

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie

der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Immunhistochemische Analyse der Glutaminsynthetase-Expression
in Astrozyten im dorsolateralen Präfrontalkortex, orbitofrontalen
Kortex und anterioren Gyrus Cinguli bei Schizophrenen und
psychisch gesunden Vergleichsfällen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Anne Tausch

aus Magdeburg

Magdeburg 2014

Dokumentationsblatt

Tausch, Anne

„Immunhistochemische Analyse der Glutaminsynthetase-Expression in Astrozyten im dorsolateralen Präfrontalkortex, orbitofrontalen Kortex und anterioren Gyrus Cinguli bei Schizophrenen und psychisch gesunden Vergleichsfällen“

- 2014.

- 69 Seiten, 12 Abbildungen, 5 Tabellen, 100 Literaturquellen.

Die vorliegende Arbeit basiert auf experimentellen Daten, die unter Anleitung von Prof. Bogerts und Prof. Bernstein in der Psychiatrie der Universitätsklinik Magdeburg erhoben wurden.

Der Dissertation liegt eine Untersuchung humaner post-mortem Gehirne Schizophrener (n=14) und psychisch gesunder Kontrollpersonen (n=15) zu Grunde. Die Gehirne wurden auf eine Veränderung der Glutaminsynthetase-Expression in Astrozyten im dorsolateralen Präfrontalkortex, im orbitofrontalen Kortex und im anterioren Gyrus Cinguli schichtenspezifisch geprüft.

Glutaminsynthetase katalysiert die Bildung von Glutamin aus Glutaminsäure und Ammoniumionen und spielt eine wichtige Rolle in der glutamatergen Neurotransmission. Die Hirnschnitte wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Enzym immunhistochemisch gefärbt und anschließend mikroskopisch beurteilt.

Die numerischen Zelldichten der Glutaminsynthetase-exprimierenden Astrozyten war bei den schizophrenen Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen signifikant vermindert in den oberflächlichen Schichten I, II und III des dorsolateralen Präfrontalkortex beider Hemisphären (rechts: $p=0,033$, links: $p=0,045$).

Bei dem Vergleich gesunder Vergleichspersonen (n=15) mit Schizophrenen, die keinen Suizid begingen (n=11), ergab sich eine signifikante Verminderung bei den nichtsuizidalen Schizophrenen im dorsolateralen Präfrontalkortex beider Hemisphären (rechts: $p=0,024$, links: $p=0,014$) sowie im linken orbitofrontalen Kortex ($p=0,043$) jeweils in den oberflächlichen Schichten I, II und III.

Bezüglich des Vergleiches der Todesursache Suizid (n=3) und kein Suizid (n=11) bei den schizophrenen Erkrankten zeigten sich signifikante Verminderungen der nichtsuizidalen Patienten in der linken Hemisphäre des Orbitofrontalkortex (Schicht I-III: $p=0,018$, Schicht IV-VI: $p=0,023$). Es ergaben sich darüber hinaus keine Unterschiede bezüglich einzelner Untergruppen des schizophrenen Formenkreises.

Im Gyrus Cinguli und in den tiefgelegenen kortikalen Schichten IV-VI des dorsolateralen Präfrontalkortex sowie des rechten Orbitofrontalkortex stellten sich keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Enzymexpression dar.

Jedoch war bei den durchgeführten Untersuchungen innerhalb der oberflächlichen Schichten I-III ein deutlich übereinstimmender Trend zu reduzierten Dichten bei den Schizophrenen als Gesamtgruppe und bei den nichtsuizidalen Patienten in Bezug auf die Kontrollpersonen zu verzeichnen.

In den Schichten IV-VI konnten bis auf die signifikanten Verminderungen bei nichtsuizidalen Schizophrenen gegenüber suizidalen Patienten im linken orbitofrontalen Kortex keine Trends erkannt werden.

Inhaltsverzeichnis

Deckblatt.....	I
Dokumentationsblatt.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Abgrenzung der Schizophrenie.....	1
1.2 Epidemiologie, Genetik, Symptomatik.....	2
1.3 Neuropathologie.....	3
1.3.1 Informationsverarbeitung im Gehirn.....	4
1.3.2 Neuropathologische Alterationen bei schizophrenen Erkrankten.....	4
1.4 Transmitterveränderungen bei Schizophrenen.....	6
1.5 Immunologie und Inflammation im schizophrenen Formenkreis.....	10
1.6 Fragestellung der vorliegenden Dissertation.....	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Schizophrene Patienten und Kontrollfälle als Untersuchungsmaterial.....	12
2.2 Untersuchungsmethoden.....	14
2.2.1 Aufbereitung der post-mortem Gehirne.....	14
2.2.2 Immunhistochemische Darstellung der Glutaminsynthetase.....	15
2.3 Abgrenzungskriterien der Hirnstrukturen.....	16
2.3.1 Kortexareale.....	16
2.3.2 Kortikale Schichtung.....	18
2.4 Morphologische Abgrenzung der Astrozyten.....	18
2.5 Bestimmung der numerischen Zelldichten der Astrozyten.....	19
2.6 Reliabilität.....	20
2.7 Statistische Tests zur Auswertung.....	22
3 Ergebnisse	23
3.1 ANOVA mit Messwertwiederholung.....	23
3.2 Numerische Zelldichten der angefärbten Astrozyten.....	25
3.3 Einfluss konfundierender Variablen auf die Messwerte.....	29

4	Diskussion.....	31
4.1	Material- und methodenkritische Aspekte.....	32
4.1.1	Einfluss möglicher konfundierender Variablen.....	32
4.1.2	Einfluss der Methodik	34
4.2	Kortikale Veränderungen bei Schizophrenen.....	36
4.2.1	Neuropathologie und –histologie.....	36
4.2.1.1	Hirnentwicklung und Neurodegeneration.....	37
4.2.1.2	Kortexregionen und kortikale Schichtung.....	39
4.2.1.3	Gliazellen.....	42
4.2.1.4	Prognostische Bedeutung hirnstruktureller Veränderungen.....	43
4.2.2	Transmitteralteration.....	43
4.2.3	Einfluss von Suizid.....	46
4.2.4	Immunologische und inflammatorische Komponenten.....	47
4.2.5	Klinische Interpretation der Pathophysiologie und Ausblick.....	48
5	Zusammenfassung.....	51
6	Literaturverzeichnis.....	52
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	59
8	Danksagung.....	VIII
9	Erklärung.....	IX
10	Darstellung des Bildungsweges.....	X

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	analysis of variance
aqua dest.	destilliertes Wasser
BGC	BogCol-Nummer (Verschlüsselungsnummer) der Gehirne
PBS	Pufferlösung „phosphate buffered saline“
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CT	Computertomographie
DLPFC	dorsolateraler Präfrontalkortex
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
D2-Rezeptor	Dopaminrezeptor
EAAT	Excitatory amino-acid transporter, Glutamat-Transporter
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GC	Gyrus cinguli
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLUL	glutamate-ammonia ligase, Glutaminsynthetase
GlnTs	Glutamintransporter
GS	Glutaminsynthetase
HLA	humanes Leukozytenantigen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases
KAINAT	ionotroper non-NMDA Glutamat-Rezeptor
li./re.	links/rechts
LSAB	labeled streptavidin-biotin technique
LSD	Lysergsäurediethylamid
mGlu	metabotroper Glutamat-Rezeptor

MHC	major histocompatibility complex
mM	Millimol
mm ³	Kubikmillimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
µm	Mikrometer
NAAG	N-acetylaspartylglutamate
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OFC	Orbitofrontalkortex
PAG	phosphataktivierte Glutaminase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
VGlut	vesikulärer Glutamat-Transporter
VSF	Volumenschrumpfungsfaktor
vs.	versus
5HT2A-R.	Serotonin-Rezeptor

1 Einleitung

1.1 Abgrenzung der Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine der schwersten und häufigsten psychiatrischen Erkrankungen, welche in sehr heterogenen Formen auftreten kann. So vielfältig die beobachteten Veränderungen sind, so mannigfaltig sind auch die damit verknüpften Erklärungsversuche der Entstehung. Die Schizophrenie bildet eine Ausnahmeerscheinung in der Medizin in Bezug auf die Unschärfe der Definitionen durch die ausgeprägte Heterogenität der Symptomatik.

Dabei gibt es zum einen hypothetische Konstrukte, die auf bedeutsame Persönlichkeiten zurückzuführen sind. So beschrieb E. Kraepelin 1896 als erster diese Erkrankung unter dem Namen „Dementia praecox“ und grenzte sie mit seiner Definition vom manisch-depressiven Irresein ab. 1911 leistete E. Bleuler einen sehr wichtigen Beitrag für die Beschreibung des Leidens, indem er die Definition weiter fasste als Kraepelin und von einem schizophrenen Formenkreis sprach. Unter dem Einfluss von S. Freud erfasste er auch psychodynamische Aspekte. Die Relevanz seines Schaffens auf die heutige Situation ist insofern gegeben, als dass er offen war für eine weitgefasste Definition, welche sich auf eine Verknüpfung zwischen Neuropathologie, theoretischem Konstrukt und Psychopathologie bezog. Auch heute ist eine Definition nur auf dieser Basis möglich und nicht ausschließlich aus einem Blickwinkel zu betrachten ¹. Als weiterer Vertreter ist K. Schneider zu nennen, welcher 1938 Symptome ersten und zweiten Ranges aufstellte und damit eine neue Definitionsgrundlage schuf.

Demgegenüber gibt es internationale Übereinkommen, welche die Symptomatik und den Verlauf der Krankheit zur Grundlage der Diagnosefindung legen. So sind die ICD-10 ² und das DSM ³ zu nennen. Diese Übereinkünfte sind zwar ausreichend verlässlich, dennoch nicht frei von Revisionen und auch nicht ganz einheitlich.

Die Schwierigkeit der Beschreibung ist des Weiteren dadurch bedingt, dass spezifische Symptome wie Denkstörungen, Sinnestäuschung, Wahn oder affektive Störungen ebenso organisch, zum Beispiel durch Tumoren, Anfälle, ZNS-Erkrankungen oder Drogen, bedingt sein können.

Das Ausmaß und die Vielfältigkeit an Symptomen machen in jedem Fall deutlich, dass komplexe Alterationen als ursächlich anzunehmen sind. Dabei ist die Frage bis heute nicht geklärt, ob multiple Veränderungen ähnliche Symptome bewirken oder ob doch eine einzige Pathologie als Ursache zu erwarten ist ⁴.

Auf dieser Basis werden ausgedehnte Hirnareale und -systeme, neurobiochemische Prozesse, genetische Aspekte und auch kognitiv-psychologische Ansätze untersucht.

1.2 Epidemiologie, Genetik, Symptomatik

Epidemiologisch betrachtet liegt die Prävalenz der Schizophrenie bei 1,4-4,0%. Dabei gibt es geschlechts- oder ethnospezifisch keine wesentlichen Unterschiede.

Es gibt eindeutige Hinweise auf genetische Faktoren, die begünstigend auf die Krankheitsentstehung wirken. Familienuntersuchungen ergaben ein erhöhtes Risiko für Verwandte an Schizophrenie zu erkranken. Dieses steigt sich bei Erkrankung beider Eltern auf ca. 40% für die Kinder. Zwillingsstudien zeigten eine 31-78%ige Konkordanz bei eineiigen Zwillingen und unterstützen die Untersuchungsergebnisse, welche allerdings differieren und nur als Richtwerte zu betrachten sind. Man geht hierbei von einer polygenen Vererbung aus ⁴.

Risikogene konnten bereits erfolgreich identifiziert werden, wenn sie bisher auch nur geringe Aspekte der Krankheit erklären können und man von zahlreichen noch nicht erkannten Suszeptibilitätsgenen ausgehen muss. Es ist beispielhaft das Gen für das Protein Neuregulin zu nennen. Es ist unter anderem an der Hirnentwicklung, der Myelinisierung und an der Expression von Transmitterrezeptoren beteiligt und wurde vermindert bei schizophren Erkrankten gefunden ⁵. Ein weiteres Kandidatengen ist das Gen für die Catechol-O-Methyltransferase, kurz COMT. Dieses Enzym konnte immunhistochemisch signifikant erhöht in Gliazellen im frontalen Kortex bei Schizophrenen im Vergleich zu gesunden Vergleichspersonen dargestellt werden ⁶. Genomweite Studien fanden spezifische Genloci bei schizophren Erkrankten, so ein Gen für ein Zinkfingerprotein ⁷ und auch eines für ein HLA-Antigen ⁸, welches eine immunologische Komponente bei der Schizophrenie vermuten lässt.

Zur Symptomatik der Schizophrenie sind die Störungen des Denkens, der Wahrnehmung bzw. des Ich-Erlebens und der Affektivität voranzustellen. Es können im Verlauf kognitive Defizite beobachtet werden. Halluzinationen, Wahnerleben und das Verlorengehen des Gefühls der Individualität spielen eine wesentliche Rolle. Auch kann die Sprache betroffen sein.

Diese typische Symptomatik tritt meist im jungen Erwachsenenalter nach einer jahrelangen unspezifischen Prodromalphase auf. Die Symptome dieser Phase umfassen Gedankenbeeinflussung, Beziehungsideen oder auch vorübergehende psychotische Symptome. Diese Vorzeichen zu erkennen ist wichtig und kann für die Therapie von Nutzen sein ⁴.

Für die Diagnosestellung der manifesten Erkrankung wurden laut ICD-10 verschiedene Symptome festgelegt, die über wenigstens einen Monat bestehen müssen. Entweder mindestens ein Hauptsymptom oder zwei akzessorische Symptome müssen vorliegen. Hauptsymptome stellen Stimmenhören, Gedankeneingebung oder -ausbreitung als auch Wahn- und Ich-Störungen dar. Die akzessorischen Symptome sind beispielsweise die Katatonie, anhaltende Halluzinationen in Verbindung mit Wahn, Zerfahrenheit oder Neologismen und Negativsymptome wie Apathie oder Affektverflachung².

Mit Einführung der Antipsychotika konnte die Positivsymptomatik, wie Wahn und Gedankeneingebung, zunehmend besser behandelt werden, wodurch die Negativsymptome stärker in den Fokus rückten. Diese sind zum Beispiel der emotionale Rückzug, Depressionen oder Motivationsverarmung.

Des Weiteren ist anzumerken, dass das Suizidrisiko für schizophrene Patienten erhöht ist. Bei 10-20% der Erkrankten ist mit einem Suizid nach einer akuten Phase im Rahmen einer postpsychotischen Depression zu rechnen⁹. Wie man heute weiß, gehen die psychotischen Symptome in der akuten Phase mit einer Inflammation und Ausschüttung von Zytokinen einher, welche auch auf den Glutamatstoffwechsel im Gehirn wirken. Bei schizophren Erkrankten, die einen Suizid begingen, wurde in einer Studie eine signifikante Verminderung der Glutaminsynthetase, einem essenziellen Enzym im Glutamatstoffwechsel, gefunden. Dieses Ergebnis lässt Schlussfolgerungen auf Störungen im besagten Stoffwechsel in Bezug auf eine schizophrene Psychose und möglicherweise auch auf den Suizid bei schizophren Erkrankten zu¹⁰.

1.3 Neuropathologie

Es gibt zahlreiche neuropathologische Forschungsarbeiten, die zeigen, dass es hirnstrukturelle Veränderungen gibt, vor allem frontal, temporal und im limbischen System auftretend. Es ist davon auszugehen, dass wesentliche Funktionen des Gehirns bei schizophrenen Patienten gestört sind, wobei sich diese zu einem großen Teil auf das limbische System, welches eine herausragende Rolle bei der Entstehung von Emotionen und Trieben hat, beziehen. Im Folgenden werden diese Aspekte näher erläutert und ihre Beziehung zur schizophrenen Erkrankung dargestellt.

1.3.1 Informationsverarbeitung im Gehirn

Nach einer von vielen Einteilungen kann man das Gehirn in drei große Komplexe unterteilen. Dabei gibt es den phylogenetisch jungen Neokortex für höhergradige kognitive Funktionen, das phylogenetisch alte Gefüge aus Septum, Hypothalamus und Hirnstamm für Triebe und Emotionen und zuletzt das limbische System, welches eine wichtige Verbindung zwischen den anderen beiden genannten Konstrukten darstellt.

Die neuronale Informationsverarbeitung hat trotz ihrer Vielfältigkeit einen gut definierten Ablauf. So gelangen die Reize der einzelnen Sinnesmodalitäten fast ausschließlich zunächst zum Thalamus, welcher in primär sensorische Kortexareale projiziert. Über sekundäre unimodale Areale gelangen die Informationen dann zu den tertiären multimodalen Kortexgebieten, wo die verschiedenen Sinnesqualitäten erstmals zusammengeführt werden und so eine Einheit entsteht. Letztendlich laufen die Signale im limbischen System, namentlich im Hippocampus und Mandelkern, zusammen und werden nach Bedeutsamkeit gefiltert, was durch Kooperation mit dem vorgeschalteten Kortex und den bisherigen Erfahrungen realisiert wird ¹¹. Dabei werden jene neuronalen Kreise stärker, die oft genutzt werden, und Synapsen, die nicht beansprucht werden, können mit der Zeit zu Grunde gehen. Dieses Phänomen nennt man Plastizität. Durch ein negatives psychosoziales Umfeld oder sensorische Deprivation kann so ein primär intaktes Gehirn krank werden. Es gibt dabei eine sogenannte kritische Phase, meist im ersten Lebensjahr, in der diese Plastizität besonders stark beeinflussbar ist. Nach Abschluss dieser Periode lässt das Phänomen stark nach und neuronale Verbindungen sind nur noch in sehr geringem Maße formbar, was sich auch in der unzulänglichen therapeutischen Beeinflussung äußert ¹². An diesem Problem wird intensiv geforscht und es sind bereits Ergebnisse publiziert worden, wie man mit Modulation inhibitorischer neuronaler Kreise die Plastizität in adulten Gehirnen zu stimulieren in der Lage sein könnte ¹³.

Neben der Projektion des Thalamus in den Kortex ist es darüber hinaus auch möglich, dass ersterer Informationen direkt zum Mandelkern leitet, wodurch eine spontane emotionale Bewertung mit verzögerter kortikaler Kontrolle erzeugt wird. Störungen bei diesen Rückkopplungsmechanismen spielen in der Pathophysiologie von Angststörungen eine maßgebliche Rolle ¹⁴.

1.3.2 Neuropathologische Alterationen bei schizophrenen Erkrankten

Im letzten Jahrhundert wurden viele Untersuchungen bezüglich neuropathologischer Alterationen durchgeführt, wobei die Ergebnisse teilweise kontrovers und umstritten waren. Erst mit Entwicklung von CT und MRT gelang der sichere Nachweis von strukturellen Veränderungen in Gehirnen schizophrener Erkrankter, wodurch die Schizophrenieforschung einen enormen Aufschwung erfuhr.

Klassische Veränderungen neuropathologischer Erkrankungen wie eine Gliose oder Degeneration sind in Gehirnen schizophrener Patienten nicht zu verzeichnen¹⁵. Allerdings konnten andere charakterisierende Abweichungen wie beispielsweise eine signifikante Erweiterung der Liquorräume bei schizophrenen Patienten gezeigt werden^{16, 17}, sowie auch ein reduziertes Gesamtvolumen des Gehirns. Zytoarchitektonische Veränderungen werden im temporalen und frontalen Kortex, im Thalamus, in den Basalganglien und im limbischen System beschrieben. Auch eine Verringerung der hemisphärischen Asymmetrie konnte nachgewiesen werden^{18, 19}. Im Folgenden werden die einzelnen Pathologien kurz zusammengefasst.

Auf kortikaler Ebene spielt das Frontalhirn im Sinne einer Hypofrontalität eine wesentliche Rolle. Insbesondere im dorsolateralen Präfrontalkortex konnten Veränderungen gezeigt werden. Diese betreffen vor allem das sogenannte Neuropil, welches das neuronale Gewebe zwischen den Zellkörpern darstellt^{20, 21}.

Ein weiteres wichtiges neuronales Gefüge, das Veränderungen bei schizophren Erkrankten aufweist, ist das limbische System. Der mediale Temporallappen mit dem Hippocampus und parahippocampalen Strukturen sowie der Gyrus cinguli bedürfen einer besonderen Aufmerksamkeit. Das limbische System ist eng mit dem frontalen Kortex gekoppelt und Veränderungen in einem Areal können Alterationen in dem jeweils Anderen nach sich ziehen²².

Darüber hinaus ist der Thalamus als zentrale Umschaltstation in den Fokus des Interesses gerückt, wobei insbesondere der Nucleus anterior von Belang ist, da dieser zum limbischen System zu zählen ist, sowie der mediodorsale Thalamuskern, welcher reziprok mit dem dorsolateralen Präfrontalkortex verschaltet ist.

Auf zellulärer Ebene stehen die Gliazellen im Mittelpunkt der Untersuchungen, nachdem die vielfältigen metabolischen und interagierenden Funktionen dieser Zellen erforscht wurden. So gibt es innerhalb dieser Zellpopulation Astrozyten, Oligodendrozyten und die Mikroglia. Astrozyten umgeben die Synapsen und bilden die Blut-Hirn-Schranke. Außerdem sind sie in hohem Maße an der Neurotransmission beteiligt. Dabei dienen sie dem Glutamin-Recycling und spielen eine große Rolle in der sogenannten Glutamathypothese, auf welche weiter unten eingegangen wird. Bei schizophrenen Patienten wurde eine Verminderung von Astrozyten und dem von ihnen exprimierten Enzym GFAP gefunden²³.

Oligodendrozyten sind an der Myelinisierung und an der neuronalen Migration beteiligt. Auch bei diesem Zelltyp konnten Veränderungen festgestellt werden, was als Konnektivitätsstörung zwischen verschiedenen Arealen, zum Beispiel dem frontalen und dem limbischen Kortex, gewertet werden kann²⁴.

Die Mikroglia ist dem immunologischen System im Gehirn zuzuordnen und von Veränderungen bei schizophren Erkrankten ebenfalls betroffen, was eine immunologische bzw. inflammatorische Komponente bei dieser Erkrankung vermuten lässt²⁵ und in einem eigenen Kapitel nachfolgend erläutert wird.

