

Polarized Light Imaging (PLI) des menschlichen Hirnstammes

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Jörn Heepe

geboren am 13. Mai 1977

in Haan / Rheinland

Gutachter

1. PD Dr. med. habil. H. Axer, Jena
2. PD Dr. med. habil. J. Böttcher, Gera
3. Prof. Dr. med. D. Graf von Keyserlingk, Aachen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.07.2010

Für meine Eltern Renate und Rolf Heepe

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
µm ³	Kubikmikrometer
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
a	Jahr
A	anterior
A.	Area
Abb.	Abbildung
ACPC-Linie	Anteriore Commissur Posteriore Commissur Linie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCT	Craniale Computertomografie
cm	Centimeter
cos	Cosinus
CT	Computertomografie
DT-MRI	Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging
etc.	et cetera
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomografie
FOSS	Free Open Source Software
I	inferior
L	links

lat.	lateinisch
MB	Megabyte
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
OP	Operation
P	posterior
PC	Personal Computer
PET	Positronen – Emissions – Tomografie
PLI	Polarized Light Imaging
R	rechts
RGB	rot – grün – blau
RWTH Aachen	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
S	superior
sin	Sinus
T	Tesla
W	Watt
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Inhaltsverzeichnis	6
1 Zusammenfassung	9
2 Einleitung.....	11
2.1 Atlanten des Gehirns	11
2.2 Grundlagen der Atlanten	11
2.3 Charakteristika von Atlanten	15
2.4 Anatomische Variabilität	17
2.5 Probabilistischer Atlas	18
2.6 Deterministische Atlanten	18
2.7 Beispiel eines multimodalen Atlas	19
2.8 Schnittbild basierte Atlanten	19
2.9 Auf histologischen Schnitten basierende Atlanten	20
2.10 Diffusionstensorbildgebung: DT-MRI – Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging	21
3 Ziele der Arbeit.....	22
4 Material und Methoden.....	24
4.1 Prinzip der Polarisation	26
4.2 Brechungsindex	27
4.3 Optisch isotrope und anisotrope Medien	28
4.4 Doppelbrechung	28
4.4.1 Doppelbrechung von histologischen Schnitten	29

4.4.2	Form-Doppelbrechung	31
4.4.3	Doppelbrechung der weißen Hirnsubstanz	32
4.5	Methoden der Polarized Light Imaging (PLI)	34
4.5.1	Gekreuzte Polarisatoren	34
4.5.2	Rotierende, gekreuzte Polarisatoren	35
4.5.3	Rotierende, gekreuzte Polarisatoren mit Viertelwellenplatte	36
4.6	Eingesetzte Polarisations-Apparatur	38
4.7	Kalibrierung mittels definiert geschnittenem Nervus opticus	40
4.8	Analyse von Polarisationssequenzen	41
4.9	Registrierung der Faserorientierungskarten	43
4.10	Manuelle Segmentierung der Pyramidenbahn	43
5	Ergebnisse	44
5.1	Digitalisierung	44
5.2	Faserorientierungskarten	45
5.3	Registrierung	50
5.4	Segmentierungskarten	51
5.5	Dreidimensionaler Datensatz / Volumendatensatz	53
5.6	Volumina der Pyramidenbahn	56
6	Diskussion	59
6.1	DT-MRI und PLI	59
6.2	Volumina	66
6.3	Alternativmethoden	68
6.4	Ausblick	69

7	Schlussfolgerung.....	76
8	Literaturverzeichnis	78
9	Anhang.....	85
9.1	Veröffentlichungen	85
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	86
9.3	Lebenslauf	87
9.4	Danksagung	88

1 Zusammenfassung

Diese Dissertation ist die Grundlage zur Erstellung eines probabilistischen Faseratlases des menschlichen Hirnstammes. Hierzu wurden 18 menschliche Hirnstämme seriell geschnitten und digitalisiert. Letztere Hirnschnitte wurden analysiert und dreidimensional rekonstruiert. Mit der Methode der Polarized Light Imaging (PLI) kann in jedem Punkt einer betrachteten Faserbahn des Präparates die Faserorientierung errechnet werden und gleichzeitig größere Fasersysteme – wie hier die Pyramidenbahn – lokalisiert werden. Die so entstandenen Datensätze können miteinander verglichen werden, und somit besteht die Möglichkeit, Aussagen über Rechts – Links – Seitenasymmetrien (bezüglich des Volumens der einzelnen Faserbahnen) oder geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen Gehirnen von Männern und Frauen zu treffen. Die Zusammenfassung der 18 Modelle soll im Verlauf einen anatomischen, probabilistischen Faserorientierungsatlas liefern.

Aus 18 in formalinhaltiger Fixierlösung konservierten menschlichen Gehirnen wurde der Hirnstamm präpariert und seriell geschnitten. Es ergaben sich 1000 – 1500 histologische Schnitte pro Hirnstamm, die anschließend mithilfe einer eigens entwickelten Polarisationsoptik, einer Digitalkamera und eines PCs digitalisiert wurden.

Die histologischen Schnitte wurden zwischen gekreuzten Polarisatoren angeordnet und mit einer Lichtquelle beleuchtet. Die Transmissionsachsen der Polarisationsfolien waren um 90° zueinander verdreht, so dass im Ausgangszustand kein Licht durch den Analysator (zur Kamera) drang. Durch die optischen Eigenschaften der Faserbahnen wurde die Polarisationsrichtung des durchtretenden Lichtes gedreht. Hierdurch wurde am Analysator eine Lichtintensität messbar. Die Rotation der Polarisatoren ergab eine periodische Abhängigkeit der gemessenen Lichtintensität von der Faserrichtung im Präparat, die sich für jedes einzelne Pixel bestimmen ließ.

Da eine Korrelation zwischen Orientierungswinkel der Faserbahnen und gemessener Lichtintensität besteht, konnten mittels einer selbst entwickelten Software Faserorientierungskarten für jeden gemessenen Schnitt errechnet werden, die eine quantitative Bestimmung der Orientierungswinkel zulassen. Die seriellen

Schnittkarten wurden im Folgeschritt dreidimensional zueinander ausgerichtet (Registrierung).

Anhand der Faserorientierungen ließen sich in jedem Schnitt spezifische Faserbündel segmentieren. Dies wurde aufgrund der dazu notwendigen neuroanatomischen Expertise manuell durchgeführt und als eigenständiger Datensatz gespeichert, aus dem dann die dreidimensionale Rekonstruktion der Faserbahnen erfolgte.

Dieses Projekt soll unter anderem in der Validierung von DT-MRI-Datensätzen (Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging), also MRT-Untersuchungen von Faserorientierungen im lebenden Gehirn Anwendung finden.

