortem-Untersuchungen mikroskopisch und mit Hilfe der strukturellen Magnetresonanztomografie aufgezeigt werden. Ein vermindertes hippocampales Volumen wurde hierbei vor Symptombeginn festgestellt und kann somit als prädisponierender Faktor der Erkrankung bezeichnet werden (5). Durch Reduktion sowie pathohistologische Veränderungen der für die Markscheidenbildung wichtigen Oligodendrozyten bei Schizophrenen im präfrontalen Kortex, kommt es außerdem zu einer gestörten interregionalen Signalübertragung innerhalb des Gehirns (6). Eine kortikale Volumenreduktion im dorsolateralen präfrontalen Kortex zeigt zudem einen progressiven Krankheitsverlauf mit zunehmender Schwere der Symptomatik bei fortschreitender Krankheitsdauer, was auf neuroinflammatorische Prozesse hindeutet (7).

Auch die Aktivierung von immunkompetenten Mikrogliazellen, die insbesondere postmortal in den Gehirnen von schizophren oder bipolar Erkrankten nach Suizid gefunden wurden, weist auf eine entzündliche Genese, insbesondere bei akut Erkrankten, hin (8).

Die Lebenszeitprävalenz von Schizophrenie liegt zwischen 0,5 und 1,6 %, aber höher bei familiärer Belastung (beispielsweise 5 – 10 % bei einem erkrankten Elternteil) (4). Die Relevanz weiterführender Forschung ergibt sich durch die Schwere der Krankheitslast der Betroffenen und der damit verbundenen Notwendigkeit neuer therapeutischer Möglichkeiten.

1.1.2 Affektive Störungen

Als Oberbegriff umfassen affektive Störungen laut ICD-10 manische und depressive Episoden sowie bipolar affektive Störungen, die mit einer pathologischen Veränderung des Erlebens und der Verarbeitung von Emotionen der Betroffenen einhergehen (9). Für die vorliegende Studie wurden die unipolare Depression sowie die bipolar-affektive Störung untersucht.

In der bevölkerungsrepräsentativen Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) konnten depressive Symptome bei 8,1 % der Befragten mit Hilfe des „Patient Health Questionnaire“ (PHQ-9) festgestellt werden (Lebenszeitprävalenz 11,6 %) (10).

Entsprechend der WHO Global Burden of Disease Study, stellen affektive Störungen eine der Hauptursachen für krankheitsbedingte Behinderung dar und sind zudem eine größere weltweite Krankheitslast als Verkehrsunfälle, COPD und frühgeburtliche Komplikationen (11). Die unipolar depressiven Erkrankungen nehmen unter den affektiven Beeinträchtigungen die bedeutendste Rolle ein, da sie mit einer Lebenszeitprävalenz von 10 – 15 % auftreten (12).

Laut ICD-10 äußern sich depressive Episoden insbesondere durch eine gedrückte Stimmungslage, Interessenlosigkeit sowie schneller Ermüdbarkeit und Mangel an Antrieb. Die Betroffenen leiden zudem gehäuft unter Appetitlosigkeit, sowie Ein- und Durchschlafstörungen. Ein gemindertes Selbstwertgefühl kann Gefühle von Wertlosigkeit und Schuld, bezogen auf die eigene Person, nach sich ziehen. Es können sich auch unspezifische körperliche Symptome wie Verlust von Gewicht und Libido einstellen, wodurch eine frühe Diagnosestellung hinausgezögert werden kann (9). Die Relevanz einer rechtzeitigen Diagnose ergibt sich in Hinblick darauf, dass die meisten Suizide bei Patienten mit Depressionen auftreten. Entsprechend zeigt sich bei bipolar erkrankten Patienten mindestens ein Suizidversuch während der Krankheitsphase bei bis zur Hälfte der Erkrankten (13).

Bipolar-affektive Störungen zeichnen sich entsprechend des ICD-10 durch instabile Gemütslagen oder Affekte aus, die sowohl eine Veränderung zur Depression als auch zur gehobenen Stimmung (hypomanisch, manisch) aufzeigen. Manische Episoden sind gekennzeichnet durch einer der Situation unangepassten gehobenen Stimmung, die unter anderem mit vermehrtem Rededrang, gesteigerter Aktivität und herabgesetztem Schlafbedürfnis gekennzeichnet sind (9).

Die Therapie affektiver Störungen gestaltet sich oft problematisch, da 30 – 50 % der Patienten auf konventionelle Antidepressiva nicht ansprechen (14). Insbesondere auch in Hinblick auf die Chronifizierungsraten von 15 – 20 % (15) erklärt sich die Bedeutung weiterer Studien bezüglich Krankheitsentstehung und der damit verbundenen Möglichkeit neuerer Behandlungsmethoden.

1.2 Psychoneuroimmunologische Befunde bei schizophrenen und affektiven Störungen

Entscheidend für die Genese neuroinflammatorischer Prozesse scheint ein Sensibilisierungsprozess zu sein, der durch erstmaliges Stimulieren bei Stress in Gang gesetzt wird (16). Schwächere Stimuli sind danach in der Lage eine überschießende Immunreaktion hervorzurufen (17), was Auswirkungen auf den Krankheitsprozess im ZNS haben kann (7). Entsprechend konnten proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukine (IL-2, IL-6 oder IL-10) im peripheren Blut und Liquor Schizophrener nachgewiesen werden (18), wofür verschiedene Auslöser diskutiert werden.

Bei Schwangeren, die eine Infektion erleiden, zeigte sich eine Häufung von Nachkommen, welche später an Schizophrenie erkranken, wobei dabei insbesondere erhöhte IL-8-Spiegel verantwortlich sein sollen. Eigene durchgemachte Infektionen sind ebenfalls mit einem gesteigerten Risiko für Schizophrenie verbunden (19). Dementsprechend zeigten sich psychotische Symptome bei Patienten nach durchgemachter Herpes-Simplex Infektion Typ 1 (20). Darüber hinaus scheint es auch Assoziationen dieser psychiatrischen Störung mit Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses (21) sowie Parallelen im Verlauf zur Multiplen Sklerose, einer chronisch inflammatorischen Erkrankung, die akute sowie chronische Symptome aufweist, zu geben, was entzündliche Prozesse auch für schizophrene Erkrankungen vermuten lassen (22).

Ein weiterer immunologischer Erklärungsansatz befasst sich mit dem Mangel an glutamaterger Übertragung, der durch Antagonismus am NMDA-Rezeptor hervorgerufen wird. Die Blockade des NMDA-Rezeptors wird dabei von Kynureninsäure verursacht, welche im humanen ZNS aus dem Stoffwechsel der Aminosäure L-Tryptophan hervorgeht und vermehrt durch Typ-2 Immunreaktionen gebildet wird. Höhere Spiegel von Kynureninsäure sind entsprechend mit psychotischer Symptomatik assoziiert worden (23).

Ein potenzielles Therapietarget stellen die Mikrogliazellen, zur Gruppe der Immuneffektorzellen gehörend, dar, welche eine zentrale Rolle im intrinsischen Immunsystem des ZNS spielen und durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine als Antwort auf eine systemische Entzündung reagieren (24). Mit dem antibiotisch wirksamen Minocyclin, welches

gleichsam die Aktivität von Mikroglia hemmt, konnten demgemäß Behandlungserfolge schizophrener Symptomatik erzielt werden (25). Ebenso zeigen erste erfolgreiche Therapieansätze mit entzündungshemmenden Wirkstoffen wie Cyclooxygenase-2-Inhibitoren (Cox-2 Hemmern), dass psychiatrische Störungen auch neuroinflammatorischen Prozessen zu Grunde liegen und auf entsprechende Behandlungen ansprechen können (26).

Inflammatorische Prozesse dienen ebenso als Erklärungsansatz für die Genese depressiver Störungen und werden mit erhöhten Plasmaspiegeln von IL-6 und löslichen IL-2-Rezeptoren, als Indikatoren einer ablaufenden Immunreaktion, interpretiert (27). Ebenso konnte eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP), einem etablierten Entzündungsmarker, bei Patienten mit diagnostizierter Depression festgestellt werden (28). Weitere Studien berichten von einer Aktivierung des zellulären Immunsystems bei depressiven Erkrankungen, wobei insbesondere Erhöhungen von CD4-positiven (T-) Zellen zu finden sind (29).

Eine antientzündliche Therapie mit COX-2 Inhibitoren, konnte, ähnlich den Ergebnissen bei Schizophrenie, auch bei depressiven Symptomen signifikante klinische Effekte erzielen (30), was die These der proinflammatorischen Krankheitsentstehung von psychotischen und affektiven Störungen weiter stützt. In Post-mortem-Studien konnte außerdem ein erhöhtes Vorkommen von T- und B-Zellen im medialen Temporallappen von Schizophrenen und Patienten mit affektiven Störungen festgestellt werden. Die dabei in manchen Fällen auftretende Nähe der T- und B-Zellen zu Kapillaren impliziert eine stattgefundene Migration der Immunzellen durch das Gefäßendothel, die durch eine Störung der Bluthirnschranke, als Resultat neuroinflammatorischer Prozesse, erklärt werden könnte (31).

1.3 Immunologische Bedeutung der T- und B- Lymphozyten

Die Lymphozyten sind zentrale Komponenten der Immunabwehr, welche zum zellulären Bestandteil des adaptiven Immunsystems gehören und in die Subtypen der T- und B-Zellen unterteilt werden. Die Klassifikation der Lymphozyten erfolgt durch Zelloberflächenmarker, die CD- (cluster of differentiation) Antigene, wodurch sie phänotypisch eingruppiert und auch durch Differenzierungsgrad und Aktivierungszustand unterschieden werden können. CD3 fungiert dabei als Erkennungsmerkmal für T-Lymphozyten. CD20 stellt ein Oberflächenantigen der B-Lymphozyten dar. Eine wichtige Funktion des Immunsystems ist die Immuntoleranz, das heißt die Fähigkeit der Lymphozyten zwischen Selbst und Nichtselbst zu unterscheiden. T-Zellen reifen zunächst in der Thymusrinde und werden in einem anschließenden Prägungsprozess befähigt zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen differenzieren zu können. Die B-Lymphozyten sollen nach der Bursa fabricius, dem lymphatischen Organ von Vögeln, in dem sie entdeckt wurden, benannt worden sein. Im

menschlichen Körper stellt das Knochenmark die Reifungsstätte der B-Zellen dar, welche nach Aktivierung zu Plasmazellen proliferieren. Die B-Zell-Rezeptoren sind zellgebundene Antikörper, fungieren als Antigenrezeptoren und befähigen die B-Zellen native Antigene zu erkennen. T-Zellen sind dagegen nur in der Lage über den T-Zell-Rezeptor bereits prozessierte Antigene (Oligopeptide), die ihnen auf MHC / HLA- (Major Histocompatibility Complex / Human Leukocyte Antigen) Molekülen akzessorischer Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten) präsentiert werden, sowie fremde MHC-Moleküle auf allogenen Zellen, zu erkennen. Die Beschränkung der T-Lymphozyten, Antigene nur mit Hilfe zellulärer Oberflächenstrukturen zu erkennen, wird MHC-Restriktion genannt. MHC stellt dabei einen von Spezies unabhängigen Begriff für einen Genkomplex dar, wobei das HLA-System ein human-spezifische MHC-System charakterisiert (32, 33).

T-Zellen können funktionell in zytotoxische und Helfer-T-Zellen unterschieden werden. Dabei nutzen zytotoxische T-Zellen Moleküle der MHC-Klasse I und T-Helferzellen der MHC II zur Identifizierung von Antigenen. Nach dem Erkennen von Antigenen durch T- und B-Zellen, kommt es zur Auslösung multipler Signalkaskaden, wobei es unter anderem durch antigenpräsentierende Zellen zur Ausschüttung von Zytokinen kommt, welche T- und B-Zellen aktivieren können. Dadurch proliferieren B-Lymphozyten zu Plasmazellen, welche zur Antikörperbildung befähigt sind. Zudem gibt es B-Zellen, die sich weiter, zu B-Gedächtniszellen, differenzieren. Diese sind durch eine niedrige Aktivierungsschwelle gekennzeichnet und somit in der Lage bei erneutem Antigenkontakt rapide eine Antikörperbildung zu initiieren. Ist das Immunsystem mit einer akuten Entzündung konfrontiert, wird das T-Helfer-1-System in Gang gesetzt. Der durch Makrophagen gebildete Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein Aktivator dieser Typ-1-Immunantwort. Die T-Helfer-Zellen (CD4+-Zellen), Makrophagen und andere produzieren hierbei weitere wichtige Zytokine insbesondere Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-12 (IL-12) und IFN- γ .

Bei chronisch entzündlichen Vorgängen sowie allergischen Prozessen wird hingegen eine Typ-2-Immunantwort provoziert, welche der humoralen Abwehr angehört. T-Helfer-2-Zellen produzieren dabei insbesondere IL-4, IL-10 und IL-13. Das durch Makrophagen ausgeschüttete IL-6 trägt dabei zum Ablauf der Typ-2-Immunantwort bei und fördert zudem die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen. Zytotoxische T-Zellen (CD8+-Zellen) ähneln den natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen) in ihrer Wirkweise, wobei über Apoptose die antigenspezifische Zytolyse der Zielzellen erfolgt. Die durch verschiedene Proteine (wie Perforin und Granzym) vermittelte Kaskade führt zur Aktivierung von Caspasen und schließlich zum genetisch programmierten Zelltod (32, 33).

1.4 Gegenstand der vorliegenden Arbeit

Die Beteiligung immunologischer Prozesse an der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschung (34). In der vorliegenden Arbeit wird die regionale Verteilung von CD3- und CD20-positiven Lymphozyten bei Schizophrenen und Patienten mit affektiven Störungen im Frontal- und vorderen Temporalhirn untersucht, was als Marker für eine Störung der Bluthirnschranke und neuroinflammatorischer Prozesse interpretiert werden kann. In vorausgehenden Untersuchungen in unserem Labor konnten bereits erhöhte Zahlen von CD3- und CD20-positiven Zellen im Zwischen- und Parietalhirn sowie in limbischen Strukturen nachgewiesen werden (31, 34). Die Entstehung psychiatrischer Erkrankungen weist somit Ähnlichkeiten zu der Genese von Autoimmunerkrankungen auf, für die analog hirnorganische Entzündungsreaktionen verantwortlich gemacht werden (35). Mit dieser Studie soll untersucht werden, ob vergleichbare Befunde auch in frontalen und vorderen temporalen Hirnarealen anzutreffen sind. Das Ziel dieser Arbeit ist eine semiquantitative sowie automatisierte quantitative Analyse von CD3-positiven T-Zellen und CD20-positiven B-Zellen von Ganzhirnschnitten in Höhe des Frontal- und vorderen Temporalhirns, die zur Beantwortung der folgenden Teilfragen führen soll:

1. Können die in anderen Studien nachgewiesenen quantitativen Veränderungen von CD3- und CD20-positiven Zellen im Parenchym von Schizophrenen gegenüber gesunden Vergleichspersonen auch in frontotemporalen Bereichen gefunden werden?
2. Können sowohl durch semiquantitative als auch durch quantitative Gewebsbeurteilung Veränderungen CD3- und CD20-positiver Zellen im Parenchym des Frontal- oder vorderen Temporalhirns von Patienten mit affektiven Störungen gegenüber Gesunden gefunden werden?
3. Gibt es Unterschiede in den morphometrisch-quantitativ ermittelten Zellhäufungen der CD3-positiven und CD20-positiven Zellen zwischen den Subgruppen der Schizophrenen?
4. Gibt es Unterschiede in der Quantität der CD3-positiven und CD20-positiven Zellen zwischen den Subgruppen der affektiven Störungen?
5. Sind die Ergebnisse semiquantitativer und quantitativer Untersuchungen vergleichbar?

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Merkmale der untersuchten Gruppen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Gehirne stammen aus der Magdeburger Hirnbank, welche 1984 an der psychiatrischen Universitätsklinik Düsseldorf gegründet, und im Forschungsbereich der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Magdeburg fortgeführt wurde.

Die Sammlung der Gehirne sowie die daran durchgeführten Studien entsprechen in vollem Umfang den Leitlinien der Deklaration von Helsinki und wurden von den zuständigen Ethikkommissionen, in Düsseldorf und Magdeburg, genehmigt. Es liegen positive Voten (Aktenzeichen 67/10 und 47/10) von der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für die neurohistologische Untersuchungen der verwendeten Hirnschnitte vor.

Vor Obduktion wurden die Einwilligung der Angehörigen oder, bei Suizidfällen, der zuständigen Staatsanwaltschaft eingeholt.

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 58 Gehirne, 31 männliche und 27 weibliche, untersucht. Die einzelnen Fälle wurden hinsichtlich Alter und Geschlecht angepasst (Tab. 1). Bei 20 der Probanden wurde eine Schizophrenie diagnostiziert, wovon 9 einer paranoiden, und 9 einer residualen Form zuzuordnen sind, bei 2 Fällen konnte im Zuge dieser Studie nicht erhoben werden welcher Schizophrenie-Unterform sie angehören (Durchschnittsalter 53,0 Jahre; 10 Männer, 10 Frauen). Die Diagnose einer Depression wurde bei 19 Patienten gestellt, wobei es sich bei 10 um eine unipolare und bei 9 um eine bipolare Depression handelt (Durchschnittsalter 54,0 Jahre; 11 Männer, 8 Frauen). Zusätzlich wurden 19 Gehirne von Personen untersucht, bei denen zuvor keine psychiatrische Erkrankung diagnostiziert wurde (Durchschnittsalter 56,0 Jahre; 10 Männer, 9 Frauen).

Die diagnostische Eingruppierung der Patienten erfolgte anhand der klinischen Dokumentation sowohl entsprechend dem zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gültigen DSM IV-TR (Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen, Version IV, Textrevision) als auch der ICD-10-Codierungen (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 2016-heute) durch zwei erfahrene Psychiater (Prof. em. Bogerts und Prof. Steiner) (9, 36).

Tabelle 1: Demografische Daten: Mittelwerte (Standardabweichung)

	Schizophrenie <i>n = 20</i> männlich = 10 weiblich = 10	Affektive Störung <i>n = 19</i> männlich = 11 weiblich = 8	Kontrollen <i>n = 19</i> männlich = 10 weiblich = 9
Alter (Jahre)	53,0 (20,0)	54,0 (19,0)	56,0 (19,0)
Krankheitsdauer (Jahre)	24,0 (10,0)	8,5 (14,0)	-
Krankheitsbeginn (Alter)	29,5 (18,0)	39,0 (14,0)	-
Autolysedauer (in h)	48,0 (20,0)	48,0 (19,0)	24,0 (19,0)
Fixationszeit (Tage)	270,0 (19,0)	420 (19,0)	182,0 (19,0)
Gehirngewicht (in g)	1380 (17,0)	1410 (19,0)	1220 (19,0)
BMI (kg/m²)	24,0 (13,0)	25,24 (7,0)	24,71 (16,0)
Suizid (Anzahl)	7	10	0
Strangulation (Anzahl)	3	7	0

2.2 Methode

2.2.1 Aufbereitung des Hirngewebes

Zunächst wurden die Hirne 48 Stunden (Std., +/- 20 Std.) post mortem von Pathologen oder Gerichtsmedizinern entnommen. Anschließend erfolgte eine gründliche Untersuchung auf Veränderungen wie Tumoren, inflammatorische, vaskuläre, oder hirotraumatische Ereignisse sowie Anzeichen für neurodegenerative Erkrankungen als Ausschlusskriterien. Zudem wurden die Gewichte der Hirne bestimmt und anschließend fotografisch dokumentiert. Im Anschluss wurden die verwendeten Hirne in einer 8 % Phosphat gepufferten Formaldehydlösung (pH 7,0; 15 – 20 °C) für mehrere Monate fixiert (Tab. 1).

Nach der Entfernung von Truncus cerebri und Cerebellum erfolgte die Separation von Frontal- und Okzipitalblock anterior des Genu sowie posterior des Spleniums des Corpus callosum, in koronarer Schnitfführung. Die drei dabei entstandenen bihemisphärischen Blöcke (anteriorer, mittlerer und posteriorer Block) wurden fotografisch dokumentiert.