Bei den neuropathologischen Veränderungen schizophrener Patienten wird zudem diskutiert, ob es sich um eine angeborene Hirnentwicklungsstörung oder erworbene, fortschreitende Degenerationen handelt. Dabei bleiben die Forschungsergebnisse bislang uneinheitlich. Primär wurde von einer Hirnentwicklungsstörung ausgegangen, da die Pathologien nicht progressiv zu sein schienen. Neuere Studien konnten jedoch ein Voranschreiten der Volumenminderung vorwiegend im Assoziationskortex feststellen. Auch im Hippocampus konnte während des Krankheitsbeginns, nicht aber in späteren Phasen, ein solcher Progress verzeichnet werden^{26, 27}. Atypische Neuroleptika wurden bei diesen Prozessen als protektiv beschrieben²⁸. Dem gegenüber konnten allerdings auch Migrationsstörungen von Zellpopulationen im entorhinalen Kortex nachgewiesen werden, welche in diesem Fall gegen eine erworbene Störung sprechen²⁹. Auch im Orbitofrontalkortex wurden pathologische Veränderungen des Myelins und der Dendriten bei schizophren Erkrankten gefunden, was eher für eine Hirnentwicklungsstörung sprechen würde³⁰. Weiterhin wurden unterstützend für eine angeborene Pathologie Gyriifizierungsstörungen im frontalen Kortex Schizophrener festgestellt³¹.

1.4 Transmitterveränderungen bei Schizophrenen

Die Übertragung von Informationen geschieht durch Erregung und Hemmung von Nervenzellen. Das wird im Gehirn durch das Binden von Transmittern an ihre spezifischen Rezeptoren erreicht. Dadurch kommt es zu einem Ionenstrom oder der Aktivierung sekundärer Botenstoffe, was dann die Signalübertragung gewährleistet.

Zur Erklärung der neuropathochemischen Grundlagen der Schizophrenie wird überwiegend die traditionelle Dopaminhypothese herangezogen, welche bereits seit vielen Jahren diskutiert wird³².

Ursprünglich ging man dabei davon aus, dass eine Dopaminüberaktivität bei Schizophrenen vorliegt, was sich unter anderem darauf begründet, dass die klassischen Antipsychotika als D2-Rezeptorblocker den psychotischen Symptomen entgegenwirken und dopaminstimulierende Wirkstoffe wie Amphetamine oder L-Dopa zu schizophrenieähnlichen Psychosen führen können.

Da das dopaminerge System, neben extrapyramidalen, endokrinen und vegetativen Funktionen, insbesondere auch auf Emotionen und das Gedächtnis in mesokortikalen und limbischen Bereichen wirkt, sind vor allem Veränderungen der zuletzt genannten Areale für die Schizophrenieforschung vordergründig³³. Doch auch im Striatum sind Veränderungen beschrieben, welche mit kognitiven Symptomen in der Schizophrenie einhergehen³². Es kam zu kontroversen Ergebnissen in Studien, die zum einen keine Konzentrationsveränderungen von Dopamin bei Schizophrenen fanden³⁴, als auch Publikationen, die die Hypothese weiter unterstützten^{35,36}.

Eine revidierte Fassung der Dopaminhypothese besagt, dass es durch Alterationen im frontalen Kortex und in limbischen Arealen zu einer nicht ausreichenden Hemmung der dopaminergen Neurone im Mittelhirn kommt, was wiederherum zu einer erhöhten Transmitterausschüttung subkortikal führt³⁷. Diese Annahme wird durch andere Studien gestützt, die frontale und limbische Störungen beschreiben. Auch in Tierversuchen wurden entsprechende Ergebnisse festgestellt³⁸. Dabei wird vermutet, dass eine dopaminerge Hyperfunktion eher die Positiv- und eine Hypofunktion eine Negativsymptomatik bedingen könnte. Sicher ist in jedem Fall eine Dysregulation der dopaminergen Transmission³³.

In dieser Arbeit steht der Neurotransmitter Glutamat im Vordergrund des Interesses. Diese Aminosäure stellt den bedeutendsten exzitatorischen Transmitter im Gehirn dar. Er bindet an die ionotropen NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren und metabotropen Glutamatrezeptoren. Wie bereits angemerkt, hat der Glutamatstoffwechsel auch in der Pathogenese der Schizophrenie eine erhebliche Bedeutung. Folgende Illustration stellt die relevanten Prozesse schematisch dar.

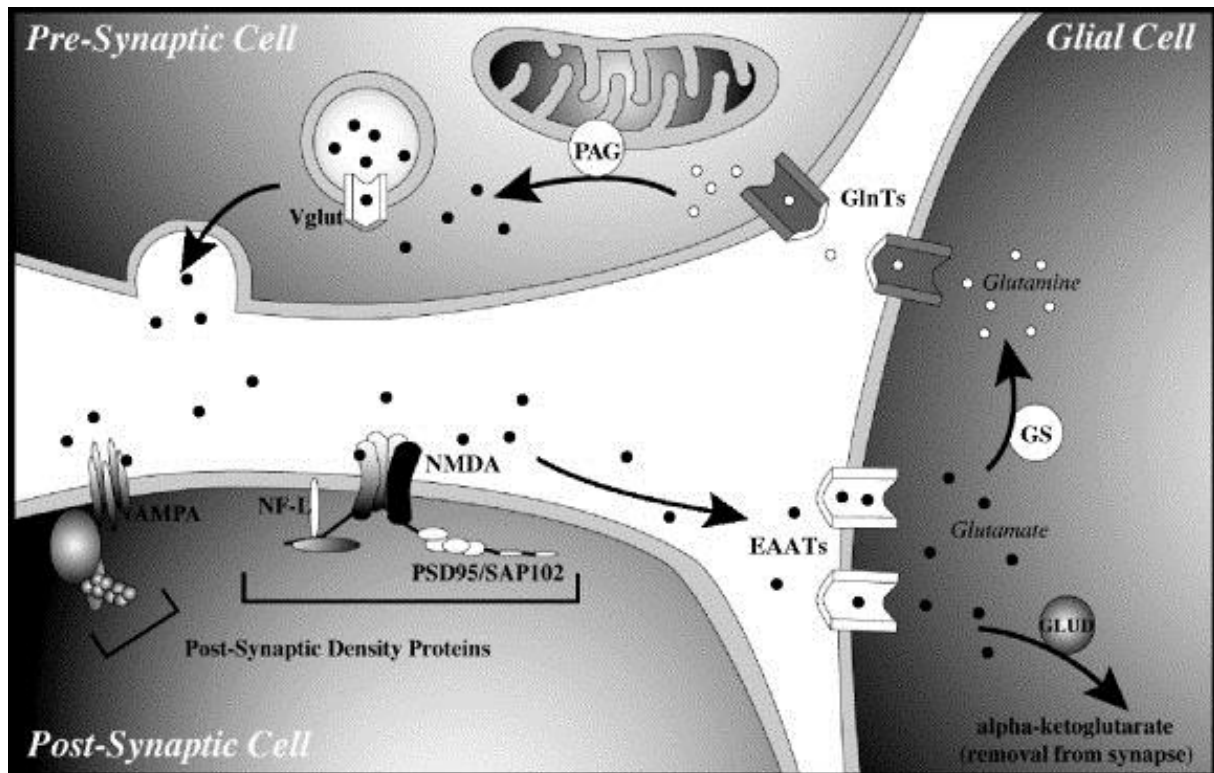


Abb. 1: Darstellung des Glutamatstoffwechsels im Gehirn, übernommen aus ³⁹.

Es sind eine präsynaptische Zelle (oben), eine postsynaptische Zelle (unten) und eine Gliazelle (rechts) abgebildet. Die schwarzen Punkte stellen den Transmitter Glutamat dar, welcher an AMPA- und NMDA-Rezeptoren andockt. Dadurch öffnen sich diese Ionenkanäle und es kommt durch Kationen zur Erregung der postsynaptischen Zelle. Das Glutamat im präsynaptischen Spalt wird dann durch exzitatorische Aminosäuretransporter (EAAT) in die Gliazelle aufgenommen, wo der Botenstoff durch Glutamatdehydrogenase (GLUD) zu Alpha-Ketoglutarat und von der Glutaminsynthetase (GS) zu Glutamin umgewandelt wird. Das entstandene Glutamin gelangt wiederherum durch spezifische Transporter (GlnTs) in die Präsynapse, in der sich der Kreislauf durch die Umwandlung zu Glutamat mit Hilfe der phosphataktivierten Glutaminase (PAG) schließt. Dieses wird dann in Vesikel eingeschlossen und kann durch vesikuläre Glutamat-Transporter (VGLUT) erneut in den präsynaptischen Spalt abgegeben werden.

Forschungsarbeiten liefern zur Glutamathypothese zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Mehr als der Beleg, dass es Regulationsschwierigkeiten bei schizophrenen Patienten gibt, lässt sich noch nicht aussagen. Fest steht, dass der Glutamatkreislauf verändert ist ⁴⁰. Überwiegend wird jedoch von einer Verarmung an Glutamat bei Schizophrenen im Kortex ausgegangen.

Die Hypothese einer glutamatergen Störung der Neurotransmission bei schizophrenen Patienten geht auf ein Modell zurück, welches psychomimetische Drogen wie Phencyclidin (PCP) und Ketamin als NMDA-Rezeptor-Antagonisten, die schizophrenieähnliche psychotische Symptome und neurokognitive Störungen hervorrufen können, als Grundlage erfasst ^{41, 42}.

Da der NMDA-Rezeptor multipel im Gehirn vorhanden ist, kann angenommen werden, dass Störungen nicht auf eine bestimmte Region beschränkt sind. Darüber hinaus findet man den NMDA-Rezeptor zudem in Schaltkreisen, welche an der Regulation der dopaminergen Transmission beteiligt sind und so Änderungen dieses Transmitters bedingen könnten ⁴¹.

NMDA-Rezeptor-Agonisten wie Glycin, D-Serin, D-Cycloserin und Glycintransporter-Inhibitoren sind Gegenstand derzeitiger Forschung, um denkbar vielversprechende neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten zu eruieren ⁴³.

Eine modifizierte Theorie der Rezeptorhypofunktion besagt, dass eine Störung der NMDA-Rezeptor-Transmission im limbischen System durch eine verringerte Aktivierung der inhibitorischen Interneurone zu einer Hyperfunktion der nachgeschalteten Nervenzellen führt ⁴⁴. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die Modulation des NMDA-Rezeptors durch Glycin als Agonist eine geringgradige antipsychotische Wirkung bewirkt und die Negativsymptomatik günstig beeinflusst, was durch die klassischen Neuroleptika bisher nicht gelang ⁴⁵. Dabei ist anzumerken, dass höhere Dosen von Glutamat oder dessen Agonisten auch neurotoxisch wirken, wodurch die therapeutische Relevanz der Behandlung von Negativsymptomen eingeschränkt wird. Darüber hinaus weiß man heute, dass auch der metabotrope Glutamatrezeptor in der Entstehung psychotischer Symptome eine Rolle spielt und als weiteres Ziel in der medikamentösen Intervention bei Schizophrenie untersucht werden sollte. In einer Studie wurde für LY2140023, einem selektiven Agonisten für einen metabotropen Glutamatrezeptor, eine vielversprechende Wirkung sowohl auf Positiv- als auch auf Negativsymptomatik gezeigt ⁴⁶.

Es wird auch intensiv an den einzelnen Elementen des Glutamatstoffwechsels geforscht. So wurde die Glutaminsynthetase-Aktivität in Gliazellen untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass quantitativ am meisten von diesem Enzym in Astrozyten enthalten ist. Auch Oligodendrozyten sollen Glutaminsynthetase beinhalten, wenn auch in geringerem Maße. In Neuronen kann sie bisher nur vermutet werden, da der Nachweis mit den gängigen Methoden noch nicht möglich ist. Diese ist jedoch dort wenn überhaupt in wesentlich geringerer Menge als in den Astrozyten zu erwarten ⁴⁷. Die Ergebnisse bezüglich dieses Enzyms sind teilweise kontrovers. So wird eine Hochregulation der Glutaminsynthetase im anterioren Gyrus cinguli ⁴⁸ beschrieben, während andere eine Herabregulation fanden ^{49, 50}. Im Thalamus ist die Glutamatexpression ebenfalls verändert, wobei eine Erniedrigung in vielen Kernen desselben festgestellt werden konnte.

Dabei handelte es sich um großzellige Populationen, welche neuronenspezifisch sind. Es konnte belegt werden, dass Projektionsneurone signifikant weniger Glutamat exprimieren und so multiple Schaltkreise beeinflussen können, was zu einem globalen Effekt in den Projektionsarealen führen kann. In kleinzelligen Populationen wurde keine Veränderung festgestellt, was für eine gliäre Abweichung gesprochen hätte. Weitere Enzyme wie die Glutaminase, aber auch die Glutaminsynthetase, sind dabei zudem als vermehrt im Thalamus bei schizophrenen Patienten beschrieben worden³⁹. Veränderungen des Glutamatstoffwechsel sind auch im dorsolateralen Präfrontalkortex belegt, so beispielsweise der Glutaminsynthetase und der Glutamatdecarboxylase⁴⁰ bzw. der Glutamatcarboxypeptidase⁵¹.

Ein weiterer bedeutender Neurotransmitter im Gehirn ist die γ -Aminobuttersäure, kurz GABA, welche in inhibitorischen Interneuronen ubiquitär im Gehirn vorkommt und mit Hilfe von Glutamatdecarboxylase aus Glutamat hergestellt wird. Bei schizophrenen Patienten kommt es zu einer abnormalen Funktion dieser Verschaltungen vor allem hippocampal⁵² und frontal⁵³. Obwohl die Ergebnisse nicht ganz einheitlich sind, muss von einer Dysregulation ausgegangen werden. Inwiefern diese Resultate jedoch für eine therapeutische Intervention eine Rolle spielen, steht noch aus⁵⁴. Benzodiazepine als GABA-Agonisten zeigen in Untersuchungen indessen keine ausreichende antipsychotische Wirkung bei schizophren Erkrankten.

Eine eher nachgeordnete Bedeutung bzgl. der Schizophrenie spielt das Serotonin. Zwar sind psychotrope Effekte, welche eine schizophrenieähnliche Symptomatik erzeugen, durch Mescaline oder LSD als Serotoninagonisten beschrieben⁵⁵, jedoch ist eine Verbindung zwischen Schizophrenie und Serotoninalterationen bislang nicht hinreichend nachgewiesen worden. Es konnte allerdings ein Zusammenhang zwischen suizidalen schizophrenen Patienten und einem Gen für einen Serotonintransporter gezeigt werden⁵⁶ nicht aber zu schizophren Erkrankten im Allgemeinen.

1.5 Immunologie und Inflammation im schizophrenen Formenkreis

Mehrfach wurde bereits eine immunologische Komponente der Schizophrenie untersucht. Eine Studie konnte belegen, dass bei schizophren Erkrankten eine Alteration eines HLA-Gens ein höheres Risiko darstellt an Schizophrenie zu erkranken⁸. Es wird dabei spekuliert, ob eine Aktivierung von Akute-Phase-Proteinen kausal für den veränderten Zytokinhaushalt bei schizophrenen Patienten sein könnte. Ein erhöhtes TNF α und IL4 ergaben einen direkten Zusammenhang mit der akuten Psychose einer Schizophrenie⁵⁷.

Auch bei IL2 und IL6 konnten Veränderungen gezeigt werden⁵⁸. Aktivierte Mikroglia gilt als gesicherte Komponente bei der Herausbildung von suizidalen Syndromen und auch bei Psychosen, wobei dadurch die Immunantwort von einer zellulären zu einer humoralen Immunreaktion verschoben wird^{59, 25}.

1.6 Fragestellung der vorliegenden Dissertation

Ziel der Arbeit ist es zu klären, ob die Expression der Glutaminsynthetase in den Astrozyten bestimmter Hirnabschnitte bei Schizophrenen im Gegensatz zu gesunden Probanden vermindert ist.

Zielregionen sind dabei der dorsolaterale Präfrontalkortex, der anteriore cinguläre Kortex und der orbitofrontale Kortex, da diese Areale in der Schizophrenieforschung eine zentrale Rolle spielen. Die Pathologien der schizophrenen Erkrankung betreffen nicht unerheblich auch die Neurotransmission mittels Glutamat, was hypothetisch auf das Modell der weiter oben erläuterten Phencyclidin-induzierten schizophrenieähnlichen Psychose zurückgeführt werden kann⁴³. Die der Dissertation zugrunde gelegte Hypothese impliziert, dass die Expression der Glutaminsynthetase in den untersuchten Hirngebieten bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu gesunden Vergleichsfällen vermindert ist, da eine Dysfunktion in der Regulation des Glutamatstoffwechsel-Kreislaufs bei dieser Erkrankungen anzunehmen ist⁴⁰ und innerhalb der kortikalen Hirnareale tendenziell häufiger Verminderungen gefunden wurden und so im Allgemeinen überwiegend von einer Reduktion auszugehen ist^{49, 50}.

Um diesen Beweis anzutreten, wurde an seriellen post-mortem Gehirnen mittels immunhistochemischer Anfärbung der Zellen durch einen Antikörper gegen Glutaminsynthetase die numerische Zelldichte der dieses Enzym enthaltenden Astrozyten in der grauen Substanz ermittelt. Bezüglich der Zählung wurden die äußeren Schichten I, II und III von den übrigen tiefliegenden Schichten IV, V und VI des Kortex getrennt beurteilt, da bereits abweichende Ergebnisse schichtenspezifisch belegt werden konnten^{60, 30}. Auch wurde der Tod durch Suizid in die Betrachtung separat mit einbezogen, weil für diesen Aspekt individuelle Ergebnisse vorliegen und man aus diesem Grund die allgemeine Diagnose der Schizophrenie von suizidalen Patienten differenziert beurteilen wollte^{10, 25, 56}.

2 Material und Methoden

2.1 Schizophrene Patienten und Kontrollfälle als Untersuchungsmaterial

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gehirne entstammen der Hirnsammlung der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. Voraussetzung für die Benutzung dieser Hirne war die schriftliche Einwilligung Angehöriger der Verstorbenen und der örtlichen Ethikkommission.

Es wurden die Gehirne von 14 schizophrenen Patienten und 15 gesunden Vergleichsfällen untersucht. Es erfolgte vorab eine statistische Prüfung bezüglich der Homogenität der beiden Testgruppen in Hinblick auf Alter, Geschlecht, Autolyse- und Fixationsdauer, Krankheitsbeginn und –dauer. Bei der Varianzanalyse zeigten sich dabei keine signifikanten Ergebnisse wie der nachfolgenden Tabelle 1 zu entnehmen ist.

Die Gruppe der schizophren Erkrankten umfasste 14 Gehirne von Patienten im Alter zwischen 40 und 76 Jahren, wobei der Krankheitsbeginn im Durchschnitt bei 31 Jahren lag und die Erkrankungsdauer 19 Jahre umfasste. Unter den Patienten waren drei, die einen Suizid begingen. Sowohl die Diagnosestellung als auch die Klassifikation der Krankheit wurde anhand der jeweiligen Krankenakten und der ICD-10² gestellt. So wurden sechs Patienten der paranoid-halluzinatorischen Schizophrenie (ICD-10: F20.0) und fünf Patienten dem schizophrenen Residuum (ICD-10: F20.5) zugeordnet. Bei den übrigen drei Fällen bestand keine nähere Differenzierung der Erkrankung (ICD-10: F20.3). Ausgeschlossen wurden Patienten mit chronischen oder demenziellen Krankheiten, neurologischen Erkrankungen und begleitendem Alkohol- oder Drogenabusus. Die schizophrenen Patienten waren medikamentös mit Neuroleptika ohne weitere Klassifizierung behandelt worden. Hinsichtlich der Todesursache fand eine Trennung zwischen suizidalen und nichtsuizidalen Schizophrenen statt.

Die Gruppe der neuropsychiatrisch gesunden Kontrollen umfasste 15 Gehirne bei einem Alter der Personen zwischen 38 und 64 Jahren. Es wurden demenzielle und neuropsychiatrische Erkrankungen, schwere Allgemeinerkrankungen sowie die Einnahme von zentral wirksamen Medikamenten als Ausschlusskriterien der Untersuchung betrachtet.

Proband	Geschlecht	Alter [Jahre]	Autolyse-dauer [h]	Fixations-dauer [Tage]	Krankheitsbeginn [Jahre]	Krankheitsdauer [Jahre]
Gesunde (n=15)						
1	m	56	48	75	-	-
2	m	47	24	84	-	-
3	m	56	30	225	-	-
4	m	64	35	240	-	-
5	m	56	24	510	-	-
6	m	63	48	540	-	-
7	m	54	24	250	-	-
8	w	52	24	60	-	-
9	w	48	48	61	-	-
10	w	64	24	75	-	-
11	w	50	72	120	-	-
12	w	61	8	780	-	-
13	w	38	24	258	-	-
14	w	61	24	820	-	-
15	w	63	24	828	-	-
7m / 8w		55,5 ± 7,5	32,1 ± 15,7	328,4 ± 290,0	-	-
Schizophrene (n=11) nicht Suizid						
15	m	51	48	300	23	28
16	m	50	48	120	25	25
17	m	48	48	210	16	32
18	m	61	24	-	26	35
19	m	58	24	240	33	25
20	m	54	48	307	20	34
21	w	61	24	270	58	3
22	w	62	24	274	46	16
23	w	59	48	273	52	7
24	w	40	48	94	21	19
25	w	54	24	150	36	18
6m / 5w		54,4 ± 6,8	37,1 ± 12,5	223,8 ± 77,0	32,4 ± 14,1	22,0 ± 10,6
Schizophrene (n=3) Suizid						
26	m	76	12	1.440	50	26
27	w	52	24	120	24	28
28	w	55	48	290	49	6
1m / 2w		61,0 ± 13,1	28,0 ± 18,3	616,7 ± 718,1	41,0 ± 14,7	20,0 ± 12,2
Differenzstatistik						
Test	Chi ² - Test	ANOVA	ANOVA	ANOVA	t-Test	t-Test
KW	χ ² =0,457	F=0,848	F=0,599	F=1,975	T =-0,909	T = 0,283
p-Wert	0,858	0,440	0,557	0,160	0,429	0,813

Tab. 1: Varianzanalyse konfundierender Variablen. Angewandte Tests (Chi-Quadrat, t-Test) ergeben keine signifikanten p-Werte > 0,05, woraus folgt, dass sich die untersuchten Gruppen nicht signifikant voneinander unterscheiden.