Der fertige Atlas soll als Wissensbasis und als Ergänzung zu anderen Atlanten fungieren, die bislang keine reliable Darstellung der Faserbündel garantieren. Aufgrund der Digitalisierung von 18 Gehirnen kann der Atlas auch als Normalisierungsdatensatz von Populationsdaten genutzt werden (Unterschiede männlich / weiblich, rechts / links, Volumen der Pyramidenbahn und anderer Strukturen, etc.)

Darüberhinaus kommen Gehirnstrukturen in ihrer Dreidimensionalität zur Darstellung, und es können ihre räumlichen Verhältnisse zueinander bestimmt werden. Diese Möglichkeiten könnten in der Stereotaxie, der Neuronavigation, der Minimal – invasiven – Chirurgie und in der OP-Vorbereitung Anwendung finden.

Die bislang sieben segmentierten und dreidimensional rekonstruierten Datensätze liefern erste Erkenntnisse. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Hirnstrukturen können bislang nicht signifikant nachvollzogen werden und auch keine Unterschiede zwischen linker und rechter Gehirnhälfte. Deutlich wurde jedoch eine eindeutige Altersabhängigkeit der Pyramidenbahnvolumina.

In der Fortführung des Gesamtprojektes werden die restlichen elf Pyramidenbahnen und weitere große Faserstrukturen – Lemniscus medialis, Fasciculus longitudinalis medialis, Pedunculi cerebelli, etc. – aber auch Kerngebiete und einzelne Hirnnerven in die Darstellung mit einbezogen.

Letztendlich ist auch eine Ausweitung der Methode auf das Großhirn und dessen Strukturen denkbar.

2 Einleitung

2.1 Atlanten des Gehirns

In den letzten Jahrzehnten hat insbesondere die Bildgebung des menschlichen Gehirns eine herausragende Bedeutung in Forschung und Klinik erlangt. Bei der Darstellung und Visualisierung des Gehirns in einem Atlas werden verschiedene Ziele verfolgt. Zum einen dienen die Atlanten als Wissensbasis bei der Abbildung der Morphologie des Hirns und seinen spezifischen Strukturen. Zum anderen ist ein Atlas die Grundlage bei der Visualisierung von Hirnstrukturen in ihrer dreidimensionalen Gestalt und den räumlichen ggf. auch zeitlichen Verhältnissen zueinander. Dies spielt aus klinischer Sicht eine herausragende Rolle bei Stereotaxie, im Rahmen der Minimal – invasiven – Chirurgie, der OP-Planung bei neurochirurgischen Operationen sowie der Neuronavigation. Des Weiteren kann eine Abbildung von Morphologie und Funktion erfolgen, eine Normalisierung von Populationsdaten (Unterschiede des Geschlechts, des Alters, der Spezies, etc.) sowie eine Detektion von Gesundheit und Krankheit. Letztendlich sind Koregistrierungen verschiedener Informationsquellen (MRT, fMRT, CCT, PET, etc.) und deren gegenseitige Validierung möglich.

2.2 Grundlagen der Atlanten

Die den in der Literatur vorhandenen Atlanten zugrunde liegende Informationsquelle bzw. Basis ist von ganz unterschiedlicher Natur. In den Anfängen der Kartierung von Gehirnen wurde anhand des histologischen Schichtmusters des Kortex die Rindenfeldgliederung nach Brodmann vorgenommen. Nach der regionalen Zytoarchitektur teilte Brodmann 1909 den Großhirnkortex in 52 Rindenfelder bzw. Areale ein, eine Nummerierung, die bis heute international Bestand hat (Brodmann 1909). Brodmann wählte dabei die Reihenfolge seiner Untersuchungen als Nummerierung der Rindenareale basierend auf der Zytoarchitektur der Hirnrinde. Abbildung 1 zeigt die inzwischen 100 Jahre alte Darstellung, wobei die fehlenden Zahlen bzw. Felder nur beim Affen beschrieben wurden.

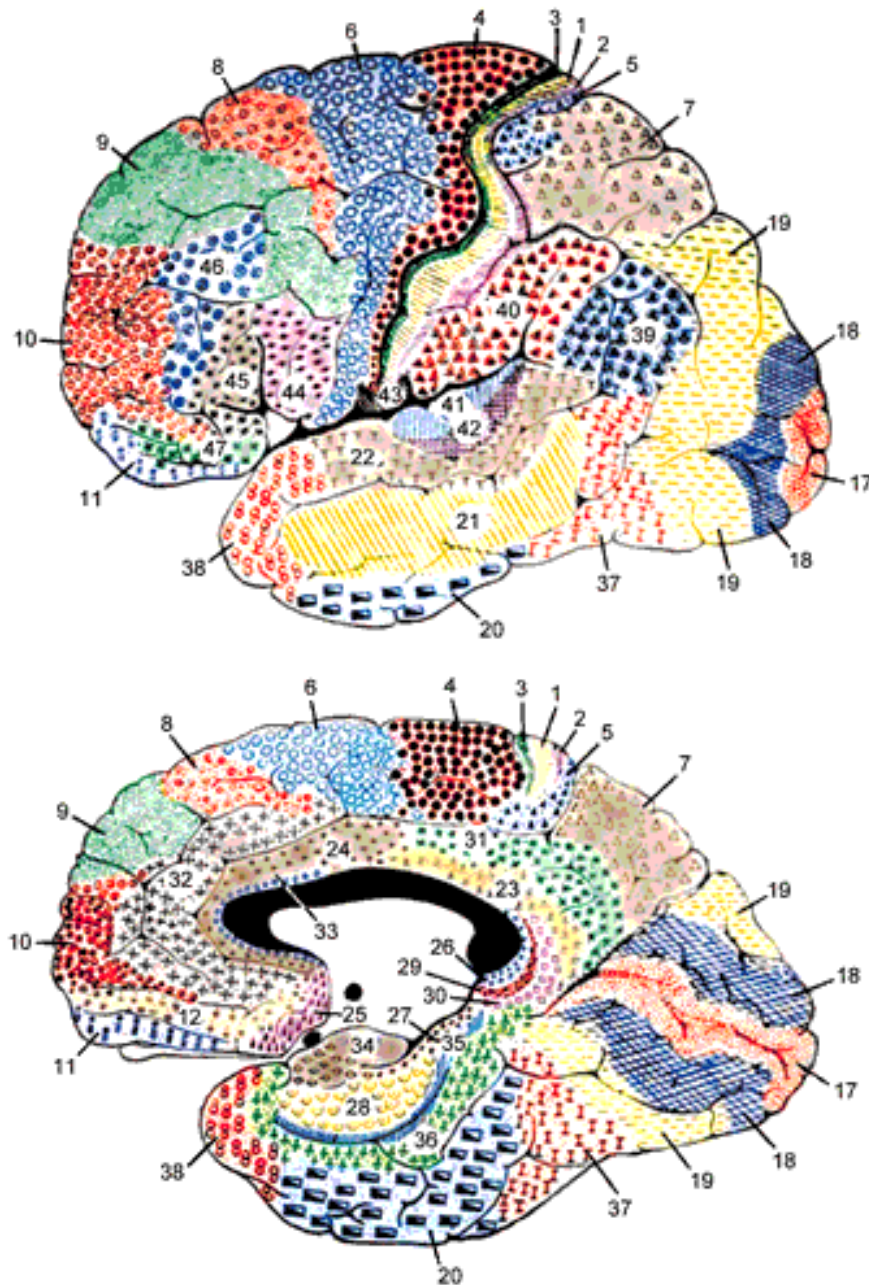


Abbildung 1:

Brodman Areale des Großhirnkortex: 1-A. (Area) postcentralis intermedia, 2-A. postcentralis caudalis, 3-A. postcentralis oralis, 4-A. gigantopyramidalis, 5-A. praeparietalis, 6-A. frontalis agranularis, 7-A. parietalis superior, 8-A. frontalis intermedia, 9-A. frontalis granularis, 10-A. frontopolaris, 11-A. praefrontalis, 12-A. praefrontalis, 17-A. striata, 18-A. parastriata, 19-A. peristriata, 20-A. temporalis inferior, 21-A. temporalis media, 22-A. temporalis superior, 23-A. cingularis posterior ventralis, 24-A. cingularis anterior ventralis, 25-A. subgenualis, 26-A. ectosplenialis, 28-A. entorhinalis, 29-A. retrolimbica granularis, 30-A. retrolimbica agranularis, 31-A. cingularis posterior dorsalis, 32-A. cingularis anterior dorsalis, 33-A. preagenualis, 34-A. entorhinalis dorsalis, 35-A. perirhinalis, 36-A. ectorhinalis, 37-A. occipitotemporalis, 38-A. temporopolaris, 39-A. angularis, 40-A. supramarginalis, 41-A. temporalis transversa anterior, 42-A. temporalis transversa posterior, 43-A. subcentralis, 44-A. opercularis, 45-A. triangularis, 46-A. frontalis media, 47-A. orbitalis, 48-A. retrosubicularis, 52-A. parainsularis (Areae 13, 14, 15, 16, 27, 49, 50, 51 werden nur beim Affen beschrieben) (Dubin 2009)

In einer anderen historischen Arbeit von 1907 bezieht sich der Autor auf kortikale Unterschiede, die er alleine mit dem „nackten Auge“ verifizieren konnte – „...I called attention to the fact that by means of the naked-eye examination of sections of the fresh brain it is possible to recognise the differences in thickness and texture of various cortical areas, and so to map out the exact extent of each of the regions.“ (Smith 1907) – und erstellte auf dieser makroskopischen Grundlage seine im Folgenden gezeigten Abbildungen (Abb. 2+3).

Weitere Atlanten gründen auf dreidimensionalen Schnittbildtechniken wie der Computertomografie und der Magnetresonanztomografie (Damasio 1995) anatomischen histologischen Proben (Talairach 1967, Talairach und Tournoux 1988, Ono et al. 1990), Rezeptorbindungsstellen (Geyer et al. 1997), Proteindichte oder mRNA-Aufteilungen.

Wieder andere Kartierungen stützen sich vermehrt auf die Funktion des Gehirns und basieren daher auf Untersuchungen mittels Positronen – Emissions – Tomografie (PET) (Minoshima et al. 1994), funktioneller Magnetresonanztomografie (fMRT) (Le Bihan 1996) oder Elektrophysiologie (Avoli et al. 1991).

Spezielle Atlanten beruhen auf neuronaler Konnektivität und Verschaltung (Maunsell und van Essen 1983) und einer Zusammenstellung verschiedener empirisch erworbener Erkenntnisse (Berger 1929, Brodmann 1909, Penfield und Boldrey 1937).

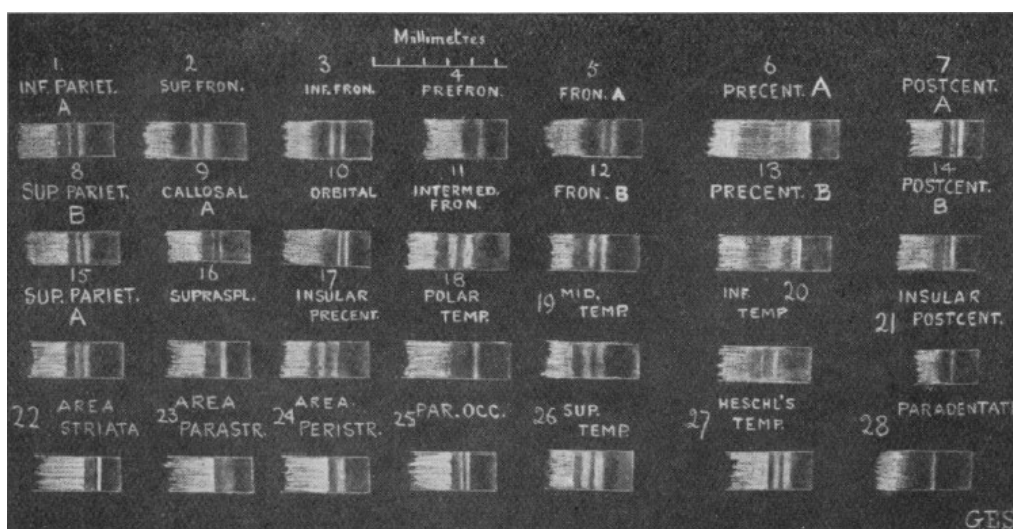


Abbildung 2:

Aufzeichnungen von Smith: Skizzierung des kortikalen Aufbaus (Smith 1907).

2.3 Charakteristika von Atlanten

Jeder der oben erwähnten Atlanten hat eine unterschiedliche räumliche Skalierung und Auflösung. Diese richtete sich nach dem jeweiligen Erkenntnisinteresse, welches mit der Gestaltung verfolgt wurde. Diese unterschiedlichen Sichtweisen erzeugen verschieden aufgebaute Atlanten, was die Vergleichbarkeit erschwert bzw. verhindert.

So beziehen sich die Atlanten mit Spezialisierung auf den Kortex zum Beispiel hauptsächlich auf eine Referenzachse, der sogenannten ACPC-Linie. Diese ist die gedachte Linie durch die **A**nteriore **C**ommissur und die **P**osteriore **C**ommissur. Der Mittelpunkt dieser Linie ist der Ursprung, die ACPC-Linie eine Achse in diesem Koordinatensystem. Mit diesen Definitionen ist jede weitere Ortsangabe als Summenvektor der einzelnen Raumebenen möglich. Das international anerkannte Referenzwerk für diese Überführung in ein Referenzsystem ist die Arbeit von Talairach (Talairach 1967, Talairach und Tournoux 1988). Mit dem Verfahren der Pneumoenzephalografie (Dandy 1918), welches eigentlich zur Interpretation des Hirnstammes und der Hirnventrikel entwickelt wurde, erstellte er ein stereotaktisches System, mit dem es Forschern aus verschiedenen Laboren möglich ist, ihre Arbeiten miteinander zu vergleichen (Talairach 1967).