Daraufhin erfolgte zunächst eine Wässerung der Hirnblöcke über Nacht, an welche sich eine Entwässerung in aufsteigender Ethanolreihe für insgesamt acht Wochen anschloss. Hierbei wurden die Hirne jeweils für eine Woche nacheinander in 50 % Alkohol, dann in 60 %, 70 %, 80 %, 90 % und 96 % Ethanol gelegt. Dann verbrachten die Blöcke für zwei Wochen in 100 % Alkohol, wobei dieser wöchentlich erneuert wurde. Im Anschluss wurden die Hirne, für insgesamt sieben Tage, täglich in Chloroform eingelegt, bevor schließlich die Einbettung und Härtung in Paraffin (Paraplast, Shandon) für vier Wochen erfolgte. Die Fixationszeit (Zeitraum zwischen der Autopsie und der Einbettung in Paraplast) der verwendeten Hirnblöcke betrug zwischen 90 und 800 Tagen.

Mit Hilfe eines Mikrotoms (Polycut-S, Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland) wurden die Gewebeblöcke abschließend in Koronarebene seriell bei einer Schnittdicke von 20 µm geschnitten und sodann auf Objektträgern übertragen. Für die vorliegende Studie wurden jeweils zwei benachbarte Schnitte vom anterioren Mittelblock zur immunhistochemischen Darstellung CD3- und CD20-positiver Lymphozyten verwendet.

2.2.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst mit Hilfe von Xylol für 10 Minuten (Min.) entparaffiniert und sodann in absteigender Ethanolreihe fixiert: 5 Min. in 100 % Alkohol, dann nacheinander jeweils für 5 Min. in 96 %, 80 %, 70 %, 60 % und 50 % Ethanol. Anschließend erfolgten zwei Spülungen mit Aqua destillata (Aqua dest.) für jeweils 5 Min.

Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte daraufhin 4 Min. lang in 10 mM Target Retrieval Puffer (pH 9,0) gekocht, und danach erneut zweimal für jeweils 5 Min. mit Aqua dest. gespült. Dann wurden die Schnitte für 5 Min. in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Sigma-Aldrich, pH 7,4) gebracht, anschließend folgte eine Behandlung mit 1,5 % Wasserstoffperoxid (H_2O_2) für 10 Min., sowie erneutes Spülen mit PBS für 2 x 5 Min. Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit Wasserstoffperoxid ist unerlässlich, da durch das Enzym freigesetzter molekularer Sauerstoff zu unerwünschten Gewebsreaktionen mit ausgeprägten Hintergrundfärbungen führen kann.

Um weitere unspezifische Bindungsstellen des Ziel-Antikörpers zu blockieren, wurden die Schnitte anschließend mit Normalserum der Ziege für 60 Min. in einer feuchten Kammer inkubiert. Nun erfolgte die Applikation des jeweiligen primären Antikörpers (DAKO, Glostrup, Dänemark; Monoklonaler Maus-Anti-Human CD20cy, Klon L26, Verdünnung 1:50; Monoklonaler Maus-Anti-Human CD3, Klon F7.2.38, Verdünnung 1:100) und die Schnitte wurden dann für 60 Min. auf den Schüttler gebracht sowie anschließend für 48 Std. bei 4 °C inkubiert. Zur Beseitigung nicht gebundener Antikörper erfolgte daraufhin eine zweifache Spülung mit PBS für jeweils 5 Min. Dann wurde der sekundäre Antikörper (DAKO, Glostrup, Dänemark; Polyklonaler Ziege-Anti-Maus, Typ IgG, biotinyliert, Verdünnung 1:100) appliziert und die Hirnschnitte in einer feuchten Kammer für 120 Min. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Spülung mit PBS (2 x 5 Min.) erfolgte wiederum zur Vermeidung potenzieller unspezifischer Hintergrundfärbungen.

Anschließend wurde durch Anwendung der Avidin-Biotin-Komplexmethode (ABC-Methode), unter Entstehung eines Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes, der Primärantikörper detektiert. Hierbei wurde Streptavidin, ein bakterielles Avidin, in einer Verdünnung von 1:100 hinzugeführt, und während einer Einwirkzeit von 60 Min. bei Raumtemperatur an spezifische Bindungsstellen des biotinylierten Sekundärantikörpers geführt. Durch ein Markerenzym des Avidins, die Meerrettichperoxidase (Horse Radish Peroxidase, HRS), konnte daraufhin eine Enzym-Substrat-Reaktion ablaufen, welche schließlich zum Farbnachweis führte.

Zunächst erfolgten die nächsten zwei Spülungen mit PBS für jeweils 5 Min. Nun wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, SIGMA-ALDRICH, FLUKA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) verwendet, welches als Substrat der HRS fungiert und dessen Oxidation schließlich die Farbreaktion hervorrief. Die Verwendung von Ammoniumnickelsulfat (Amm. $NiSO_4$, SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, Missouri, USA) führte zu einer Intensivierung der Färbung. Dafür wurde für einen Ansatz von 25 ml Gesamtfärbelösung, 0,5 g Amm. $NiSO_4$ sowie 0,0125 g DAB separat von einander in PBS gelöst, bevor beide Lösungen zusammengeführt und filtriert wurden. Das entstandene Filtrat wurde nun auf 25 ml mit PBS aufgefüllt, und 250 μ l von 1 % H_2O_2 kurz vor Verwendung dazugeben. Das entstandene

Gemisch wurde sodann auf die Schnitte appliziert und anschließend bei Raumtemperatur für 10 Min. auf den Schüttler platziert.

Es folgten zwei weitere Spülungen mit Aqua dest. für jeweils 5 Min. wonach die Schnitte abschließend zur Entwässerung eine aufsteigende Ethanolreihe durchliefen: für jeweils 5 Min. nacheinander in 50 %, 70 %, 80 %, 96 % und 100 % Alkohol. Die gefärbten Gewebeschritte wurden schließlich für 2 x 10 Min. in Xylol gebadet und mit einem Eindeckmedium (EUKITT, O. Kindler GmbH & Co) luftdicht fixiert.

Zudem erfolgte die Anfärbung von Hirnschnitten ohne primären Antikörper (Negativkontrollen), um die Spezifität der angewandten immunhistochemischen Färbung zu gewährleisten.

2.2.3 Semiquantitative Bewertung immunreaktiver Zellen

Die Untersuchung der koronaren Ganzhirnschnitte wurde auf Schnitthöhe des Genu des Corpus callosum, das den vorderen Pol des Striatum beinhaltet, durchgeführt. Um das Vorhandensein CD3- oder CD20-positiver Lymphozyten zu eruieren, wurden die gefärbten Hirnschnitte jeweils in folgende anatomische Regionen unterteilt (Abb. 1):

- Orbitalkortex
- inferiorer frontaler Gyrus (IFG)
- dorsolateraler frontaler Kortex (DLFC)
- hochfrontaler Kortex
- Gyrus cinguli
- anteriorer Pol des Corpus callosum (APCC)
- anteriorer Nucleus caudatus
- Temporalpol.

Dabei erfolgte die Untersuchung in den oben genannten Regionen jeweils in der linken sowie rechten Hemisphäre. Zudem wurden die verschiedenen Lokalisationen in Kortex sowie angrenzendes Marklager unterschieden, wobei letzteres in peripheres (direkt an den Kortex angrenzendes) und zentrales Marklager unterteilt wurde. Schließlich erfolgte für alle Regionen eine Diskrimination von CD3- oder CD20-positiven Lymphozyten, die perivaskulär (Abb. 2 und 3) oder unabhängig von Gefäßen, d.h. im Hirnparenchym außerhalb von Gefäßen gelegen, lokalisiert wurden.

Die Identifikation und Bezeichnung der zu untersuchenden Regionen wurde mit Hilfe des "Atlas of the Human Brain" von J.K. Mai (2003) vorgenommen (37). Ein systematisches Screening der Hirnregionen erfolgte blind, d.h. ohne Wissen der Untersuchenden bezüglich

der Diagnosegruppen, mit einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) in 100-facher Vergrößerung. Dabei diente die 40-fache Vergrößerung um einen ersten Überblick zu erhalten. Die 400-fache Vergrößerung wurde schließlich zur eindeutigen Zellidentifikation verwendet.

Das Vorhandensein beziehungsweise Nichtvorhandensein von CD3- oder CD20-positiven Lymphozyten in allen oben beschriebenen Regionen wurde mit Hilfe einer semiquantitativen Ratingskala erfasst: 0 = keine Zellen, 1 = wenige Zellen, 2 = mäßig viele Zellen, 3 = viele Zellen (Abb. 3).

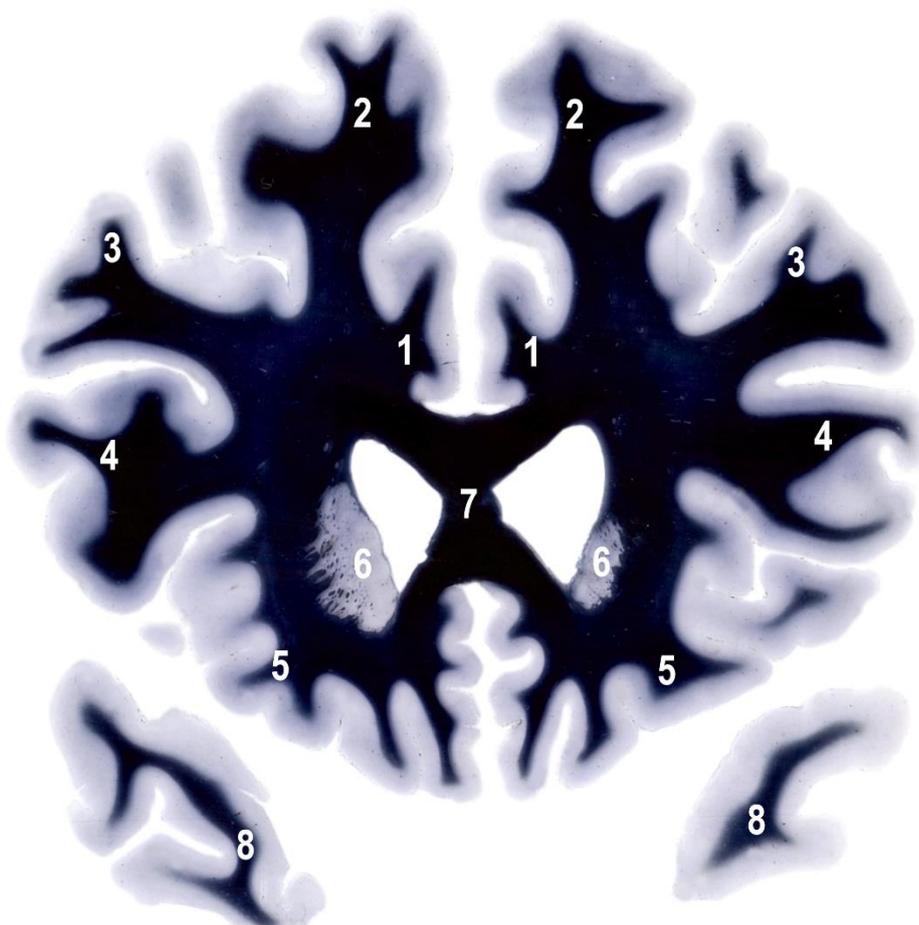


Abbildung 1: Übersicht untersuchter Hirnregionen in Nissl- Färbung: 1 Gyrus cinguli, 2 hochfrontal, 3 DLFC, 4 IFG, 5 orbital, 6 anteriorer Nucleus caudatus, 7 APCC, 8 Temporalpol

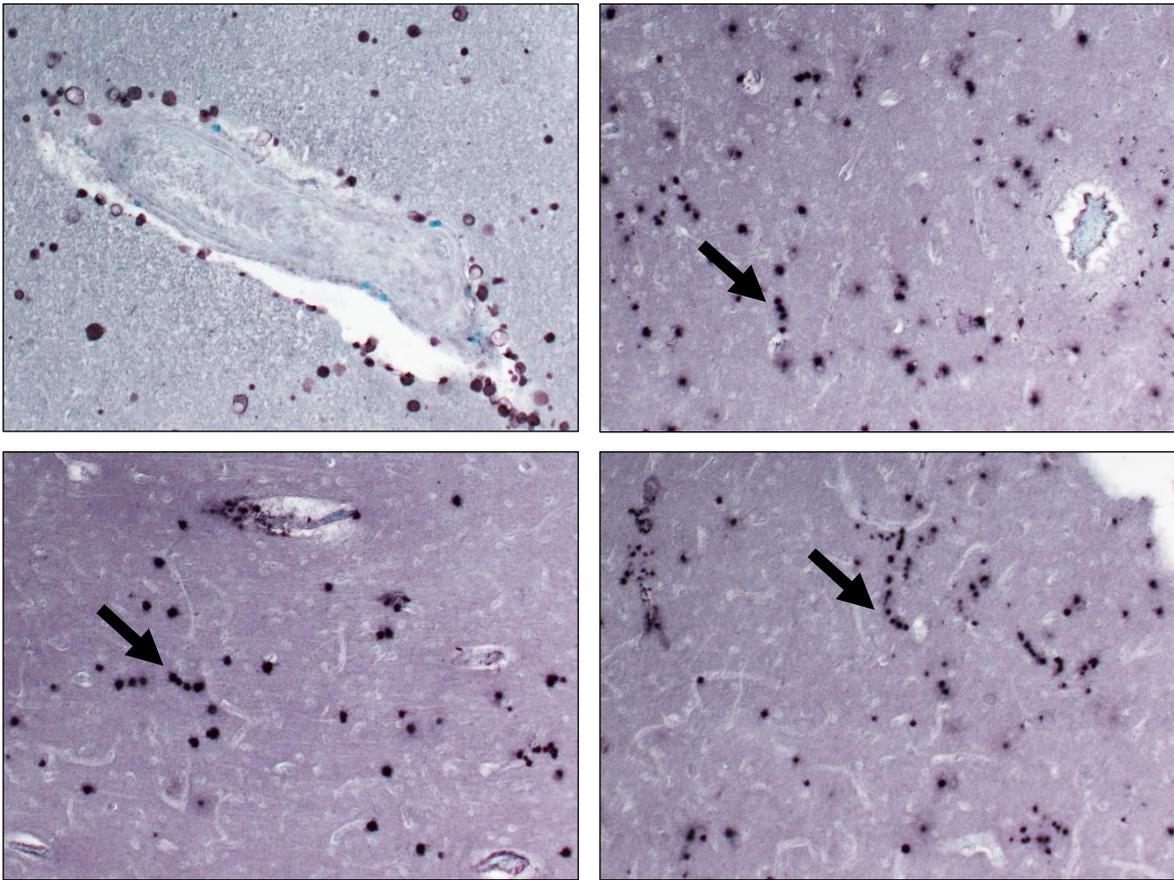


Abbildung 2: Beispiele perivaskulärer Effekte (Aneinanderreihungen, Zellketten) bei CD3-positiven Zellen in 100-facher Vergrößerung

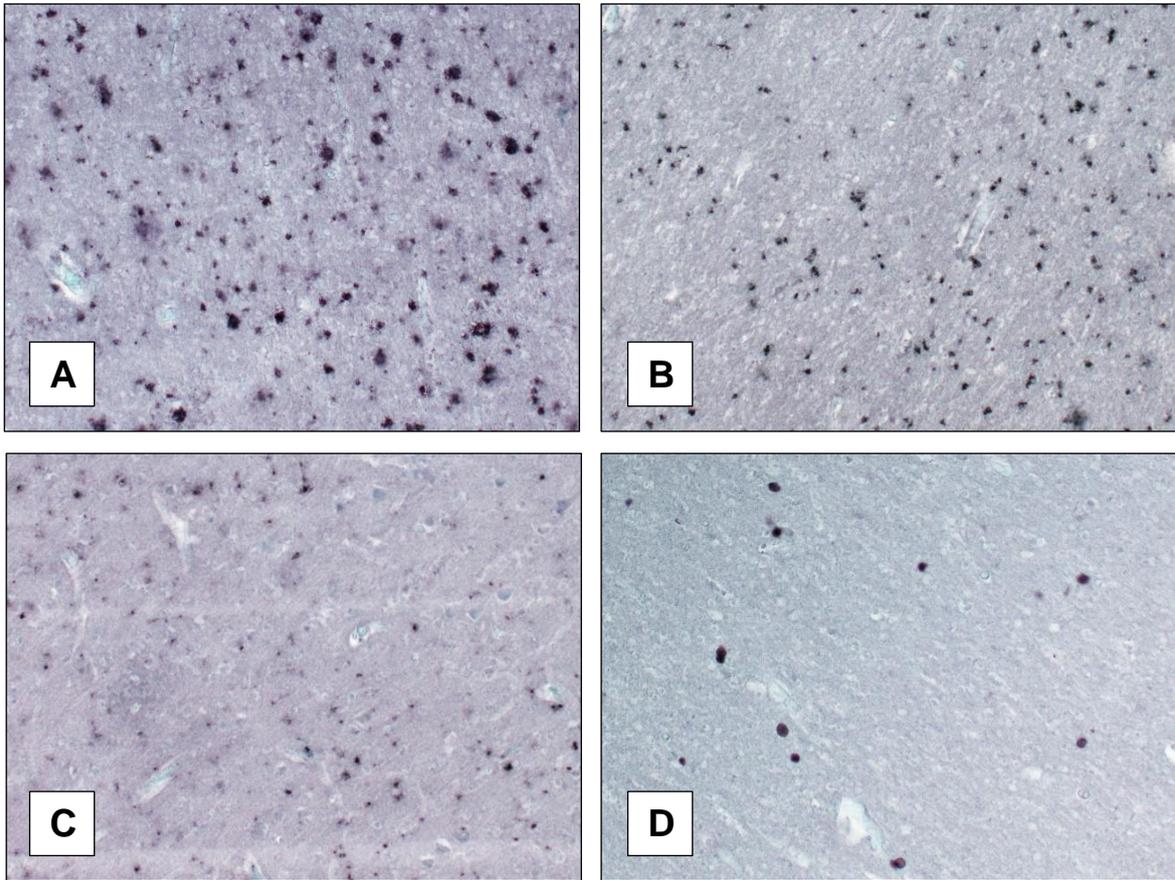


Abbildung 3: Beispiele semiquantitativer Bewertungen (dargestellt **CD3**-positive Zellen (T-Lymphozyten) in 100-facher Vergrößerung): (A) und (B) Beispiele Rating 3: viele Zellen, (C) Beispiel Rating 2: mäßig viele Zellen, (D) Beispiel Rating 1: wenige Zellen

2.2.3.1 Statistische Datenanalyse der semiquantitativen Methode

Zur statistischen Auswertung diente die Statistiksoftware R Studio v1.1.383 (R language for statistical computing, v3.3.3: <https://r-project.org>) (38).

Demografische Variablen (Tab. 1) wurden mit Hilfe des Exakten Fisher-Tests, des Kruskal–Wallis-H-Tests oder des Mann–Whitney-U-Tests verglichen.

Unterschiede zwischen den Diagnosegruppen und zwischen den diagnostischen Untergruppen konnten durch den Exakten Fisher-Test ausgewertet und weiterhin durch den post-hoc Bonferroni-Test auf Signifikanz geprüft werden.

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman diente zur Untersuchung potenziell konfundierender Variablen.

Statistische Signifikanz wurde definiert mit $p < 0,05$ und $p < 0,10$ als Trend betrachtet.

2.2.4 Quantitative Bewertung immunreaktiver Zellen

Für eine quantitative Erhebung der CD3- und CD20-positiven Lymphozyten fanden dieselben koronaren Ganzhirnschnitte Anwendung, die für die semiquantitative Methode genutzt wurden. Entsprechend erfolgte die Untersuchung auf der Schnitthöhe des Genu des Corpus callosum mit dem vorderen Pol des Striatum (Abb. 1) und beinhaltete alle anatomischen Regionen der semiquantitativen Vorgehensweise, jeweils beider Hemisphären sowie in Kortex und angrenzendem Marklager:

- Orbitalkortex
- inferiorer frontaler Gyrus (IFG)
- dorsolateraler frontaler Kortex (DLFC)
- hochfrontaler Kortex
- Gyrus cinguli
- anteriorer Pol des Corpus callosum (APCC)
- anteriorer Nucleus caudatus
- Temporalpol.