2.2 Untersuchungsmethoden

2.2.1 Aufbereitung der post-mortem Gehirne

Die Gehirne wurden nach einer durchschnittlichen Autolysedauer von 32,1 Stunden mit einer Standardabweichung von 15,7 Stunden bei den Kontrollen bzw. nach 35,1 Stunden mit einer Standardabweichung von 13,7 Stunden bei den schizophrenen Patienten nach Eintritt des Todes entnommen, fotografiert und anschließend in einer 10%igen phosphatgepufferten Formaldehydlösung für mindestens zwei Monate fixiert. Die Hirne lagerten so bei einer Temperatur von 15-20 Grad Celsius und einem pH-Wert von 7,0. Nachdem dieser Fixierungsprozess abgeschlossen war, wurden die Hirne in einen Frontal-, Mittel- und Okzipitalblock zerlegt. Die Schnitte wurden in der Koronarebene am vorderen Pol vor dem Knie des Balkens und am hinteren Pol hinter dem Splenium gesetzt. Der Hirnstamm wurde auf Höhe der Lamina quadrigemina entfernt.

Für diese Arbeit wurde der Frontalblock zur Untersuchung verwendet, welcher in Paraplast eingebettet wurde. Es wurde zunächst erneut eine Fotografie der Hirnblöcke angefertigt, um die Schrumpfung des Volumens durch die Einbettung des Gewebes mit dem sogenannten Schrumpfungsfaktor später zu korrigieren. Dieser Faktor wird weiter unten aufgeschlüsselt. Nach der beschriebenen Fixierung wurde das Gewebe drei Stunden lang mit Wasser gründlich gespült, um anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert zu werden. Hierbei wurde mit einer 50%igen Alkohol-Lösung begonnen und wöchentlich die Konzentrationen bis 96% erhöht. Eine weitere Woche verbrachten die Gehirne danach in Chloroform, welches täglich ausgewechselt wurde. Danach wurden die Blöcke in Paraplast eingebettet. Nach erneuter vierwöchiger Lagerung wurden 20 µm dicke frontale Großmikrotomschnitte mit dem Gerät Polycut S®, Jung angefertigt und auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Die endgültige Lagerung vollzog sich im Kühlraum.

Jeder 50. Hirnschnitt wurde zur anatomischen Orientierung mit einer Markscheiden-Nissl-Kombinationsfärbung angefärbt. Bei dieser Färbung werden basophile Verbindungen dargestellt. Damit gelingt eine Darstellung von Ribosomen und Nukleolen, während Gliazellen weitgehend ungefärbt bleiben, was eine sehr gute Differenzierung der einzelnen Schichten erlaubt.

2.2.2 Immunhistochemische Darstellung der Glutaminsynthetase

Das verwendete Detektionsverfahren LSAB® (labeled streptavidin-biotin technique) ist ein sehr empfindliches System, welches dem Nachweis von Gliazellen und Neuronen mittels Antigen-Antikörper-Reaktion dient und am häufigsten in der Immunhistochemie benutzt wird. Bei dieser Methode wird zuerst ein unkonjugierter Primärantikörper auf das Gewebe gegeben. Dieser soll das zu suchende Antigen, in diesem Fall die Glutaminsynthetase, erkennen und binden. Ein Biotin-markierter Sekundärantikörper wird dann zur Brückenbildung zwischen Primärantikörper und Peroxidase-markiertem Streptavidin hinzugefügt, welches eine der vier freien Bindungen am Biotin eingehen kann.

Um die Hirnschnitte derart zu bearbeiten, musste das Gewebe zunächst durch Überführung in eine wässrige Phase vom Paraplast befreit werden. Dazu wurden die Schnitte zweimal für zehn Minuten in Xylol getaucht und danach in einer absteigenden Alkoholreihe von 100%-50% für jeweils fünf Minuten hydratisiert und so aus dem Paraffin befreit. Nach einer zweimaligen Spülung mit aqua dest. wurde das Gewebe vier Minuten lang in 10mM Citratpufferlösung mit einem pH-Wert von 6,0 gekocht. Der Puffer bestand aus einer Stammlösung A, Citronensäure-Monohydrat, und einer Stammlösung B, Tri-Natrium-Dihydrat (MERCK). Danach wurde erneut mit aqua dest. gespült, woraufhin die Schnitte dann für zehn Minuten in 1,5%ige H₂O₂/PBS (SIGMA) lagen, um die Peroxidase-Aktivität und die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Nach diesem Schritt erfolgte die Spülung mit der Pufferlösung PBS zweimal für jeweils zehn Minuten. PBS ist ein Säure-Basen-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4. Das Material wurde dann mit einem speziellen Fettstift (DAKO-Stift) umrandet und für eine Stunde in einer feuchten Kammer im Taumelmischer inkubiert. Das Gewebe war danach soweit vorbereitet, dass es mit den Antikörpern behandelt werden konnte.

So fand zunächst das Beträufeln mit dem Primärantikörper gegen die Glutaminsynthetase (polyklonaler Kaninchen-Antimensch GLUL Antikörper, ATLAS antibodies/ SIGMA LS) in einer Verdünnung von 1:200 und die folgende Inkubation für 72 Stunden statt. Nach zweimaligem Spülen mit PBS kam es zur zweistündigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper (polyklonaler Ziegen-Antikaninchen Antikörper, biotinyliert, DAKO) in der Verdünnung von 1:100 im Taumelmischer. Wieder wurde zweimal mit PBS gespült. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für eine Stunde mit Streptavidin (biotinylierter Streptavidin horseradish Peroxidasekomplex, GE Healthcare UK Limited) in einer Verdünnung von 1:00 im Taumelmischer inkubiert. Noch einmal erfolgte die zweimalige Spülung mit PBS.

Nachfolgend wurde das Gewebe zur optischen Sichtbarmachung mit einer speziellen Färbelösung beträufelt und zehn Minuten im Taumelmischer geschwenkt. Die Rezeptur dieser Lösung besteht aus 0,5 g Ammonium-Nickel(II)-Sulfat-Hexahydrat (FLUKA) und 0,0125 g DAB (3,3-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid) (SIGMA).

Diese werden in 25 ml SIGMA PBS gelöst, filtriert und zu 250 µl 1%igem H₂O₂ zugegeben⁶¹. Nachdem die Färbelösung wieder abgegossen wurde, folgte eine zweimalige Spülung mit aqua dest. und zur Entwässerung wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe von 50% bis 100% gestellt. Hiernach wurde das Material mit Eukitt, einem Eindeckmedium, eingedeckt und luftblasenfrei durch Deckgläser verschlossen.

2.3 Abgrenzungskriterien der Hirnstrukturen

Die Abgrenzungskriterien der einzelnen Hirnabschnitte wurden mit Hilfe des neuroanatomischen „Atlas of the Human Brain“ von Mai et al. 2008 getroffen. Die Lage der betreffenden Areale orientiert sich an der jeweiligen Schnittebene der Frontalblöcke, welche ohne Ausnahme im rostralen Bereich noch vor Beginn des Corpus callosum gesetzt wurden.

2.3.1 Kortexareale

Der dorsolaterale Präfrontalkortex entspricht der Area 9 nach Brodmann im frontalen Hirn. Der Orbitofrontalkortex befindet sich rostral im inferioren frontalen Kortex des Gehirns und wird nach lateral vom Operculum des Frontallappens begrenzt. Medial liegt der Gyrus rectus und kaudal befinden sich der piriforme Kortex und die Insula.

Vom Gyrus cinguli wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich der anteriore Teil dieses Areals untersucht, das heißt nur Bereiche, die sich rostral des Balkens befinden. Der vordere cinguläre Kortex liegt kaudal der superioren und inferioren rostralen Hirnwindung und unterhalb des superioren Frontallappens und der frontalen limbischen Region.

Folgende Abbildungen zeigen die genaue Lokalisation der untersuchten Areale:

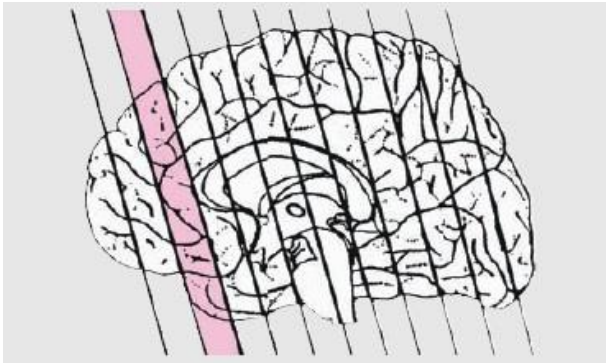


Abb. 2: Darstellung der Schnittebene der untersuchten Gehirne ⁶².
Untersucht wurde die farblich gekennzeichnete Schnittebene.

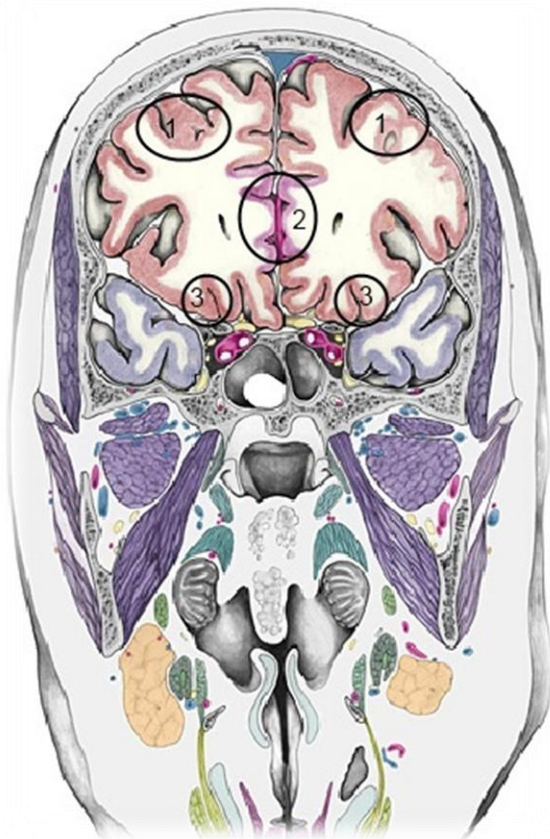


Abb. 3: Genaue Lokalisation der untersuchten Areale. Verwendet aus „Atlas of the human Brain“ ⁶³.
1: dorsolateraler Präfrontalkortex, 2: Gyrus cinguli, 3: orbitofrontaler Kortex.

2.3.2 Kortikale Schichtung

In der grauen Substanz werden sechs Schichten unterschieden, die sich histologisch unterschiedlich darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden die drei oberflächlichen Schichten I, II und III und die drei tiefliegenden Schichten IV, V, und VI jeweils getrennt gezählt. Dabei wurde sich an den jeweils direkt benachbarten Hirnschnitten in Markscheiden-Nissl-Färbung orientiert, so dass die exakte kortikale Schichtung bei der Erfassung der numerischen Zelldichten der Astrozyten genau berücksichtigt werden konnte.

2.4 Morphologische Abgrenzung der Astrozyten

Um Astrozyten von anderen immunpositiven Zellen wie Oligodendrozyten unterscheiden zu können, wurde sich an etablierten Kriterien bezüglich der Histologie der Zellen orientiert. Der Astrozyt stellt sich als eine sternförmige Zelle dar, woher auch ihr Name stammt. Man unterscheidet protoplasmatische und fibrilläre Astrozyten, wobei der protoplasmatische Typ mit einem großen Zellkörper mit prominenten Zellausläufern vorwiegend im Kortex und der fibrilläre, eher schlankere Typ mit vielen Ausläufern in der weißen Substanz zu finden ist. Neben der Astroglia findet man auch Glutaminsynthetase-immunreaktive Oligodendrozyten. Diese sind überwiegend in der weißen Substanz anzutreffen und zudem wesentlich kleiner als die untersuchten Astrozyten ⁶⁴.

Folgende Fotografien zeigen einen repräsentativen Ausschnitt aus den untersuchten Hirnschnitten:

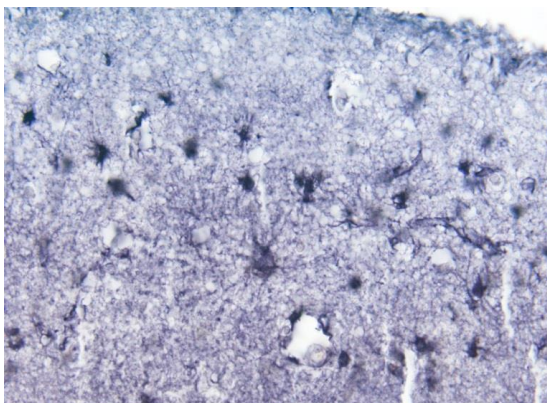


Abb. 4: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x. Anteriorer Gyrus cinguli, Lamina I, Membrana limitans Gliae. Mittig ein besonders großer sternförmiger Astrozyt.

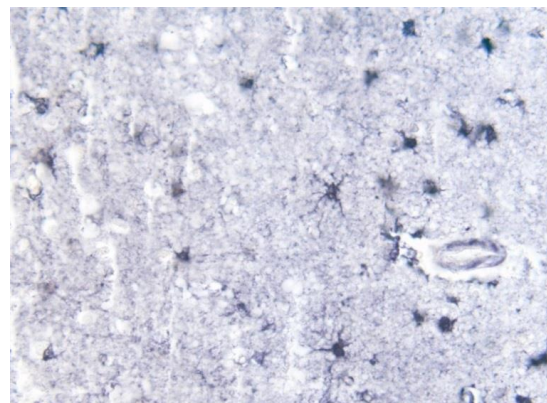


Abb. 5: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x. Orbitofrontalkortex, Lamina I. Gut differenzierbare Astrozyten mit Zellausläufern (mittig und unten mittig), kleinere runde Oligodendrozyten.

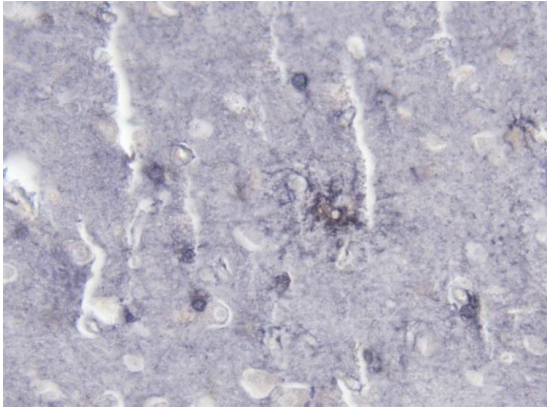


Abb. 6: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x.
Orbitofrontalkortex, Lamina II. Mittig ein großer Astrozyt
umgeben von kleinen Oligodendrozyten.

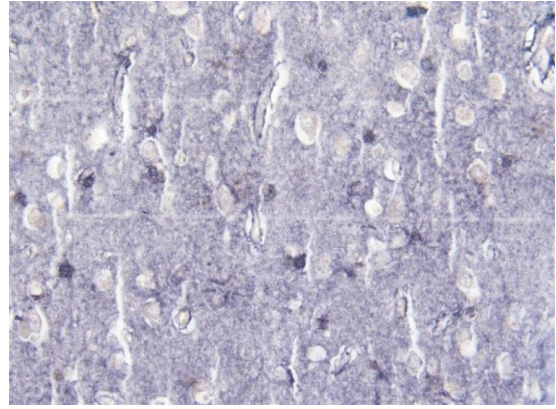


Abb. 7: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x.
Lamina IV. Kleine runde Oligodendrozyten.

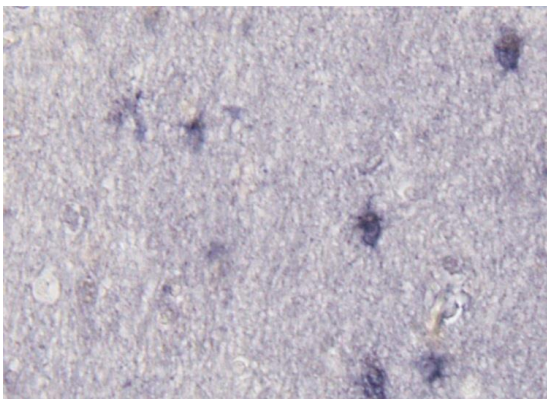


Abb. 8: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x.
Weiße Substanz. Keine Astrozyten, vereinzelt
Oligodendrozyten erkennbar.

2.5 Bestimmung der numerischen Zelldichten der Astrozyten

Die Bestimmung der numerischen Zelldichten fand blind, und demnach ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit, statt. Alle Gehirne wurden im Vorfeld nummeriert und kodiert, sodass ohne eine Zuordnungsmöglichkeit des Materials gearbeitet werden konnte.

Untersucht wurden Hirnschnitte frontal vom Corpus callosum, wobei bei jedem Schnitt makroskopisch und mikroskopisch eine Identifikation der Strukturen stattfand. Außerdem wurde stets ein direkt benachbarter Heidenhain-Wölcke-gefärbter Hirnschnitt derselben Person herangezogen und verglichen, um die Abgrenzung der benachbarten Areale präzise treffen zu können. Anschließend wurde mit einem wasserfesten Stift die Region, in der gezählt wurde, eingekreist.

Die mikroskopische Auszählung fand mit einem Olympus BH-2 Mikroskop mit 200facher Vergrößerung (Objektiv 10x, Okular 20x) statt. Dazu wurden pro Gehirn in beiden Hemisphären jeweils sechs Zählfelder mit Hilfe einer speziellen Zählbox sowohl in den äußeren Schichten I, II und III als auch in den inneren Schichten IV, V und VI des dorsolateralen Präfrontalkortex, des vorderen cingulären Kortex und des orbitofrontalen Kortex gelegt, worin die Zellen anschließend ausgezählt werden konnten. Für die genaue kortikale Schichtung wurden benachbarte Marscheiden-Nissl-gefärbte Hirnschnitte der gleichen Person zur Hilfe genommen.

Für die Berechnung der numerischen Zelldichten der ausgezählten Astrozyten in den verschiedenen Kortexarealen wurde ein Volumenschwundfaktor (VSF) berücksichtigt, um die Gewebeschrumpfung durch die Einbettung der Gehirne in Paraffin zu korrigieren. Das Ausmaß der Volumenschwundung der Gehirne wurde dazu vor und nach Dehydratation und Einbettung des Gewebes in Paraffin für jedes Gehirn einzeln bestimmt, indem die Fläche der auf 1:1-Fotografien gemessenen koronaren Anschnitte der Blöcke mit der Fläche der entsprechenden aufgezogenen und gefärbten Schnitte miteinander verglichen wurden. Anschließend kam die Formel $VSF=(A_1/A_2)^{3/2}$ (A_1 : Querschnittsfläche auf 1:1-Fotografien des Blockes vor Gewebeaufbereitung, A_2 : Querschnittsfläche nach Gewebeaufbereitung auf den gefärbten Schnitten) zum Einsatz. Der VSF von 2,15 stellt dabei den Mittelwert über sämtliche berechnete Volumenschwundfaktoren der in der Gehirnsammlung befindlichen Gehirne dar.

Es wurde die endgültige numerische Zelldichte als Produkt aus der sich ergebenden Fläche der ausgezählten Zellen innerhalb der Zählfelder, der mittleren gemessenen Schnittdicke von 18µm und dem gemittelten Volumenschwundfaktor (2,15) gebildet.

2.6 Reliabilität

Die **Intrarater**-Reliabilität ist ein Gütekriterium, welches die Zuverlässigkeit, mit der ein und dieselbe Person wiederholt zum gleichen Ergebnis kommt, beschreibt. Für diese Überprüfung wurden zehn Gehirne doppelt ausgezählt, wobei sich ein Intraclass-Koeffizient von 0,970 ergab, der eine sehr hohe Übereinstimmung anzeigt.

Ein weiteres Güte Merkmal für die Validität ist die **Interrater**-Reliabilität. Hierbei führen zwei unabhängige Personen unter identischen Bedingungen die Messungen durch und man vergleicht anschließend den Grad der Kongruenz. Dazu wurden Zählungen einer zweiten Doktorandin nach sorgfältiger Einarbeitung in die Thematik an drei Gehirnen in allen betreffenden Arealen durchgeführt. Es ließ sich anschließend ein Korrelationskoeffizient von 0,994 ermitteln, welcher in dieser Größenordnung eine sehr hohe Zuverlässigkeit repräsentiert. Folgende Diagramme stellen diese Ergebnisse dar.

Intrarater-Reliabilität:

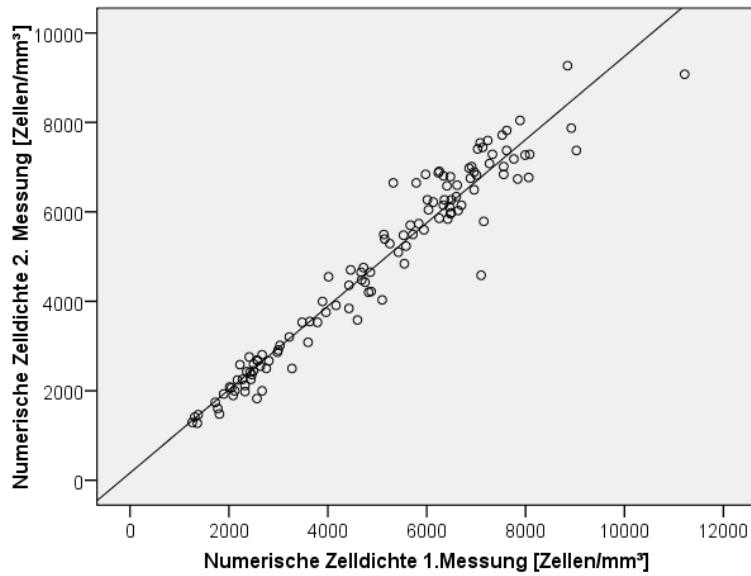


Abb. 9: Darstellung der Intrarater-Reliabilität. Aufgetragen sind die berechneten numerischen Zelldichten pro mm^3 an zehn zufällig gewählten Gehirnen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten unter gleichen Bedingungen.