Hirnstammatlanten hingegen beziehen sich nach ihrer anatomischen Achse primär auf die Achse nach Meynert, die der von den Großhirnhemisphären abweichenden Orientierung Rechnung trägt. Des Weiteren sind nach den anatomischen Landmarken weitere Bezugspunkte am Hirnstamm definiert, wie die folgende Abbildung veranschaulicht (Abb. 4).

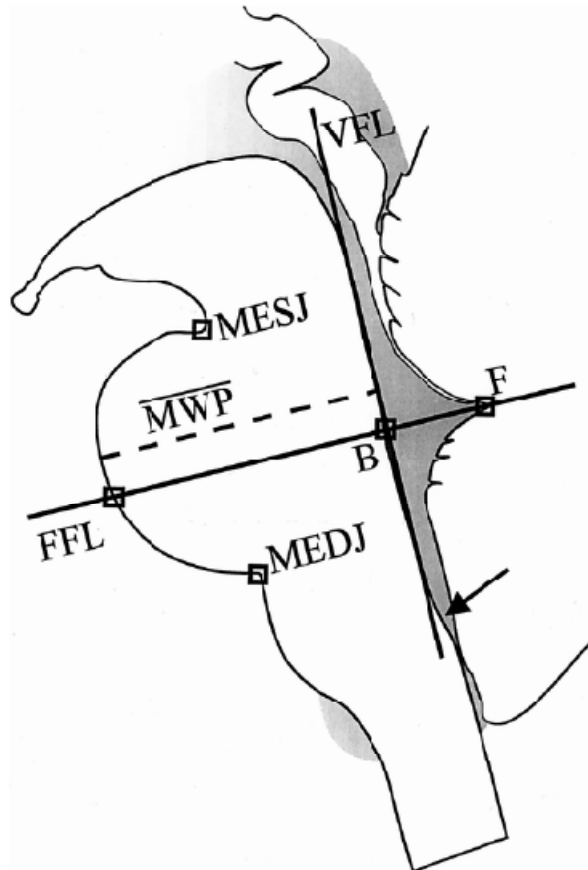


Abbildung 4:

Landmarken am Hirnstamm, schematische Darstellung eines midsagittalen Hirnstammschnittes. Der Pfeil zeigt die dorsale Einbuchtung nahe des Obex, B = origin of the fastigial (FFL/VFL) reference system; F = fastigium cerebelli; \overline{FB} = ventricular height; FFL = fastigial floor line, perpendicular to the VFL through the F; MEDJ = pontomedullary junction; MESJ = pontomesencephalic junction; \overline{MWP} = maximum width of the pons; VFL = ventricular floor line, midsagittal tangent to the rhomboid fossa (Niemann et al. 1999).

Durch die Festlegung des Koordinatensystems werden Vergleiche zwischen verschiedenen Atlanten mit dem gleichen Referenzsystem möglich vor allem jedoch der Abgleich bzw. die Beurteilung eines individuellen, untersuchten Gehirns mit dem Atlasgehirn.

Voraussetzung für diese Vergleichbarkeit ist die Digitalisierung der Daten. Erst durch die automatisierten Algorithmen der Registrierung und weiterer Werkzeuge zur Transformation lässt sich der zu untersuchende Datensatz in den gleichen Zusammenhang bringen wie die Referenz im Atlas.

Viele der vorhandenen Arbeiten haben ein einzelnes oder eine kleine Anzahl Gehirne als Grundlage für den Atlas. Diese dienen dann als sogenannte Referenz oder aber beziehen sich auf eine bestimmte Eigenschaft und verallgemeinern diese. Wohlwissend, dass es weder das eine repräsentative Gehirn gibt, noch ein Konstrukt, welches das Durchschnittsgehirn darstellt, ist es weiterhin Stand der gegenwärtigen Forschungen, eine möglichst repräsentative Darstellung zu produzieren. Daher spielen Atlanten, welche verschiedene Modalitäten (MRT, CT, PET, u.a.) und Medien nutzen und diese mit allen zur Verfügung stehenden Informationen verwenden, eine herausragende Rolle. Durch die realistisch komplexe Präsentation lässt sich die Morphologie, Funktion und räumliche sowie multidimensionale Komplexität des Gehirns abbilden.

2.4 Anatomische Variabilität

Die Vergleichbarkeit und Anwendbarkeit der einzelnen Atlanten auf eine zu untersuchende oder zu bewertende Probe wird durch deren hohe interindividuelle Variabilität erschwert. Dies behindert ebenso die Gegenüberstellung der Anatomie als auch der Funktion, die wiederum anatomischen Landmarken zugeordnet wird. Selbst nach Bearbeitung und Angleichung an das Referenzsystem, im allgemeinen das Talairach – System (Talairach 1967), sind Abweichungen im außen liegenden Kortex von 17 – 19 mm der beobachteten Sulci keine Ausnahme (Thompson et al. 1996, Rajkowska und Goldman-Rakic 1995). Eine noch weiter reichende Variabilität ist bei erkrankten Proben zu postulieren.

2.5 Probabilistischer Atlas

Ein Versuch dieser interindividuellen Variabilität zu begegnen, ist die Erstellung eines probabilistischen (lat. probabilis = glaublich, wahrscheinlich, der Wahrscheinlichkeit nach) Atlas. Dieser soll durch den Einschluss von mehreren (bzw. sehr vielen) Gehirnen die Variabilität möglichst vollständig abdecken bzw. abbilden. Durch die Zusammenfassung der einzelnen Informationen entsteht ein Atlas, der durch seine Abbildung von Wahrscheinlichkeiten eine zwar unschärfere Einzelaussage über die Morphologie macht, jedoch eine, die im Rahmen der Standardabweichung realistischer sein soll, weil durch die Einbindung von vielen Informationen der interindividuellen Variabilität Rechnung getragen wird. So werden diese Arbeiten bei der Unterstützung zur Detektion von Pathologien des Einzelnen oder von Gruppen verwendet. Sie werden durch diese aussagekräftige Annäherung an die Realität zu einem Instrument mit breiten Anwendungsmöglichkeiten in Klinik und Forschung, indem sie die Untersuchungen von Morphologie und Funktion stark verbessern (Scheperjans et al. 2008).

Ihnen gegenüber zu stellen sind die deterministischen Atlanten.