2.2.4.1 Gewebsschrumpfung

Die durch Dehydratation und Einbettung in Paraffin hervorgerufene Gewebsschrumpfung der Hirnschnitte konnte mit der Formel:

$$VF = \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{A_1}{A_2}\right)^3$$

berechnet werden. Hierbei bezeichnet A_1 die Fläche vor, sowie A_2 die Fläche nach Fixation. Der Volumenschrumpfungsfaktor (VF) wurde in die Bestimmung der Bildmaßstäbe entsprechend einbezogen.

2.2.4.2 Mikroskopische Aufnahmen

Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten blind in Hinsicht auf die diagnostischen Untergruppen und es kamen die in Tabelle 2 dargestellten Vorrichtungen zum Einsatz.

Zunächst wurden Übersichtsaufnahmen aller Hirnschnitte mit 12,5-facher Mikroskopvergrößerung (Objektiv 1,25x, Okular 10x) und einer linearen Auflösung von 2,990 $\mu\text{m}/\text{px}$ vorgenommen, was eine bessere Orientierung zur Festlegung der späteren Aufnahmefelder in den Zielregionen ermöglichte. Dann erfolgten die regionalen Aufnahmen beider Hemisphären in den gewählten anatomischen Bereichen (Abb. 1) jeweils in Kortex und Marklager mit 100-facher Mikroskopvergrößerung (Objektiv 10x, Okular 10x) und einer linearen Auflösung von 0,36937 $\mu\text{m}/\text{px}$. In jeder Zielregion wurden dabei 10, bzw. im Corpus Callosum 20, Bildaufnahmen angefertigt (Abb. 4).

Somit entstanden Datensätze mit 280 Bildern pro aufgenommenen Hirnschnitt, wobei 5 Hirnschnitte keine oder nur teilweise Temporalpole aufwiesen und somit eine entsprechend geringere Bildanzahl generiert werden konnte. Anschließend erfolgte eine manuelle Durchsicht der Bildsätze, sowie im Bedarfsfall, bei Feststellung von ungenügender Bildqualität, Gewebedefekten oder fehlerhafter Färbung, eine erneute Aufnahme.

Für eine spätere farbcodierte Kartierung, zur Veranschaulichung der Lymphozytenverteilungen, erfolgten Aufnahmen von Ganzhirnschnitten mit 100-facher Mikroskopvergrößerung und einer linearen Auflösung von 0,36937 $\mu\text{m}/\text{px}$, welche in der semiquantitativen Analyse in mindestens einer Region viele oder mäßig viele Lymphozyten (Rating 2 oder 3) aufzuweisen hatten.

Im Anschluss erfolgte die Speicherung der Bilder als verlustfreie JPG-Dateien, ohne zuvor Farb- oder Kontrastanpassungen vorgenommen zu haben.

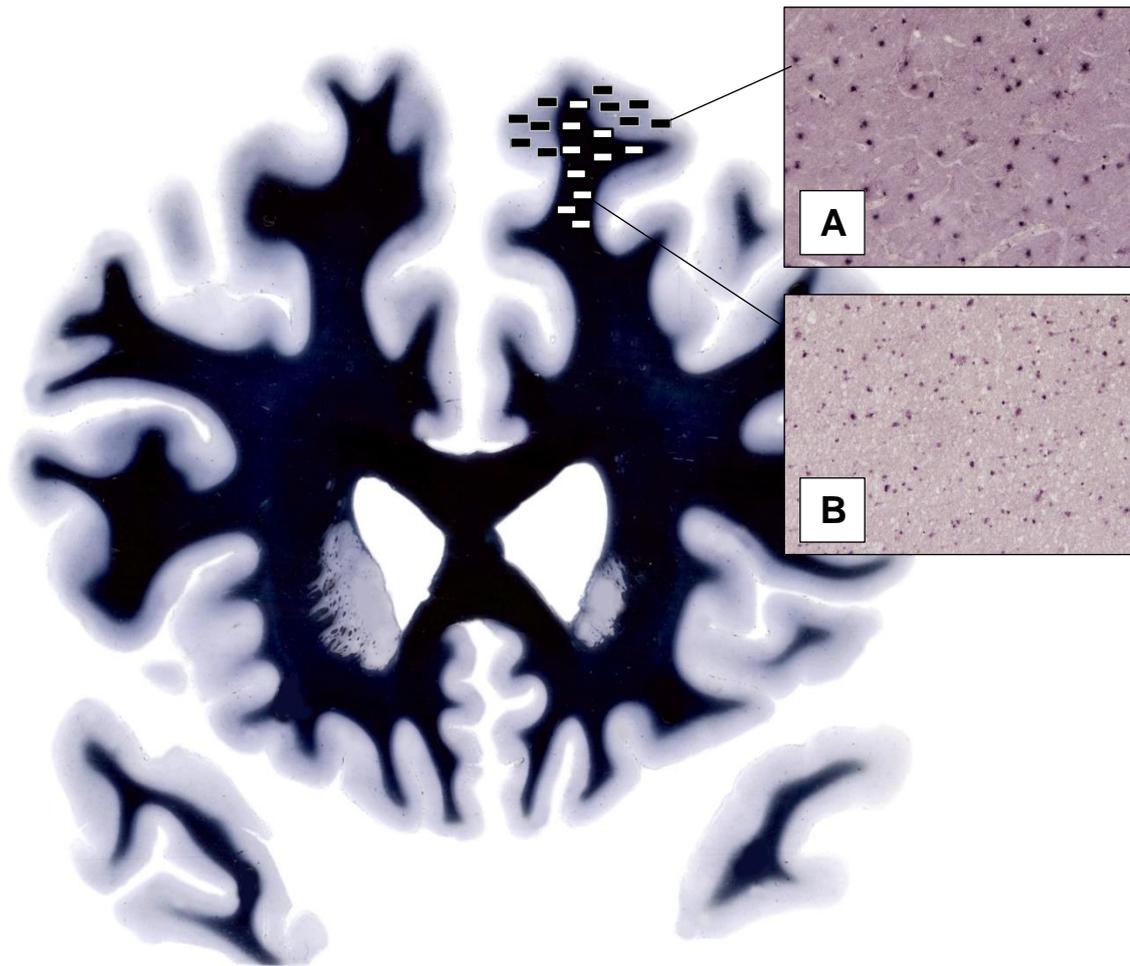


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Platzierung von Zählfeldern (hier beispielhaft hochfrontal) in Kortex (A) und Marklager (B) für die mikroskopischen Aufnahmen der quantitativen Methode

Tabelle 2: Verwendete Hard- und Softwareprodukte und weitere Einzelheiten zu Bildaufnahme und -bearbeitung**Technische Daten**

Bestandteil	Produkt	Details	Hersteller
Mikroskop	Olympus BX60	<u>Übersichtsaufnahmen:</u> <ul style="list-style-type: none"> - Objektiv: 1,25x, - Lineare Auflösung: 2,990 $\mu\text{m}/\text{px}$; <u>Farbcodiertes Mapping:</u> <ul style="list-style-type: none"> - Objektiv: 4x, - Lineare Auflösung: 0,91986 $\mu\text{m}/\text{px}$; <u>Quantitative Analyse:</u> <ul style="list-style-type: none"> - Objektiv: 10x, - Lineare Auflösung: 0,36937 $\mu\text{m}/\text{px}$ 	Olympus K.K., Tokyo, Japan
Kamera	Olympus DP22	<u>Bildmaße:</u> <ul style="list-style-type: none"> - 1920 x 1440 px (4x Objektiv); - 12589 x 21076 px (10x Objektiv) 	
Bildaufnahmesoftware	Olympus cellSens Dimension, v1.15		
Tischsteuerung	Märzhäuser TANGO Desktop		Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar, Deutschland
Bildbearbeitungssoftware	Fiji ImageJ, v1.53c	<u>Partikelfiltereinstellungen:</u> <ul style="list-style-type: none"> - Größe/Fläche: 20 – 300 μm^2; - Rundheit: 0,55 – 1,00 	Schindelin, J. et al.: https://imagej.nih.gov/ij (39, 40)

2.2.4.3 Bildbearbeitung und Zellzählung

Für die quantitative Erfassung und Ausmessung der CD3- und CD20-positiven Lymphozyten wurde das Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (39, 40) verwendet. Dabei wurden die hochaufgelösten Farbbilder (RGB) zunächst in Graustufen-Bilder mit einer Farbtiefe von 8-bit (256 Graustufen) umgewandelt. Durch Einstellen eines geeigneten Schwellenwertes entstanden binäre Bilder (schwarzweiß), die für den weiteren Bearbeitungsprozess notwendig waren. Dann erfolgte eine Filterung der Bilder mit Eliminierung redundanter Pixel zur Erleichterung der Partikelerkennung durch das angewandte Programm. Anschließend wurde nach Größe der Partikel (Size) und Rundheit (Circularity) gefiltert. Der Zielgrößenbereich der zu untersuchenden Zellen wurde dabei auf 20 – 300 μm^2 festgelegt (entsprechend einem Durchmesser von 5 – 19,5 μm). Somit konnten Lymphozyten, gemäß der wissenschaftlich etablierten Größenverhältnisse, erfasst werden (33). Für das Filterkriterium der Rundheit galt:

$$\text{Circularity} = 4\pi \cdot \frac{A}{d^2} .$$

Hierbei bezeichnet A die Fläche und d den Umfang der kreisförmigen Partikel. Eine angemessene Ähnlichkeit zur Kreisform (Circularity) wurde hierbei bei Werten zwischen 0,55 – 1,00 festgelegt, wobei 0,00 für ein unendlich elongiertes Polygon und 1,00 für einen perfekten Kreis angenommen wurde. Die verwendeten Grenzwerte wurden zuvor an einer Reihe Testbilder manuell ermittelt, um eine ausreichende Detektion der Zielzellen zu gewährleisten.

2.2.4.4 Farbcodierung

Für die Darstellung einer regionalen Verteilung der untersuchten immunreaktiven Zellen, wurden Aufnahmen von Ganzhirnschnitten, die in der semiquantitativen Analyse Regionen mit mäßig vielen oder vielen Partikel aufwiesen, vorgenommen (2.2.3).

Durch Anwendung von Filterkriterien für Form und Größe mittels Cellsens-Software war es möglich entsprechende Lymphozyten zu detektieren und farblich zu markieren. Mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware GIMP (GNU Image Manipulation Program, v2.10.22) wurden die immunreaktiven Bereiche der Bilder dabei zunächst mit einer Kantenlänge von 7,2 mm verpixelt. Dann erfolgte eine Umwandlung, der zuvor durch Graustufen codierten Dichten, in colorierte Areale, wobei die Verwendung einer intuitiven Farbabstufung von warmen nach kalten Farben (rot, orange = hohe Zelldichte, gelb = mäßig hohe Zelldichte, blau = niedrige Zelldichte) eine visuelle Erfassbarkeit der hirnregionalen Lymphozytendistribution ermöglichte (siehe 3.4).

2.2.4.5 Statistische Datenanalyse der quantitativen Methode

Die Statistiksoftware R Studio v1.1.383 (R language for statistical computing, v3.3.3) (38) wurde auch zur statistischen Auswertung der quantitativen Daten genutzt.

Der H-Test nach Kruskal Wallis wurde angewandt, um (signifikante) Unterschiede zwischen den drei Diagnosegruppen sowie zwischen den Subgruppen zu erfassen.

Für die Differenzstatistik, zur Erfassung von Effekten zwischen zwei Gruppen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet, um Gruppeneffekte jeweils zwischen Gesunden und Erkrankten der entsprechenden Haupt- und Nebengruppe erfassen zu können.

Zur Spezifizierung wurden die Ergebnisse FDR korrigiert (FDR = false discovery rate, berechnet als Verhältnis aus fälschlicherweise zurückgewiesenen Nullhypothesen zu den zurückgewiesenen Nullhypothesen insgesamt; dient zur Kontrolle der nicht versuchsbezogenen Irrtumswahrscheinlichkeit).

Der Spearman Korrelationskoeffizient wurde zur Untersuchung des Einflusses potenziell konfundierender Variablen verwendet.

Statistische Signifikanz wurde definiert mit $p < 0,05$; $p < 0,10$ wurde als Trend betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Semiquantitative Auswertung

3.1.1 Interraterreliabilität

Zur Überprüfung der Interraterreliabilität wurden jeweils 20 Hirnschnitte der CD3- sowie CD20-Färbung ($n = 40$), der in der Arbeit verwendeten Hirnschnitte, von einer zweiten Person (Prof. em. Bogerts) nach den gleichen Kriterien bewertet, und mit Hilfe der semiquantitativen Ratingskala erfasst (0 = keine Zellen, 1 = wenige Zellen, 2 = mäßig viele Zellen, 3 = viele Zellen). Der Korrelationskoeffizient, zu der von der Promovendin erfassten Daten, nach Spearman betrug dabei $r_s = 0,815$ ($p < 0.001$) und zeigte somit einen hohen Grad an Übereinstimmung.

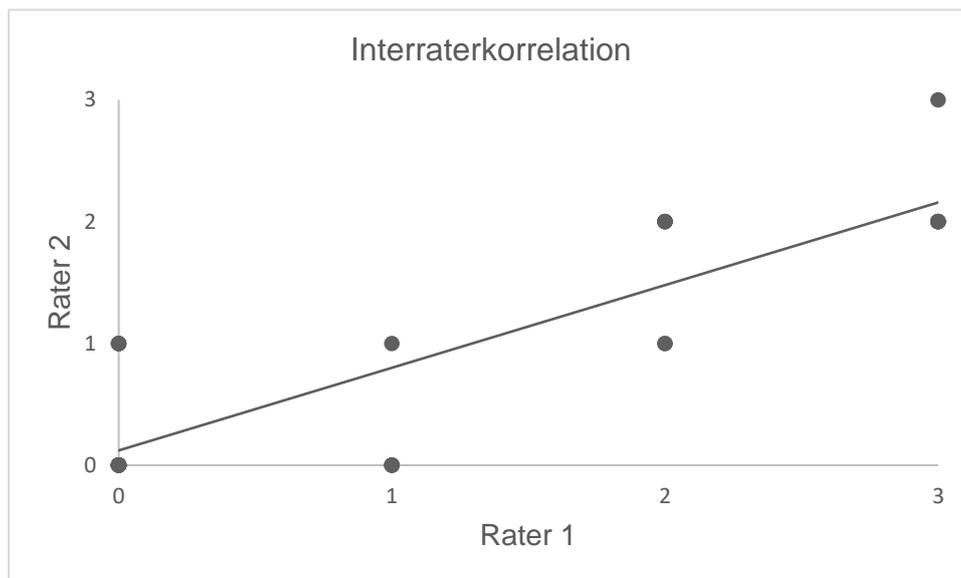


Abbildung 5: Spearman-Korrelation zur Überprüfung der Interraterreliabilität für insgesamt 40 Hirnschnitte ($r_s = 0,815$ ($p < 0.001$))

3.1.2 Unterschiede in den Hauptgruppen der semiquantitativen Methode

CD3- sowie CD20-positive Lymphozyten konnten in mehreren der untersuchten Hirnarealen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Patientengruppen der Depressiven und Schizophrenen, sowie die Gruppe der Gesunden, erhielten die in Tabellen 3 und 4 dargestellten Ratings. Dabei wurden die Subtypen der Schizophrenen (paranoid und residual) sowie der affektiven Störungen (unipolar und bipolar) jeweils zusammengefasst.

Es konnten signifikante Erhöhungen hinsichtlich CD3-positiver T-Zellquantitäten bei Depressiven eruiert werden. Entsprechend zeigten sich erhöhte Zellzahlen (Rating 2 oder 3: mäßig viele bzw. viele Zellen) bei jeweils 7 / 19 Patientenfällen im rechten IFG ($p = 0,050$), dorsolateral rechts ($p = 0,034$), hochfrontal links ($p = 0,006$) und rechts ($p = 0,046$), sowie im rechten Temporalpol ($p = 0,001$) (Tab. 3).

Auch für CD20-positive B-Zellen konnten signifikante Zellhäufungen bei den affektiv Erkrankten gefunden werden und traten entsprechend in jeweils 8 / 19 Fällen orbital unabhängig von Gefäßen rechts ($p = 0,013$), hochfrontal rechts ($p = 0,016$), und temporal links ($p = 0,004$) auf (Rating 2 oder 3: mäßig viele bzw. viele Zellen). Zudem fanden sich in der Gruppe der Depressiven 7 / 19 Fällen jeweils im peripheren Orbitalmark links ($p = 0,035$) und rechts ($p = 0,035$), im linken IFG ($p = 0,041$), im linken peripheren Temporalmark ($p = 0,002$), sowie rechts temporal ($p = 0,002$) signifikante B-Zell-Anhäufungen (Rating 2 oder 3: mäßig viele bzw. viele Zellen) (Tab. 4).

In der Gruppe der Schizophrenen wiesen 3 / 20 Patientenfällen bezüglich T-Lymphozyten erhöhte Zellzahlen (Rating 3: viele Zellen) im rechten IFG ($p = 0,050$) auf. Bei 2 / 20 Fällen konnten hinsichtlich CD3- sowie CD20-positiver Zellen in mehreren Arealen sowohl in Marklager- als auch in Kortexarealen, perivaskulär, sowie unabhängig von Gefäßen erhöhte Zellquantitäten (Rating 3: viele Zellen) bei Schizophrenen gefunden werden (Tab. 3 und 4).