Interrater-Reliabilität:

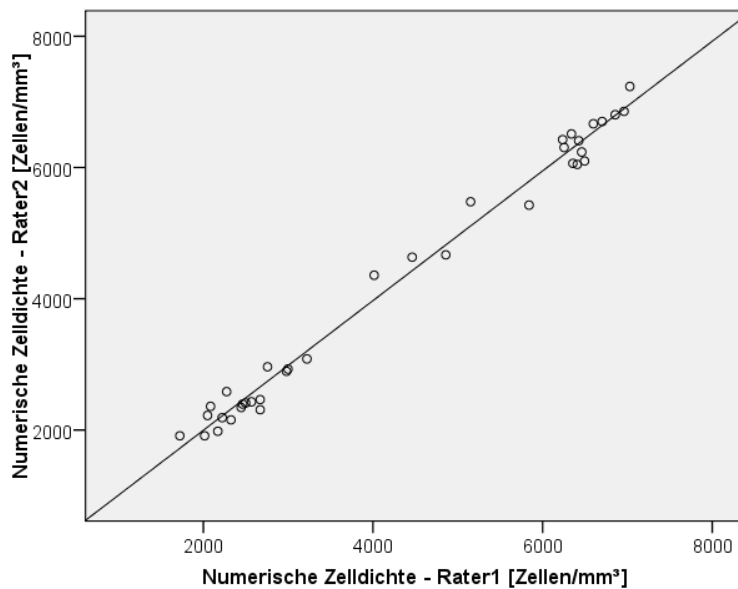


Abb. 10: Darstellung der Interrater-Reliabilität. Aufgetragen sind die berechneten numerischen Zelldichten pro mm^3 an je drei zufällig gewählten Gehirnen unter gleichen Bedingungen zusätzlich durch eine andere Doktorandin.

2.7 Statistische Tests zur Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS 15.0 zur computergestützten Datenanalyse benutzt. Die Untersuchungen stützen sich dabei auf die Multivarianzanalyse ANOVA mit Messwertwiederholung. Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde angewandt, um festzustellen, ob eine Normalverteilung der Werte vorliegt und damit parametrische Tests zur Auswertung herangezogen werden können.

Bei der Analyse der vorliegenden Daten kann eine Normalverteilung angenommen werden, sodass die statistischen Auswertungen mittels des parametrischen t-Tests durchgeführt wurden.

Eine Varianzanalyse und eine Korrelationsanalyse nach Pearson wurden in Bezug auf möglicherweise konfundierende Variablen wie Geschlecht, Alter, Fixations- und Autolysedauer, Krankheitsdauer und –beginn über alle untersuchten Gruppen auf die Messwtergebnisse angewandt.

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Glutaminsynthetase-positiven Astrozyten im dorsolateralen Präfrontalkortex, im anterioren Gyrus cinguli und im orbitofrontalen Kortex jeweils schichtenspezifisch dargelegt werden. Es wurde bei den Schizophrenen unterschieden zwischen solchen, die eines natürlichen Todes starben und Patienten, die sich suizidierten. Die numerischen Zelldichten der Glutaminsynthetase enthaltenden Astrozyten wurden dabei getrennt für die Schichten I-III und IV-VI beurteilt.

Die Zelldichten waren bei den schizophren Erkrankten im Vergleich zu den gesunden Kontrollfällen signifikant vermindert in den oberflächlichen Schichten I, II und III des dorsolateralen Präfrontalkortex beider Hemisphären (links: $p=0,045$, rechts: $p=0,033$). Bei der Analyse der gesunden Vergleichspersonen mit Schizophrenen getrennt nach Suizidalität konnten signifikante Verminderungen bei den nichtsuizidalen Patienten im dorsolateralen Präfrontalkortex beider Hemisphären (links: $p=0,014$, rechts: $p=0,024$) sowie im linken Orbitofrontalkortex ($p=0,043$) jeweils in den oberflächlichen Schichten I, II und III verzeichnet werden.

Stellte man schizophrene Patienten getrennt nach Suizidalität gegenüber, ergaben sich signifikante Verminderungen der nichtsuizidalen Schizophrenen im linken Orbitofrontalkortex in den Schichten I, II und III (Schicht I-III: $p=0,018$).

In den tieferen Schichten IV, V und VI konnten ausschließlich bei den nichtsuizidalen Schizophrenen in Bezug auf suizidale Schizophrene in der linken Hemisphäre des orbitofrontalen Kortex signifikante Reduktionen in der Zelldichte verzeichnet werden (Schicht IV-VI: $p=0,023$).

3.1 ANOVA mit Messwertwiederholung

Die Multivarianzanalyse ANOVA mit Messwertwiederholung wurde zur Prüfung der gruppenübergreifenden Wechselwirkungen und Effekte herangezogen. Signifikante Ergebnisse einzelner Faktoren berechtigen zur getrennten weiteren Analyse. Statistische Werte für mehr als zwei Elemente wie der Vergleich zwischen psychiatrisch gesunden Kontrollen, suizidalen und nichtsuizidalen Schizophrenen wurden mit Hilfe des Tukey-HSD-post-Hoc-Tests berechnet.

Dazu wurde die Analyse der Effekte zwischen den Hirnregionen, den oberflächlichen Schichten I, II und III sowie den tiefen Schichten IV, V und VI der Hemisphären sowie in Bezug auf die Suizidalität bei Schizophrenen vorgenommen.

Deskriptive Statistik							
Region	Hemisp.	Schicht	Schizophrene Nicht Suizid	Schizophrene Suizid	Gesunde -	ANOVA	
			n=11	n=3	n=15	F	p-Wert
			numerische Zelldichte	numerische Zelldichte	numerische Zelldichte		
			[Zellen/mm ²]	[Zellen/mm ²]	[Zellen/mm ²]		
			MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD		
Dorsolateraler Kortex							
links		I-III	4655 ± 2054	6947 ± 2320	6429 ± 1083	5,589	0,010*
		IV-VI	2851 ± 1170	4420 ± 2770	3272 ± 1076	2,269	0,123
rechts		I-III	4537 ± 1917	6135 ± 2016	6216 ± 1120	4,228	0,026*
		IV-VI	3230 ± 1425	4534 ± 2080	3132 ± 1142	1,584	0,224
Gyrus Cinguli							
links		I-III	5326 ± 2544	6465 ± 1926	6686 ± 1261	1,290	0,292
		IV-VI	3839 ± 1727	4381 ± 2666	3316 ± 1211	0,808	0,456
rechts		I-III	5007 ± 2077	6246 ± 1626	6090 ± 1083	2,377	0,113
		IV-VI	3592 ± 1243	4026 ± 2578	3126 ± 1241	0,547	0,585
Oorbitofrontaler Kortex							
links		I-III	3881 ± 1932	6651 ± 1869	5301 ± 1089	5,615	0,009**
		IV-VI	2711 ± 1159	4575 ± 1773	2929 ± 943	4,054	0,029*
rechts		I-III	4507 ± 2271	6932 ± 1605	5159 ± 1108	3,281	0,054
		IV-VI	3035 ± 1750	3953 ± 1892	2760 ± 949	0,889	0,423

a: p-Wert korrigiert mit Tukey-HSD

Tab. 2: Varianzanalyse ANOVA über die Gruppen (1) Schizophrene, die eines natürlichen Todes starben; (2) suizidale Schizophrene; (3) gesunde Kontrollen. Signifikante p-Werte im t-Test im dorsolateralen Präfrontalkortex Schicht I-III links (p=0,010) und rechts (p= 0,026) als auch im Orbitofrontalkortex links Schicht I-III (p= 0,009) und Schicht IV-VI (p=0,029). Die gefundenen signifikanten Werte bedürfen einer genauen Überprüfung der einzelnen Gruppen.

Anhand der gefundenen gruppenübergreifenden Effekte wurde eine getrennte Betrachtung in Bezug auf die Suizidalität vorgenommen und die einzelnen Gruppen wurden miteinander verglichen. Die Differenzstatistik stellt die Ergebnisse dieser Untersuchung nachfolgend anschaulich dar.

3.2 Numerische Zelldichten der angefärbten Astrozyten

Die folgende Tabelle zeigt die statistische Auswertung in Abhängigkeit von dem Diagnosekriterium Schizophrenie als Gesamtgruppe im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Region	Hemisp.	Schicht	Schizophrene n=14 numerische Zelldichte [Zellen/mm ³] MW ± SD	Gesunde n=15 numerische Zelldichte [Zellen/mm ³] MW ± SD	Relative Differenz [%]	t-Test p-Wert
Dorsolateraler Kortex						
links		I-III	5018 ± 2225	6429 ± 1083	-21,95%	0,045*
		IV-VI	3058 ± 1602	3272 ± 1076	-6,54%	0,679
rechts		I-III	4845 ± 1966	6216 ± 1120	-22,06%	0,033*
		IV-VI	3364 ± 1595	3132 ± 1142	7,42%	0,658
Gyrus Cinguli						
links		I-III	5671 ± 2475	6686 ± 1261	-15,19%	0,184
		IV-VI	4040 ± 1926	3316 ± 1211	21,86%	0,242
rechts		I-III	5143 ± 1944	6090 ± 1083	-15,55%	0,124
		IV-VI	3512 ± 1497	3126 ± 1241	12,34%	0,459
Orbitofrontaler Kortex						
links		I-III	4392 ± 2181	5301 ± 1089	-17,15%	0,176
		IV-VI	2993 ± 1464	2929 ± 943	2,21%	0,890
rechts		I-III	4830 ± 2315	5159 ± 1108	-6,38%	0,635
		IV-VI	3127 ± 1805	2760 ± 949	13,30%	0,505

a: p-Wert korrigiert mit Tukey-HSD

Tab. 3: t-Test zur statistischen Auswertung des Diagnosekriteriums Schizophrenie und gesunde Kontrollen.

Signifikante p-Werte im t-Test im dorsolateralen Präfrontalkortex Schicht I-III links (p=0,045) mit einer relativen Differenz von -21,95% und rechts (p= 0,033) mit einer relativen Differenz von -22,06%.

Daraus geht hervor, dass Schizophrene eine signifikant niedrigere Glutaminsynthetase-Expression in Astrozyten im dorsolateralen Präfrontalkortex in den oberflächlichen Schichten I, II und III beider Hemisphären im Vergleich zu gesunden Kontrollen haben, wie auch die nachfolgende Abbildung graphisch darstellt. Dabei ist bemerkenswert, dass es auch in den Schichten I-III der übrigen untersuchten Hirnregionen zu tendenziellen Verminderungen der Werte bei den Schizophrenen kommt. So konnte eine relative Differenz in den oberflächlichen Schichten I-III im anterioren cingulären Kortex innerhalb der linken Hemisphäre von -15,19% und rechts von -15,55% festgestellt werden sowie im orbitofrontalen Kortex in den Schichten I-III links von -17,15% und rechts von -6,38%. Diese negativen Differenzen in Bezug auf die gesunden Kontrollen sind als ein klarer Trend anzusehen.

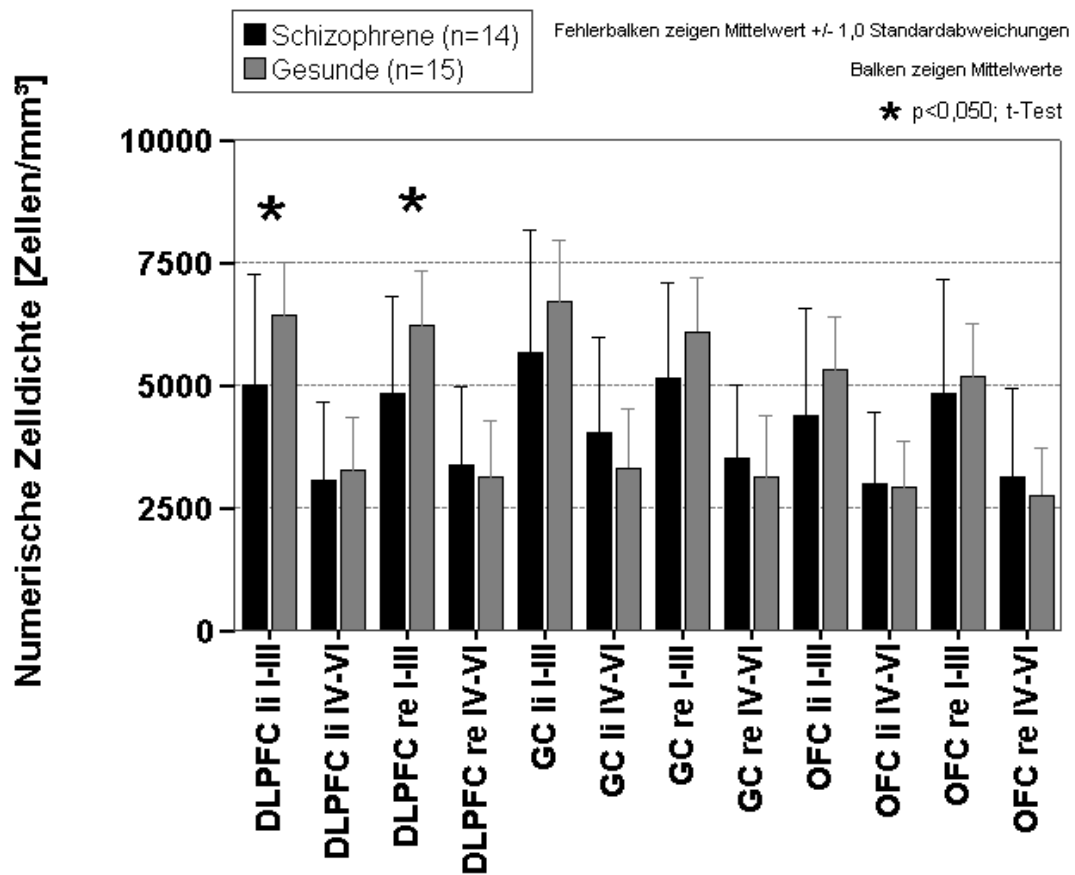


Abb. 11: Numerische Zelldichten bei Schizophrenen und gesunden Kontrollen im dorsolateralen Präfrontalkortex, anterioren Gyrus cinguli und Orbitofrontalkortex unterteilt in die beiden Hemisphären (re, li) und die kortikalen Schichten I, II und III sowie IV, V und VI. Signifikante Verminderungen der Mittelwerte in den Schichten I, II und III im dorsolateralen Präfrontalkortex bei Schizophrenen in der linken ($p=0,045$) und rechten ($p=0,033$) Hemisphäre.

Wie bereits erwähnt, erfolgte nach der Varianzanalyse ANOVA die gesonderte Betrachtung bzgl. der Suizidalität bei den Schizophrenen, welche anschließend erläutert wird. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse dieser Analyse.

Differenzstatistik								
Region	Hemisp.	Schicht	Sz n. Suiz vs. Ges		Sz Suiz vs. Ges		Sz Suiz vs. Sz n. Suiz.	
			rel. Diff.	p-Wert ^a	rel. Diff.	p-Wert ^a	rel. Diff.	p-Wert ^a
Dorsolateraler Kortex								
links		I-III	-30,1%	0,014*	8,1%	0,866	-35,3%	0,066
		IV-VI	-17,9%	0,491	35,1%	0,345	-39,2%	0,113
rechts		I-III	-27,7%	0,024*	-1,3%	0,996	-26,8%	0,247
		IV-VI	-2,8%	0,985	44,8%	0,238	-32,8%	0,218
Gyrus Cinguli								
links		I-III	-18,4%	0,269	-3,3%	0,982	-15,6%	0,711
		IV-VI	19,1%	0,595	32,1%	0,559	-9,9%	0,911
rechts		I-III	-20,5%	0,120	2,6%	0,986	-22,5%	0,351
		IV-VI	7,8%	0,896	28,8%	0,565	-16,3%	0,750
Oorbitofrontaler Kortex								
links		I-III	-28,8%	0,043*	25,5%	0,347	-43,2%	0,018*
		IV-VI	-12,5%	0,676	56,2%	0,061	-44,0%	0,023*
rechts		I-III	-17,5%	0,363	34,4%	0,221	-38,6%	0,048
		IV-VI	5,1%	0,966	43,2%	0,392	-26,6%	0,500

a: p-Wert korrigiert mit Tukey-HSD

Tab. 4: t-Test zur statistischen Auswertung des Vergleichs zwischen (1) nichtsuizidalen Schizophrenen und Kontrollen; (2) suizidalen Schizophrenen und Kontrollen; (3) suizidalen und nichtsuizidalen Schizophrenen. (1) Nichtsuizidale Schizophrenen vs. gesunde Kontrollen: Signifikante p-Werte im dorsolateralen Präfrontalkortex Schicht I-III links ($p=0,014$) mit einer relativen Differenz von -30,1% und rechts ($p=0,024$) mit einer relativen Differenz von -27,7% sowie im Orbitofrontalkortex Schicht I-III links ($p=0,043$) mit einer relativen Differenz von -28,8%. (2) Suizidale Schizophrenen vs. gesunde Kontrollen: Keine signifikanten Unterschiede. (3) Suizidale vs. nichtsuizidale Schizophrenen: Signifikante p-Werte im Orbitofrontalkortex Schicht I-III links ($p=0,018$) mit einer relativen Differenz von -43,2% und in Schicht IV-VI links ($p=0,023$) mit einer relativen Differenz von -44,0%.

Es lässt sich festhalten, dass beim Vergleich der nichtsuizidalen Schizophrenen mit gesunden Vergleichsfällen signifikante Verminderungen der Glutaminsynthetase-exprimierenden Astrozyten bei den Erkrankten in den Schichten I, II und III im dorsolateralen Präfrontalkortex beider Hemisphären und in den oberflächlichen Schichten I-III innerhalb der linken Hemisphäre des Orbitofrontalkortex nachgewiesen wurden.

Innerhalb der oberflächlichen Schichten I-III der übrigen untersuchten Regionen zeigten sich ebenfalls negative Differenzen bezüglich der Kontrollen, welche den Trend der allgemeinen Verminderung der immunpositiven Astrozyten in diesen Arealen bei Schizophrenen anzeigen. So beträgt diese relative Differenz im vorderen Gyrus cinguli links -18,4% und rechts -20,5% sowie im Orbitofrontalkortex rechts -17,5%.

Bei dem Vergleich der suizidalen Schizophrenen mit gesunden Kontrollpersonen ergaben sich weder signifikante Verminderungen noch erkennbare Trends der relativen Differenzen bei den immunpositiven Zellen.

Die Gegenüberstellung der Schizophrenen untereinander getrennt nach Suizidalität konnte signifikante Verminderungen der Glutaminsynthetase-Expression der Astrozyten bei den nichtsuizidalen Schizophrenen im Orbitofrontalkortex der linken Hemisphären in allen Schichten zeigen. Es ergaben sich in allen untersuchten Regionen und Schichten negative relative Differenzen zwischen -9,9% und -39,2% in den nicht signifikant veränderten Arealen, was als ein sehr deutlicher bestätigender Trend angesehen werden kann.

Bezüglich der tiefen Schichten IV, V und VI ließen sich bis auf die Ausnahme bei dem Vergleich der Schizophrenen untereinander in Bezug auf die Todesart keine signifikanten Veränderungen oder gleichartige Tendenzen bei den relativen Differenzen erkennen. In diesen Regionen variierte die Zahl der immunpositiven Zellen zu stark und war zudem sehr gering.

Die nachstehende graphische Darstellung dient der Veranschaulichung der erhobenen Ergebnisse.

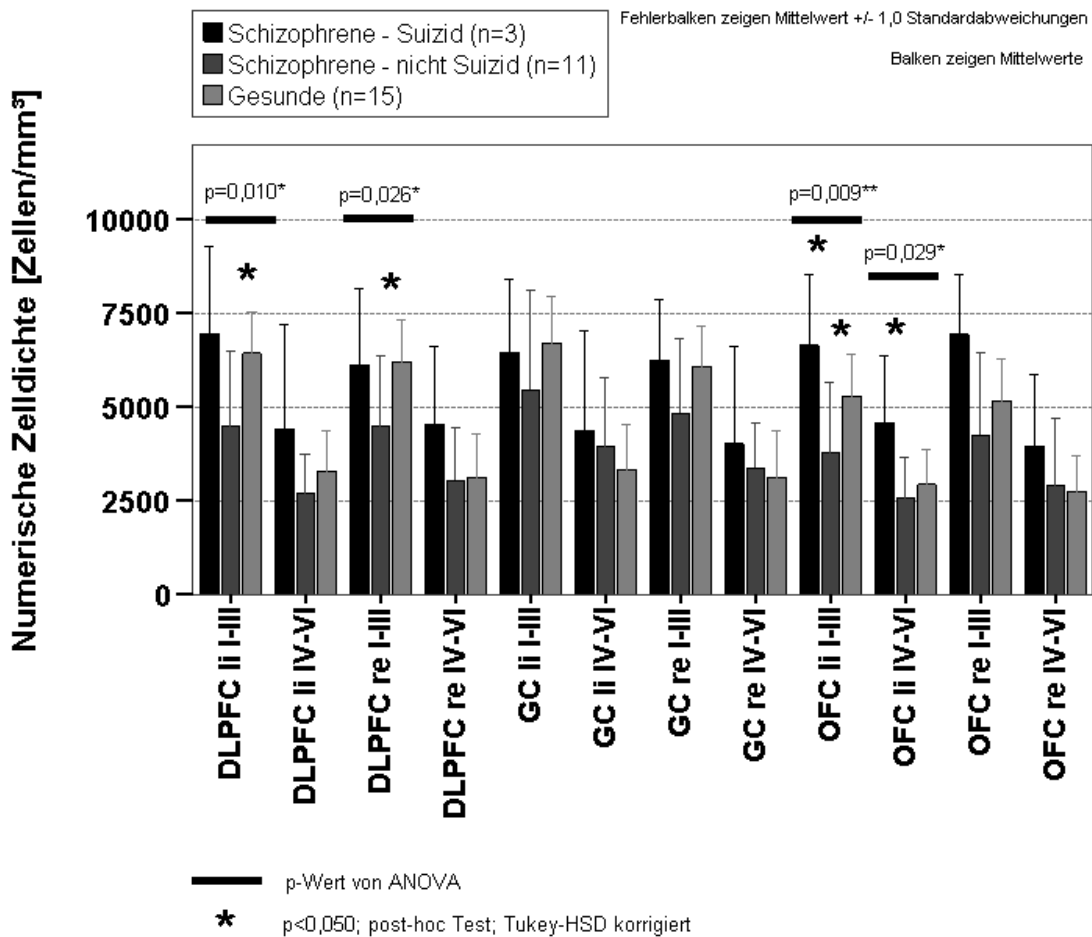


Abb. 12: Numerische Zelldichten bei suizidalen und nichtsuizidalen Schizophrenen sowie der gesunden Kontrollen im dorsolateralen Präfrontalkortex, anterioren Gyrus cinguli und Orbitofrontalkortex unterteilt in die beiden Hemisphären (re, li) und die kortikalen Schichten I, II und III sowie IV, V und VI. Signifikante Verminderungen der Mittelwerte bei nichtsuizidalen Schizophrenen in den Schichten I, II und III im dorsolateralen Präfrontalkortex in der linken ($p=0,014$) und rechten ($p=0,024$) Hemisphäre und im Orbitofrontalkortex in der linken Hemisphäre ($p=0,043$) gegenüber gesunden Kontrollen. Signifikante Verminderungen der Mittelwerte bei nichtsuizidalen Schizophrenen im Orbitofrontalkortex in der linken Hemisphäre Schicht I-III ($p=0,018$) und Schicht IV-VI ($p=0,023$) gegenüber suizidalen Schizophrenen.