2.6 Deterministische Atlanten

Der Begriff „deterministisch“ ist zwar keine wissenschaftlich korrekte Bezeichnung, jedoch drückt dies den Gegensatz zum „probabilistisch“ die festgelegte Aussagekraft dieser Atlanten aus. Meist aus einem einzelnen bestehenden Datensatz zusammengesetzt (Swanson 1992, Paxinos und Huang 1995, Brodmann 1909, Talairach 1967, Talairach und Tournoux 1988, Ono et al. 1990, Schaltenbrand und Bailey 1959, Schaltenbrand und Wahren 1977), bilden diese ein Gehirn mit einer hohen Auflösung und detailgetreuen Informationswiedergabe sehr genau ab. Der Paxinos-Atlas basiert letztendlich auf dem Gehirn eines 59 Jahre alten Mannes, weder mit einer medizinischen Vorgeschichte noch einer neurologischen oder psychiatrischen Erkrankung. Der Vorgänger-Atlas „The rat brain in stereotaxic coordinates“ (Paxinos und Watson 1986) gehört zu den 50 meist zitierten Eintragungen in der Geschichte der Wissenschaft und wurde bis heute über 30.000 Mal zitiert (LOC 2007).

Solche, auf einem Datensatz beruhenden Atlanten, fungieren als anatomische Referenz oder repräsentieren eine besondere Einzelheit eines Gehirns, wie beispielsweise die Basalganglien oder den Thalamus (Van Buren und Maccubbin 1962, Van Buren und Borke 1972), die Verbreitung eines neurochemischen Rezeptors (Mansour et al. 1995) oder die bereits erwähnte zelluläre Architektur des Kortex (Brodmann 1909).

2.7 Beispiel eines multimodalen Atlas

Wie oben bereits erwähnt, spielen multimodale Atlanten eine große Rolle aufgrund ihrer vielfältigen Anwendbarkeit und Genauigkeit. Beispielsweise untersuchten Mega und Kollegen (Mega et al. 1997) Alzheimer-Patienten im Endstadium ihrer Krankheit mittels MRT und PET und konnten diese Daten nach dem Tod mit den histologischen Schnitten der Gehirne und speziellen Färbetechniken vergleichen. Auf diese Weise konnten die anatomischen und histopathologischen Untermauerungen mit dem Metabolismus und der Hirnperfusion dieser Erkrankung in Bezug zueinander gebracht werden.

2.8 Schnittbild basierte Atlanten

Auf Schnittbildtechnik basierende Atlanten (MRT, CCT) haben den Vorteil, dass in ihnen eine Registrierung anhand der drei räumlichen Achsen und dem dazugehörigen räumlichen Koordinatensystem bereits angelegt ist. In einer Arbeit von 1996 betrug die Auflösung ($\sim 2080 \mu\text{m}$)³ mit einem 1,5 Tesla MRT und ist damit vergleichsweise niedrig, wenn es um die Beurteilung von wichtigen Subregionen geht (Pierpaoli et al. 1996). Mit einer Weiterentwicklung (High-Resolution MRT) war 1998 eine Auflösung von ($\sim 780 \mu\text{m}$)³ möglich (Holmes et al. 1998) und schlussendlich mit einem Spezialgerät (9,4 Tesla) eine Auflösung von ($\sim 39 \times 47 \times 47 \mu\text{m}$)³ für ein Mausgehirn (Mori et al. 2001) erreicht worden. Bei letzterem ist jedoch aufgrund der langen Scanzeit und dem speziellen Untersuchungsaufbau nur eine Analyse postmortem möglich.

Die resultierenden volumetrischen Datensätze dienen als Basis für detaillierte dreidimensionale Modelle von anatomischen Strukturen. Diese werden repräsentiert unter der Nutzung einer Fülle volumetrischer und grafischer Werkzeuge. Die Modelle können interaktiv oder Off-Line begutachtet werden. Selektive Transparenz oder animierte Flüge durch die Strukturen vermitteln die komplexen Beziehungen zwischen den anatomischen Systemen.

2.9 Auf histologischen Schnitten basierende Atlanten

Im Gegensatz zu den oben genannten sind manche digitalen Atlanten auf Grundlage von histologischen Schnitten erstellt, die mittels Datenerfassung (Digitalkamera) digitalisiert wurden (Bohm et al. 1989, Greitz et al. 1991). Voraussetzung für diese Art der Datenerfassung und eine korrekte Korrelation der Daten mit der Probe ist eine Schnittebene, die mit der späteren Datenebene übereinstimmt.

Unter Benutzung einer Digitalkamera mit einer Auflösung bis maximal 4164 x 3120 Pixel (z. B. AxioCam HR, Carl Zeiss, Jena) sind Auflösungen von $(\sim 100 \mu\text{m})^3$ für das menschliche Hirn und $(\sim 60 \mu\text{m})^3$ für ein Rattenhirn möglich (Larsen et al. 2007). Bei der Verwendung eines Mikroskops lässt sich diese Auflösung noch vielfach erhöhen.

Bei der seriellen Kryosektionierung und gleichzeitigen Digitalisierung noch am Kryostaten ist eine spätere Registrierung der Datensätze nicht erforderlich. Sind zusätzliche Färbungen, weitere spezielle Aufbereitungen der Proben oder ein spezieller Aufbau (Mikroskop, Polarisation, etc.) notwendig, werden eine Fixierung und eine anschließende Registrierung der Datensätze unabdingbar. In diesem Fall treten Informationsverluste und Verzerrungen durch das Aufziehen auf Objektträger, die Fixierung sowie Eindeckung mittels Deckgläsern auf.

Die seriellen Abbildungen sind auf diese Weise der dreidimensionalen Rekonstruktion eines anatomischen Volumens mit den weiteren Möglichkeiten der digitalen Datenverarbeitung zugänglich.

2.10 Diffusionstensorbildgebung: DT-MRI – Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging

Als eine der diversen speziellen Wichtungen in der Magnetresonanztomografie ist die DT-MRI eine Technik, die Wasserdiffusion im lebenden Gehirn messen kann (Basser et al. 1994, Beaulieu 2002). Mit dieser speziellen Darstellung ist es seit Anfang der 90er Jahre möglich, die akute Hirnischämie zu detektieren (Moseley et al. 1990b). In der weißen Substanz erzeugen die lokal dicht gepackten Faserstrukturen eine „anisotrope Diffusion“ (Moseley et al. 1990a). Dies bedeutet, dass die Diffusion entlang der Achse der Faser schneller verläuft als die Diffusion senkrecht dazu. Die räumlich variierende Messung von einem Diffusionsvermögen ermöglicht somit die Messung der räumlichen Orientierung der Faserstrukturen in der weißen Substanz. Wie zu Anfang erwähnt, spielen Kartierungen der weißen Substanz und insbesondere die DT-MRI eine wichtige Rolle bei der Erforschung der Hirnanatomie, -funktion und -pathologie (Wakana et al. 2004, Jones et al. 2002).