Tabelle 3: Ratings und p-Werte bezüglich **CD3**-positiver Zellen für Areale mit signifikanten Differenzen zwischen den Diagnosegruppen

Region	Schizophrenie <i>n</i> = 20	Depression <i>n</i> = 19	Gesund <i>n</i> = 19	p-Wert
	<i>keine Zellen / wenige Zellen / mäßig viele Zellen / viele Zellen</i>			
Orbital Mark peripher re	18 / 0 / 0 / 2	13 / 1 / 0 / 5	18 / 1 / 0 / 0	0,030
IFG gesamt rechts	16 / 1 / 0 / 3	12 / 0 / 3 / 4	18 / 0 / 1 / 0	0,050
Dorsolateral gesamt re	17 / 1 / 0 / 2	12 / 0 / 2 / 5	18 / 0 / 1 / 0	0,034
Hochfrontal Mark periph li	18 / 0 / 0 / 2	13 / 2 / 0 / 4	19 / 0 / 0 / 0	0,028
Hochfrontal gesamt links	18 / 0 / 0 / 2	10 / 2 / 2 / 5	18 / 1 / 0 / 0	0,006
Hochfrontal gesamt rechts	18 / 0 / 0 / 2	10 / 2 / 2 / 5	17 / 1 / 0 / 1	0,046
Gyrus cinguli Kortex links	17 / 2 / 0 / 1	13 / 3 / 3 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,026
Gyrus cinguli Kortex re	17 / 2 / 0 / 1	13 / 3 / 3 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,026
Gyrus cinguli perivask re	18 / 1 / 1 / 0	13 / 4 / 0 / 2	19 / 0 / 0 / 0	0,015
Gyrus cinguli gesamt re	17 / 1 / 0 / 2	11 / 2 / 3 / 3	19 / 0 / 0 / 0	0,016
Temporal Kortex rechts	14 / 0 / 2 / 0	11 / 4 / 4 / 0	18 / 0 / 0 / 0	0,005
Temporal Mark periph re	14 / 0 / 0 / 2	12 / 1 / 3 / 3	18 / 0 / 0 / 0	0,029
Temporal perivaskulär re	14 / 0 / 0 / 2	12 / 2 / 3 / 2	18 / 0 / 0 / 0	0,024
Temporal gesamt links	16 / 0 / 1 / 1	10 / 3 / 3 / 3	17 / 1 / 0 / 0	0,026
Temporal gesamt rechts	14 / 0 / 0 / 2	9 / 3 / 4 / 3	18 / 0 / 0 / 0	0,001

Anmerkungen zu Tabelle 3: p-Werte (Fisher Exakt) Bonferroni korrigiert; Abkürzungen: IFG – inferiorer frontaler Gyrus, periph – peripher, perivask – perivaskulär, li – links, re – rechts; Anzahl der Fälle variiert: in wenigen Hirnschnitten Temporalmark oder gesamter Temporalpol fehlend

Tabelle 4: Ratings und p-Werte bezüglich **CD20**-positiver Zellen für Areale mit signifikanten Differenzen zwischen den Diagnosegruppen

Region	Schizophrenie <i>n</i> = 20	Depression <i>n</i> = 19	Gesund <i>n</i> = 19	p-Wert
	<i>keine Zellen / wenige Zellen / mäßig viele Zellen / viele Zellen</i>			
Orbital kortikal links	17 / 1 / 2 / 0	11 / 2 / 6 / 0	17 / 2 / 0 / 0	0,045
Orbital Mark peripher li	18 / 0 / 0 / 2	12 / 0 / 4 / 3	18 / 0 / 1 / 0	0,035
Orbital Mark peripher re	18 / 0 / 0 / 2	12 / 0 / 3 / 4	18 / 0 / 1 / 0	0,035
Orbital perivaskulär links	19 / 0 / 0 / 1	10 / 4 / 4 / 1	18 / 0 / 1 / 0	0,001
Orbital perivaskulär rechts	19 / 0 / 0 / 1	10 / 5 / 3 / 1	18 / 0 / 1 / 0	0,001
Orbital unabhängig rechts	16 / 2 / 0 / 2	10 / 1 / 4 / 4	18 / 0 / 1 / 0	0,013
IFG kortikal links	18 / 0 / 2 / 0	12 / 1 / 6 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,006
IFG links gesamt	18 / 0 / 0 / 2	11 / 1 / 3 / 4	18 / 0 / 0 / 1	0,041
Dorsolateral Kortex links	16 / 1 / 2 / 1	13 / 0 / 6 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,013
Dorsolateral Kortex rechts	17 / 1 / 2 / 0	13 / 0 / 6 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,014
Hochfrontal Kortex links	17 / 0 / 3 / 0	12 / 2 / 5 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,015
Hochfrontal Kortex rechts	18 / 0 / 2 / 0	12 / 2 / 5 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,014
Hochfrontal Mark periph re	18 / 0 / 0 / 2	11 / 2 / 2 / 4	18 / 1 / 0 / 0	0,022
Hochfrontal perivaskulär li	19 / 0 / 1 / 0	12 / 3 / 2 / 2	19 / 0 / 0 / 0	0,006
Hochfrontal perivaskulär re	19 / 0 / 1 / 0	12 / 3 / 3 / 1	19 / 0 / 0 / 0	0,006
Hochfrontal gesamt rechts	18 / 0 / 0 / 2	11 / 0 / 4 / 4	18 / 0 / 0 / 1	0,016
Caudatum perivaskulär li	18 / 0 / 1 / 1	14 / 3 / 0 / 2	19 / 0 / 0 / 0	0,045
Temporal Mark peripher li	15 / 0 / 0 / 2	11 / 1 / 5 / 2	19 / 0 / 0 / 0	0,002
Temporal Mark peripher re	14 / 0 / 0 / 2	12 / 1 / 4 / 2	19 / 0 / 0 / 0	0,014
Temporal perivaskulär re	14 / 0 / 0 / 2	12 / 4 / 1 / 2	19 / 0 / 0 / 0	0,014
Temporal gesamt links	15 / 0 / 0 / 2	10 / 1 / 6 / 2	18 / 0 / 1 / 0	0,004
Temporal gesamt rechts	14 / 0 / 0 / 2	9 / 3 / 5 / 2	18 / 0 / 1 / 0	0,002

Anmerkungen zu Tabelle 4: p-Werte (Fisher Exakt) Bonferroni korrigiert; Abkürzungen: IFG – inferiorer frontaler Gyrus, periph – peripher, li – links, re – rechts; Anzahl der Fälle variiert: in wenigen Hirnschnitten Temporalmark oder gesamter Temporalpol fehlend

Zwischen den Diagnosegruppen der Gesunden und Depressiven (wobei hier die Subtypen der unipolaren und bipolar affektiven Störungen zusammengefasst wurden) fanden sich für mehrere Areale Bonferroni korrigierte signifikante Unterschiede bezüglich Zellquantitäten

CD3- sowie CD20-positiver Lymphozyten. (Tab. 5). Entsprechend konnten T-Zell-Erhöhungen insbesondere temporal, sowie vermehrte B-Zell-Quantitäten vor allem orbital, hochfrontal und temporal bei Patienten mit affektiven Störungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen eruiert werden (Tab.5).

Tabelle 5: Signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und allen affektiv Erkrankten bezüglich **CD3-** sowie **CD20-** positiver Zellen für Areale mit signifikanten Gruppendifferenzen

Region	Gesund / Depression p-Wert
CD3	
Hochfrontal gesamt links	0,022
Gyrus cinguli gesamt rechts	0,009
Temporal Kortex rechts	0,010
Temporal Mark peripher rechts	0,039
Temporal perivaskulär rechts	0,026
Temporal gesamt links	0,047
Temporal gesamt rechts	0,001
CD20	
Orbital Kortex rechts	0,041
Orbital perivaskulär links	0,036
Orbital perivaskulär rechts	0,025
Orbital gesamt rechts	0,037
IFG Kortex links	0,024
Hochfrontal Kortex links	0,025
Hochfrontal Kortex rechts	0,024
Hochfrontal perivaskulär links	0,023
Hochfrontal perivaskulär rechts	0,023
Temporal Mark peripher links	0,010
Temporal Mark peripher rechts	0,025
Temporal perivaskulär rechts	0,024
Temporal gesamt links	0,039
Temporal gesamt rechts	0,022

Anmerkungen zu Tabelle 5: p-Werte (Fisher Exakt) Bonferroni korrigiert; Abkürzung: IFG – inferiorer frontaler Gyrus

3.1.3 Unterschiede in den diagnostischen Untergruppen der semiquantitativen Methode

In Tabellen 6 und 7 sind die Ratings von CD3- sowie CD20-positiven Lymphozyten für die Untergruppen der paranoiden und residualen Schizophrenen, unipolaren und bipolaren Depressiven sowie der Gesunden dargestellt.

Hierbei zeigten sich in der Gruppe der bipolar Depressiven, bezüglich CD3-positiver Zellen, bei jeweils 5 / 9 Patientenfällen erhöhte Zellzahlen dorsolateral rechts ($p = 0,013$), im rechten Gyrus cinguli ($p = 0,001$), im rechten peripheren Temporalmark ($p = 0,004$), sowie im gesamten Temporalpol rechts ($p = 0,001$) (Tab.6).

Hinsichtlich CD20-positiver B-Zellen waren erhöhte Zellquantitäten ebenfalls bei Patienten mit bipolar affektiven Störungen zu eruieren. Entsprechend konnten in 5 / 9 Fällen hochfrontal rechts ($p = 0,021$) und im linken peripheren Temporalmark ($p = 0,001$) mäßig viele bzw. viele B-Lymphozyten ausgemacht werden (Tab.7).

Tabelle 6: Ratings bezüglich **CD3**-positiver Zellen in Arealen mit signifikanten Differenzen und nahezu signifikanten Differenzen ($p < 0,1$) für die diagnostischen Untergruppen

Region	Sz para <i>n</i> = 9	Sz resid <i>n</i> = 9	Dep uni <i>n</i> = 10	Dep bip <i>n</i> = 9	Gesund <i>n</i> = 19	p-Wert
	<i>keine Zellen / wenige Zellen / mäßig viele Zellen / viele Zellen</i>					
Orbital Mark peripher rechts	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	8 / 0 / 0 / 2	5 / 1 / 0 / 3	18 / 0 / 1 / 0	0,038
IFG gesamt re	7 / 1 / 0 / 1	8 / 0 / 0 / 1	7 / 0 / 2 / 1	5 / 0 / 1 / 3	18 / 0 / 1 / 0	0,074
Dorsolateral gesamt rechts	8 / 1 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	8 / 0 / 1 / 1	4 / 0 / 1 / 4	18 / 0 / 1 / 0	0,013
Hochfrontal Mark periph li	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	8 / 1 / 0 / 1	5 / 1 / 0 / 3	19 / 0 / 0 / 0	0,020
Hochfrontal ge- samt links	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	7 / 0 / 2 / 1	3 / 2 / 0 / 4	18 / 1 / 0 / 0	0,001
Hochfrontal ge- samt rechts	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	7 / 0 / 2 / 1	3 / 2 / 0 / 4	17 / 1 / 0 / 0	0,005
Gyrus cinguli Kortex links	9 / 0 / 0 / 0	7 / 1 / 0 / 1	8 / 1 / 1 / 0	5 / 2 / 2 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,018
Gyrus cinguli Kortex rechts	9 / 0 / 0 / 0	7 / 1 / 0 / 1	8 / 1 / 1 / 0	5 / 2 / 2 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,018
Gyrus cinguli perivaskulär re	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 1 / 0	8 / 2 / 0 / 0	5 / 2 / 0 / 2	19 / 0 / 0 / 0	0,004
Gyrus Cinguli gesamt rechts	9 / 0 / 0 / 0	7 / 1 / 0 / 1	8 / 1 / 0 / 1	3 / 1 / 3 / 2	19 / 0 / 0 / 0	0,001
Temporal Kor- tex rechts	7 / 0 / 0 / 0	6 / 0 / 1 / 0	5 / 3 / 2 / 0	6 / 1 / 2 / 0	18 / 0 / 0 / 0	0,011
Temporal Mark peripher re	7 / 0 / 0 / 0	6 / 0 / 0 / 1	8 / 1 / 0 / 1	4 / 0 / 3 / 2	18 / 0 / 0 / 0	0,004
Temporal peri- vaskulär re	7 / 0 / 0 / 0	6 / 0 / 0 / 1	7 / 1 / 1 / 1	5 / 1 / 2 / 1	18 / 0 / 0 / 0	0,068
Temporal ge- samt links	8 / 0 / 0 / 0	7 / 0 / 0 / 1	6 / 2 / 1 / 1	4 / 1 / 2 / 2	17 / 1 / 0 / 0	0,040
Temporal ge- samt rechts	7 / 0 / 0 / 0	6 / 0 / 0 / 1	5 / 3 / 1 / 1	4 / 0 / 3 / 2	18 / 0 / 0 / 0	0,001

Anmerkungen zu Tabelle 6: p-Werte (Fisher Exakt) Bonferroni korrigiert; Abkürzungen: Sz – Schizophrenie, Dep – Depression, para – paranoid, resid – residual, uni – unipolar, bip – bipolar; signifikante p-Werte fett gedruckt; Anzahl der Fälle variiert: in wenigen Hirnschnitten Temporalmark oder gesamter Temporalpol fehlend

Tabelle 7: Ratings bezüglich **CD20**-positiver Zellen in Arealen mit signifikanten Differenzen und nahezu signifikanten Differenzen ($p < 0,1$) für die diagnostischen Untergruppen

Region	Sz para <i>n</i> = 9	Sz resid <i>n</i> = 9	Dep uni <i>n</i> = 10	Dep bip <i>n</i> = 9	Gesund <i>n</i> = 19	p-Wert
	<i>keine Zellen / wenige Zellen / mäßig viele Zellen / viele Zellen</i>					
Orbital Kortex links	8 / 1 / 0 / 0	7 / 1 / 1 / 0	5 / 3 / 2 / 0	6 / 0 / 3 / 0	18 / 1 / 0 / 0	0,029
Orbital Mark periph li	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	7 / 0 / 1 / 2	5 / 0 / 3 / 1	18 / 0 / 1 / 0	0,045
Orbital Mark periph re	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	6 / 0 / 1 / 3	6 / 0 / 2 / 1	18 / 0 / 1 / 0	0,053
Orbital perivaskulär li	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	6 / 1 / 2 / 1	4 / 3 / 2 / 0	18 / 0 / 1 / 0	0,007
Orbital perivaskulär re	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	5 / 2 / 2 / 1	5 / 3 / 1 / 0	18 / 0 / 1 / 0	0,010
Orbital gesamt rechts	8 / 1 / 0 / 0	7 / 1 / 0 / 1	5 / 1 / 1 / 3	5 / 0 / 3 / 1	18 / 0 / 1 / 0	0,015
IFG Kortex links	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 1 / 0	7 / 1 / 2 / 0	5 / 0 / 4 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,006
IFG gesamt links	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	7 / 0 / 1 / 2	4 / 1 / 2 / 2	18 / 0 / 0 / 1	0,041
Dorsolateral Kortex li	7 / 1 / 0 / 1	8 / 0 / 1 / 0	7 / 0 / 3 / 0	6 / 0 / 3 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,010
Dorsolateral Kortex re	8 / 1 / 0 / 0	8 / 0 / 1 / 0	7 / 0 / 3 / 0	6 / 0 / 3 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,013
Hochfrontal Kortex li	9 / 0 / 0 / 0	7 / 0 / 2 / 0	7 / 1 / 2 / 0	5 / 1 / 3 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,012
Hochfrontal Kortex re	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 1 / 0	7 / 1 / 2 / 0	5 / 1 / 3 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,014
Hochfrontal Mark peripher rechts	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	7 / 0 / 2 / 1	4 / 2 / 0 / 3	18 / 1 / 0 / 0	0,006
Hochfrontal perivask li	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 1 / 0	8 / 0 / 2 / 0	4 / 3 / 2 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,000
Hochfrontal perivask re	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 1 / 0	8 / 0 / 2 / 0	4 / 3 / 1 / 1	19 / 0 / 0 / 0	0,001
Hochfrontal gesamt re	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	7 / 0 / 2 / 1	4 / 0 / 2 / 3	18 / 0 / 0 / 1	0,021
Caudatum perivask li	9 / 0 / 0 / 0	8 / 0 / 0 / 1	7 / 1 / 0 / 2	7 / 2 / 0 / 0	19 / 0 / 0 / 0	0,032
Temporal Mark peripher links	7 / 0 / 0 / 0	7 / 0 / 0 / 1	8 / 0 / 1 / 1	3 / 1 / 4 / 1	19 / 0 / 0 / 0	0,001
Temporal Mark peripher rechts	7 / 0 / 0 / 0	6 / 0 / 0 / 1	8 / 0 / 1 / 1	4 / 1 / 3 / 1	19 / 0 / 0 / 0	0,010
Temporal perivask re	7 / 0 / 0 / 0	6 / 0 / 0 / 1	7 / 2 / 0 / 1	5 / 2 / 1 / 1	19 / 0 / 0 / 0	0,035
Temporal gesamt links	7 / 0 / 0 / 0	7 / 0 / 0 / 1	6 / 0 / 3 / 1	4 / 1 / 3 / 1	18 / 0 / 1 / 0	0,023
Temporal gesamt rechts	7 / 0 / 0 / 0	6 / 0 / 0 / 1	5 / 2 / 2 / 1	4 / 1 / 3 / 1	18 / 0 / 1 / 0	0,021

Anmerkungen zu Tabellen 7: p-Werte (Fisher Exakt) Bonferroni korrigiert; Abkürzungen: Sz – Schizophrenie, Dep – Depression, para – paranoid, resid – residual, uni – unipolar, bip – bipolar, li – links, re – rechts, periph – peripher, perivask – perivaskulär; Anzahl der Fälle variiert: in wenigen Hirnschnitten Temporalmark oder gesamter Temporalpol fehlend

Bei Vergleich der Zellquantitäten zwischen Gesunden und Patienten der affektiven Subtypen (unipolar, bipolar) konnten ebenso Bonferroni korrigierte signifikante Unterschiede für CD3-positive (T-), sowie CD20-positive (B-) Lymphozyten gefunden werden.

Entsprechend zeigten sich im rechten temporalen Kortex ($p = 0,020$) sowie für den gesamten rechten Temporalpol ($p = 0,023$) signifikante Differenzen hinsichtlich T-Zellen zwischen Gesunden und einerseits unipolar Depressiven; sowie andererseits bipolar Depressiven links hochfrontal ($p = 0,007$), im rechten Gyrus cinguli ($0,002$), im rechten peripheren Temporalmark ($p = 0,013$) und im gesamten rechten Temporalpol ($p = 0,015$) (Tab. 8).

Bezüglich (CD20-positiver) B-Zellen, konnten signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und der Gruppe mit bipolar affektiven Störungen hochfrontal perivaskulär links ($p = 0,012$) und rechts ($p = 0,011$), sowie im peripheren Temporalmark links ($p = 0,002$) und rechts ($p = 0,011$) eruiert werden (Tab. 8). Ein Vergleich unipolar Depressiver und Gesunder erbrachte keine signifikanten Differenzen bezüglich CD20-positiver Zellen.

Auch zwischen den Diagnosegruppen der residualen oder paranoiden Schizophrenen und den Gesunden bezüglich CD3- oder CD20-positiver Lymphozyten konnten jeweils keine signifikanten Unterschiede bezüglich Zellquantitäten festgestellt werden.

Tabelle 8: Signifikante Unterschiede zwischen Diagnosegruppen bezüglich **CD3**-positiver sowie **CD20**-positiver Lymphozyten für Areale mit signifikanten Gruppendifferenzen

Region	Gesund / Depression uni p-Wert	Gesund / Depression bip p-Wert
CD3		
Hochfrontal links gesamt	n.s.	0,007
Gyrus Cinguli rechts gesamt	n.s.	0,002
Temporal Kortex rechts	0,020	n.s.
Temporal Mark peripher rechts	n.s.	0,013
Temporal rechts gesamt	0,023	0,015
CD20		
Hochfrontal perivaskulär links	n.s.	0,012
Hochfrontal perivaskulär rechts	n.s.	0,011
Temporal Mark peripher links	n.s.	0,002
Temporal Mark peripher rechts	n.s.	0,011

Anmerkungen zu Tabelle 8: p-Werte (Fisher Exakt) Bonferroni korrigiert; Abkürzungen: uni – unipolar, bip – bipolar, n.s. – nicht signifikant; signifikante p-Werte fett gedruckt

3.1.4 Auswirkungen konfundierender Variablen

Für das Auftreten von T- und B-Lymphozyten zeigten sich zwischen strangulierten Patienten und nichtstrangulierten Patienten signifikante Unterschiede.

In diesem Sinne konnten signifikant mehr CD3-positive Zellen dorsolateral rechts ($p = 0,018$), hochfrontal links ($p = 0,017$) und rechts ($p = 0,017$) sowie perivaskulär temporal rechts ($p = 0,017$) gefunden werden. Dementsprechend zeigten die Ratings für T-Zellen ein vermehrtes Zellaufkommen (Rating 3: viele Zellen) bei 5 / 10 Strangulierten für die Areale: dorsolateral rechts, sowie hochfrontal für beide Hemisphären (Tab. 9).

Bezüglich CD20-positiver Zellen konnten im peripheren Orbitalmark rechts ($p = 0,027$), im peripheren Temporalmark links ($p = 0,012$) und rechts ($p = 0,012$), sowie im gesamten Temporalpol links ($p = 0,022$) und rechts ($p = 0,007$) signifikant mehr entsprechende Lymphozyten bei Patienten, die durch Strangulation zu Tode kamen, eruiert werden (Tab. 10).

Die entsprechenden Ratings für CD20-positive B-Zellen zeigten signifikant erhöhte Zellzahlen (Rating 2 oder 3: mäßig viele bzw. viele Zellen) bei 5 / 10 untersuchten Patientenfällen im rechten peripheren Orbitalmark, sowie bei 4 / 10 Fällen temporal links (Tab. 10).

Es kann sich bei den signifikanten Unterschieden zwischen Depressiven und Gesunden um Strangulationseffekte oder tatsächliche Krankheitseffekte auf Grund einer ausgeprägteren Pathologie der Betroffenen handeln. Die hiesige Untersuchung kann diesen Sachverhalt nicht grundlegend klären.