3.3 Einfluss konfundierender Variablen auf die Messwerte

Bei dieser Analyse wurde der Einfluss der konfundierenden Variablen auf die Messwerte in den einzelnen Hirnstrukturen untersucht. Sowohl eine Varianz- als auch eine Korrelationsanalyse wurden durchgeführt.

Die Prüfung umfasste die Gehirne von 14 schizophren Erkrankten und 15 gesunden Vergleichsfällen. Es konnten keine signifikanten Einflüsse in Bezug auf das Alter, Fixations- und Autolysedauer sowie Krankheitsbeginn und –dauer festgestellt werden, wie der nachfolgenden Korrelationsanalyse nach Pearson zu entnehmen ist.

Korrelationen

		Alter[J.]	Autolyse[h]	Fixation[Tage]	BeginnDer Krankheit	Krankheit sdauer
DLPFC li I-III	Korrelation nach Pearson	,236	-,166	,278	,146	,191
	Signifikanz (2-seitig)	,217	,391	,153	,619	,512
	N	29	29	28	14	14
DLPFC li IV-VI	Korrelation nach Pearson	,190	-,203	,170	-,041	,329
	Signifikanz (2-seitig)	,325	,291	,387	,889	,250
	N	29	29	28	14	14
DLPFC re I-III	Korrelation nach Pearson	,208	-,084	,207	,007	,150
	Signifikanz (2-seitig)	,279	,664	,290	,981	,610
	N	29	29	28	14	14
DLPFC re IV-VI	Korrelation nach Pearson	,142	-,085	,111	-,102	,229
	Signifikanz (2-seitig)	,462	,663	,573	,728	,430
	N	29	29	28	14	14
GC li I-III	Korrelation nach Pearson	-,053	-,199	,108	-,153	,189
	Signifikanz (2-seitig)	,783	,302	,583	,601	,516
	N	29	29	28	14	14
GC li IV-VI	Korrelation nach Pearson	,068	-,037	,072	-,118	,151
	Signifikanz (2-seitig)	,726	,848	,715	,688	,607
	N	29	29	28	14	14
GC re I-III	Korrelation nach Pearson	-,042	-,062	,042	-,186	,194
	Signifikanz (2-seitig)	,829	,749	,833	,524	,507
	N	29	29	28	14	14
GC re IV-VI	Korrelation nach Pearson	,084	-,047	-,012	-,021	,145
	Signifikanz (2-seitig)	,664	,808	,952	,944	,620
	N	29	29	28	14	14
OFC li I-III	Korrelation nach Pearson	,075	-,065	,215	-,075	,211
	Signifikanz (2-seitig)	,697	,738	,272	,799	,468
	N	29	29	28	14	14
OFC li IV-VI	Korrelation nach Pearson	,100	-,096	,195	-,180	,271
	Signifikanz (2-seitig)	,606	,622	,321	,538	,350
	N	29	29	28	14	14
OFC re I-III	Korrelation nach Pearson	,065	-,072	,292	-,097	,208
	Signifikanz (2-seitig)	,738	,711	,132	,742	,476
	N	29	29	28	14	14
OFC re IV-VI	Korrelation nach Pearson	-,107	,126	-,018	-,357	,315
	Signifikanz (2-seitig)	,580	,515	,927	,210	,272
	N	29	29	28	14	14

Tab. 5: Korrelationsanalyse nach Pearson der konfundierenden Variablen. Hinsichtlich der konfundierenden Variablen konnten keine signifikanten Korrelationen für die Variablen in Bezug auf die untersuchten Hirnareale erhoben werden. (N=Anzahl der untersuchten Patienten)

4 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde die Veränderung der Expression des Enzyms Glutaminsynthetase in Astrozyten untersucht, wobei eine Verminderung bei schizophren Erkrankten angenommen wurde. Diese Annahme stützt sich auf die derzeitige Forschungslage, welche eine allgemeine Verarmung an Glutamat bei Schizophrenen postuliert. Bereits 1995 fanden Tsai et al.⁶⁵ erniedrigte Glutamatspiegel und erhöhte Werte für NAAG, ein Neuropeptid in glutamatergen Neuronen, welches die Effekte von Glutamat am NMDA-Rezeptor antagonisiert. Diese Veränderungen betrafen in den Gehirnen Schizophrener insbesondere den Präfrontalkortex und Hippocampus. In den Gehirnen neuroleptisch behandelter Patienten fand man erhöhte Glutamatspiegel, was als Zeichen therapeutischer Effektivität gewertet werden kann⁶⁵. Andere Arbeiten bestätigen diese Ergebnisse durch die Untersuchung anderer Enzyme innerhalb des Glutamatstoffwechsels, wie zum Beispiel Glutamatcarboxypeptidase⁵¹ oder Glutamatdehydrogenase⁴⁰. Im vorderen Gyrus cinguli sind Verminderungen der Astrozytenzahl bei schizophrenen Patienten beschrieben²³. Hier konnte auch bezüglich der Glutaminsynthetase, welche vor allem in den genannten Astrozyten vorkommt⁴⁷, eine signifikante Reduktion nachgewiesen werden⁴⁹. Es muss angemerkt werden, dass daneben auch Publikationen existieren, die konträre Ergebnisse liefern. Jedoch wird vornehmlich eine Hypofunktion des Glutamatstoffwechsels beschrieben und gilt deshalb auch hier als Grundhypothese.

Die Fragestellung der vorliegenden Promotionsschrift wurde mittels einer immunhistochemischen Analyse geprüft. Dazu wurden Gehirnareale von schizophrenen Patienten und psychiatrisch gesunden Vergleichsfällen mikroskopisch beurteilt. Es wurde sich auf den dorsolateralen Präfrontalkortex, den anterioren cingulären Kortex und den Orbitofrontalkortex konzentriert. In den jeweiligen Kortexarealen wurde zwischen den oberflächlichen drei Schichten I, II und III und den tieferen, der weißen Substanz anliegenden drei Schichten IV, V und VI unterschieden.

Bei dieser Prüfung wurden signifikante Verminderungen der Glutaminsynthetase-exprimierenden Astrozyten bei schizophrenen Erkrankten im Vergleich zu den gesunden Vergleichsfällen in den oberen Schichten des dorsolateralen Präfrontalkortex in beiden Hemisphären gefunden. Bezüglich der Problematik des Suizids ergab sich, dass nichtsuizidale schizophrene Patienten in Bezug auf die Kontrollfälle signifikante Verminderungen beidseits in den oberflächlichen Schichten des Präfrontalkortex und in den oberflächlichen Schichten der linken Hemisphäre des Orbitofrontalkortex aufwiesen.

Beim Vergleich der Schizophrenen untereinander in Hinblick auf die Suizidalität konnte eine signifikante Verminderung der Glutaminsynthetase-Expression bei den nichtsuizidalen Patienten in der linken Hemisphäre sowohl in den oberflächlichen Schichten I-III als auch den tiefen Schichten IV-VI des orbitofrontalen Kortex festgestellt werden.

In allen untersuchten oberflächlichen kortikalen Schichten (I, II und III) war darüber hinaus erkennbar, dass schizophrene Patienten, bis auf die suizidalen Patienten, stets tendenziell weniger angefärbte Astrozyten als die gesunden Kontrollen aufwiesen und damit eine Verminderung der Glutaminsynthetase-Expression in den beurteilten Strukturen bei den Schizophrenen belegt werden konnte. In den tieferen Schichten ließen sich bis auf die festgestellte Verminderung bei nichtsuizidalen Schizophrenen im linken orbitofrontalen Kortex keine Trends erkennen.

Die Schizophrenie ist eine Krankheit, die durch eine Vielzahl von Ursachen bedingt wird. Obwohl in der Schizophrenieforschung erhebliche Fortschritte gegenüber der Mitte des letzten Jahrhunderts zu verzeichnen sind, gibt es noch viele offene Fragen. Im Folgenden soll diese Problematik auf der Basis der aktuellen Forschungslage und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

4.1 Material- und methodenkritische Aspekte

Bei jeder wissenschaftlichen Arbeit kann es bei der Erhebung der Daten zur Beeinflussung der Ergebnisse durch bestimmte materielle und arbeitstechnische Verhältnisse kommen. Es ist daher wichtig, alle diese Komponenten genau zu untersuchen und mögliche Abhängigkeiten auszuschließen bzw. zu erkennen, um die erhobenen Werte korrekt einordnen zu können. Es soll deshalb in der Folge eine Diskussion dieser Thematik stattfinden.

4.1.1 Einfluss möglicher konfundierender Variablen

Wie bereits beschrieben, wurde eine Abhängigkeit der numerischen Zelldichte von möglicherweise konfundierenden Variablen wie Alter, Geschlecht, Autolyse- und Fixationsdauer sowie Krankheitsdauer und –beginn statistisch geprüft und ausgeschlossen. Es ergab sich in keinem Fall signifikante Abhängigkeiten.

Die untersuchten Gehirne stammten vorrangig von Personen, die durch Herz-Kreislaufversagen und respiratorische Insuffizienz verstarben, unabhängig davon, ob es psychiatrisch gesunde Kontrollen oder schizophren Erkrankte waren. Eine Ausnahme bildeten drei Schizophrene, die durch Suizid verstarben.

Diese Patienten brachten sich durch Intoxikation, Ertrinken und Strangulation um. In verschiedenen Studien wird ein Zusammenhang zwischen der Suizidalität, Inflammation und der Verminderung der Glutaminsynthetase postuliert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei einem Suizid die Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine ein wesentliches Merkmal ist. IL1, IL6 und TNF α steigen stark an und haben darüber hinaus einen Einfluss auf den Glutamatstoffwechsel²⁵. Aufgrund dieser Ergebnisse, welche weiter unten ausführlich diskutiert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine getrennte Betrachtung hinsichtlich des Suizids vorgenommen.

Bezüglich der Medikation muss beachtet werden, dass die schizophrenen Erkrankten mit Neuroleptika behandelt wurden. Die durchschnittliche Krankheitsdauer betrug 21,2 Jahre \pm 10,2 Jahre mit einer Spanne zwischen drei und 35 Jahren. Studien postulieren überwiegend einen Einfluss der Medikation auf neuronale Veränderungen. Dabei konnte beispielsweise mittels einer PET- Untersuchung herausgefunden werden, dass Haloperidol, ein klassisches Neuroleptikum, eine Herabregulation der Dopaminsynthesekapazität zur Folge haben kann³⁶. Auch eine verringerte Schrumpfung des Hippocampusvolumens bei schizophrenen Patienten über eine bestimmte Zeit wurde mit atypischen Neuroleptika in Verbindung gebracht²⁸. Eine andere Studie beschreibt eine positive Korrelation zwischen der Veränderung von Glutamatdecarboxylase und der Krankheitsdauer⁵⁴. Bezüglich der Auswirkung einer antipsychotischen Behandlung zeigte eine weitere Untersuchung, dass Clozapin, ein atypisches Neuroleptikum, Enzymalterationen beispielsweise von GFAP nach Gabe eines nichtkompetitiven NMDA-Antagonisten deutlich minderte, wobei Haloperidol kein Effekt zugesprochen wurde⁶⁶.

Wenn man in der hier durchgeführten Untersuchung von einem Effekt der Medikation auf neuronale Veränderungen bei Schizophrenen ausgeht, müsste ein gleichsinniger Zusammenhang zwischen der Krankheitsdauer und einer Verminderung der immunpositiven Zellen bestehen, da mit der Krankheitsdauer auch die Dauer der neuroleptischen Behandlung ansteigt. Es konnten jedoch keinerlei derartige Korrelationen festgestellt werden. Damit kann eine Verfälschung der Ergebnisse durch die medikamentöse Therapie der Patienten in diesem Fall als eher unwahrscheinlich angesehen werden.

Bei dem Kriterium des Geschlechts wurde bei der Auswahl auf eine gleichmäßige Verteilung geachtet, da man die Möglichkeit in Betracht zog, dass es geschlechtsspezifisch zu Änderungen kommen könnte. Diese Überlegung stützte sich auf die Ergebnisse einer Publikation, in der die geschlechtsabhängige Veränderung der Expression von Glutaminsynthetase bei Schizophrenen diskutiert und eine signifikante Hochregulation der Expression im vorderen cingulären Kortex für weibliche schizophrene Patienten gefunden wurde. Bei den männlichen Patienten gab es dabei ausschließlich eine Tendenz zur Vermehrung der Glutaminsynthetase-Expression in diesem Areal ⁴⁸.

In der vorliegenden Dissertation fand somit eine homogene Verteilung des Geschlechts statt. Es konnten darüber hinaus keine geschlechtsspezifischen Abhängigkeiten festgestellt werden.

4.1.2 Einfluss der Methodik

Es erfolgte eine Auszählung der Glutaminsynthetase-exprimierenden Astrozyten in den beschriebenen Hirnarealen bei Schizophrenen und gesunden Vergleichsfällen. Dabei wurde eine Unterscheidung zwischen Oligodendrozyten und Astrozyten vorgenommen, da das hier untersuchte Enzym vor allem in Astrozyten enthalten ist ⁴⁷ und damit diesen Zellen eine sehr hohe Repräsentativität zukommt. Diese Unterschiede in der Expression sind mit den unterschiedlichen Funktionen der Gliazellen zu erklären ²⁴.

Die untersuchten Gehirne wurden für die spätere mikroskopische Analyse schonend und möglichst strukturerhaltend behandelt. Bei der Beurteilung der histologischen Präparate ist es zudem wichtig, eine Zelle einheitlich als immunpositiv oder immunnegativ zu bewerten. Hierbei war entscheidend, dass eine deutliche Abgrenzung der Zelle gegenüber der Umgebung und eine prägnante Immunreaktion des Zellkörpers vorhanden sein mussten, um als immunpositiv gewertet zu werden. Diese Kriterien erfüllten in der Untersuchung Astrozyten und in geringerem Maße auch Oligodendrozyten. Neurone konnten nicht angefärbt werden. Die Unterscheidung zwischen Astrozyten und Oligodendrozyten war in einigen wenigen Fällen anspruchsvoll, da die Färbemuster und die Intensität der Anfärbung der Zellen zwischen den einzelnen Gehirnen variierten. Durch den Vergleich der Zellen innerhalb eines Gehirns durch die sorgfältige Beurteilung der Färbung, Morphologie und Größe wurde die jeweilige Identifikation vorgenommen. Es wurden dabei nur die Zellen als immunpositive Astrozyten erfasst und gezählt, die einen verhältnismäßig prominenten, großen Zellkörper mit sichtbaren sternförmigen Ausläufern vorwiesen. Die Zuverlässigkeit der Methode ließ sich durch Mehrfachzählungen eindeutig bestätigen.

Dazu wurde eine Zählung durch eine zweite Person an drei Gehirnen in sämtlichen beurteilten Bereichen vorgenommen. Hierbei ergab sich ein Interratingkoeffizient von 0,994, welcher eine hochgradige Korrelation belegt.

An zehn Gehirnen wurde zudem eine Doppeltzählung in allen untersuchten Arealen durchgeführt, wobei sich ein Intraratingkoeffizient von 0,970 errechnen ließ, was auch in diesem Fall auf eine sehr hohe Zuverlässigkeit schließen lässt.

Zur Methodik der Arbeit ist des Weiteren zu bemerken, dass die Gesamtvolumina der einzelnen Hirnregionen durch Fixierung und Einbettung der Hirnschnitte einer Schrumpfung unterliegen. Aus diesem Grund wurde der bereits erläuterte Schrumpfungsfaktor bestimmt, welcher als Korrekturfaktor diente und einheitlich mit den ermittelten Werten multipliziert wurde. Zwischen den einzelnen Gruppen ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede.

Studien beschreiben darüber hinaus eine krankheitsbedingte Volumenreduktion bei schizophrenen Patienten, wobei diese hauptsächlich durch eine kortikale Atrophie verursacht werden sollen⁶⁷. So wird beispielsweise von geringeren Volumina bei den Erkrankten im Orbitofrontalkortex und im oberen temporalen Kortex ausgegangen²⁶. Auch im anterioren cingulären Kortex⁶⁸ soll es zu einer Volumenverminderung bei Schizophrenen kommen. Es stellt sich dabei die Frage, inwiefern ein Zusammenhang mit Veränderungen in der kortikalen Zelldichte besteht und ob diese durch die krankheitsbedingten Volumenreduktionen beeinflusst werden. Eine Metaanalyse mittels Voxel-basierte Morphometrie (VBM) von über 1000 schizophrenen Patienten und ebenso vielen Kontrollen brachte hervor, dass eine Abnahme der Dichte der grauen Substanz insulär, medial präfrontal, temporal als auch striatal in Gehirnen Schizophrener signifikant im Vergleich zu einer reinen kortikalen Volumenreduktion überwog. Im lateralen und orbitalen Frontalkortex dominierte allerdings eine Volumenverminderung bei den schizophren Erkrankten⁶⁹. Die Annahme, dass es schrumpfungsbedingt zu Dichteerhöhungen kommen müsste, kann als unterstützend für die hier gefundenen Dichteminderungen als nicht kompensatorischen Effekt angesehen werden.

4.2 Kortikale Veränderungen bei Schizophrenen

In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante Verminderungen der Glutaminsynthetase-exprimierenden Astrozyten bei den Schizophrenen in den Schichten I-III im dorsolateralen Präfrontalkortex beider Hemisphären gegenüber gesunden Vergleichsfällen gefunden. Unter Berücksichtigung der Suizidalität bei schizophrenen Patienten konnten beim Vergleich zwischen nichtsuizidalen Schizophrenen und den Kontrollen signifikante Verminderungen bei den Erkrankten in den Schichten I-III beidseits des dorsolateralen Präfrontalkortex sowie links des orbitofrontalen Kortex herausgefunden werden.

Der Vergleich der suizidalen Patienten mit gesunden Kontrollen ergab keine signifikanten oder tendenziell gleich gerichteten Veränderungen bei den immunpositiven Zellen.

Nichtsuizidale Schizophrene zeigten gegenüber den Schizophrenen, die durch Suizid verstarben, signifikante Verminderungen der Enzymexpression in allen Schichten der linken Hemisphäre des Orbitofrontalkortex.

Innerhalb der kortikalen Schichten I-III der Regionen, für die keine Signifikanz bezüglich der Verminderung der angefärbten Zellen aufgezeigt werden konnte, wurde ohne Ausnahme der Trend der Verminderung bei Schizophrenen vs. Kontrollen, bei nichtsuizidalen Schizophrenen vs. Kontrollen und bei nichtsuizidalen Schizophrenen vs. suizidalen Schizophrenen beobachtet. Dieser Befund legt nahe, dass sich durch eine Stichprobenerweiterung auch in diesen Arealen signifikante Verminderungen ergeben könnten.

Bezüglich der tieferen Schichten IV-VI der untersuchten Kortexareale konnten bis auf die Verminderung der Enzymexpression bei nichtsuizidalen Schizophrenen im Vergleich zu den suizidalen schizophren Erkrankten, keine abgrenzbaren Veränderungen oder Tendenzen festgestellt werden. Die relativen Differenzen bei der statistischen Beurteilung der einzelnen Vergleiche waren uneinheitlich. Diese Befunde sind durch die deutlich geringeren und stärker variierenden Zelldichten innerhalb dieser Schichten bei allen untersuchten Gehirnen begründet.

4.2.1 Neuropathologie und –histologie

Es ist bekannt, dass die Gehirne schizophrene Erkrankter pathomorphologische Veränderungen aufweisen. Seit der Entwicklung von CT und MRT konnten diese Alterationen in vivo untersucht werden und sollen an dieser Stelle ausführlich diskutiert werden.

4.2.1.1 Hirnentwicklung und Neurodegeneration

Schizophrene Patienten weisen nicht die typischen Veränderungen, wie einen Untergang von Neuronen mit begleitender Gliose auf, welche man bei neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer oder Chorea Huntington beobachten kann. Die hier vorliegenden neuropathologischen Alterationen, die eine Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie spielen, müssen anderer Ursache sein¹⁵. So gibt es spezielle Veränderungen, die charakteristisch für die schizophrene Erkrankung sind. Auf diese soll im Folgenden eingegangen werden.