Als noch relativ junges Verfahren in der Beschreibung der Architektur der weißen Substanz fehlt bis heute die fundierte Validierung. Als schlussfolgernde und indirekte Methode ist es notwendig, die wissenschaftliche Gültigkeit der DT-MRI zu bestätigen, da von der lokalen Faserorientierung weit reichende Aussagen über die komplette Faserstruktur gemacht werden.

3 Ziele der Arbeit

Ziel der Forschung ist die Erstellung eines probabilistischen Faseratlases des menschlichen Hirnstammes.

Die Diffusionstensorbildgebung (DT-MRI – Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging) als diagnostisches Mittel zur Detektierung von Nervenfaseroorientierungen am lebenden Patienten, im Sinne einer Diagnostik beispielsweise bei ischämischen Infarkten im Hirnstammbereich, ist ein noch junges Verfahren. Bislang fehlen ausreichende Arbeiten und Möglichkeiten, diese Methode zu validieren.

Des Weiteren existieren multiple Darstellungen des menschlichen Großhirnkortex, seien es multimodale Atlanten, basierend auf MRT, fMRT, PET, CT oder histologischen Präparaten, probabilistische Atlanten, welche eine ganze Reihe von Präparaten vereinen, Einzelfalldarstellungen und sogar Atlanten, die speziell bei einer vorhandenen Pathologie Verwendung finden. Hinreichende Kartierungen des Hirnstammes fehlen bis auf einige Ausnahmen. Als solche seien die Arbeiten von Paxinos / Huang und Schaltenbrand / Wahren (Paxinos und Huang 1995, Schaltenbrand und Wahren 1977) genannt, die sich bereits mit dem Hirnstamm beschäftigt haben. Deren Arbeiten beziehen sich in der Regel jedoch auf ein untersuchtes Gehirn. Probabilistische Arbeiten zum Hirnstamm, basierend auf vielen Gehirnen, fehlen bis heute.

In dem vorliegenden, von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten, Projekt werden 18 menschliche Hirnstämme seriell geschnitten und (ohne weitere Färbungsmethoden) mittels einer Polarisationsoptik und einer Bildverarbeitungseinheit digitalisiert. Die digitalisierten Hirnschnitte werden analysiert und dreidimensional rekonstruiert. Mit der Methode der Polarized Light Imaging (PLI) kann in jedem Punkt einer betrachteten Faserbahn des Präparates die Faserorientierung errechnet und gleichzeitig größere Fasersysteme – in diesem Fall zunächst die Pyramidenbahn – lokalisiert werden. Dies geschieht mit der so genannten manuellen Segmentierung der einzelnen Datensätze im 3D-Slicer, einem Software-Programm, welches die digitale Bildverarbeitung unterstützt. Es resultieren farbkodierte Volumendatensätze, die den Verlauf der Faserstrukturen im Hirnstammbereich sichtbar machen.

Die so entstandenen Datensätze können miteinander verglichen werden, und somit besteht die Möglichkeit, Aussagen über Rechts – Links – Seitenasymmetrien (bezüglich des Volumens der einzelnen Faserbahnen) oder geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen Gehirnen von Männern und Frauen zu treffen. Die Zusammenfassung der 18 Modelle liefert einen anatomischen probabilistischen Faserorientierungsatlas, mit dem die Beurteilung und Validierung der DT-MRI erfolgen soll. Eine Verbesserung der Aussagekraft ist auf dieser Basis zu erwarten. Dazu sollen die dargestellten Faserstrukturen an individuelle MRT-Datensätze angepasst werden und mit den dort durch Diffusionstensorbildung erhaltenen Bahnverbindungen verglichen werden.

4 Material und Methoden

Grundlage dieser Untersuchung waren 18 menschliche Gehirne, welche von Körperspendern stammen (Tab. 1+2).

Tabelle 1:

Alters- und Geschlechtsverteilung (segmentierte Gehirne farblich unterlegt)

Digitalisierte Gehirne nummeriert	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Alter / a	65	87	77	84	84	53	91	92	67	65	84	75	79	85	88	59	78	65
Geschlecht	m	m	m	w	w	m	m	w	m	m	w	m	m	w	w	w	w	w

Tabelle 2:

Statistische Angaben

Median / a	78,5
Altersbereich / a	53-92
Geschlechtsverteilung	9 männlich / 9 weiblich

Letztere hatten zu Lebzeiten ihr Einverständnis gegeben, nach dem Tod ihren Körper für anatomische Studien zur Verfügung zu stellen. Nach der Präparation der Gehirne im anatomischen Institut der RWTH Aachen wurden diese in 4 % wässriger Formalinlösung für mindestens 3 Wochen fixiert und nach Jena überführt. Hier wurde der untere Hirnstamm, vom Diencephalon bis zur Medulla oblongata, herauspräpariert (Abb. 5+6).



Abbildung 5:
Makroskopisches Hirnstammpräparat
von ventral



Abbildung 6:
Makroskopisches Hirnstammpräparat
von dorsal

Die verbliebenen Hirnteile wurden für künftige Forschungszwecke weiterhin in der Formalinlösung konserviert. Nach der Präparation wurde der Hirnstamm in Gelatine eingebettet und in Formalin gehärtet. Danach wurde das Exemplar senkrecht zur Achse nach Meynert in mehrere ca. 1 cm starke Scheiben geschnitten. Diese wurden daraufhin im Kryomikrotom (Leica Microsystems, Typ: CM 3050 S, Bensheim) seriell auf 100 µm geschnitten, ohne spezielle Färbung auf handelsübliche Objektträger aufgezogen, im wasserlöslichen Einbettungsmedium Aquatex® (Merck, Darmstadt) eingebettet und mit einem Deckplättchen (Menzel-Gläser, Braunschweig) versehen. Pro Hirnstamm ergaben sich ca. 1000 – 1500 histologische Schnitte, von denen jeder zweite zur weiteren Verarbeitung verwendet wurde. Die andere Hälfte dient weiteren von dieser Dissertation unabhängigen Untersuchungen.

Die Exemplare wurden in einer Einheit, bestehend aus einer im Institut entwickelten Polarisationsoptik und einer Bildverarbeitungseinheit (Pentium PC), digitalisiert.

Unter Ausnutzung der doppelbrechenden Eigenschaften der im Hirnstamm verlaufenden Faserstrukturen ergeben sich auf diese Weise Datensätze, mit denen Aussagen darüber getroffen werden können, in welcher räumlichen Orientierung die einzelnen Faserstrukturen verlaufen. Die erhaltenen Faserorientierungskarten wurden anschließend einer digitalen Ausrichtung unterzogen, um einen Volumendatensatz zu erhalten, der in weiterer Bearbeitung das digitale Abbild des ursprünglichen Hirnstammes darstellt.