Tabelle 9: Ratings und p-Werte bezüglich Strangulation für **CD3**-positive Zellen in Arealen mit signifikanten Gruppendifferenzen

Region	Strangulation	Keine Strangulation	p-Wert
	<i>n = 10</i>	<i>n = 29</i>	
	<i>keine / wenige / mäßig viele / viele Zellen</i>		
Orbital Mark peripher rechts	6 / 0 / 0 / 4	25 / 1 / 0 / 3	0,129
IFG gesamt rechts	6 / 0 / 0 / 4	22 / 1 / 3 / 3	0,214
Dorsolateral gesamt rechts	5 / 0 / 0 / 5	24 / 1 / 2 / 2	0,018
Hochfrontal Mark peripher links	6 / 0 / 0 / 4	25 / 2 / 0 / 2	0,063
Hochfrontal gesamt links	5 / 0 / 0 / 5	23 / 2 / 2 / 2	0,017
Hochfrontal gesamt rechts	5 / 0 / 0 / 5	23 / 2 / 2 / 2	0,017
Gyrus cinguli Kortex links	7 / 2 / 1 / 0	23 / 3 / 2 / 1	0,750
Gyrus cinguli Kortex rechts	7 / 2 / 1 / 0	23 / 3 / 2 / 1	0,750
Gyrus cinguli perivaskulär rechts	6 / 3 / 0 / 1	25 / 2 / 1 / 1	0,135
Gyrus cinguli gesamt rechts	6 / 0 / 1 / 3	22 / 3 / 2 / 2	0,243
Temporal Kortex rechts	6 / 0 / 3 / 0	19 / 4 / 3 / 0	0,214
Temporal Mark peripher rechts	5 / 0 / 1 / 3	21 / 1 / 2 / 2	0,239
Temporal perivaskulär rechts	5 / 1 / 0 / 3	21 / 1 / 3 / 1	0,017
Temporal gesamt links	6 / 0 / 2 / 2	20 / 3 / 2 / 2	0,292
Temporal gesamt rechts	5 / 0 / 1 / 3	18 / 3 / 3 / 2	0,242

Anmerkungen zu Tabellen 9: p-Werte (Fisher Exakt) Bonferroni korrigiert; Abkürzung: IFG – inferiorer frontaler Gyrus; signifikante p-Werte fett gedruckt; Anzahl der Fälle variiert: in wenigen Hirnschnitten Temporalmark oder gesamter Temporalpol fehlend

Tabelle 10: Ratings und p-Werte bezüglich Strangulation für **CD20**-positive Zellen in Area-
len mit signifikanten Gruppendifferenzen

Region	Strangulation <i>n</i> = 10	Keine Strangulation <i>n</i> = 29	p-Wert
	<i>keine / wenige / mäßig viele / viele Zellen</i>		
Orbital Kortex links	5 / 1 / 4 / 0	23 / 2 / 4 / 0	0,129
Orbital Mark peripher links	6 / 0 / 1 / 3	24 / 0 / 3 / 2	0,139
Orbital Mark peripher rechts	5 / 0 / 1 / 4	25 / 0 / 2 / 2	0,027
Orbital perivaskulär links	7 / 1 / 1 / 1	22 / 3 / 3 / 1	0,891
Orbital perivaskulär rechts	6 / 1 / 2 / 1	23 / 4 / 1 / 1	0,230
Orbital gesamt rechts	5 / 0 / 1 / 4	21 / 3 / 3 / 2	0,085
IFG Kortex links	6 / 0 / 4 / 0	24 / 1 / 4 / 0	0,219
IFG gesamt links	6 / 0 / 0 / 4	23 / 1 / 3 / 2	0,082
Dorsolateral Kortex links	6 / 0 / 4 / 0	23 / 1 / 4 / 1	0,304
Dorsolateral Kortex rechts	6 / 0 / 4 / 0	24 / 1 / 4 / 0	0,219
Hochfrontal Kortex links	6 / 1 / 3 / 0	23 / 1 / 5 / 0	0,302
Hochfrontal Kortex rechts	6 / 1 / 3 / 0	24 / 1 / 4 / 0	0,273
Hochfrontal Mark peripher re	6 / 0 / 0 / 4	23 / 2 / 2 / 2	0,116
Hochfrontal perivaskulär links	7 / 0 / 1 / 2	24 / 3 / 2 / 0	0,100
Hochfrontal perivaskulär rechts	7 / 0 / 2 / 1	24 / 3 / 2 / 0	0,157
Hochfrontal gesamt rechts	5 / 0 / 1 / 4	24 / 0 / 3 / 2	0,055
Caudatum perivaskulär links	6 / 1 / 1 / 2	26 / 2 / 0 / 1	0,067
Temporal Mark peripher links	5 / 1 / 0 / 3	21 / 0 / 5 / 1	0,012
Temporal Mark peripher rechts	4 / 1 / 0 / 3	22 / 0 / 4 / 1	0,012
Temporal perivaskulär rechts	5 / 0 / 0 / 3	21 / 4 / 1 / 1	0,064
Temporal gesamt links	4 / 1 / 1 / 3	21 / 0 / 5 / 1	0,022
Temporal gesamt rechts	3 / 2 / 0 / 3	20 / 1 / 5 / 1	0,007

Anmerkungen zu Tabellen 10: p-Werte (Fisher Exakt) Bonferroni korrigiert; Abkürzungen: IFG – inferiorer frontaler Gyrus, re – rechts; signifikante p-Werte fett gedruckt; Anzahl der Fälle variiert: in wenigen Hirnschnitten Temporalmark oder gesamter Temporalpol fehlend

Es konnte festgestellt werden, dass das Gehirngewicht strangulierter Patienten (Median, Md = 1515 g) signifikant von den Hirnen nichtstrangulierter Patienten (Md = 1330 g; $p = 0,005$) abweicht. Dies kann das Resultat von Hirnödemen sein, welche auf die Todesart zurückzuführen sind (Abb. 6).

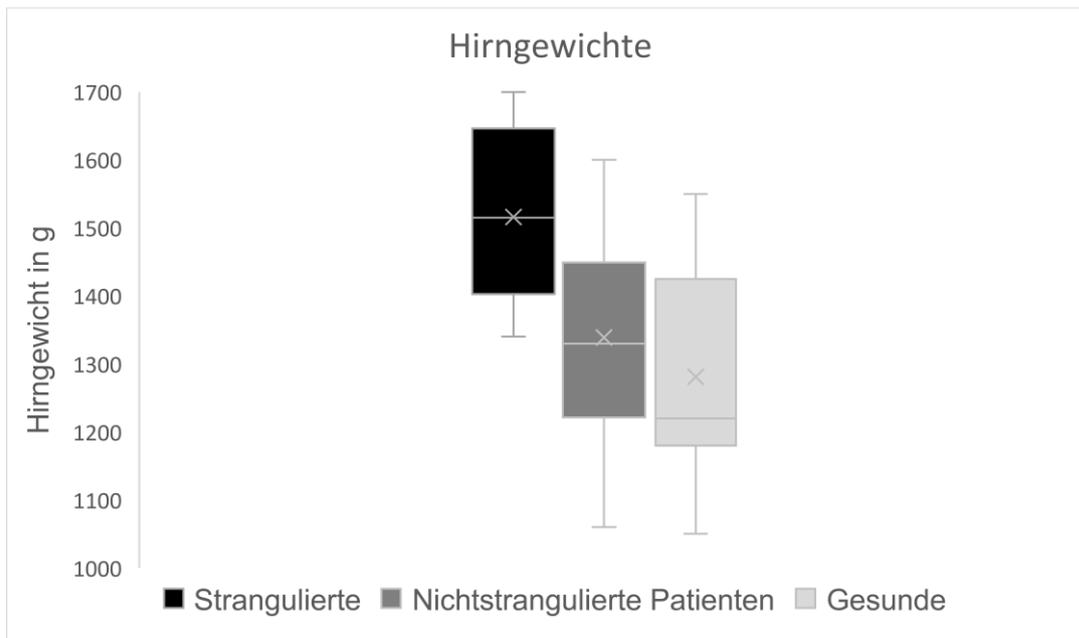


Abbildung 6: Hirngewichte bei strangulierten Patienten, nichtstrangulierten Patienten und Gesunden (Mittelwerte; Mediane; obere, untere Quartile; Minimum, Maximum)

Die Auswertungen für alle Gehirnregionen, welche signifikante Gruppendifferenzen zeigten, wurden mit den möglichen konfundierenden Variablen Fixationszeit, Autolyse und Krankheitsdauer korreliert. Dabei konnten für mehrere Areale signifikante positive Korrelationen nachgewiesen werden.

Entsprechend fanden sich in der Gruppe der affektiv Erkrankten bezüglich erhöhter (CD3-positiver) T-Zell-Quantitäten signifikante Korrelationen mit der Krankheitsdauer im gesamten rechten IFG ($r_s = 0,622$, $p = 0,018$), im linken peripheren Marklager hochfrontal ($r_s = 0,582$, $p = 0,029$), im rechten ($r_s = 0,617$, $p = 0,019$) und linken Kortex ($r_s = 0,617$, $p = 0,019$) des Gyrus Cinguli, im temporalen Marklager peripher rechts ($r_s = 0,756$, $p = 0,002$), sowie im gesamten Temporalpol ($r_s = 0,588$, $p = 0,038$) (Tab. A.1).

Für die Gruppe der Schizophrenen konnten signifikante Korrelationen bezüglich erhöhter Zellzahlen CD3-positiver Lymphozyten und Fixationsdauer im linken ($r_s = 0,473$, $p = 0,041$) und rechten ($r_s = 0,473$, $p = 0,041$) Kortex des Gyrus cinguli, sowie im gesamten rechten Gyrus cinguli ($r_s = 0,481$, $p = 0,037$) eruiert werden (Tab. A.1).

Hinsichtlich des vermehrten Auftretens von CD-20-positiven B-Zellen waren in der Schizophrenie-Gruppe signifikante positive Korrelationen vermehrter Zellquantitäten mit der Fixationsdauer im jeweils linken Kortex orbital ($r_s = 0,481$, $p = 0,037$) und hochfrontal ($r_s = 0,475$, $p = 0,040$) zu finden (Tab. A.2).

3.2 Quantitative Auswertung

3.2.1 Validierung der automatisierten Zellzählung

Zur Überprüfung der Validität der Messung sowie der angewandten Filterkriterien wurden 100 Einzelbilder verschiedener Hirnregionen, welche CD3-positive Zellen enthielten, zufällig ausgewählt und manuell ausgezählt. Ein Einzelbild (in 100-facher Mikroskopvergrößerung, lineare Auflösung: $0,36937 \mu\text{m}/\text{px}$, Bildgröße: $12589 \times 21076 \text{ px}$) wurde jeweils im Ganzen durchsucht und stellte so somit ein Zählfeld dar. Zellen, die vom Computer nicht erkannt wurden (falsch Negative), wurden dabei miterfasst, wobei Partikel, die im automatisierten Verfahren fälschlicherweise mitgezählt wurden (falsch Positive), in der manuellen Auszählung nicht eingeschlossen waren. Im Vergleich zwischen der automatisierten Zellzählung und der manuellen Erhebung aller sichtbaren Zellen, ergab sich ein Spearman Korrelationskoeffizient von $r_s = 0,938$ ($p < 0,001$). Damit lag eine zufriedenstellende Validierung der automatisiert-quantitativen Methode zur Zellzahlbestimmung vor (Abb.7).

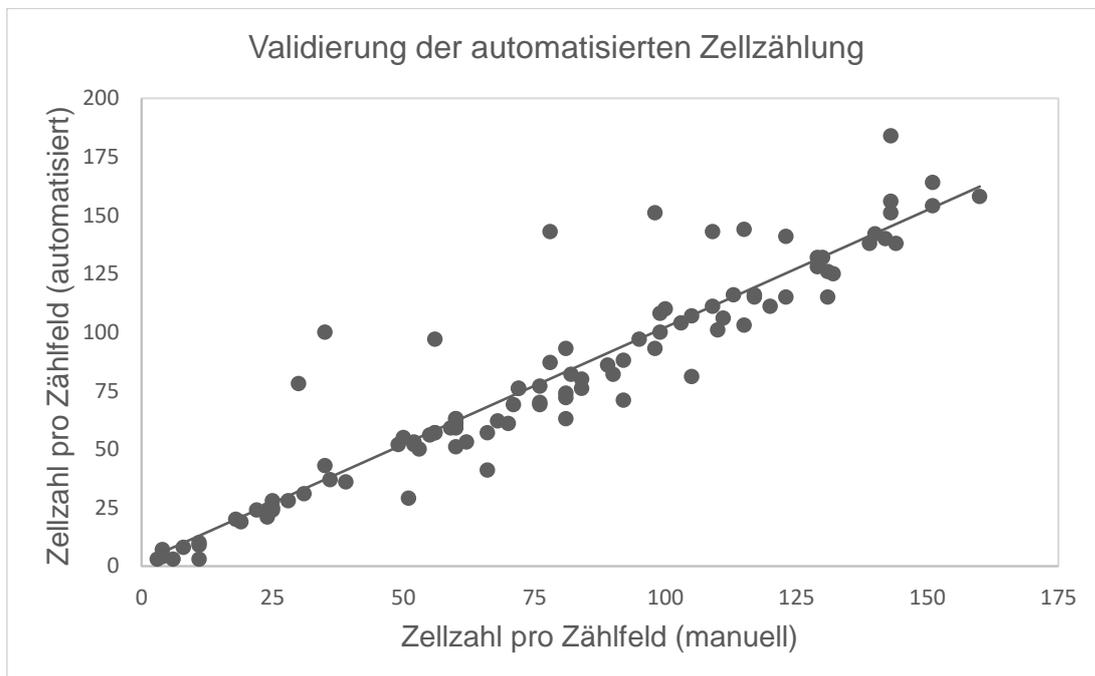


Abbildung 7: Spearman-Korrelation der automatisierten Erfassung CD3-positiver Zellen mit der manuellen Zellzählung bei 100 zufällig ausgewählten Bildern ($r_s = 0,938$, $p < 0,001$) zur Validierung der automatisierten Zellzählung

3.2.2 Unterschiede in den Hauptgruppen der quantitativen Methode

Nach der automatisierten Zellzählung konnten Regionen mit signifikanten Unterschieden für das Auftreten von CD3- sowie CD20-positiven Zellen zwischen den Gruppen der Schizophrenen, Depressiven und Gesunden identifiziert werden, welche in den nachfolgenden Tabellen dargestellt sind. Zudem finden sich die zu der jeweiligen Diagnosegruppe zugehörigen Medianwerte (Md), welche auf Grund der nicht normalverteilten Daten zur Beschreibung der Ergebnisse geeignet sind. Zusätzlich werden die untere und obere Quartile mit angegeben, welche die Daten präzisieren.

Innerhalb der betroffenen Areale wiesen jeweils die kortikalen Bereiche erhöhte Zellzahlen auf. In diesem Sinne zeigten sich in der CD3-Färbung im orbitalen Kortex beidseitig signifikante Differenzen bezüglich der Lymphozytenzahlen zwischen Schizophrenen, Depressiven und Gesunden (links: $p = 0,023$, rechts: $p = 0,043$) (Tab. 11).

In Hinblick auf CD20-positive Zellen fanden sich im orbitalen Kortex rechts ($p = 0,032$), im linken dorsolateralen Kortex ($p = 0,030$), jeweils beidseits im hochfrontalen Kortex (links: $p = 0,014$, rechts: $p = 0,018$), sowie im temporalen Kortex (links: $p = 0,022$; rechts: $p = 0,043$, Depressive: Md = 0,50) und im rechten Temporalmark ($p = 0,029$) entsprechende Differenzen. Zudem konnten im Caudatum der linken Hemisphäre erhöhte B-Zellzahlen in der Gruppe der affektiv Erkrankten ($p = 0,027$; Md = 0,50) eruiert werden (Tab. 11).

Eine Analyse der Hauptgruppendifferenzen erbrachte in der quantitativen Methode signifikante Abweichungen der CD3- und CD20-positiven Zellzahlen zwischen Gesunden und Depressiven in verschiedenen Arealen.

Entsprechend waren im Orbitalkortex (links: $p = 0,029$) erhöhte CD3-positive Zellquantitäten zu verzeichnen (Tab. 12).

Bezüglich CD20-positiver B-Zellen konnten im linken hochfrontalen Kortex ($p = 0,023$), im linken Temporalkortex ($p = 0,044$) sowie im rechten Temporalmark ($p = 0,034$) signifikant höhere Zellzahlen in der Gruppe der affektiv Erkrankten im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden (Tab. 12).

Tabelle 11: Mediane (untere, obere Quartile) und p-Werte für **CD3**-positive sowie **CD20**-positive Zellen für Areale mit signifikanten Differenzen zwischen den Diagnosegruppen

Region	Schizophrenie <i>n</i> =20	Depression <i>n</i> =19	Gesund <i>n</i> =19	p-Wert
Mediane (unteres Quartil, oberes Quartil)				
CD3				
Orbital Kortex links	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 1,50)	0,00 (0,00; 0,00)	0,023
Orbital Kortex rechts	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 1,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,043
CD20				
Orbital Kortex rechts	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 2,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,032
Dorsolateral Kortex links	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 1,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,030
Hochfrontal Kortex links	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 5,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,014
Hochfrontal Kortex rechts	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 14,50)	0,00 (0,00; 0,00)	0,018
Caudatum links	0,00 (0,00; 0,50)	0,50 (0,00; 4,50)	0,50 (0,00; 2,00)	0,027
Temporal Kortex links	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 9,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,022
Temporal Kortex rechts	0,00 (0,00; 0,25)	0,50 (0,00; 8,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,043
Temporal Mark rechts	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 2,50)	0,00 (0,00; 0,00)	0,029

Anmerkungen zu Tabelle 11: p-Werte (H-test) FDR-korrigiert (FDR = false discovery rate)

Tabelle 12: Signifikante Unterschiede und nahezu signifikante Differenzen ($p < 0,1$) zwischen den Diagnosegruppen bezüglich **CD3**- sowie **CD20**-positiver Lymphozyten für Areale mit signifikanten Gruppendifferenzen

Region	Gesund / Depression p-Wert
CD3	
Orbital Kortex links	0,029
Orbital Kortex rechts	0,056
CD20	
Orbital Kortex rechts	0,061
Dorsolateral Kortex links	0,066
Hochfrontal Kortex links	0,023
Hochfrontal Kortex rechts	0,050
Temporal Kortex links	0,044
Temporal Kortex rechts	0,061
Temporal Mark rechts	0,034

Anmerkungen zu Tabelle 12: p-Werte (U-Test) FDR-korrigiert (FDR = false discovery rate); signifikante p-Werte fett gedruckt

3.2.3 Unterschiede in den diagnostischen Untergruppen der quantitativen Methode

In der nachfolgenden Tabelle sind die gefundenen Unterschiede zwischen den diagnostischen Untergruppen und deren Mediane, sowie jeweils die untere und obere Quartile dargestellt.

Hinsichtlich CD3-positiver Lymphozyten konnten signifikante Abweichungen im orbitalen linken Kortex ($p = 0,010$) gefunden werden, wobei die Gruppe der bipolar Depressiven ($Md = 1,00$) die höchsten Zellzahlen aufwies. (Tab. 13).

Bezüglich CD20-positiver Zellen fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Untergruppen in verschiedenen Regionen. Hohe Zellzahlen konnten für die Gruppe der bipolar affektiven Störungen im orbitalen Kortex rechts ($Md = 1,00$; $p = 0,013$) sowie beidseits im hochfrontalen Kortex (links: $Md = 0,50$; $p = 0,017$; rechts: $Md = 2,50$; $p = 0,013$). Auch im

linken Caudatum ($Md = 4,00$; $p = 0,015$) und linkem Temporalkortex ($Md = 1,50$; $p = 0,014$) waren höhere Lymphozytenzahlen bei den bipolar Depressiven als in den anderen Subgruppen zu finden. Im rechten temporalen Kortex konnten dagegen signifikant höhere Zellzahlen in der Gruppe der unipolar Depressiven ($Md = 1,00$, $p = 0,039$) im Vergleich zu den anderen Untergruppen und Gesunden eruiert werden (Tab. 13).