Neuropathologische Untersuchungen fanden bisher zahlreich statt, sodass es bereits große Metaanalysen über viele Studien gibt. So stellte man bei einer solchen Analyse von Balla et al. 2011, welche Studien von über 100 Jahren beinhaltet, fest, dass die graue Substanz kortikal und subkortikal signifikant reduziert ist bei Schizophrenen. Diese Alterationen traten meistens präfrontal, temporal und im limbischen System auf. Auch fand man bei schizophren Erkrankten eine verminderte natürliche kortikale Asymmetrie und Veränderungen im Neuropil, den Axonen, Dendriten und Synapsen¹⁹.

Eine Metaanalyse über 55 Studien mittels MRT konnte ebenfalls Verminderungen der grauen und weißen Substanz und erweiterte Ventrikel aufzeigen. Hier waren diese Veränderungen besonders stark in frühen Stadien der Schizophrenie vorhanden⁷⁰.

Verminderte kortikale Volumina und Zelldichten brachte eine weitere Metaanalyse insbesondere temporal, frontal, im Thalamus und Striatum mittels Voxel-basierter Morphometrie zum Vorschein⁶⁹. Ebenfalls mit Hilfe dieses Verfahrens fand eine Analyse von über 1000 Schizophrenen statt, welche eine Volumenminderung im anterioren Gyrus cinguli, insulär, frontal, parahippocampal und im Thalamus beschrieb⁶⁸.

Diese Ergebnisse werden durch eine neurohistologische Untersuchung ergänzt, welche drei Studien beinhaltet und eine signifikante Reduktion von dendritischen Dornfortsätzen insbesondere frontal und temporal eruierte⁷¹.

Weitere Studien fanden Volumeninvolutionen unter anderem im Orbitofrontalkortex²⁶ und stellten zudem fest, dass diese Alterationen auf eine frühe kortikale Entwicklungsstörung hinweisen könnten⁷². Auch der Verlust der kortikalen Asymmetrie, die erweiterten Ventrikelräume und eine frontale Hypergyrie³¹ könnten eine frühe Hirnentwicklungsstörung vermuten lassen, wobei ein später hinzukommender progressiver Prozess nicht ausgeschlossen werden kann⁷³.

In einer weiteren Publikation wird beschrieben, dass neonatale Hippocampusläsionen bei Tieren zu einem veränderten Verhalten, unter anderem durch eine Übererregbarkeit mesolimbischer dopaminergener Neurone, welche auch den dorsolateralen Präfrontalkortex beeinflussen, führen können.

Diese Befunde der kortikalen Über- und Dysfunktion durch pathologisch veränderte inhibitorische Schaltkreise existieren ebenso bei schizophrenen Erkrankten, wodurch ein Zusammenhang zwischen einem früh erworbenen hippocampalen Defekt und der späteren Entstehung einer Schizophrenie hergestellt werden kann ⁷⁴.

Die Ursachen neuropathologischer und –histologischer Aberrationen sind jedoch auch auf genetischer Ebene zu suchen. Untersuchungen konnten beispielsweise das Gen für Neuregulin mit der Schizophrenie in Verbindung bringen. Die normalerweise zahlreichen als protektiv geltenden Polymorphismen sind bei Schizophrenen deutlich erniedrigt. Dieser Befund fiel umso stärker aus, je früher der Erkrankungsbeginn und je ausgeprägter die Positivsymptomatik war ⁷⁵. Neuregulin kommt in zentralnervösen Synapsen vor und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Expression von Transmitterrezeptoren, insbesondere auch beim Glutamat-Rezeptor. Die Erforschung der genetischen Komponenten bedarf noch weiterer Validierung. Das Gen für Neuregulin ist als eines von mehreren Kandidatengenen für die Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises anzusehen ⁵.

Es kann jedoch nicht nur von angeborenen oder früher erworbenen Störungen ausgegangen werden, da eine gewisse neuronale Plastizität auch später noch vorliegt und einen bedeutenden Einfluss hat. In speziellen Phasen, insbesondere im ersten Lebensjahr, können sozioemotionale Ereignisse ein sogenanntes Imprinting induzieren, welches synaptische Konnektivität und neuronale Schaltkreise vor allem im limbischen System modulieren kann ¹². Basierend darauf erhofft man sich eine Besserung der Symptomatik durch Psychotherapie, mit welcher man die Schaltkreiseralterationen bei Schizophrenen zu modulieren versucht. Darüber hinaus wird die Methylierung der genetischen Information für neuronale Plastizität und das Langzeitgedächtnis verantwortlich gemacht ⁷⁶, wodurch die Hoffnung der Umkehr dieser Prozesse mit einer Therapie besteht.

Bezüglich der morphologischen Veränderungen der Ventrikel bei schizophrenen Patienten wird einheitlich eine Erweiterung postuliert. Mittels CT ¹⁶ und 3D-MRT ¹⁷ konnten diese Veränderungen sehr genau untersucht und beschrieben werden und gelten als gesichert. Eine Studie verglich Patienten, bei denen die Erkrankung bereits in der Adoleszenz ausbrach mit solchen, die erst im Erwachsenenalter erkrankten. Veränderungen wie eine kortikale Volumenminderung frontal, temporal, im limbischen System, im Thalamus und in den Basalganglien sowie Ventrikelerweiterungen waren dabei bei den früh Erkrankten wesentlich stärker ausgeprägt als bei den Patienten, die später krank wurden. Es wurde indes auch eine Progredienz der kortikalen Volumenabnahme bei den Patienten ermittelt ¹⁸, was für ein Voranschreiten der Alterationen und damit für einen degenerativen Prozess sprechen würde.

4.2.1.2 Kortexregionen und kortikale Schichtung

In der vorliegenden Arbeit wurde der dorsolaterale Präfrontalkortex, der anteriore Gyrus cinguli und der Orbitofrontalkortex untersucht. Innerhalb der einzelnen Areale wurde die Untersuchung schichtenspezifisch vorgenommen, d.h. es wurden sich die Schichten I-III und die tieferen kortikalen Schichten IV-VI getrennt angeschaut. An dieser Stelle soll auf die Alterationen dieser Areale bei schizophrenen Patienten mit besonderem Augenmerk auf den Zusammenhang mit der Störung des Glutamatstoffwechsels eingegangen werden.

Die Untersuchung fand getrennt für obere (I-III) und untere (IV-VI) Kortexschichten statt, da gefundene Veränderungen in Gehirnen Schizophrener sich nicht immer einheitlich auf alle Schichten beziehen.

So analysierte eine Arbeitsgruppe Pyramidenzellen, Interneurone und Gliazellen getrennt nach den sechs kortikalen Schichten und stellte fest, dass die Interneurone signifikant am ausgeprägtesten in Schicht II der grauen Substanz des vorderen cingulären Kortex und des Präfrontalkortex bei Schizophrenen vermindert waren⁷⁷. Die Anzahl der GABA-enthaltenden Zellen im anterioren cingulären Kortex wurden innerhalb der Schicht II bereits 1998 als vermindert beschrieben⁷⁸. In einer anderen Studie befasste man sich mit Veränderungen der Astrozyten im vorderen Gyrus cinguli getrennt nach den Schichten I-III, Schichten IV-VI und der weißen Substanz. Einige spezifische Astrozytenmarker wie die Glutaminase waren in den tiefen Schichten IV-VI dabei signifikant reduziert⁶⁰. Auch im orbitofrontalen Kortex konnte schichtenspezifisch eine Verdichtung der Dendriten und deren Fortsätze in der Schicht VI bei schizophrenen Patienten festgestellt werden³⁰. Im dorsolateralen Präfrontalkortex fand man bei einer anderen Untersuchung heraus, dass der GABA-Membrantransporter in den Schichten I-V dieses Areals signifikant erniedrigt war, nicht jedoch in Schicht VI⁵³. So wird deutlich, dass eine differenzierte Betrachtung der kortikalen Schichtung in jedem Fall sinnvoll ist und eine undifferenzierte Betrachtung aller Schichten das Ergebnis verfälschen kann, was sich auch allein schon aus den unterschiedlichen Afferenzen und Efferenzen der verschiedenen kortikalen Schichten erklärt.

Der Thalamus stellt eine zentrale Schaltstation dar, die von fast allen Informationen durchlaufen werden muss. Er ist reziprok mit diversen kortikalen Arealen vernetzt, so auch mit dem dorsolateralen Präfrontalkortex über den mediodorsalen Kern und mit limbischen Hirnregionen über den anterioren Kern. Störungen auf Ebene des Thalamus können folglich multiple Dysfunktionen auf kortikaler Ebene nach sich ziehen.

So konnte eine Forschungsgruppe im Thalamus eine signifikante Erhöhung von phosphataktivierter Glutaminase und Glutaminsynthetase zeigen, welche beide in den Glutamatstoffwechsel involviert sind³⁹. Weitere Veränderungen im Glutamatkreislauf stellten Sodhi et al. in einer Untersuchung fest, in der die Expression glutamaterger Transkripte für ionotrope Glutamatrezeptoren im mediodorsalen Kern des Thalamus analysiert wurde. Dabei fand man heraus, dass die Transkripte in Projektionsneuronen bedeutsam vermindert waren, nicht aber in Interneuronen und Gliazellen, was auf eine Störung der kortikalen Projektion schließen lässt. So ist die Schlussfolgerung von Dysfunktionen innerhalb thalamo-kortikaler Schaltkreise zulässig⁷⁹.

Der dorsolaterale Präfrontalkortex spielt eine erhebliche Rolle für das menschliche Verhalten und Emotionen, sodass es bei Störungen dieses Areals zu gravierenden Veränderungen der genannten Aspekte kommen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde in beiden Hemisphären dieses Kortexgebiets bei den Schizophrenen eine Verminderung der Glutaminsynthetase-Expression in Astrozyten in den Schichten I-III im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden.

Es konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass der NMDA-Rezeptor Antagonist MK-801 die Aktivität des Präfrontalkortex elektrophysiologisch deutlich modulieren und als Model für die Mechanismen kortikaler Defizite Schizophrener herangezogen werden kann⁸⁰. Eine weitere Forschungsarbeit eruierte eine verminderte Glutaminsynthetase-Expression sowie eine Erhöhung der Glutamatdehydrogenase im dorsolateralen Präfrontalkortex, was als eine stärkere Variabilität der Regulation bei schizophrenen Patienten, welche zu einer Dysregulation kortikaler Prozesse führen könnte, interpretiert wurde⁴⁰. Von pathologischen Regulationsabläufen, welche das glutamaterge und GABAerge System betreffen, wurde ebenfalls in einer Studie berichtet, die im dorsolateralen Präfrontalkortex erhöhte Werte für phosphataktivierete Glutaminase und Glutamatdecarboxylase maß²⁰. Auch in einer anderen Arbeit wird von einer alterierten dopaminergen und glutamatergen Interaktion gesprochen, bei der die COMT-Expression in Gliazellen signifikant erhöht beschrieben wurde⁶.

Der anteriore cinguläre Kortex besitzt eine wichtige Funktion in der Gedächtnisbildung als Teil des Papez-Neuronenkreises, welcher unabdingbar für die Erinnerungsfähigkeit ist. In der vorliegenden Untersuchung wurde im vorderen cingulären Kortex zwar keine signifikante Verminderung der Glutaminsynthetase bei schizophren Erkrankten gefunden, allerdings war ein deutlicher Abnahmetrend in den Schichten I, II und III einheitlich bei allen schizophrenen Patienten als Gesamtgruppe und bei allen nichtsuizidalen Schizophrenen gegenüber gesunder Kontrollen und suizidaler Schizophrener zu beobachten.

Was die Forschungslage anbelangt, so werden Veränderungen in diesem Areal bei schizophrenen Patienten durchaus postuliert. So wurde eine Verminderung in der Expression eines Oligodendrozytenmarkers in der weißen Substanz beschrieben⁸¹ und auch Astrozyten konnten vermindert in der grauen und weißen Substanz des cingulären Kortex²³ als auch speziell in den Schichten IV-VI dargestellt werden⁶⁰. Eine Untersuchung mit diversen Biomarkern ergab eine geschlechtsabhängige Erhöhung der Glutaminsynthetase und auch der Aldolase C, ein Enzym bei der Glykolyse, bei weiblichen schizophrenen Patienten im anterioren Gyrus cinguli⁴⁸. Weiterhin stellte eine Forschungsgruppe eine deutliche Verminderung der Astrozytenmarker GFAP und Glutaminsynthetase in diesem Areal bei Schizophrenen fest⁴⁹, was den Schluss zulässt, dass innerhalb des anterioren cingulären Kortex eher von einer Herabregulation des Glutamatstoffwechsels ausgegangen werden kann und die hier gefunden Trends einer Reduktion der Glutaminsynthetase bei Schizophrenen bestätigt.

Als weiteres Hirngebiet wurde der orbitofrontale Kortex untersucht, welcher unter anderem mit der Insel und dem Mandelkern neuronal verbunden ist. Dieser Kortexbereich ist an der Angstentstehung mitbeteiligt und beeinflusst vegetative Vorgänge. Eine signifikante Verminderung der Glutaminsynthetase-Expression in Astrozyten und damit womöglich der glutamatergen Transmission zeigte sich in dieser Studie bei nichtsuizidalen schizophrenen Patienten gegenüber Kontrollen in den Schichten I-III der linken Hemisphäre. Schizophren Erkrankte, die eines natürlichen Todes starben, wiesen zudem eine signifikant geringere Dichte immunpositiver Zellen im Vergleich zu suizidalen Schizophrenen in der linken Hemisphäre innerhalb aller kortikaler Schichten auf.

Studien fanden bei schizophren Erkrankten ebenfalls pathologische Veränderungen in dieser Region. So fand eine Gruppe heraus, dass es im Orbitofrontalkortex bei Schizophrenen zu einer erhöhten Dichte an Pyramidenzellen und dendritischen Dornfortsätzen kommt³⁰ und dass darüber hinaus die kortikalen Sulci pathologisch verändert sind⁷².

Als weitere bedeutende Region wird in der Schizophrenieforschung der Hippocampus diskutiert. In einer Studie von Greene et al. wurde die Wirkung von NMDA-Antagonisten, vergleichbar mit Ketamin und Phencyclidin, in dem Areal CA1 untersucht, was zu einer schizophrenieähnlichen Psychose führte. Man deutete die Ursache dieses Befundes als eine Disinhibition kortikaler Projektionsneurone, die zu der Symptomatik führen soll⁸². Mit einer PET-Analyse konnte außerdem gezeigt werden, dass der Hippocampus bei Gedächtnisleistungen Schizophrener geringer aktiviert wird, was die kognitiven Störungen in der Schizophrenie erklären könnte²².

Es wird auch diskutiert, dass hippocampale Läsionen zu einer Diskonnektivität zwischen Hippocampus und Präfrontalkortex führen, was als eine Ursache der Erkrankung in Betracht gezogen werden kann ⁸³.

4.2.1.3 Gliazellen

In der vorliegenden Dissertation wurde ein Antikörper gegen das Enzym Glutaminsynthetase verwendet. Es zeigten sich bei der histologischen Beurteilung ausschließlich Astrozyten und in deutlich geringerem Maße Oligodendrozyten immunpositiv. Neurone stellten sich nicht dar. Seit die vielfältige Bedeutung der Gliazellen genauer bekannt wurde, gelangten diese Zellen auch stärker in den Fokus der Schizophrenieforschung.

Gliazellen beeinflussen den Elektrolyt- und Wasserhaushalt, Synapsen, die Abgabe und Aufnahme von Neurotransmittern und haben auch immunologische Funktionen. Deshalb werden Alterationen dieser Zellpopulation heute zu großen Teilen an der Pathogenese der Schizophrenie verantwortlich gemacht und dienen auch als Target bei therapeutischen Interventionen bzw. deren Weiterentwicklung ⁸⁴. Veränderungen bei Gliazellen werden zudem als Ursache einer veränderten Interaktion zwischen Glutamat und Dopamin diskutiert⁶.

Astrozyten wurden vermindert im vorderen Gyrus cinguli in der grauen und weißen Substanz ²³ als auch schichtenspezifisch in den Schichten IV-VI herabreguliert ⁶⁰ gefunden. Oligodendrozytenveränderungen konnten in einer Studie mit einem spezifischen Marker in der weißen Substanz des anterioren cingulären Kortex als erniedrigt festgestellt werden ⁸¹. Auch wurde eine signifikante Verminderung bestimmter Gene und der Zelldichte der Oligodendrozyten im Kortex gefunden, was als Ursache der abnormen inter- und intrahemisphärischen Verschaltung bei Schizophrenen diskutiert wird ²⁴.

Eine andere Forschungsgruppe untersuchte das Vorkommen des Enzyms Glutaminsynthetase in Gliazellen und Neuronen und konnte feststellen, dass vorrangig Astrozyten Glutaminsynthetase exprimieren. Oligodendrozyten enthielten dabei in wesentlich geringem Maße das Enzym und bei Neuronen gab es gar keinen Hinweis auf das Vorkommen von Glutaminsynthetase ⁴⁷. Damit können Astrozyten als relativ spezifisch für dieses Enzym betrachtet werden, was sich auch durch ihre Funktionen bezüglich der Neurotransmitterregulation erklärt. In einer weiteren Studie wurde Glutaminsynthetase vermindert im vorderen Gyrus cinguli und superioren Temporallappen gefunden und der Astrozytenmarker GFAP als verringert im anterioren Gyrus cinguli beschrieben ⁴⁹. Auch im dorsolateralen Präfrontalkortex gab eine Forschungsgruppe Alterationen der Gliazellen bei einer Untersuchung von Glutaminsynthetase und Glutamatdehydrogenase bekannt.

Glutaminsynthetase wurde dabei reduziert vorgefunden, während Glutamatdehydrogenase erhöht war, was die Dysfunktion innerhalb des Glutamatstoffwechsels bei schizophrenen Patienten verdeutlicht ⁴⁰.

4.2.1.4 Prognostische Bedeutung hirnstruktureller Veränderungen

Es stellt sich die Frage, ob oder in welchem Maße die Veränderungen der Neuropathologie und –histologie als prognostische Faktoren dienen können. Die Voraussagekraft hirnstruktureller Befunde wird derzeit kontrovers diskutiert und eine einheitliche Antwort steht noch aus.

Bezüglich des Langzeitverlaufs spielt die Vergrößerung der Ventrikel bei Schizophrenen eine gewisse Rolle. So wurde in einer Studie mittels MRT eine stärkere Größenzunahme der Ventrikel bei schizophren Erkrankten gemessen, die einen ungünstigen Verlauf aufwiesen. Man geht jedoch davon aus, dass die Prognose nicht von einer einzigen morphologischen Alteration bestimmt wird ⁸⁵. Diesen Befund stützt eine andere Untersuchung, in der eine exzessive Vergrößerung des Vorder- und Hinterhorns der Seitenventrikel mit einem schlechten Verlauf bei schizophrenen Patienten einherging ⁸⁶. In einer Metaanalyse über 21 Studien, die mit Hilfe von CT und MRT Volumenänderungen der Ventrikel und des Kortex untersuchten, ergaben sich ebenfalls Zusammenhänge zwischen der Ventrikelgröße und der Prognose ⁸⁷.

Bezüglich der kurzfristigen positiven Wirkung von Antipsychotika wurde eine Metaanalyse von Falkai et al. durchgeführt. Bei den meist rechtshändigen gesunden Kontrollen waren eine Vergrößerung des rechten frontalen Kortex und eine Verminderung des linken okzipitalen Kortex zu verzeichnen. Bei schizophrenen Non-Respondern bezüglich der Medikation konnte im Gegensatz dazu eine signifikante Reduktion der frontalen Asymmetrie gezeigt werden ⁸⁸. Eine andere Untersuchung, welche 33 Studien beinhaltete, konnte keinen Parameter mit einer signifikanten Relevanz für die antipsychotische Therapie ermitteln, wobei die Ergebnisse der einzelnen Studien sehr heterogen waren ⁸⁹.

4.2.2 Transmitteralteration

Die Glutamathypothese spielt in der Schizophrenieforschung eine bedeutungsvolle Rolle. Eine Dysfunktion kann als gesichert angenommen werden, wohingegen die genauen Störungen noch nicht eindeutig definiert werden können. Erstmals wurde diese Hypothese 1980 in Bezug auf die Schizophrenie beschrieben, als man erniedrigte Glutamat Spiegel im Liquor, nicht aber im Serum Schizophrener fand und diesen Effekt einer Dysregulation im glutamatergen Stoffwechsel zuschrieb ⁹⁰.

Den Astrozyten kommt eine Schlüsselrolle im Glutamatmetabolismus zu ²⁴. Das Enzym Glutaminsynthetase ist ein wichtiges Element in der Metabolisierung von Glutamat und führt bei Alterationen zu einer Dysfunktion in dem Stoffwechselkreislauf. Eine Forschungsgruppe fand Glutaminsynthetase und phosphataktivierte Glutaminase erhöht im Thalamus und vermutete eine verstärkte Transmission mittels Glutamat in dieser Hirnregion ³⁹. Dass sich die Störungen nicht nur auf den Thalamus beziehen, bewies eine andere Studie, die ionotrope Glutamatrezeptoren im mediodorsalen Thalamus untersuchte und eine selektive Minderung der Rezeptoren in Projektionsneuronen nachwies, was auf den globalen kortikalen Effekt der Alterationen schließen lässt ⁷⁹. Eine andere Arbeit bestätigte die Hypothese der kortikalen Wirkung durch die Untersuchung von NMDA-Antagonisten in der CA1 Region des Hippocampus, die bei Ratten zu Veränderungen in diesem Areal führten und durch eine Disinhibition kortikaler Projektionsneurone eine schizophrenieähnliche Teilsymptomatik induzierten ⁸².

Auch im vorderen cingulären Kortex sind Veränderungen beschrieben. Steffek et al. fanden verminderte Werte der Glutaminsynthetase-Expression in diesem Areal und eine Vermehrung des Enzyms im Thalamus, was als kompensatorische Reaktion gewertet wurde. Im dorsolateralen Präfrontalkortex und Hippocampus wurden keine signifikanten Änderungen festgestellt ⁴⁹.

Im Gyrus cinguli fand man außerdem eine erhöhte Glutaminsynthetase-Expression bei weiblichen Schizophrenen ⁴⁸, wodurch die teilweise kontroverse Diskussion der Alterationen der Enzyme im Glutamatstoffwechsel bei Schizophrenen deutlich wird.