In den vorliegenden Datensätzen wurden händisch die wichtigen neuroanatomischen Strukturen, in diesem Beispiel die Pyramidenbahn, mit einem speziellen Computerprogramm segmentiert und sichtbar gemacht. Aus den segmentierten Datensätzen ließen sich dreidimensionale Faserbündelmodelle herstellen, die die Grundlage eines dreidimensionalen Faseratlases markieren.

4.1 Prinzip der Polarisation

Für den praktischen Gebrauch der Polarisationsmikroskopie, auf welcher letztlich die hier verwendete Methode aufbaut, sind zum Verständnis der optischen Erscheinungen einige wesentliche Begriffe der elektromagnetischen Wellentheorie ausreichend, die im Folgenden angegeben werden. Eine umfangreiche physikalisch-mathematische Beschreibung der Methode wurde kürzlich von Larsen et al. (2007) publiziert, auf der die folgenden Ausführungen im Wesentlichen beruhen.

Elektromagnetische Strahlung verbreitet sich wie eine Welle. Als solche ist Licht aufzufassen, welches sich von einer Lichtquelle entfernt. Die Welle ist eine Transversalwelle, ihre Schwingung erfolgt senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Ein fadenförmiger Lichtstrahl ist als unpolarisiert gekennzeichnet, wenn die Richtung der Schwingung von einem Moment zum anderen nicht vorhersagbar variiert. Im Gegensatz dazu folgt die Schwingung eines polarisierten Lichtstrahls über die Zeit bestimmten Gesetzmäßigkeiten. Es existieren verschiedene Zustände in der Polarisation.

Linear polarisiertes Licht

Bei linear polarisiertem Licht beschreibt der Lichtvektor (F) in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung eine Gerade.

Elliptisch polarisiertes Licht

Bei elliptisch polarisiertem Licht schwingt der Lichtvektor (F) in einer zur Ausbreitungsrichtung der Lichtwelle senkrechten Ebene, die sich mit gleicher Winkelgeschwindigkeit dreht. Dabei beschreibt der Endpunkt des Lichtvektors im Verlaufe der Zeit eine Ellipse. Als Spezialfall des elliptisch polarisierten Lichtes gilt das zirkular polarisierte Licht. Hier beschreibt der Endpunkt des Lichtvektors einen Kreis.

Diese Voraussetzungen für einen Lichtstrahl können auf eine Gesamtheit von Lichtstrahlen angewendet werden, wenn diese in einer zu ihnen senkrechten Ebene polarisiert sind und die gleiche Ausbreitungsrichtung haben sowie die gleiche Schwingungsamplitude und Phasendifferenz besitzen.

4.2 Brechungsindex

Wenn eine Lichtwelle ein Medium durchläuft, interagiert es mit den Atomen und Molekülen des Mediums, was dazu führt, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes in einem Medium im Vergleich zur Ausbreitungsgeschwindigkeit im Vakuum langsamer verläuft. Das Verhältnis von Lichtgeschwindigkeit im Vakuum (c_{Vak}) zur Lichtgeschwindigkeit im betreffenden Material (c_M) bezeichnet man als **Brechungsindex** (n) (Brechungskoeffizient, Brechzahl) der Substanz.

$$n = \frac{c_{Vak}}{c_M}$$

Typische Brechungsindizes von biologischen Geweben sind 1,38 für Muskelgewebe (Haskell et al. 1989), 1,40 für Hühnerleber, 1,46 für unfixierte Nervenzellen (de Campos Vidal et al. 1980), 1,47 für Fettgewebe vom Schwein, 1,48 für Lipide und 1,55 für Kollagen. Die Lichtgeschwindigkeit kann innerhalb eines Materials in allen Lichtausbreitungsrichtungen gleich oder unterschiedlich sein. Man unterscheidet danach optisch isotrope von optisch anisotropen Substanzen.

4.3 Optisch isotrope und anisotrope Medien

Man nennt ein Medium optisch isotrop, wenn in ihm die Ausbreitung des Lichtes in allen Richtungen des Raumes gleichartig erfolgt. Unabhängig vom Strahlungseinfall propagiert das Licht im isotropen Medium nach allen Seiten mit der gleichen Geschwindigkeit, d. h. der Brechungsindex ist in allen Richtungen gleich.

Ein Medium ist optisch anisotrop, wenn in ihm die Ausbreitung des Lichtes als Ausdruck einer bestimmten, orientierten und submikroskopischen Struktur in verschiedenen Richtungen des Raumes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit erfolgt. Daraus ergibt sich ein für diese Richtungen verschiedener Brechungsindex. Weiterhin wird das Licht für die meisten Einfallrichtungen (mit Ausnahme besonders ausgezeichneter Richtungen) in zwei linear polarisierte Teilwellen aufgespalten (**Doppelbrechung**), deren Schwingungsebenen senkrecht zueinander stehen.

4.4 Doppelbrechung

Ist ein doppelbrechendes Medium gleichförmig im Rahmen der Wellenlänge des benutzten Lichtes, dann ist die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Ausbreitungsrichtung und dem Zustand der Polarisation simpel zu bestimmen. Abhängig vom Medium und dessen Orientierung im Raum kann ein System gefunden werden (mit den Achsen u, v, w), so dass der gefundene Brechungsindex bei einer sich unbestimmt ausbreitenden linear polarisierten Lichtwelle, schwingend in einer Richtung, definiert als Einheitsvektor $\vec{d} = (d_u d_v d_w)^T$, gegeben ist als

$$n_{\vec{d}} = \left(d_u^2 n_{uu}^{-2} + d_v^2 n_{vv}^{-2} + d_w^2 n_{ww}^{-2} \right)^{-1/2} \text{ (Abb. 7).}$$

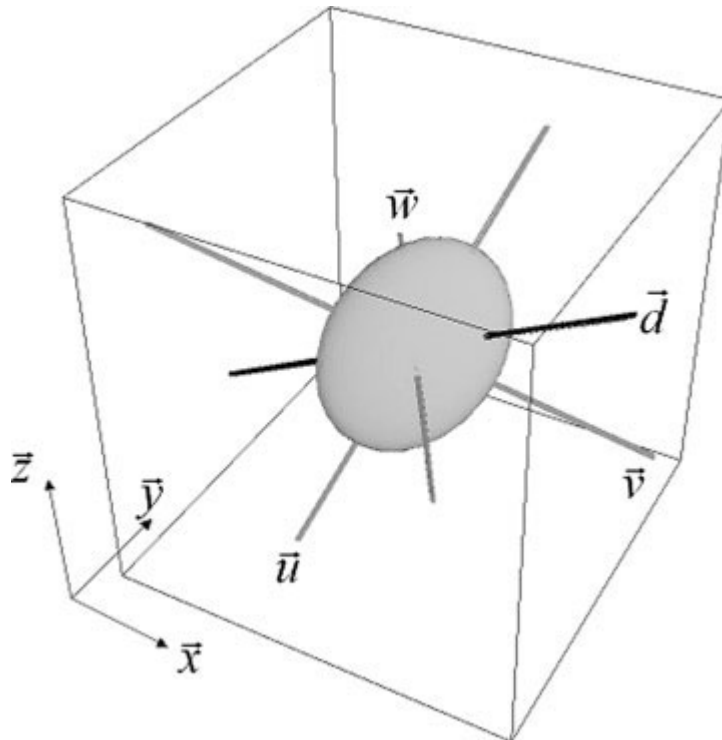


Abbildung 7:

Brechungsindex – Indikatrix eines doppelbrechenden Mediums (Larsen et al. 2007).