Eine Analyse der Untergruppendifferenzen zwischen Gesunden und Erkrankten erbrachte signifikante Differenzen für T-Lymphozyten zwischen Gesunden und bipolar Depressiven im linken Orbitalkortex ($p = 0,010$), sowie im linken Caudatum ($p = 0,012$) (Tab. 14). Dagegen waren bezüglich B-Lymphozyten signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und bipolar Depressiven im orbitalen Kortex in beiden Hirnhemisphären (links: $p = 0,020$; rechts: $p = 0,026$), sowie im linken Kortex des IFG ($p = 0,024$), im linken Temporalkortex ($p = 0,034$) und im rechten Temporalmark ($p = 0,028$) zu finden (Tab. 14).

Der separate Vergleich der diagnostischen Untergruppen mit den psychisch gesunden Kontrollfällen ergab, dass nur bei den uni- und bipolar depressiven Patienten erhöhte CD3- oder CD20-Lymphozytenzahlen vorlagen. Dagegen konnten weder für die Schizophrenen als Gesamtgruppe noch für eine der beiden schizophrenen Subgruppen (paranoide, residuale) signifikante Differenzen im Vergleich zu den anderen Diagnosegruppen gefunden wurden.

Tabelle 13: Mediane (unteres, oberes Quartil) und p-Werte bezüglich **CD3**-positiver sowie **CD20**-positiver Zellen der entsprechenden diagnostischen Untergruppen für Areale mit signifikanten Gruppendifferenzen

Region	Sz paranoid <i>n=9</i>	Sz residual <i>n=9</i>	Dep unipolar <i>n=10</i>	Dep bipolar <i>n=9</i>	Gesunde <i>n=19</i>	p-Wert
Mediane (unteres Quartil; oberes Quartil)						
CD3						
Orbital Kor-tex links	0,00 (0,00; 0,25)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 7,625)	1,00 (0,00; 12,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,010
CD20						
Orbital Kor-tex rechts	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,50)	0,00 (0,00; 3,50)	1,00 (0,00; 2,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,013
Dorsolateral Kortex links	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,12)	0,00 (0,00; 15,75)	0,00 (0,00; 0,00)	0,017
Hochfrontal Kortex links	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,25)	0,00 (0,00; 1,50)	0,50 (0,00; 12,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,017
Hochfrontal Kortex rechts	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 3,50)	2,50 (0,00; 20,25)	0,00 (0,00; 0,00)	0,013
Caudatum links	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,50)	0,00 (0,00; 5,63)	4,00 (0,25; 5,25)	0,50 (0,00; 2,00)	0,015
Temporal Kortex links	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 7,00)	1,50 (0,00; 14,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,014
Temporal Kortex rechts	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,88)	1,00 (0,00; 8,00)	0,00 (0,00; 6,25)	0,00 (0,00; 0,00)	0,039
Temporal Mark rechts	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,62)	0,00 (0,00; 7,00)	0,00 (0,00; 0,00)	0,025

Anmerkungen zu Tabelle 13: p-Werte (H-Test) FDR korrigiert (FDR = false discovery rate); Abkürzungen: Sz – Schizophrenie, Dep – Depression

Tabelle 14: Signifikante und nahezu signifikante Differenzen (Trends, $p < 0,1$) bezüglich **CD3**- sowie **CD20**-positiver Zellen zwischen den jeweiligen Diagnosegruppen

Region	Gesund / Depression unipolar	Gesund / Depression bipolar
	p-Wert	
CD3		
Orbital Kortex links	n.s.	0,010
Caudatum links	n.s.	0,012
Temporal Kortex links	n.s.	0,092
Temporal Mark links	n.s.	0,099
CD20		
Orbital Kortex links	n.s.	0,020
Orbital Kortex rechts	n.s.	0,026
IFG Kortex links	n.s.	0,024
Hochfrontal Kortex links	n.s.	0,066
Hochfrontal Kortex rechts	n.s.	0,054
Gyrus Cinguli Kortex links	n.s.	0,099
Temporal Kortex links	n.s.	0,034
Temporal Kortex rechts	0,096	n.s.
Temporal Mark rechts	n.s.	0,028

Anmerkungen zu Tabelle 14: p-Werte (U-Test) FDR korrigiert (FDR = false discovery rate); Abkürzungen: IFG – inferiorer frontaler Gyrus, n.s. – nicht signifikant; signifikante p-Werte fett gedruckt

3.2.4 Auswirkungen konfundierender Variablen

Wie bei der semiquantitativen Analyse wurden auch für die automatisierte quantitative Analyse die Ergebnisse der Hirnregionen, für die signifikante Gruppendifferenzen vorlagen, mit den möglichen konfundierenden Variablen Autolysedauer, Fixationszeit und Krankheitsdauer korreliert, wobei keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden konnten. Somit dürfte eine artefizielle Beeinflussung der Ergebnisse durch Autolyse, Fixation und Krankheitsdauer, welche ungefähr der Medikationsdauer entsprechen dürfte, für die quantitativen Ergebnisse, ausgeschlossen sein (Tab. A.3).

In den relevanten Regionen zeigte sich für CD20-positive Lymphozyten im rechten temporalen Marklager eine signifikante Differenz zwischen strangulierten und nichtstrangulierten Patienten ($p = 0,037$), wodurch ein Effekt durch Suizid durch Erhängen für dieses Areal nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann.

3.3 Vergleich der Ergebnisse der semiquantitativen und quantitativen Methode

Ein weiteres Ziel der Arbeit war ein Vergleich der zuvor dargestellten Ergebnisse der semiquantitativen Beurteilung der Lymphozytenquantitäten mit den Ergebnissen einer vollautomatisierten Lymphozytenzahlbestimmung mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms.

Eine Spearman-Korrelationsanalyse des manuellen Ratings und der automatisierten Zellzählung für verschiedene Regionen erbrachte moderate Zusammenhänge zwischen beiden Methoden. Für das orbitale Mark rechts ($r_s = 0,548$) sowie links ($r_s = 0,513$) sind in folgender Abbildung Spearman-Korrelationen beispielhaft dargestellt (Abb. 8).

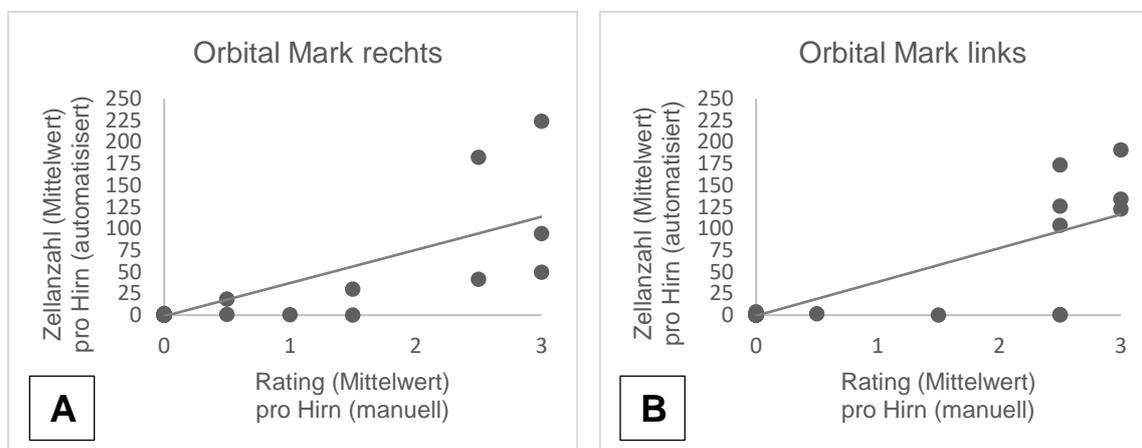


Abbildung 8: Spearman-Korrelationen der automatisierten / quantitativen Zählung CD3-positiver Zellen (Mittelwerte) mit dem Ranking (Mittelwerte) der manuellen / semiquantitativen Erfassung im (A) orbitalen Marklager rechts ($r_s = 0,548$, $p < 0,001$) sowie im (B) orbitalen Marklager links ($r_s = 0,513$, $p < 0,001$); Rating: 0 = keine Zellen, 1 = wenige Zellen, 2 = mäßig viele Zellen, 3 = viele Zellen

In Zusammenschau der Ergebnisse für die semiquantitative und die automatisierte quantitative Methode, lassen sich für beide Vorgehensweisen signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Depressiven in mehreren Arealen aufweisen.

In den meisten betroffenen Regionen zeigt sich dabei vermehrt ein Auftreten CD20-positiver (B-) Lymphozyten. Die Häufung von B-Zellen bei Depressiven im Vergleich zu Gesunden tritt bei beiden Methoden im orbitalen rechten Kortex (semiquantitativ (sq): $p = 0,041$, quantitativ (q): $p = 0,061$), im temporalen Marklager rechts (sq: $p = 0,025$, q: $p = 0,034$) sowie im hochfrontalen Kortex beidseits (links: sq: $p = 0,025$, q: $p = 0,023$; rechts: sq: $p = 0,024$, q: $p = 0,050$) auf (Tab. 15).

Hinsichtlich CD3-positiver Zellen zeigten sich in der manuellen Auswertung signifikante Häufungen im rechten temporalen Kortex ($p = 0,010$) und im rechten temporalen Marklager ($p = 0,039$), wobei die automatisierte Methode eine signifikante Erhöhung im linken orbitalen Kortex ($p = 0,029$) erbrachte. Auch hier waren erhöhte Lymphozytenzahlen bei den Depressiven im Vergleich zu den Gesunden zu finden.

Insgesamt kann außerdem für beide Methoden festgestellt werden, dass insbesondere kortikale Bereiche, im Gegensatz zu Arealen im Marklager, signifikant erhöhte Quantitäten immunreaktiver Zellen, und dies vermehrt hinsichtlich CD20-positiver Lymphozyten, aufweisen (Tab. 15).

Tabelle 15: Vergleich beider Methoden

Region	Gesund / Depression		Gesund / Depression	
	Manuell	Automatisiert	Manuell	Automatisiert
p- Wert				
CD20			CD3	
Orbital Kortex links	0,073	0,068	0,449	0,029
Orbital Kortex rechts	0,041	0,061	0,327	0,056
IFG Kortex links	0,024	0,118	0,539	0,313
Hochfrontal Kortex li	0,025	0,023	0,309	0,731
Hochfrontal Kortex re	0,024	0,050	0,311	0,229
Temporal Kortex li	0,271	0,044	0,316	0,069
Temporal Kortex re	0,457	0,061	0,010	0,621
Temporal Mark (peripher) links	0,010	0,313	0,304	0,175
Temporal Mark (peripher) rechts	0,025	0,034	0,039	0,347

Anmerkungen zu Tabelle 15: p-Werte der manuellen Methode (Fisher Exakt): Bonferroni korrigiert; p-Werte der automatisierten Methode (U-Test): FDR korrigiert (FDR = false discovery rate); Abkürzungen: IFG – inferiorer frontaler Gyrus, li – links, re – rechts; signifikante p-Werte fett gedruckt

3.4 Visualisierung der regionalen Verteilungsmuster

Nachfolgend sind ausgewählte farbcodierte Ganzhirnschnitte abgebildet, die eine regionale Verteilung von CD3-positiven (T-) und CD20-positiven (B-) Lymphozyten zeigen. Für die colorierten Areale, kam eine intuitive Farbabstufung von warmen nach kalten Farben (rot, orange = hohe Zelldichte, gelb = mäßig hohe Zelldichte, blau = niedrige Zelldichte) zur visuellen Erfassbarkeit der hirnregionalen Lymphozytenverteilung zur Anwendung (2.2.4.4). In einigen Schnitten sind vorrangig kortikale und subkortikale Infiltrationen (Abbildungen 9, 10: D) erkennbar, wogegen andere insbesondere einen Befall in der weißen Substanz aufweisen (Abbildungen 9, 10: B, C).

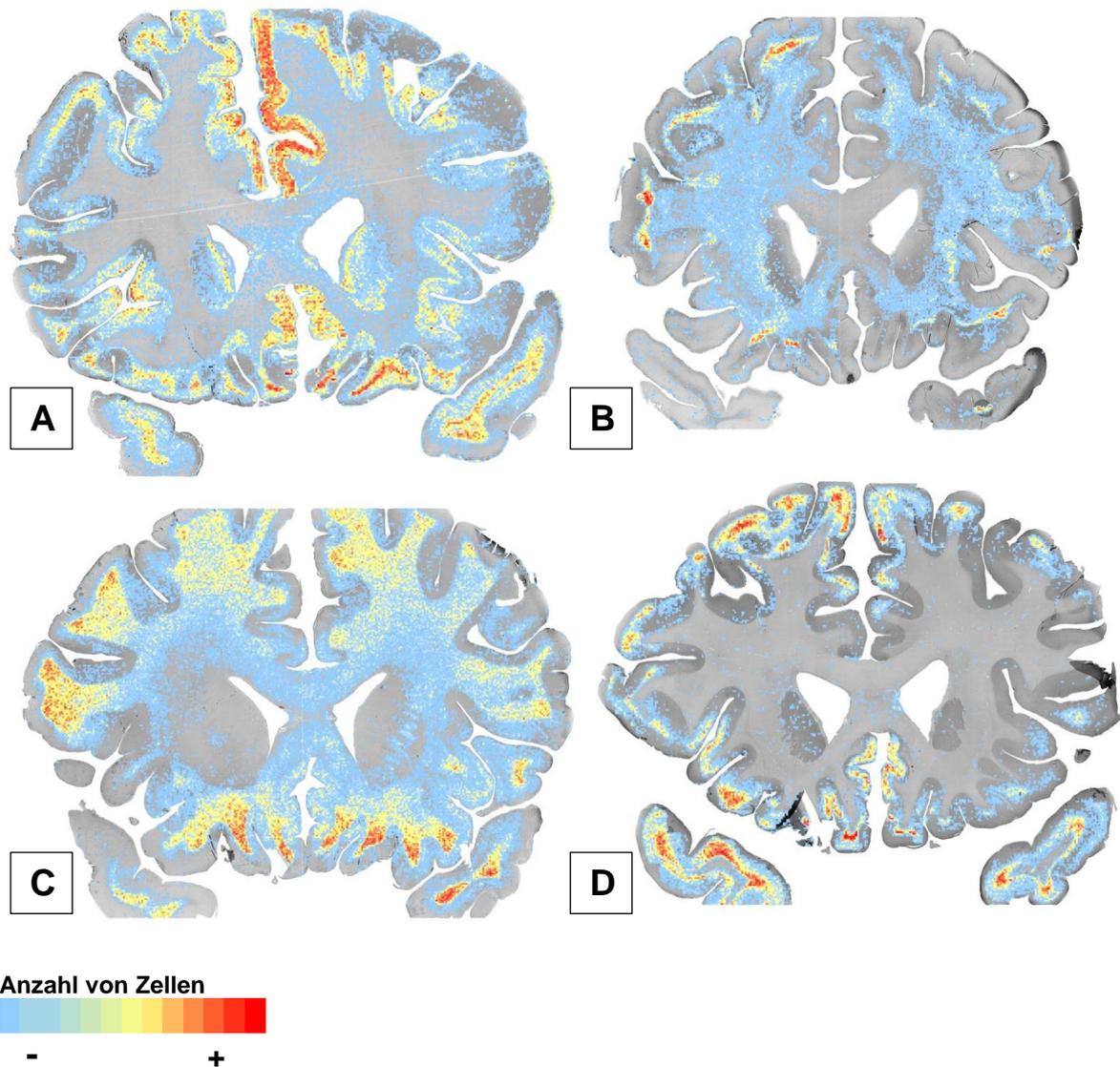
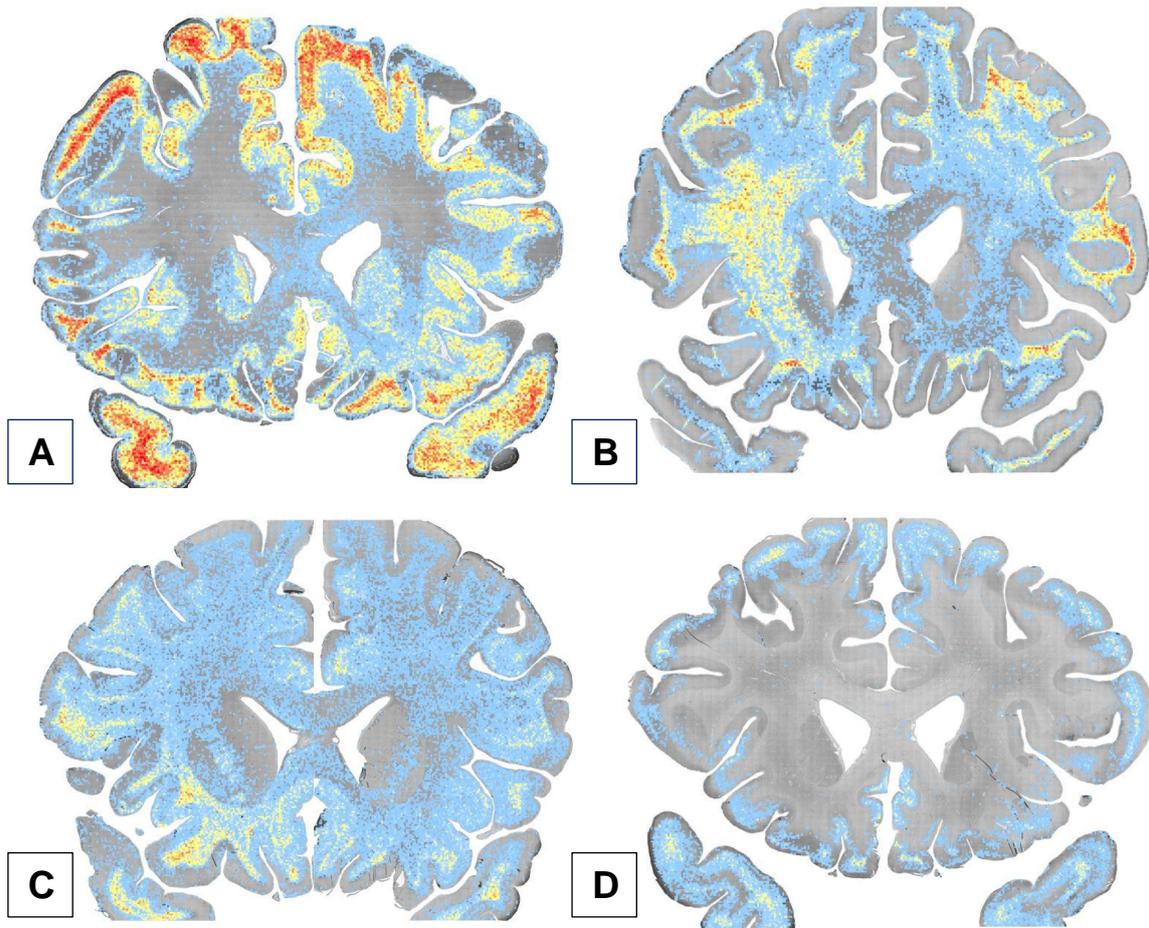


Abbildung 9: Neuroinflammatorisch auffällige Gehirne mit farbcodierter Dichtedarstellung (CD3-positiv): (A) 37-jährige suizidale Patientin mit residualer Schizophrenie, Infiltrate in kortikalen und subkortikalen Bereichen sowie insbesondere temporal auch im weißen Marklager, (B) 72-jährige suizidale Patientin mit Schizophrenie, Infiltrate überwiegend im weißen Marklager, (C) 54-jähriger suizidaler Patient mit unipolarer Depression, Infiltrate überwiegend im weißen Marklager, (D) 62-jähriger suizidaler Patient mit bipolarer Depression, Infiltrate überwiegend kortikal und subkortikal



Anzahl von Zellen



-

+

Abbildung 10: Neuroinflammatorisch auffällige Gehirne mit farbcodierter Dichtedarstellung (CD20-positiv): (A) 37-jährige suizidale Patientin mit residualer Schizophrenie, Infiltrate in kortikalen und subkortikalen Bereichen sowie insbesondere temporal auch im weißen Marklager (B), 72-jährige suizidale Patientin mit Schizophrenie, Infiltrate überwiegend im weißen Marklager, (C) 54-jähriger suizidaler Patient mit unipolarer Depression, Infiltrate überwiegend im weißen Marklager, (D) 62-jähriger suizidaler Patient mit bipolarer Depression, Infiltrate überwiegend kortikal

4 Diskussion

4.1 Interpretation der Ergebnisse

Die ätiopathogenetische Aufklärung der Entstehung von schizophrenen sowie affektiven Störungsbildern ist trotz intensiver jahrzehntelanger Forschungsarbeit weiterhin unvollständig. Neben genetischen, neurobiologischen und psychosozialen Faktoren werden zunehmend neuroimmunologische Ansätze genutzt, um die Genese psychiatrischer Erkrankungen zu erklären (41). Das Überwinden der Bluthirnschranke durch immunreaktive Zellen stellt einen neuroinflammatorischen Erklärungsansatz dar, der einer Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose ähneln könnte (35).