Die unterschiedlichen Befunde können möglicherweise jedoch auch darin begründet sein, dass sich die einzelnen Elemente des Glutamatzyklus gegenseitig kompensatorisch beeinflussen und so inverse Ergebnisse für verschiedene Enzyme des Stoffwechselweges durchaus nicht widersprüchlich sind. Beispielsweise induziert ein Glutaminmangel eine vermehrte Enzymsynthese ⁵⁰. Auch kann die Pathologie in der erhöhten Variabilität der Regulation des Glutamatstoffwechsels liegen, was differierende Ergebnisse für einzelne Elemente des Zyklus nicht ausschließt. So wurde in einer Studie im Präfrontalkortex Schizophrener Glutaminsynthetase erniedrigt und Glutamatdehydrogenase erhöht ermittelt und eine stärkere Schwankung diskutiert, welche die Dysfunktion verursachen könnte ⁴⁰. Ghose et al. stellte fest, dass das Enzym Glutamatcarboxypeptidase II im dorsolateralen Präfrontalkortex und Hippocampus bei Schizophrenen erniedrigt ist, während man demgegenüber eine Erhöhung in der polymorphen Region CA3 des Hippocampus fand, was für regionsspezifische Alterationen sprechen kann. In dem Zusammenhang wurde eine kompensatorische Abnahme der Synthese diskutiert ⁵¹. Des Weiteren handelt es sich um sehr komplexe Änderungsprozesse.

Sehr früh im Leben werden kortikale ionotrope Glutamatrezeptoren gebildet und können zum Beispiel durch zahlreiche sozioemotionale Erlebnisse vielfältig verändert werden⁹¹. Der Glutamatstoffwechsel ist darüber hinaus nicht als unabhängig zu betrachten. Vielfach wird eine Interaktion mit dem dopaminergen System beschrieben, wodurch sich Änderungen ebenfalls beeinflussen können. So wird die NMDA-Rezeptor Hypofunktion im Präfrontalkortex Schizophrener in Zusammenhang mit der überaktiven striatalen Dopaminausschüttung gebracht, wodurch es zur dopaminergen Dysbalance kommen kann. Diese Wechselwirkungen sollen auch die gestörte Konnektivität und Plastizität in Gehirnen Schizophrener erzeugen³³.

Auch wird ein Zusammenspiel von Glutamat mit GABA beschrieben, welche aus ersterem synthetisiert wird. Phosphataktivierte Glutaminase und Glutamatdecarboxylase, welche die Stoffwechselkreisläufe beider Transmitter beeinflussen, wurden bei schizophrenen Patienten im dorsolateralen Präfrontalkortex gemeinsam erhöht vorgefunden und lassen Interaktionen vermuten²⁰.

Die Dopaminhypothese geht von Störungen im dopaminergen System bei schizophren Erkrankten aus. Diese Tatsache ist der zentralen Rolle des mesolimbischen dopaminergen Systems an Motivation, Verhalten, Belohnung, Kognition und Lernprozessen geschuldet, welche Dopamin über neuronale Aktivierung thalamo-kortikaler Schaltkreise beeinflussen kann¹¹.

Es wird auch eine striatale Dysfunktion diskutiert, welche durch die Verbindung zum Kortex mit der kognitiven Störung Schizophrener in Zusammenhang gebracht wird³². D2-Rezeptoren werden bei schizophren Erkrankten im Striatum als überaktiv beschrieben, während man präfrontal eine Verminderung von D1-Rezeptoren findet. Man geht folglich von einer Dysregulation aus, welche auch durch den gestörten Glutamatstoffwechsel beeinflusst wird und in enger Verbindung zu den glutamatergen Veränderungen bei Schizophrenen zu betrachten ist³³. Es ist weiterhin beschrieben, dass neonatale temporal-limbische Defekte bei Affen zu einer disinhibierten subkortikalen Dopaminausschüttung führen, wie sie auch bei schizophren Erkrankten vorkommen kann³⁸. Darüber hinaus forscht man an der prognostischen Bedeutung von dopaminergen Veränderungen. So konnte mit bildgebenden Verfahren wie der Magnetresonanztomographie geprüft werden, ob Dopamin und Glutamat in der Prodromalphase vor einer schizophrenen Psychose bereits verändert sind und so eine frühzeitige Intervention ermöglichen könnten. Eindeutige Ergebnisse stehen allerdings noch aus⁹².

Das GABAerge System spielt in der Schizophrenie ebenfalls eine wichtige Rolle und steht in enger Beziehung zum Glutamatstoffwechsel²⁰. Es konnte festgestellt werden, dass kognitive Defizite bei schizophrenen Erkrankten mit einer abnormen GABAergen Transmission im dorsolateralen Präfrontalkortex zusammenhängen. Die Expression von mit GABA zusammenhängenden mRNA-Transkripten konnte bei Schizophrenen signifikant vermindert im dorsolateralen Präfrontalkortex und im anterioren Gyrus cinguli gefunden werden²¹. Veränderungen für Glutamatdecarboxylase-immunpositive Neurone bei Schizophrenen sind außerdem im hinteren Subiculum und parahippocampal beschrieben⁵⁴. Auch in Bezug auf das Krankheitsstadium werden Veränderungen im GABAergen System diskutiert. So stellte man in einer Studie fest, dass es insbesondere in der ersten Episode der Erkrankung zu einer reduzierten kortikalen Inhibition durch eine Verminderung von GABA kam. In diesem Zusammenhang wird auch die vermutete kortikale Diskonnektivität bei Schizophrenen hervorgehoben⁹³. Auch im dorsolateralen Präfrontalkortex brachte eine Studie Veränderungen zum Vorschein, wobei ein GABAerger Membrantransporter in Neuronen untersucht wurde, der sich vermindert darstellte⁵³. Eine andere Analyse ergab zudem auch eine verminderte Anzahl an GABAergen Interneuronen im vorderen Gyrus cinguli vor allem in der kortikalen Schicht II⁷⁸, was die globale kortikale Alteration dieses Transmitters verdeutlicht.

Serotonin als weiterer Neurotransmitter spielt eine zentrale Rolle in neuronalen Schaltkreisen bezüglich Kognition und Emotion. Dysfunktionen wurden in einer Studie in Hinblick auf Psychosen und kognitiven Störungen innerhalb des schizophrenen Formenkreises diskutiert.

Diese Hypothese begründet sich auf der Wirkung von Clozapin, einem atypischen Neuroleptikum, welches vorrangig an 5-HT-2A-Rezeptoren wirkt und damit die serotonerge Transmission beeinflusst. Bei den beschriebenen schizophrenen Störungen wirkt es effektiv, sodass eine Dysfunktion anzunehmen ist⁹⁴. Eine weitere Untersuchung fand einen Zusammenhang zwischen genetischen Variationen eines Serotonintransporter-Gens und suizidalen Schizophrenen⁵⁶. Insgesamt stellt dieser Transmitter jedoch nur eine untergeordnete Rolle in der Schizophrenieforschung dar.

4.2.3 Einfluss von Suizid

Der Einfluss des Suizids auf ein verändertes Vorkommen der Glutaminsynthetase bei den schizophrenen Erkrankten zeigte sich bei der vorliegenden Analyse im orbitofrontalen Kortex.

Beim Vergleich der Schizophrenen getrennt nach Suizidalität ergaben sich signifikant verminderte Ergebnisse bei den nichtsuizidalen Schizophrenen gegenüber den suizidalen Patienten innerhalb aller kortikaler Schichten der linken Hemisphäre des Orbitofrontalkortex .

Der Aspekt der Todesursache Suizid wurde bereits mehrfach untersucht. Dabei konnte ein erheblicher Einfluss glutamaterger und GABAerger Transmittersysteme festgestellt werden⁹⁵. Eine Beziehung zwischen einer höheren Aktivität der Mikroglia bei psychotischen Patienten, welche einen Suizid begingen, wurde ebenfalls beschrieben²⁴. Auch die serotonerge Neurotransmission scheint bei suizidalen Schizophrenen verändert zu sein. In einer Studie untersuchte man genetische Polymorphismen eines Serotonintransporter-Gens und stellte einen eindeutigen Zusammenhang zwischen einem bestimmten Polymorphismus und dem Suizid bei Schizophrenen fest⁵⁶. Eine weitere Forschungsgruppe konnte zeigen, dass IL1 und TNF α konzentrationsabhängig in menschlichen Astrozytenkulturen die Aktivität der Glutaminsynthetase inhibieren können. Bei suizidalen Schizophrenen gegenüber Patienten, die eines natürlichen Todes starben, konnte ebenfalls eine Verminderung der Glutaminsynthetase, gezeigt werden. Aus diesem Grund ist der Rückschluss auf eine Inflamationsreaktion im Rahmen des Suizids denkbar¹⁰. In einer weiteren Studie wurde die Aktivierung der Mikroglia bei suizidalen Schizophrenen in verschiedenen Hirnregionen immunhistologisch analysiert, wobei eine signifikante Erhöhung der Zellpopulation im dorsolateralen Präfrontalkortex, im anterioren cingulären Kortex und im mediodorsalen Thalamus gefunden werden konnte. Hippocampal war ein Trend in die gleiche Richtung erkennbar. Es wurde diskutiert, ob diese umfassende Mikrogliose mit dem psychischen Stress während der präsuizidalen Psychose in Beziehung zu setzen ist oder ob sie als Trigger für die Entstehung des Suizids gewertet werden kann.

Letztere Überlegung wurde in Betracht gezogen, da bekannt ist, dass es bei einer Mikroglia-Aktivierung zur Ausschüttung neuroendokriner Faktoren, von Stickstoffoxid und Zytokinen kommt, welche die Transmission durch Serotonin, Noradrenalin und auch Glutamat modulieren können und damit für Suizidalität bedeutsam sein können²⁵. Ferner muss festgehalten werden, dass der Einfluss von Glutaminsynthetase bei schizophrenen Patienten bezüglich eines Suizids als wichtiger Faktor diskutiert werden sollte, jedoch noch weiterer Untersuchungen bedarf⁹⁵.

4.2.4 Immunologische und inflammatorische Komponenten

Wie im vorigen Kapitel dargelegt, wird eine inflammatorische Komponente bei einer schizophrenen Psychose²⁵ bzw. einer akuten Exazerbation der Krankheit beschrieben⁵⁷.

Darüber hinaus wird jedoch auch unabhängig davon ein Einfluss immunologischer Faktoren bei schizophrenen Patienten diskutiert. Eine Studie konnte mit einem Antikörper gegen HLA-DR als Marker für Mikroglia erhöhte Werte frontal und temporal in Gehirnen Schizophrener messen⁷¹. Auch bei der Analyse von Polymorphismen aus großen genomweiten Untersuchungen konnten veränderte Gene für MHC-Antigene bei Schizophrenen festgestellt werden, was die Möglichkeit eine immunologische Komponente weiter untermauert⁸. Im unreifen Gehirn kann eine Inflammation zum einen physiologisch auftreten, zum anderen allerdings auch pathologisch sein und zu einer erhöhten Vulnerabilität des Gehirns führen. Zudem kann eine akute Inflammation in eine chronische Reaktion übergehen und die Hirnentwicklung beeinträchtigen. In einer Analyse dieser Thematik untersuchte Hagberg et al. die Konsequenzen bei Kindern und Erwachsenen und stellte einen Langzeiteffekt fest, welcher sich als ein erhöhtes Risiko für neurologische und psychiatrische Erkrankungen, so auch für die Schizophrenie, äußerte. Es sei jedoch auf den meist vorläufigen Charakter der Daten und das noch nicht vollständige Bild an Veränderungen hingewiesen⁵⁹. Es wurde darüber hinaus eine Metaanalyse über 62 Studien durchgeführt, in welcher die periphere Zytokinausschüttung im Blut bei schizophren Erkrankten untersucht wurde. Dabei fand man eine signifikante Vermehrung von IL1, IL2 und IL6 im Serum, was als eine veränderte Immunantwort bei den Patienten interpretiert werden kann⁵⁸. Eine andere Studie untersuchte mRNA-Transkripte im dorsolateralen Präfrontalkortex Schizophrener und fand beinahe 800 verschieden regulierte Transkripte bei den schizophrenen Patienten. Mit einer PCR-Untersuchung konnte diese Forschungsgruppe des Weiteren zeigen, dass Schizophrene eine signifikant höhere Expression von MHC II-positiven Zellen zeigten, was mit der IL1 β -Expression korrelierte.

Zusammenfassend konnte bei 40% der Schizophrenen eine veränderte immunologische bzw. inflammatorische Reaktion gefunden werden⁹⁶, weshalb eine inflammatorische Komponente der Erkrankung als ein wichtiger Aspekt betrachtet werden muss.

4.2.5 Klinische Interpretation der Pathophysiologie und Ausblick

Die Ergebnisse der Forschungsarbeiten haben klinisch eine nicht unerhebliche Relevanz in Bezug auf neue therapeutische Möglichkeiten und prognostische Faktoren bei der Schizophrenie. So erhofft man sich durch eine medikamentöse Regulation der immunologischen Veränderungen, beispielsweise durch spezifische Antikörper, einen direkten Effekt in den Gehirnen Schizophrener⁹⁶.

Mit Einführung atypischer Neuroleptika wie Clozapin als Prototyp konnte bereits eine verbesserte Wirkung auf die Negativsymptomatik durch zusätzliche Effekte am Serotonin-Rezeptor verzeichnet werden als mit herkömmlichen Antipsychotika wie Haloperidol, welche nur an dopaminergen Rezeptoren wirken. So wurde auch ein selektiver 5-HT-2A-Rezeptor Antagonist entwickelt, welcher effektiv einer L-Dopa induzierten Psychose entgegenwirken konnte und als mögliches Add-On zur Therapie mit anderen atypischen Neuroleptika diskutiert wird ⁹⁴.

Dennoch sprechen ca. ein Drittel der Patienten nicht auf die antipsychotische Therapie an. Eine bessere Wirkung insbesondere bei Negativsymptomatik und kognitiven Störungen verspricht man sich durch einen Angriff an glutamatergen Rezeptoren, da die Alterationen als gesichert gelten können. Durch ein noch genaueres Verständnis der frontalen NMDA-Rezeptor Hypofunktion wird angestrebt, die Therapie von schizophrenen Erkrankten deutlich zu verbessern ⁴⁴. Bei Ratten mit neonataler Hippocampusläsion konnte durch einen mGlu2/3-Rezeptor-Agonisten die kognitive Flexibilität der Tiere signifikant verbessert werden ⁹⁷. In einer anderen Untersuchung prüfte man präklinische und klinische Daten bezüglich NMDA-Rezeptor-Agonisten. Dabei zeigte ein Glycintransporter-Inhibitor eine vielversprechende Wirkung und AMPA-Rezeptor-Agonisten konnten kognitive Störungen günstig beeinflussen. Man untersuchte auch Memantin als NMDA-Rezeptor-Antagonist zur Relativierung der glutamatergen Exzitotoxizität in frühen Stadien der Erkrankung. Hier konnte ein langsamerer Progress der Negativsymptomatik bei jedoch schwereren Krankheitsstadien festgestellt werden ⁹⁸. Zudem wird im Zusammenhang mit der Therapie durch Modulation der glutamatergen Neurotransmission die Bedeutung des allosterischen Rezeptorangriffs diskutiert, da so eine Herabregulation der Rezeptoren verhindert werden könnte ⁹⁹.

Ferner werden Änderungen im glutamatergen System als Prädiktoren für die Therapiedauer mit einem positiven Outcome analysiert. Dazu wurde der Serumspiegel von Glutaminsynthetase-like-Peptid und Glutamatdehydrogenase in Blutplättchen Schizophrener vor und nach 28 Wochen medikamentöser Therapie mit Olanzapin gemessen. Vor Beginn der Behandlung konnten signifikant erhöhte Werte für Glutaminsynthetase-like-Peptid gezeigt werden, welche unter der Behandlung abnahmen. Dabei war zu erkennen, dass ein höherer Ausgangswert eine kürzere Dauer der Medikamenteneinnahme bis zu einem positiven klinischen Erfolg zur Folge hatte. So kann Glutaminsynthetase-like-Peptid zukünftig als ein prognostischer Faktor für das therapeutische Ansprechen diskutiert und weiter untersucht werden.

Es konnte darüber hinaus die Wirkung von Olanzapin auch auf den Glutamatstoffwechsel durch die Änderung der Enzyme Glutaminsynthetase-like-Peptid und Glutamatdehydrogenase in Blutplättchen gezeigt werden sowie die damit verbundene breitere Wirkung gegenüber anderen Medikamenten ¹⁰⁰.

Die Inhomogenität der neuropathologischen und –histologischen Alterationen bei schizophrenen Patienten können als eine der Ursachen der klinischen Vielfältigkeit angesehen werden. Dennoch sind die Daten auch auf Grund von noch ungenügender Forschungsarbeit teilweise uneinheitlich und unterliegen der Notwendigkeit der Untersuchung durch weitere Studien.

Veränderungen in der Immunologie bzw. Inflammation müssen genauer demaskiert werden und in diesem Zusammenhang auch der Einfluss einer solchen Reaktion auf den Suizid. Auch die Voraussagekraft von Alterationen bezüglich des Krankheitsverlaufs bedürfen weiterer Untersuchungen, um eine frühzeitige Intervention beginnen zu können. Zusätzlich gilt es, die Theorie der Schizophrenie als pränatal erworbene Hirnstrukturanomalie mit progressiven Komponenten weiter zu evaluieren. Die Thematik der gliären Veränderungen und Transmitteralterationen bei Schizophrenen, die zahlreich diskutiert und auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind so weitreichend und vielfältig, dass neue Studien ohne Zweifel einen wichtigen Zuwachs an Informationen bringen können und zukünftig ebenso wie derzeit im Fokus der Forschung stehen sollten. Die Beteiligung bestimmter Hirnareale an neuropathologischen Alterationen bei schizophrenen Patienten kann im limbischen System, frontal und temporal als gesichert angenommen werden. Dennoch muss die neuronale Verschaltung bzw. der Einfluss der Veränderungen eines Gebietes auf eine andere Hirnregion noch genau erforscht werden, da sich hieraus ein konkreteres Verständnis der Pathophysiologie schizophrener Erkrankungen ergeben wird.

5 Zusammenfassung

Die Dysfunktion der glutamatergen Neurotransmission wird als eine bedeutsame pathophysiologische Komponente der schizophrenen Erkrankung angesehen. Dabei spielt die Glutaminsynthetase im Glutamatstoffwechsel eine wesentliche Rolle, sodass der Rückschluss auf eine veränderte Enzymexpression bei schizophren Erkrankten zulässig ist.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Expression der Glutaminsynthetase in Astrozyten im dorsolateralen Präfrontalkortex, anterioren cingulären Kortex und Orbitofrontalkortex mikroskopisch mittels immunhistochemischer Färbung schichtenspezifisch untersucht. Für die Analyse wurden 14 Gehirne von schizophrenen Patienten und 15 Gehirne gesunder Kontrollpersonen verwendet.

Die statistische Auswertung zeigte bei schizophrenen Erkrankten gegenüber gesunden Vergleichsfällen im dorsolateralen Präfrontalkortex eine signifikante Dichteminderung der Glutaminsynthetase exprimierenden Astrozyten beidseits in den Schichten I-III, sowie gleichgerichtete Trends in den Schichten I-III der übrigen untersuchten Regionen. Bei den nichtsuizidalen Schizophrenen konnten gegenüber gesunden Vergleichsfällen präfrontal beidseits sowie orbitofrontal linksseitig in den Schichten I-III signifikante sowie in den übrigen Schichten I-III sonstiger untersuchter Areale tendenzielle Dichteminderungen festgestellt werden.

Bei den nichtsuizidalen schizophrenen Erkrankten konnten im Vergleich zu suizidalen Schizophrenen signifikante Dichteminderungen orbitofrontal linkshemisphäriell in den Schichten I-VI sowie ein gleichgerichteter Trend in allen Schichten der übrigen untersuchten Areale eruiert werden. Beim Vergleich suizidaler Schizophrener und gesunder Kontrollen ergaben sich weder Trends noch Signifikanzen.

Die differierenden Ergebnisse bezüglich der Trennung nach Suizidalität bei den schizophrenen Patienten stellen die gesonderten pathologischen Vorgänge während eines Suizids bzw. einer vorangehenden schizophrenen Psychose mit einer möglichen Inflammationsreaktion heraus und machen deutlich, dass auch zukünftig eine getrennte Betrachtung sinnvoll ist.

Auf Grund der erhobenen Daten und der damit unterstützten derzeitigen Forschungslage ist es denkbar, dass die schizophrene Erkrankung mit einem Verlust an Astrozyten einhergeht, wodurch die Kapazität der Enzymexpression und damit der glutamatergen Transmission begrenzt wird und so die gezeigte Verminderung der Glutaminsynthetase-exprimierenden Astrozyten bewirkt werden könnte.