In dieser Arbeit erfolgte eine semiquantitative (manuelle) sowie quantitative (automatisierte) Bestimmung von immunhistochemisch markierten CD3- und CD20-positiven Lymphozyten in Regionen des Frontal- und vorderen Temporalhirns. Nachfolgend werden diese Ergebnisse in Hinblick auf die in der Einleitung formulierten Fragestellungen (1.4) diskutiert.

Es konnten diagnoseabhängige Unterschiede bezüglich des Auftretens von immunreaktiven Zellen mit beiden Methoden festgestellt werden, wobei insbesondere affektiv Erkrankte in beiden Vorgehensweisen signifikante Unterschiede zu Gesunden in verschiedenen Hirnarealen aufwiesen. Die Häufung immunreaktiver Zellen betraf in der manuellen sowie in der automatisierten Methode vermehrt CD20-positive Lymphozyten, somit B-Zellen, wobei sich signifikante Differenzen ($p < 0,05$) oder deutliche Trends ($p < 0,1$) für beide Vorgehensweisen zwischen Gesunden und Depressiven im orbitalen rechten Kortex (semiquantitativ (sq): $p = 0,041$, quantitativ (q): $p = 0,061$), im temporalen Marklager rechts (sq: $p = 0,025$, q: $p = 0,034$) sowie im hochfrontalen Kortex beidseits zeigten (links: sq: $p = 0,025$, q: $p = 0,023$; rechts: sq: $p = 0,024$, q: $p = 0,050$). Abweichungen waren bei den Arealen, die vermehrt CD3-positive Lymphozyten aufzeigten, festzustellen. Hier war in der automatisierten Methode im linken orbitalen Kortex ($p = 0,029$) eine signifikante Erhöhung immunreaktiver Zellen bei den Depressiven im Gegensatz zu den Gesunden zu finden, welche in der manuellen Auswertung nicht detektiert wurde. Demgegenüber fanden sich signifikante Differenzen jeweils rechts temporal in Kortex ($p = 0,010$) und Marklager ($p = 0,039$) mit der semiquantitativen Methode, die mit der automatisierten quantitativen Methode nicht festgestellt wurden.

Die Diskrepanzen der detektierten auffälligen Areale, insbesondere bezüglich CD3-positiver Lymphozyten, kann auf die unterschiedliche methodische Vorgehensweise zurückzuführen sein. Eine kategorisierende Einordnung der Zellen mit der semiquantitativen Methode und konkrete numerische Größen, die das quantitative Vorgehen generierte, können in der statistischen Analyse abweichende Resultate erbringen. Dennoch konnten moderate

positive Korrelationen zwischen automatisierter und manueller Auszählung festgestellt werden (Abb. 8). Die direkte Überprüfung der automatisierten Erfassung von Zellquantitäten, zur Validierung der quantitativen Methode, von zufällig ausgewählten Bildern durch manuelles Auszählen erbrachte eine sehr starke Korrelation zwischen beiden Vorgehensweisen (Abb. 7).

Wie zu erwarten, ergab der semiquantitative Ansatz, bei dem alle untersuchten Hirnschnitte gänzlich unter einem Lichtmikroskop inspiziert wurden, ein breiteres Feld an signifikant auffälligen Hirnarealen als die automatisierte Methode, bei der die Suche nach immunpositiven Zellen gezielt punktuell und nur in ausgewählten Hirnregionen stattfand. Entsprechend wurden Anhäufungen von immunpositiven Lymphozyten bei der semiquantitativen Durchmusterung der Hirnschnitte immer mitbewertet, wohingegen in den voreingestellten Hirnregionen bei der quantitativen-automatisierten Zelldichtebestimmung ein Zählfeld auch außerhalb eines Areals mit hoher Zelldichte liegen konnte.

Das vermehrte Auftreten immunreaktiver Zellen im Hirnparenchym, wie in dieser Studie anhand von T- und B-Zell-Erhöhungen in verschiedenen Hirnregionen frontal und temporal nachgewiesen, deutet auf einen neuroinflammatorischen Prozess und eine Störung der Bluthirnschranke bei den Betroffenen hin. Erhöhte Zellzahlen konnten dabei in der quantitativen Methode nicht mit den konfundierenden Variablen Autolysedauer, Fixationszeit oder Krankheitsdauer erklärt werden (Tab A.3). In der semiquantitativen Methode zeigten sich hingegen für einige wenige Areale signifikante positive Korrelationen mit den konfundierenden Variablen Fixationszeit und Krankheitsdauer für erhöhte T-Zellquantitäten in der Gruppe der Depressiven und Schizophrenen (Tab. A.1), sowie für vermehrtes Auftreten von B-Zellen in der Schizophrenie-Gruppe (Tab. A.2). Zudem zeigten sich jeweils bei Strangulierten vermehrt sowohl CD3- als auch CD20-positive Lymphozyten in der semiquantitativen Vorgehensweise, sowie eine signifikante Häufung von B-Zellen im quantitativen Teil, im Vergleich zu Gehirnen von Nichtstrangulierten. Die vorliegende Studie kann nicht abschließend klären, inwiefern hierbei Strangulationseffekte oder tatsächliche krankhafte Veränderungen im Sinne einer intensiveren Psychopathologie und damit zusammenhängenden Pathohistologie der betroffenen Hirne ausschlaggebende Faktoren für die gefundenen Veränderungen darstellen. Auch stellt sich die Frage, ob nicht Medikationseffekte bei chronischen Krankheitsverläufen eine Rolle gespielt haben könnten. Die Medikationsdauer dürfte bei chronischen schizophrenen oder depressiven Erkrankungen in etwa der Krankheitsdauer entsprechen.

4.2 Einordnung in den derzeitigen Literaturstand

Periphere Immunzellen gelangen, unter gesunden Bedingungen, selten durch die Bluthirnschranke und wurden in der Literatur bisher insbesondere bei viralen und Autoimmunerkrankungen beschrieben (42). In diesem Sinne, kann die Präsenz von CD3- und CD20-positiven Zellen im Hirnparenchym von Depressiven auf neuroinflammatorische Prozesse hindeuten.

Es ist bekannt, dass T-Zellen in der Lage sind sich durch selbst bereit gestellte Bindungsproteine (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1, PSGL-1) an inflammatorisch verändertem Gefäßendothel entlang zu bewegen. Mit Hilfe von Transmembranproteinen können sie darüber hinaus an Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1) von entzündlichen Endothelstrukturen binden und diese schließlich verlassen, um ins umgebene Parenchym einzuwandern (33). Auch B-Lymphozyten sind in der Lage Oberflächenmoleküle des Endothels (insbesondere ICAM-1) und von T-Zellen exprimierte Zytokine (MCP-1) zu nutzen, um in inflammatorisches Nachbargewebe vorzudringen (43).

Dementsprechend waren T- und B- Lymphozyten in einigen der untersuchten Hirnregionen vermehrt perivaskulär auffindbar, was darauf hindeutet, dass die Immunzellen direkt aus dem Gefäßendothel in das benachbarte Hirnparenchym gewandert sind. Neben Lymphozyten werden entzündliche Prozesse im ZNS unter anderem von Zytokinen, Mikroglia und Astrozyten vermittelt. Das Zusammenwirken dieser proinflammatorischen Zellformen kann eine überschießende Entzündungsreaktion hervorrufen, welche möglicherweise einen Zelluntergang im betroffenen Gewebe bewirkt. Da das Auftreten von immunreaktiven Zellen bei psychotischen und affektiven Störungen auf einem kontinuierlich niedrigen Niveau stattfindet, kann die Hypothese einer milden Enzephalopathie für Schizophrenie und affektive Störungen unterstützt werden (44).

Obwohl andere Studien darauf hindeuten, dass in limbischen und hochkortikalen Hirnarealen erhöhte T- und B-Lymphozytenzahlen bei Schizophrenen vorliegen können (34, 45), konnte in der vorliegenden Studie keine signifikante Häufung immunreaktiver Zellen in den untersuchten Arealen des Frontal- und vorderen Temporalhirns bei Schizophrenen im Vergleich zu Gesunden festgestellt werden. Das verminderte Aufkommen von CD3- und CD20-positiven Zellen im untersuchten Hirnparenchym der Schizophrenen kann mit den heterogenen Ausprägungen der Erkrankung zusammenhängen. Es könnten auch andere inflammatorische Marker in den betroffenen Gehirnen auffindbar sein, welche nicht Gegenstand der hiesigen Arbeit sind. Denkbar wäre auch ein Auftreten von T- und B-Lymphozyten in anderen Hirnregionen als den untersuchten Loci im Frontal- und Temporalpol.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der betroffenen Hirne fällt eine Distribution immunreaktiver Zellen oft in nur einer oder wenigen einzelnen Regionen auf. Verschiedene Verteilungsmuster in bestimmten Hirnarealen konnten zuvor für affektive und schizophrene Erkrankungen gezeigt werden, und ermöglichen sogar eine Differenzierung zwischen verschiedenen Diagnosegruppen (34). Die Heterogenität des Verlaufes und der vorliegenden jeweiligen Krankheitsstadien könnte ausschlaggebend für die unterschiedlichen hirnregionalen Ausbreitungstypen sein.

Im Gegensatz zu anderen im gleichen Labor durchgeführten Studien von posterior von den hier verwendeten Schnitten des Frontalhirns gelegenen Hirnregionen (31), waren in der vorliegenden Arbeit vermehrt CD20-positive und weniger CD3-positive Lymphozyten zu finden, was auch auf die immunhistochemischen Färbung der Immunzellen zurückzuführen sein könnte.

4.3 Limitationen

Post-mortem-Untersuchungen stellen eine besondere Möglichkeit dar, pathohistologische Grundlagen psychiatrischer Erkrankungen zu beschreiben. Ein häufig auftretendes Problem, wie in der hiesigen Studie, stellt dabei eine Post-mortem-Studien inhärente Stichprobengröße durch niedrige Fallzahlen dar. Dennoch konnten, trotz der relativ geringen Anzahl von Untersuchungsobjekten, signifikante Unterschiede zwischen erkrankten Individuen und Gesunden herausgearbeitet werden.

Lymphozyten, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung der Hirnschnitte in den Gefäßanschnitten befanden, wurden für alle Diagnosegruppen miterfasst. Bereiche mit sichtbaren Gefäßlumen größerer Gefäße, wurden nach manueller Sichtung unter lichtmikroskopischen Bedingungen nicht erfasst. Dennoch war eine Unterscheidung zwischen immunreaktiven Zellen in kleinsten Gefäßanschnitten von Kapillaren und Immunzellen im umliegenden Gewebe nicht immer möglich.

In den meisten Hirnregionen, in denen signifikante Unterschiede zwischen Erkrankten und Gesunden gefunden wurden, waren B-Lymphozyten die verstärkt auftretende Zellfraktion. Nur in wenigen inflammatorisch auffälligen Hirnarealen waren T-Lymphozyten dominant. Andere Untersuchungen zeigten eine quantitativ verstärkte Häufung von T-Zellen und gemischtere Resultate (31). Zudem wurden B- und T-Zellen trotz unterschiedlich immunologischer Eigenschaften und Funktionen nicht für die jeweiligen Subtypen dieser Lymphozyten differenziert ausgewertet und zu einer gemeinsamen T-Zell oder B-Zell-Gruppe zusammengefasst. Weitere Studien sind nötig, um ein differenzierteres Gesamtbild der verschiedenen

Lymphozytenarten zu erhalten und ihren Beitrag zur Entstehung psychiatrischer Erkrankungen besser verstehen zu können.

4.4 Stärken

In der vorliegenden Studie wurden zwei unterschiedlich methodische Vorgehensweisen angewandt, um die Ergebnisse eines manuellen semiquantitativen Ansatzes mit einem automatisierten bildanalytischen Prozess vergleichen zu können. Die Resultate stimmten insbesondere dahingehend überein, dass sie signifikante Unterschiede zwischen affektiv Erkrankten und Gesunden in frontalen und vorderen temporalen Hirnarealen, sowie erhöhte Zellzahlen von CD20-positiven Lymphozyten bei uni- und bipolaren depressiven Patienten aufzeigen konnten. Die semiquantitative Methode erzielte eine Einschätzung der vorhandenen Lymphozyten in den Kategorien (keine / wenige / mäßig viele / viele Zellen), wogegen der automatisierte Ansatz jeweils eine konkrete Anzahl immunreaktiver Zellen der entsprechenden Region lieferte. Der manuelle Ansatz ging dabei von einer genauen Inspektion des jeweils gesamten Hirnschnitts aus, wobei im automatisierten Prozess die betroffenen Areale nur in vorher definierten Gewebsausschnitten untersucht wurden. Die Kombination beider Vorgehensweisen kann somit als eine wechselseitige Kontrollmöglichkeit und auch als Erweiterung der jeweils anderen Untersuchungstechnik angesehen werden.

Die für diese Arbeit erstellten farbcodierten Kartierungen der am stärksten betroffenen Hirne, ermöglichen, wie schon zuvor festgestellt, eine schnelle und einfache Übersicht über regionale Ausbreitungsarten entzündlicher Prozesse (34).

5 Zusammenfassung

Die Ätiopathogenese psychiatrischer Erkrankungen ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung, wobei zunehmend immunologische Ursachen in den Fokus der wissenschaftlichen Diskussion geraten. In diesem Sinne konnten proinflammatorische Zellen und Botenstoffe im peripheren Blut und Liquor, sowie in zerebralen Strukturen von Schizophrenen und affektiv Erkrankten nachgewiesen werden. Die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke für immunreaktive Zellen, scheint dabei, ähnlich der Entstehung anderer neuroimmunologischer Erkrankungen, eine entscheidende Rolle zu spielen.

In der hiesigen Post-mortem-Studie, wurden Ganzhirnschnitte der Magdeburger Hirnsammlung von 20 Schizophrenie-Patienten (akut paranoid und residual), 19 affektiv Erkrankten (unipolar und bipolar) sowie von 19 Personen ohne psychiatrische Diagnose untersucht. Nach immunohistochemischer Einfärbung der entsprechenden Hirnschnitte, erfolgte die Überprüfung auf Vorhandensein von T-Zellen (CD3-positiv) sowie B-Zellen (CD20-positiv), was als Hinweis für neuroimmunologische Pathologie gedeutet wurde.

Zur Erfassung der immunreaktiven Zellen kamen zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung, wobei der semiquantitative Ansatz eine manuelle mikroskopische Durchsicht aller Hirnschnitte mit anschließender Einordnung in mengenmäßige Kategorien beinhaltete, die quantitative Vorgehensweise dagegen eine automatisierte Registrierung von Zellzahlen mittels Bildanalyseprogramm umfasste. Für die automatisierte Methode wurden zuvor mikroskopische Bildaufnahmen der Ganzhirnschnitte angefertigt, und die Anzahl von T- und B-Zellen anschließend mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms erfasst. Die Verfahren zur Zellerfassung erfolgten jeweils verblindet.

Für beide methodischen Vorgehensweisen konnte eine signifikante Erhöhung von CD20-positiven B-Zellen bei Depressiven im Vergleich zu Gesunden in kortikalen Bereichen orbital und hochfrontal, sowie im temporalen Marklager aufgezeigt werden. Abweichende Areale von Zellerhöhungen fanden sich bei affektiv Erkrankten bezüglich CD3-positiver Zellen für beide Verfahren. Die Differenzen können auf die unterschiedliche Vorgehensweise zurückzuführen sein, wobei die semiquantitative Methode eine Untersuchung der kompletten Hirnschnitte beinhaltete, die quantitative Methode dagegen nur eine punktuelle Analyse zuvor festgelegter Hirnareale umfasste.

Eine Korrelationsanalyse der Zellerhöhungen mit möglichen konfundierenden Variablen erbrachte signifikante Ergebnisse in einigen wenigen Arealen für Strangulation, Fixationszeit und Krankheitsdauer. Dennoch deuten die Ergebnisse der Arbeit auf einen immunologischen Faktor, im Sinne einer neuroinflammatorischen Teilursache von affektiven Erkrankungen, bei gestörter Bluthirnschranke, hin.

Literaturverzeichnis

- 1 Bleuler, E.: Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. Arts & Boeve. Nijmegen 1911.
- 2 Vos, T., A.A. Abajobir, K.H. Abate, C. Abbafati, K.M. Abbas, F. Abd-Allah et al.: Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 390. 1211-1259 (2017)
- 3 Laursen, T.M., M. Nordentoft, P.B. Mortensen: Excess early mortality in schizophrenia. *Annual review of clinical psychology*. 10. 425-448 (2014)
- 4 Falkai, P., R. Schennach, T. Lincoln, A. Schaub, A. Hasan: Schizophrene Psychosen. In: Möller, Laux, Kapfhammer (eds.): *Psychiatrie und Psychotherapie*. 5 ed. pp. 1583-1674. Springer Berlin 2017.
- 5 Adriano, F., C. Caltagirone, G. Spalletta: Hippocampal volume reduction in first-episode and chronic schizophrenia: a review and meta-analysis. *The Neuroscientist*. 18(2). 180-200 (2012)
- 6 Nave, K.A., H. Ehrenreich: Myelination and oligodendrocyte functions in psychiatric diseases. *JAMA Psychiatry*. 71(5). 582-584 (2014)
- 7 Müller, N., E. Weidinger, B. Leitner, M.J. Schwarz: The role of inflammation in schizophrenia. *Frontiers in neuroscience*. 9:372. 1-9 (2015)
- 8 Busse, S., M. Busse, K. Schiltz, H. Bielau, T. Gos, R. Brisch, C. Mawrin, A. Schmitt, W. Jordan, U.J. Müller, H.-G. Bernstein, B. Bogerts, J. Steiner: Different distribution patterns of lymphocytes and microglia in the hippocampus of patients with residual versus paranoid schizophrenia: further evidence for disease course-related immune alterations?. *Brain, behavior, and immunity*. 8. 1273-1279 (2012)
- 9 World Health Organization: ICD-10 : international statistical classification of diseases and related health problems : tenth revision. 2nd ed. World Health Organization. Genf 2004.