6 Literaturverzeichnis

1. Hoff P. Eugen Bleuler's Concept of Schizophrenia and Its Relevance to Present-Day Psychiatry. *Neuropsychobiology* 2012;66(1):6–13.
2. Dilling H. Internationale Klassifikation psychischer Störungen: ICD-10 Kapitel V (F) klinisch-diagnostische Leitlinien. 8th ed. Bern: Huber; 2011.
3. Sass H. Diagnostische Kriterien des diagnostischen und statistischen Manuals psychologischer Störungen DSM-IV-TR. Göttingen [u.a.]: Hogrefe; 2003.
4. Tölle R, Windgassen K. Springer-Lehrbuch. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2006.
5. Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 2002;71(4):877–892.
6. Brisch R, Bernstein H, Krell D, Dobrowolny H, Bielau H, Steiner J et al. Dopamine-glutamate abnormalities in the frontal cortex associated with the catechol-O-methyltransferase (COMT) in schizophrenia. *Brain Res.* 2009;1269:166–175.
7. O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V et al. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat. Genet.* 2008;40(9):1053–1055.
8. Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, Andreassen OA, Cichon S, Rujescu D et al. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 2009.
9. Ebert D, Loew T. Psychiatrie systematisch. 6th ed. Bremen [u.a.]: UNI-MED-Verl; 2005.
10. Kalkman HO. Circumstantial evidence for a role of glutamine-synthetase in suicide. *Medical Hypotheses* 2011;76(6):905–907.
11. Alcaro A, Huber R, Panksepp J. Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. *Brain Res Rev* 2007;56(2):283–321.
12. Braun K, Bogerts B. Erfahrungsgesteuerte neuronale Plastizität. Bedeutung für Pathogenese und Therapie psychischer Erkrankungen. *Nervenarzt* 2001;72(1):3–10.
13. Baroncelli L, Braschi C, Spolidoro M, Begenisic T, Maffei L, Sale A. Brain Plasticity and Disease: A Matter of Inhibition. *Neural Plasticity* 2011;2011:1–11.
14. Möller H. Psychiatrie und Psychotherapie: 235 Tabellen ; [mit Patientengesprächen auf Video-CD-ROM. 3rd ed. Stuttgart: Thieme; 2005.
15. Falkai P, Honer WG, David S, Bogerts B, Majtenyi C, Bayer TA. No evidence for astrogliosis in brains of schizophrenic patients. A post-mortem study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1999;25(1):48–53.
16. Johnstone EC, Crow TJ, Frith CD, Husband J, Kreel L. Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet* 1976;2(7992):924–926.

17. Meduri M, Bramanti P, Ielitto G, Favaloro A, Milardi D, Cutroneo G et al. Morphometrical and morphological analysis of lateral ventricles in schizophrenia patients versus healthy controls. *Psychiatry Res* 2010;183(1):52–58.
18. Mehler C, Warnke A. Structural brain abnormalities specific to childhood-onset schizophrenia identified by neuroimaging techniques. *J Neural Transm* 2002;109(2):219–234.
19. Balla P, Frecska E. Posztmortem vizsgálatok eredményei a szkizofrénia kutatásban. *Neuropsychopharmacol Hung* 2011;13(4):219–227.
20. Gluck MR, Thomas RG, Davis KL, Haroutunian V. Implications for altered glutamate and GABA metabolism in the dorsolateral prefrontal cortex of aged schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 2002;159(7):1165–1173.
21. Hashimoto T, Bazmi HH, Mirnics K, Wu Q, Sampson AR, Lewis DA. Conserved regional patterns of GABA-related transcript expression in the neocortex of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2008;165(4):479–489.
22. Heckers S, Rauch SL, Goff D, Savage CR, Schacter DL, Fischman AJ et al. Impaired recruitment of the hippocampus during conscious recollection in schizophrenia. *Nat. Neurosci.* 1998;1(4):318–323.
23. Williams MR, Hampton T, Pearce RK, Hirsch SR, Ansorge O, Thom M et al. Astrocyte decrease in the subgenual cingulate and callosal genu in schizophrenia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 2012.
24. Bernstein H, Steiner J, Bogerts B. Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy. *Expert Rev Neurother* 2009;9(7):1059–1071.
25. Steiner J, Bielau H, Brisch R, Danos P, Ullrich O, Mawrin C et al. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res* 2008;42(2):151–157.
26. van Haren NEM, Schnack HG, Cahn W, van den Heuvel MP, Lepage C, Collins L et al. Changes in cortical thickness during the course of illness in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 2011;68(9):871–880.
27. Northoff G, Waters H, Mooren I, Schlüter U, Diekmann S, Falkai P et al. Cortical sulcal enlargement in catatonic schizophrenia: a planimetric CT study. *Psychiatry Res* 1999;91(1):45–54.
28. Koolschijn PCMP, van Haren NEM, Cahn W, Schnack HG, Janssen J, Klumpers F et al. Hippocampal volume change in schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2010;71(6):737–744.
29. Kovalenko S, Bergmann A, Schneider-Axmann T, Ovary I, Majtenyi K, Havas L et al. Regio entorhinalis in schizophrenia: more evidence for migrational disturbances and suggestions for a new biological hypothesis. *Pharmacopsychiatry* 2003;36 Suppl 3:S158-61.
30. Senitz D, Winkelmann E. Über morphologische Befunde in der orbitofrontalen Rinde bei Menschen mit schizophrenen Psychosen. Eine Golgi- und eine elektronenoptische Studie. *Psychiatr Neurol Med Psychol (Leipz)* 1981;33(1):1–9.

31. Falkai P, Honer WG, Kasper T, Dustert S, Vogele K, Schneider-Axmann T et al. Disturbed frontal gyrification within families affected with schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2007;41(10):805–813.
32. Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E. A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron* 2010;65(5):585–596.
33. Laruelle M, Kegeles LS, Abi-Dargham A. Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;1003:138–158.
34. Toda M, Abi-Dargham A. Dopamine hypothesis of schizophrenia: making sense of it all. *Curr Psychiatry Rep* 2007;9(4):329–336.
35. Kumakura Y, Cumming P, Vernaleken I, Buchholz H, Siessmeier T, Heinz A et al. Elevated [18F]fluorodopamine turnover in brain of patients with schizophrenia: an [18F]fluorodopa/positron emission tomography study. *J. Neurosci.* 2007;27(30):8080–8087.
36. Gründer G, Vernaleken I, Müller MJ, Davids E, Heydari N, Buchholz H et al. Subchronic haloperidol downregulates dopamine synthesis capacity in the brain of schizophrenic patients in vivo. *Neuropsychopharmacology* 2003;28(4):787–794.
37. Heinz A, Braus DF, Romero B, Gallinat J, Puls I, Juckel G et al. Genetische und medikamentöse Einflüsse auf die Funktion des präfrontalen Kortex bei schizophrenen Patienten. *Nervenarzt* 2004;75(9):845–856.
38. Heinz A, Saunders RC, Kolachana BS, Jones DW, Gorey JG, Bachevalier J et al. Striatal dopamine receptors and transporters in monkeys with neonatal temporal limbic damage. *Synapse* 1999;32(2):71–79.
39. Bruneau EG, McCullumsmith RE, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Increased expression of glutaminase and glutamine synthetase mRNA in the thalamus in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2005;75(1):27–34.
40. Burbaeva GS, Boksha IS, Turishcheva MS, Vorobyeva EA, Savushkina OK, Tereshkina EB. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2003;27(4):675–680.
41. Javitt DC. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 2010;47(1):4–16.
42. Krystal JH, Anand A, Moghaddam B. Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 2002;59(7):663–664.
43. Javitt DC, Zukin SR, Heresco-Levy U, Umbricht D. Has an Angel Shown the Way? Etiological and Therapeutic Implications of the PCP/NMDA Model of Schizophrenia. *Schizophr Bull* 2012;38(5):958–966.
44. Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 1995;52(12):998–1007.
45. Coyle JT, Tsai G. The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)* 2004;174(1):32–38.

46. Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, Jackson KA, Andreev BV et al. Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat. Med.* 2007;13(9):1102–1107.
47. Tansey FA, Farooq M, Cammer W. Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. *J. Neurochem* 1991;56(1):266–272.
48. Martins-de-Souza D, Schmitt A, Röder R, Lebar M, Schneider-Axmann T, Falkai P et al. Sex-specific proteome differences in the anterior cingulate cortex of schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 2010;44(14):989–991.
49. Steffek AE, McCullumsmith RE, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2008;103(1-3):71–82.
50. Lacoste L, Chaudhary KD, Lapointe J. Derepression of the glutamine synthetase in neuroblastoma cells at low concentrations of glutamine. *J. Neurochem* 1982;39(1):78–85.
51. Ghose S, Weickert CS, Colvin SM, Coyle JT, Herman MM, Hyde TM et al. Glutamate carboxypeptidase II gene expression in the human frontal and temporal lobe in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2004;29(1):117–125.
52. Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2001;25(1):1–27.
53. Volk D, Austin M, Pierri J, Sampson A, Lewis D. GABA transporter-1 mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia: decreased expression in a subset of neurons. *Am J Psychiatry* 2001;158(2):256–265.
54. Schreiber S, Bernstein H, Fendrich R, Stauch R, Ketzler B, Dobrowolny H et al. Increased density of GAD65/67 immunoreactive neurons in the posterior subiculum and parahippocampal gyrus in treated patients with chronic schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry* 2011;12(1):57–65.
55. Gouzoulis-Mayfrank E, Thelen B, Habermeyer E, Kunert HJ, Kovar KA, Lindenblatt H et al. Psychopathological, neuroendocrine and autonomic effects of 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE), psilocybin and d-methamphetamine in healthy volunteers. Results of an experimental double-blind placebo-controlled study. *Psychopharmacology (Berl.)* 1999;142(1):41–50.
56. Lindholm Carlstrom E, Saetre P, Rosengren A, Thygesen JH, Djurovic S, Melle I et al. Association between a genetic variant in the serotonin transporter gene (SLC6A4) and suicidal behavior in patients with schizophrenia. *Behavioral and brain functions BBF* 2012;8(1):24.
57. O'Brien SM, Scully P, Dinan TG. Increased tumor necrosis factor-alpha concentrations with interleukin-4 concentrations in exacerbations of schizophrenia. *Psychiatry Res* 2008;160(3):256–262.
58. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol. Psychiatry* 2008;63(8):801–808.

59. Hagberg H, Gressens P, Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: Implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Annals of neurology* 2011.
60. Katsel P, Byne W, Roussos P, Tan W, Siever L, Haroutunian V. Astrocyte and glutamate markers in the superficial, deep, and white matter layers of the anterior cingulate gyrus in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2011;36(6):1171–1177.
61. Bernstein HG, Baumann B, Danos P, Diekmann S, Bogerts B, Gundelfinger ED et al. Regional and cellular distribution of neural visinin-like protein immunoreactivities (VILIP-1 and VILIP-3) in human brain. *J. Neurocytol.* 1999;28(8):655–662.
62. Mai JK, Assheuer JK, Paxinos G. *Atlas of the human brain*. 2nd ed. Boston: Elsevier Academic Press; 2003.
63. Mai JK, Paxinos G, Voss T. *Atlas of the human brain*. 3rd ed. Amsterdam usw: Elsevier Acad. Press; 2008.
64. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*. 2nd ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2006.
65. Tsai G, Passani LA, Slusher BS, Carter R, Baer L, Kleinman JE et al. Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. *Arch. Gen. Psychiatry* 1995;52(10):829–836.
66. Arif M, Chikuma T, Ahmed MM, Yoshida S, Kato T. Suppressive effect of clozapine but not haloperidol on the increases of neuropeptide-degrading enzymes and glial cells in MK-801-treated rat brain regions. *Neurosci. Res* 2007;57(2):248–258.
67. Rimol LM, Nesvåg R, Hagler DJ, Bergmann O, Fennema-Notestine C, Hartberg CB et al. Cortical volume, surface area, and thickness in schizophrenia and bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* 2012;71(6):552–560.
68. Glahn DC, Laird AR, Ellison-Wright I, Thelen SM, Robinson JL, Lancaster JL et al. Meta-analysis of gray matter anomalies in schizophrenia: application of anatomic likelihood estimation and network analysis. *Biol. Psychiatry* 2008;64(9):774–781.
69. Fornito A, Yücel M, Patti J, Wood SJ, Pantelis C. Mapping grey matter reductions in schizophrenia: an anatomical likelihood estimation analysis of voxel-based morphometry studies. *Schizophr. Res* 2009;108(1-3):104–113.
70. Peri L de, Crescini A, Deste G, Fusar-Poli P, Sacchetti E, Vita A. Brain Structural Abnormalities at the Onset of Schizophrenia and Bipolar Disorder: A Meta-analysis of Controlled Magnetic Resonance Imaging Studies. *Curr. Pharm. Des* 2012;18(4):486–494.
71. Garey L. When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *J. Anat* 2010;217(4):324–333.
72. Uehara-Aoyama K, Nakamura M, Asami T, Yoshida T, Hayano F, Roppongi T et al. Sexually dimorphic distribution of orbitofrontal sulcogyral pattern in schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci* 2011;65(5):483–489.
73. Bogerts B. The neuropathology of schizophrenic diseases: historical aspects and present knowledge. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1999;249 Suppl 4:2–13.

74. Tseng KY, Lewis BL, Hashimoto T, Sesack SR, Kloc M, Lewis DA et al. A neonatal ventral hippocampal lesion causes functional deficits in adult prefrontal cortical interneurons. *J. Neurosci.* 2008;28(48):12691–12699.
75. Papiol S, Begemann M, Rosenberger A, Friedrichs H, Ribbe K, Grube S et al. A phenotype-based genetic association study reveals the contribution of neuregulin1 gene variants to age of onset and positive symptom severity in schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet* 2011;156B(3):340–345.
76. Puckett RE, Lubin FD. Epigenetic mechanisms in experience-driven memory formation and behavior. *Epigenomics* 2011;3(5):649–664.
77. Benes FM, McSparren J, Bird ED, SanGiovanni JP, Vincent SL. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch. Gen. Psychiatry* 1991;48(11):996–1001.
78. Benes FM. Model generation and testing to probe neural circuitry in the cingulate cortex of postmortem schizophrenic brain. *Schizophr Bull* 1998;24(2):219–230.
79. Sodhi MS, Simmons M, McCullumsmith R, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Glutamatergic gene expression is specifically reduced in thalamocortical projecting relay neurons in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 2011;70(7):646–654.
80. Wood J, Kim Y, Moghaddam B. Disruption of prefrontal cortex large scale neuronal activity by different classes of psychotomimetic drugs. *J. Neurosci.* 2012;32(9):3022–3031.
81. Farkas N, Lendeckel U, Dobrowolny H, Funke S, Steiner J, Keilhoff G et al. Reduced density of ADAM 12-immunoreactive oligodendrocytes in the anterior cingulate white matter of patients with schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry* 2010;11(3):556–566.
82. Greene R. Circuit analysis of NMDAR hypofunction in the hippocampus, in vitro, and psychosis of schizophrenia. *Hippocampus* 2001;11(5):569–577.
83. Schmitt A, Hasan A, Gruber O, Falkai P. Schizophrenia as a disorder of disconnectivity. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2011;261 Suppl 2:S150-4.
84. Matthias Rothermundt JNAKENG SJ. Glial Activation in Schizophrenia- Evidence from Clinical Studies. In: *European Psychiatric Review*:14–16.
85. Rossi A, Bustini M, Prosperini P, Marinangeli MG, Splendiani A, Daneluzzo E et al. Neuromorphological abnormalities in schizophrenic patients with good and poor outcome. *Acta Psychiatr Scand* 2000;101(2):161–166.
86. Mitelman SA, Canfield EL, Brickman AM, Shihabuddin L, Hazlett EA, Buchsbaum MS. Progressive ventricular expansion in chronic poor-outcome schizophrenia. *Cogn Behav Neurol* 2010;23(2):85–88.
87. Staal WG, Hulshoff Pol HE, Kahn RS. Outcome of schizophrenia in relation to brain abnormalities. *Schizophr Bull* 1999;25(2):337–348.
88. Falkai P, Schneider T, Greve B, Klieser E, Bogerts B. Reduced frontal and occipital lobe asymmetry on the CT-scans of schizophrenic patients. Its specificity and clinical significance. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 1995;99(1-3):63–77.

89. Friedman L, Lys C, Schulz SC. The relationship of structural brain imaging parameters to antipsychotic treatment response: a review. *J Psychiatry Neurosci* 1992;17(2):42–54.
90. Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 1980;20(3):379–382.
91. Ritter LM, Unis AS, Meador-Woodruff JH. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor expression in human fetal brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2001;127(2):123–133.
92. Bauer M, Kasper S, Willeit M. Is dopamine neurotransmission altered in prodromal schizophrenia? A review of the evidence. *Current pharmaceutical design* 2012.
93. Wobrock T, Schneider M, Kadovic D, Schneider-Axmann T, Ecker UKH, Retz W et al. Reduced cortical inhibition in first-episode schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2008;105(1-3):252–261.
94. Meltzer HY, Massey BW, Horiguchi M. Serotonin Receptors as Targets for Drugs Useful to Treat Psychosis and Cognitive Impairment in Schizophrenia. *Current pharmaceutical biotechnology* 2012.
95. Bernstein H, Tausch A, Wagner R, Steiner J, Seeleke P, Walter M et al. Disruption of glutamate-glutamine-GABA cycle significantly impacts on suicidal behaviour: survey of the literature and own findings on glutamine synthetase. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013;12(7):900–913.
96. Fillman SG, Cloonan N, Catts VS, Miller LC, Wong J, McCrossin T et al. Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 2012.
97. Gruber AJ, Calhoun GG, Shusterman I, Schoenbaum G, Roesch MR, O'Donnell P. More is less: a disinhibited prefrontal cortex impairs cognitive flexibility. *J. Neurosci.* 2010;30(50):17102–17110.
98. Bartolomeis A de, Sarappa C, Magara S, Iasevoli F. Targeting glutamate system for novel antipsychotic approaches: Relevance for residual psychotic symptoms and treatment resistant schizophrenia. *European journal of pharmacology* 2012.
99. Moghaddam B, Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology* 2012;37(1):4–15.
100. Burbaeva GS, Boksha IS, Tereshkina EB, Savushkina OK, Turishcheva MS, Starodubtseva LI et al. Effect of olanzapine treatment on platelet glutamine synthetase-like protein and glutamate dehydrogenase immunoreactivity in schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry* 2006;7(2):75–81.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen

- Tab. 1: Varianzanalyse konfundierender Variablen.
- Tab. 2: Varianzanalyse ANOVA.
- Tab. 3: t-Test zur statistischen Auswertung des Diagnosekriteriums Schizophrenie und gesunde Kontrollen.
- Tab. 4: t-Test zur statistischen Auswertung des Vergleichs zwischen (1) und Kontrollen; (2) suizidalen Schizophrenen und Kontrollen; (3) suizidalen und nichtsuizidalen Schizophrenen.
- Tab. 5: Korrelationsanalyse nach Pearson der konfundierenden Variablen.

Abbildungen

- Abb. 1: Darstellung des Glutamatstoffwechsels im Gehirn, übernommen aus³⁹.
- Abb. 2: Darstellung der Schnittebene der untersuchten Gehirne⁶².
- Abb. 3: Genaue Lokalisation der untersuchten Areale. Verwendet aus „Atlas of the human Brain“⁶³.
- Abb. 4: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x. Anteriorer Gyrus cinguli, Lamina I, Membrana limitans Gliae.
- Abb. 5: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x. Orbitofrontalkortex, Lamina I.
- Abb. 6: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x. Orbitofrontalkortex, Lamina II.
- Abb. 7: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x. Lamina IV.
- Abb. 8: Fotografie eines untersuchten Gehirns. Vergr. 200x. Weiße Substanz.
- Abb. 9: Darstellung der Intrarater Reliabilität.
- Abb. 10: Darstellung der Interrater Reliabilität.
- Abb. 11: Numerische Zelldichten bei Schizophrenen und gesunden Kontrollen im dorsolateralen Präfrontalkortex, anterioren Gyrus cinguli und Orbitofrontalkortex unterteilt in die beiden Hemisphären (re, li) und die kortikalen Schichten I, II und III sowie IV, V und VI.
- Abb. 12: Numerische Zelldichten bei suizidalen und nichtsuizidalen Schizophrenen sowie der gesunden Kontrollen im dorsolateralen Präfrontalkortex, anterioren Gyrus cinguli und Orbitofrontalkortex unterteilt in die beiden Hemisphären (re, li) und die kortikalen Schichten I, II und III sowie IV, V und VI.

8 Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle ganz besonders bei Herrn Professor Dr. med. B. Bogerts, dem Klinikdirektor für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatische Medizin, für das entgegengesetzte Vertrauen bei Vergabe des Dissertationsthemas sowie für konstruktive Kritik während der Zeit der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. rer. nat. H.-G. Bernstein danke ich inständig für die unterstützende und tatkräftige Betreuung, welche mich und meine Arbeit richtungsweisend durch zahlreiche Diskussionen und Hilfestellung bei der Auswertung der erhobenen Daten beeinflusst hat.

Von ganzem Herzen danke ich auch Herrn Dipl.-Ing. H. Dobrowolny, der immer offen für statistische Fragen war und stets engagiert mit der statistischen Aufarbeitung der Daten der Erstellung der Arbeit geholfen hat.

Herzlich danke ich abschließend Frau Dipl.-Ing. R. Stauch und ihrem Team, mit deren Hilfe ein zügiges Erheben der Daten möglich war und die mir hilfsbereit und geduldig die Arbeitsschritte der Aufbereitung des Materials bis hin zum fertigen immunhistochemisch gefärbtem Präparat näher gebracht haben.

9 Erklärung

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

„Immunhistochemische Analyse der Glutaminsynthetase-Expression in Astrozyten im dorsolateralen Präfrontalkortex, orbitofrontalen Kortex und anterioren Gyrus cinguli bei Schizophrenen und psychisch gesunden Vergleichsfällen“

in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie mit Unterstützung durch Prof. Bogerts und Prof. Bernstein ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation 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 01.11.2014

Anne Tausch

10 Bildungsweg

Persönliches

Name	Anne Tausch
Geburtstag	16.07.1989 in Magdeburg
Adresse	Adolfstraße 7, 39122 Magdeburg, Sachsen-Anhalt/Deutschland
E-Mail	post.anne@gmail.com

Schullaufbahn

1996 – 2000	Grundschule in Niegripp
2000 – 2002	Sportsekundarschule Hans Schellheimer in Magdeburg
2002 – 2008	Sportgymnasium in Magdeburg

Studium

2008 – 2014	Studium der Humanmedizin Otto-von-Guericke Universität Magdeburg 09/2010 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 11/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
-------------	---

Berufliche Laufbahn

ab 12/2014	Assistenzärztin in der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten Diabetologie und Endokrinologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
------------	---

Publikationen	Bernstein, H.; Tausch, A.; Wagner, R.; Steiner, J.; Seeleke, P.; Walter, M. et al. (2013): Disruption of glutamate-glutamine-GABA cycle significantly impacts on suicidal behaviour: survey of the literature and own findings on glutamine synthetase. <i>CNS Neurol Disord Drug Targets</i> 12 (7), S. 900–913.
----------------------	---