- 10 Busch, M.A., U.E. Maske, L. Ryl, R. Schlack, U. Hapke: Prävalenz von depressiver Symptomatik und diagnostizierter Depression bei Erwachsenen in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz. 56(5). 733-739 (2013)
- 11 Ferrari, A.J., F.J. Charlson, R.E. Norman, S.B. Patten, G. Freedman, C.J. Murray, T. Vos, H.A. Whiteford: Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. PLoS medicine. 10(11). e1001547 (2013)
- 12 Lépine, J.P., M. Briley: The increasing burden of depression. Neuropsychiatric disease and treatment. 7 Suppl. 1. 3-7 (2011)
- 13 Gonda, X., M. Pompili, G. Serafini, F. Montebovi, S. Campi, P. Dome, T. Duleba, P. Girardi, Z. Rihmer: Suicidal behavior in bipolar disorder: epidemiology, characteristics and major risk factors. Journal of affective disorders. 143(1-3). 16-26 (2012)
- 14 Kopschina Feltes, P., J. Doorduyn, H.C. Klein, L.E. Juárez-Orozco, R.A. Dierckx, C.M. Moriguchi-Jeckel, E.F. de Vries: Anti-inflammatory treatment for major depressive disorder: implications for patients with an elevated immune profile and non-responders to standard antidepressant therapy. Journal of Psychopharmacology. 31(9). 1149-1165 (2017)
- 15 Bschor, T.: Definition, klinisches Bild und Epidemiologie therapieresistenter Depressionen. In: T. Bschor (ed.): Behandlungsmanual therapieresistente Depression. Pharmakotherapie – Somatische Therapieverfahren – Psychotherapie. pp. 11-16. Kohlhammer Stuttgart 2008.
- 16 Sparkman, N.L., R.W. Johnson: Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. Neuroimmunomodulation. 15(4-6). 323-330 (2008)
- 17 Frank, M.G., M.V. Baratta, D.B. Sprunger, L.R. Watkins, S.F. Maier: Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. Brain, behavior, and immunity. 21(1). 47-59 (2007)
- 18 Müller, N., M.J. Schwarz: Neuroimmune-endocrine crosstalk in Schizophrenia and mood disorders. Expert review of neurotherapeutics. 6. 1017-1038 (2006)

- 19 Müller, N.: Psychoneuroimmunologische Grundlagen psychischer Erkrankungen. In: Möller, Laux, Kapfhammer (eds.): Psychiatrie und Psychotherapie. 5 ed. pp. 291-310. Springer Berlin 2017.
- 20 Chiveri, L., M. Sciacco, A. Prella: Schizophreniform Disorder with Cerebrospinal Fluid PCR Positivity for Herpes Simplex Virus Type 1. *European Neurology*. 50(3). 182-183 (2003)
- 21 Van Dam, A.P.: Diagnosis and pathogenesis of CNS lupus. *Rheumatology international*. 11(1). 1-11 (1991)
- 22 Hanson, D.R., I.I. Gottesman: Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC medical genetics*. 6(1). 1-17 (2005)
- 23 Müller, N., M.J. Schwarz: The immunological basis of glutamatergic disturbance in schizophrenia: towards an integrated view. In: M. Gerlach, J. Deckert, K. Double, E. Koutsilieris (eds.): *Neuropsychiatric Disorders An Integrative Approach*. *Journal of Neural Transmission*. Suppl. Vol. 72. pp. 269-280. Springer Wien 2007.
- 24 Dantzer, R.: Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand?. *Brain, behavior, and immunity*. 15(1). 7-24 (2001)
- 25 Chaudhry, I.B., J. Hallak, N. Husain, F. Minhas, J. Stirling, P. Richardson, S. Dursun, G. Dunn, B. Deakin: Minocycline benefits negative symptoms in early schizophrenia: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial in patients on standard treatment. *Journal of psychopharmacology*. 26(9). 1185-1193 (2012)
- 26 Müller, N., M. Riedel, M.J. Schwarz, R.R. Engel: Clinical effects of COX-2 inhibitors on cognition in schizophrenia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 255(2). 149-151 (2005)
- 27 Maes, M., H.Y. Meltzer, E. Bosmans, R. Bergmans, E. Vandoolaeghe, R. Ranjan, R. Desnyder: Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *Journal of Affective Disorders*. 34(4). 301-309 (1995)
- 28 Lanquillon, S., J.C. Krieg, U. Bening-Abu-Shach, H. Vedder: Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*. 22(4). 370-379 (2000)

- 29 Tondo, L., P.P. Pani, R. Pellegrini-Bettoli, G. Milia, P.E. Manconi: T-lymphocytes in depressive disorder. *Medical Science Research*. 16(16). 867-868 (1988)
- 30 Köhler, O., M.E. Benros, M. Nordentoft, M.E. Farkouh, R.L. Iyengar, O. Mors, J. Krogh: Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA psychiatry*. 71(12). 1381-1391 (2014)
- 31 Bogerts, B., D. Winopal, S. Schwarz, K. Schlaaff, H. Dobrowolny, C. Mawrin, T. Frodl, J. Steiner: Evidence of neuroinflammation in subgroups of schizophrenia and mood disorder patients: A semiquantitative postmortem study of CD3 and CD20 immunoreactive lymphocytes in several brain regions. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*. 2-9 (2017)
- 32 Ansorge, S., M. Täger: Immunologie. In: P.C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve (eds.): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9 ed. pp. 893-930. Springer Berlin Heidelberg 2014.
- 33 Murphy, K., C. Weaver: Janeway Immunologie. 9 ed. Springer. Berlin 2018.
- 34 Schlaaff, K., H. Dobrowolny, T. Frodl, C. Mawrin, T. Gos, J. Steiner, B. Bogerts: Increased densities of T and B lymphocytes indicate neuroinflammation in subgroups of schizophrenia and mood disorder patients. *Brain, Behavior, and Immunity*. 88. 497-506 (2020)
- 35 O'Connor, K.C., A. Bar-Or, D.A. Hafler: The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *Journal of clinical immunology*. 21(2). 81-92 (2001)
- 36 American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th revised edition (DSM-IV-TR). American Psychiatric Press. Washington, DC 2000.
- 37 Mai, J.K.: Atlas of the human brain. 2nd ed. Elsevier Science and Technology Books. San Diego 2003.
- 38 R Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. (2020)
- 39 Schneider, C.A., W.S. Rasband, K.W. Eliceiri: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 9(7). 671-675 (2012)

- 40 Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 9(7). 676-682 (2012)
- 41 Najjar, S., D.M. Pearlman, K. Alper, A. Najjar, O. Devinsky: Neuroinflammation and psychiatric illness. *Journal of neuroinflammation*. 10:43. 1-24 (2013)
- 42 Wohleb, E.S., J.P. Godbout: Basic aspects of the immunology of neuroinflammation. *Modern Trends in Pharmacopsychiatry*. 28. 1-19 (2013)
- 43 Alter, A., M. Duddy, S. Hebert, K. Biernacki, A. Prat, J.P. Antel, V.W. Yong, R.K. Nuttall, C.J. Pennington, D.R. Edwards, A. Bar-Or: Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *The Journal of Immunology*. 170(9). 4497-4505 (2003)
- 44 Müller, N., K. Bechter: The mild encephalitis concept for psychiatric disorders revisited in the light of current psychoneuroimmunological findings. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*. 19(3). 87-101 (2013)
- 45 Bogerts, B., K. Schlaaff, H. Dobrowolny, T. Frodl, J. Steiner: Mapping of lymphocyte densities in postmortem brains of schizophrenic and depressed patients. Evidence of neuroinflammation in subgroups of patients. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*. 29. 6 (2018)

Danksagung

Die Danksagung ist in dieser Version aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion vorgelegten Dissertation mit dem Titel

„T- und B-Lymphozyten im Frontal- und vorderen Temporalhirn bei Schizophrenie und affektiven Störungen als Indikatoren neuroinflammatorischer Prozesse“

in der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. em. Bernhard Bogerts sowie den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der experimentellen Psychiatrie

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 28.03.2022

Sophia Büchner

Bildungsweg

Der Bildungsweg ist in dieser Version aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

Anhang

Tabelle A.1: Spearman-Korrelationen der konfundierenden Variablen mit **T-Zell**-Häufungen (**CD3**- positiv) innerhalb der Diagnosegruppen für Areale mit signifikanten Gruppendifferenzen (semiquantitative Methode)

Region		Autolysedauer [Stunden]			Fixationszeit [Stunden]			Krankheitsdauer [Jahre]	
		Sz (n = 20)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 19)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 18)	Dep (n = 14)
Orbital Mark pe- riph re	r_s	0,198	0,198	0,360	0,439	0,270	-0,215	0,117	0,342
	p-Wert	0,437	0,437	0,130	0,060	0,264	0,376	0,644	0,231
IFG ge- samt re	r_s	0,412	0,164	0,240	0,364	0,285	-0,387	-0,143	0,622
	p-Wert	0,071	0,502	0,322	0,012	0,237	0,101	0,571	0,018
Dorsola- teral ge- samt re	r_s	0,266	0,115	0,240	0,364	0,302	-0,122	0,138	0,273
	p-Wert	0,257	0,639	0,322	0,126	0,209	0,619	0,585	0,346
Hoch- frontal Mark pe- ripher li	r_s	0,198	0,309	n.a.	0,439	0,350	n.a.	0,117	0,582
	p-Wert	0,437	0,199		0,060	0,142		0,644	0,029
Hoch- frontal gesamt li	r_s	0,198	0,105	0,432	0,439	0,305	-0,043	0,117	0,216
	p-Wert	0,437	0,670	0,065	0,060	0,204	0,861	0,644	0,457
Hoch- frontal gesamt rechts	r_s	0,198	0,105	0,151	0,439	0,305	-0,030	0,117	0,216
	p-Wert	0,437	0,670	0,538	0,060	0,204	0,904	0,644	0,457
Gyrus Cinguli Kortex li	r_s	0,139	0,323	n.a.	0,473	-0,122	n.a.	0,341	0,617
	p-Wert	0,559	0,177		0,041	0,619		0,166	0,019
Gyrus Cinguli Kortex re	r_s	0,139	0,323	n.a.	0,473	-0,122	n.a.	0,341	0,617
	p-Wert	0,559	0,177		0,041	0,619		0,166	0,019
Gyrus Cinguli perivask rechts	r_s	0,198	-0,033	n.a.	0,435	-0,126	n.a.	0,117	0,273
	p-Wert	0,404	0,893		0,063	0,766		0,644	0,346
Gyrus Cinguli ges re	r_s	0,127	0,089	n.a.	0,481	0,158	n.a.	0,331	0,492
	p-Wert	0,593	0,717		0,037	0,518		0,180	0,074
Temporal Kortex re	r_s	0,309	0,372	n.a.	0,451	-0,284	n.a.	0,103	0,224
	p-Wert	0,244	0,117		0,079	0,238		0,725	0,442
Temporal Mark pe- ripher re	r_s	0,309	0,372	n.a.	0,451	0,178	n.a.	0,103	0,756
	p-Wert	0,244	0,117		0,079	0,465		0,725	0,002

Region	Autolysedauer [Stunden]			Fixationszeit [Stunden]			Krankheitsdauer [Stunden]	
	Sz (n = 20)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 19)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 18)	Dep (n = 14)

CD3

Temporal perivas- kulär re	r_s	0,309	0,331	n.a.	0,451	0,167	n.a.	0,103	0,501
	p-Wert	0,244	0,166		0,079	0,495		0,725	0,068
Temporal gesamt li	r_s	0,273	0,361	0,206	0,442	0,103	0,351	0,084	0,507
	p-Wert	0,273	0,129	0,412	0,075	0,675	0,154	0,757	0,064
Temporal gesamt rechts	r_s	0,309	0,372	n.a.	0,451	-0,002	n.a.	0,103	0,558
	p-Wert	0,244	0,117		0,079	0,994		0,725	0,038

Anmerkungen zu Tabelle A.1: Abkürzungen: Sz – Schizophrenie, Dep – Depression, Ges – Gesund, IFG – inferiorer frontaler Gyrus, periph – peripher, perivask – perivaskulär, li – links, re – rechts, n.a. – nicht anwendbar; signifikante p-Werte fett gedruckt; teilweise geringere Fallzahlen, da Angaben nicht vorlagen

Tabelle A.2: Spearman-Korrelationen der konfundierenden Variablen mit **B-Zell**-Häufungen (**CD20**-positiv) innerhalb der Diagnosegruppen für Areale mit signifikanten Gruppendifferenzen (semiquantitative Methode)

Region		Autolysedauer [Stunden]			Fixationszeit [Stunden]			Krankheitsdauer [Stunden]	
		Sz (n = 20)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 19)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 18)	Dep (n = 14)
Orbital Kortex links	r_s	0,127	0,135	0,280	0,481	-0,230	0,188	0,331	-0,105
	p-Wert	0,593	0,582	0,246	0,037	0,343	0,441	0,180	0,720
Orbital Mark pe- ripher li	r_s	0,184	0,592	0,360	0,439	0,247	-0,215	0,117	-0,184
	p-Wert	0,437	0,122	0,130	0,060	0,555	0,376	0,644	0,528
Orbital Mark pe- ripher re	r_s	0,184	-0,199	0,360	0,439	0,126	-0,215	0,117	-0,052
	p-Wert	0,437	0,414	0,130	0,060	0,766	0,376	0,644	0,859
Orbital perivas- kulär li	r_s	0,317	-0,086	0,360	0,258	0,144	-0,215	n.a.	-0,181
	p-Wert	0,174	0,727	0,130	0,286	0,557	0,376		0,536
Orbital perivas- kulär re	r_s	0,317	-0,132	0,360	0,258	0,038	-0,215	n.a.	0,039
	p-Wert	0,174	0,589	0,130	0,286	0,876	0,376		0,894
Orbital gesamt rechts	r_s	0,213	-0,117	0,360	0,425	-0,082	-0,215	0,323	0,060
	p-Wert	0,368	0,633	0,130	0,070	0,846	0,376	0,191	0,839
IFG Kor- tex links	r_s	0,184	0,083	0,101	0,439	0,315	0,188	0,117	0,333
	p-Wert	0,437	0,734	0,681	0,060	0,190	0,441	0,644	0,244
IFG ge- samt li	r_s	0,184	-0,009	0,360	0,439	0,286	-0,215	0,117	0,285
	p-Wert	0,437	0,972	0,130	0,060	0,235	0,376	0,644	0,323
Dorsola- teral Kor- tex li	r_s	0,401	0,117	n.a.	0,300	0,227	n.a.	-0,097	0,087
	p-Wert	0,080	0,632		0,211	0,349		0,702	0,768
Dorsola- teral Kor- tex re	r_s	0,266	0,117	n.a.	0,364	0,227	n.a.	0,138	0,087
	p-Wert	0,257	0,632		0,126	0,349		0,585	0,768
Hoch- frontal Kortex li	r_s	0,116	0,082	n.a.	0,475	0,295	n.a.	0,341	0,024
	p-Wert	0,626	0,740		0,040	0,221		0,166	0,936
Hoch- frontal Kortex re	r_s	0,184	0,082	n.a.	0,439	0,295	n.a.	0,117	-0,024
	p-Wert	0,437	0,740		0,060	0,221		0,644	0,936
Hoch- frontal Mark pe- ripher re	r_s	0,184	0,035	0,192	0,439	0,476	0,000	0,117	0,244
	p-Wert	0,437	0,887	0,431	0,060	0,040	1,000	0,644	0,400

Region	Autolysedauer [Stunden]			Fixationszeit [Stunden]			Krankheitsdauer [Stunden]		
	Sz (n = 20)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 19)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 18)	Dep (n = 14)	
CD20									
Hoch- frontal perivas- kulär li	r_s	0,317	0,086	n.a.	0,258	0,336	n.a.	n.a.	0,005
	p-Wert	0,174	0,726		0,286	0,160			0,986
Hoch- frontal perivas- kulär re	r_s	0,317	0,113	n.a.	0,258	0,340	n.a.	n.a.	0,026
	p-Wert	0,174	0,645		0,286	0,154			0,930
Hoch- frontal gesamt rechts	r_s	0,184	0,040	-0,192	0,439	0,391	0,000	0,117	0,170
	p-Wert	0,437	0,870	0,431	0,060	0,098	1,000	0,644	0,561
Cauda- tum peri- vask li	r_s	0,198	-0,199	n.a.	0,435	0,094	n.a.	0,117	-0,296
	p-Wert	0,404	0,415		0,063	0,701		0,644	0,304
Temporal Mark pe- ripher li	r_s	0,244	0,046	n.a.	0,492	0,227	n.a.	0,062	0,279
	p-Wert	0,346	0,852		0,053	0,350		0,826	0,334
Temporal Mark pe- ripher re	r_s	0,295	0,149	n.a.	0,500	0,125	n.a.	0,103	0,434
	p-Wert	0,267	0,543		0,058	0,609		0,725	0,121
Temporal periph re	r_s	0,295	0,045	n.a.	0,500	0,117	n.a.	0,103	0,340
	p-Wert	0,267	0,856		0,058	0,632		0,725	0,234
Temporal gesamt li	r_s	0,244	0,056	-0,192	0,492	0,100	0,344	0,062	0,054
	p-Wert	0,346	0,819	0,431	0,053	0,685	0,149	0,826	0,854
Temporal gesamt rechts	r_s	0,295	0,057	-0,192	0,500	0,043	0,344	0,103	0,149
	p-Wert	0,267	0,816	0,431	0,058	0,861	0,149	0,725	0,611

Anmerkungen zu Tabelle A.2: Abkürzungen: Sz – Schizophrenie, Dep – Depression, Ges – Gesund, IFG – inferiorer frontaler Gyrus, periph – peripher, perivask – perivaskulär, li – links, re – rechts, n.a. – nicht anwendbar; signifikante p-Werte fett gedruckt; teilweise geringere Fallzahlen, da Angaben nicht vorlagen

Tabelle A.3: Spearman-Korrelationen der konfundierenden Variablen mit T-Zell-Häufungen (**CD3**-positiv) sowie B-Zell-Häufungen (**CD20**-positiv) innerhalb der Diagnosegruppen für Areale mit signifikanten Gruppendifferenzen (quantitative Methode)

Region		Autolysedauer [Stunden]			Fixationszeit [Stunden]			Krankheitsdauer [Jahre]	
		Sz (n = 20)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 19)	Dep (n = 19)	Ges (n = 19)	Sz (n = 18)	Dep (n = 14)
CD3									
Orbital Kortex links	r_s	0,223	0,156	0,096	0,360	0,021	0,021	-0,056	0,587
	p-Wert	0,862	0,962	0,872	0,427	0,988	0,988	0,933	0,189
Orbital Kortex rechts	r_s	0,324	0,311	-0,192	0,260	-0,215	-0,258	0,009	0,098
	p-Wert	0,862	0,877	0,812	0,534	0,783	0,602	0,97	0,88
CD20									
Orbital Kortex rechts	r_s	0,116	-0,036	0,021	0,484	0,177	0,153	0,331	0,285
	p-Wert	0,904	0,971	0,968	0,313	0,845	0,799	0,933	0,552
Dorsola- teral Kor- tex links	r_s	-0,063	0,121	-0,192	0,344	0,099	-0,301	0,117	0,602
	p-Wert	0,949	0,962	0,812	0,448	0,951	0,518	0,933	0,189
Hoch- frontal Kortex links	r_s	0,139	0,101	0,035	0,471	0,318	-0,118	0,331	0,419
	p-Wert	0,876	0,962	0,940	0,313	0,667	0,719	0,933	0,361
Hoch- frontal Kortex rechts	r_s	0,170	0,253	0,332	0,441	0,281	-0,063	0,117	0,578
	p-Wert	0,862	0,877	0,724	0,313	0,724	0,924	0,933	0,189
Cauda- tum links	r_s	0,205	-0,258	0,190	0,133	0,184	-0,099	0,341	0,421
	p-Wert	0,862	0,877	0,812	0,782	0,845	0,924	0,933	0,361
Temporal Kortex links	r_s	0,224	0	0,001	0,494	0,119	0,446	0,062	0,125
	p-Wert	0,862	1	0,997	0,313	0,918	0,293	0,933	0,836
Temporal Kortex rechts	r_s	-0,014	0,355	-0,125	0,421	-0,05	0,076	0,107	-0,237
	p-Wert	0,984	0,877	0,869	0,404	0,988	0,924	0,933	0,636
Temporal Mark rechts	r_s	0,262	0,220	n.a.	0,489	-0,067	n.a.	0,062	0,074
	p-Wert	0,862	0,877		0,313	0,988		0,933	0,924

Anmerkungen zu Tabelle A.3: Abkürzungen: Sz – Schizophrenie, Dep – Depression, Ges – Gesund, n.a. – nicht anwendbar; teilweise geringere Fallzahlen, da Angaben nicht vorlagen