Ein linear polarisierter Lichtstrahl, welcher sich in Richtung einer Achse eines Koordinatensystems (mit den Achsen x, y und z , siehe Abb. 7) ausbreitet (z. B. x) und in einer anderen Richtung des Systems schwingt (z. B. y), wird nur einem einzelnen Brechungsindex (n_{yy} in diesem Beispiel) ausgesetzt sein. Er wird sich zudem mit der dazugehörigen Ausbreitungsgeschwindigkeit ($n_{yy}^{-1}c$) ausdehnen, mit einem sich nicht verändernden Polarisationszustand.

4.4.1 Doppelbrechung von histologischen Schnitten

Für doppelbrechende Medien bestehen zwei verschiedene Typ-Möglichkeiten: biaxial, wenn alle drei Brechungskoeffizienten unterschiedlich sind oder uniaxial, wenn zwei der Brechungskoeffizienten gleich sind. Bei uniaxialen Medien haben in einer bestimmten Symmetrieebene alle Brechungsindizes den gleichen Wert, jedoch einen differierenden Brechungsindex in einer zur Symmetrieebene senkrecht verlaufenden Richtung. Wenn der Brechungsindex für diese senkrechte Richtung der

kleinere der beiden Indizes ist, spricht man von **negativer Doppelbrechung**, im umgekehrten Fall von **positiver Doppelbrechung**.

Unabhängig davon welcher Typ vorliegt, die Doppelbrechung eines Mediums lässt sich mit lediglich zwei Brechungsindizes beschreiben. In einem geeigneten Koordinatensystem ist der Brechungsindex $n_{\vec{d}} = \left(d_a^2 n_{aa}^{-2} + d_b^2 n_{bb}^{-2} \right)^{-1/2}$ (Abb. 8).

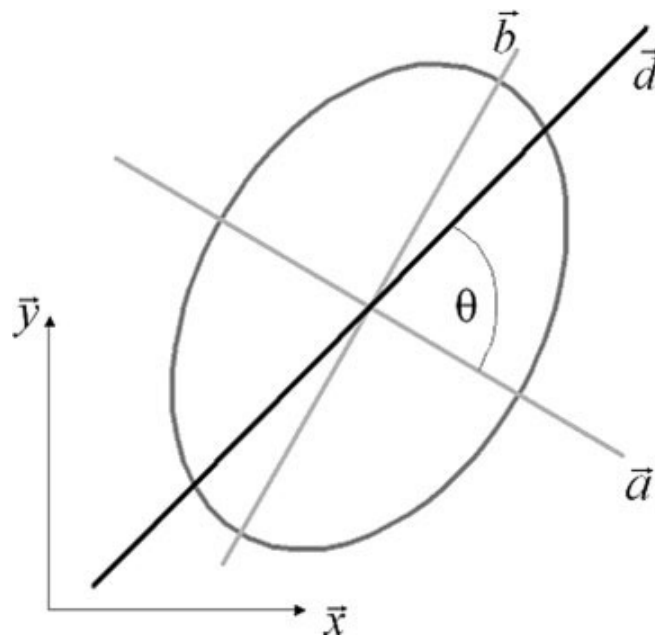


Abbildung 8:

Brechungsindex – Indikatrix eines dünnen Schnittes eines doppelbrechenden Mediums: Die 2D-Indikatrix ist elliptisch, weil es ein Schnitt durch die elliptische Indikatrix eines dreidimensionalen Mediums ist (Larsen et al. 2007).

Ein linear polarisierter Lichtstrahl, welcher auf einen histologischen Schnitt trifft und in Richtung a respektive b schwingt, wird nur einen Brechungsindex antreffen und daher seinen Polarisationszustand nicht verändern. Um zu verstehen, was mit einem Lichtstrahl passiert, der in einer Richtung \vec{d} in einem Winkel θ relativ zur a -Achse schwingt, ist der oben beschriebene Zusammenhang zu nutzen. Der einzelne Strahl kann in eine Intensität $\cos^2 \theta$ in die a -Richtung und in eine Intensität $\sin^2 \theta$ in b -Richtung aufgeteilt werden. Jeder der einzelnen Strahlen trifft auf einen Brechungsindex, so dass sich an der individuellen Polarisation nichts ändert. Da die jeweiligen Brechungsindizes jedoch unterschiedlich sind, schwingen die Strahlen

nach Durchtritt durch das Medium nicht mehr in Phase. Die Phasendifferenz ist gegeben als $\delta = 2\pi\lambda^{-1}t\Delta n$, wobei λ die Wellenlänge im Vakuum ist, t die Schichtdicke und $\Delta n = n_{aa} - n_{bb}$ die Differenz der Brechungsindizes, die die beiden Einzelstrahlen erfahren. Werden die Einzelstrahlen nun zusammengeführt, erzeugt die Phasendifferenz eine elliptische Polarisation.

4.4.2 Form-Doppelbrechung

Doppelbrechung wurde zunächst in Kristallen identifiziert, welche durch die geordnete Struktur der Atome die Anisotropie zur Folge hat. Die Messung dieser molekularen Doppelbrechung ist bis zu einem hohen Niveau entwickelt worden (Kaminsky et al. 2004). Sie ist für die Identifikation, Beschreibung und weiteren Informationen der Kristalle von außerordentlicher Bedeutung.

Doppelbrechung kann jedoch auch infolge der geordneten Anordnung von weit größerer Struktur als die der anorganischen Moleküle der Kristalle auftreten. Dieser Typ der „Form-Doppelbrechung“ wurde zuerst durch Wiener (1912) analysiert. Er zeigte, dass in einem Modell aus parallel verlaufenden Stäben die ein Volumen umschließen uniaxiale Doppelbrechung, mit zwei unterschiedlichen Brechungsindizes erzeugt wird. Gleiche man die Indizes aneinander an, verschwände die Doppelbrechung (Wolman 1975).

Typischerweise ist es Form-Doppelbrechung, welche in biologischen Proben vorliegt. Das besondere Interesse daran liegt darin begründet, dass mit der Messung quantitative Rückschlüsse auf geometrische Strukturen gezogen werden können, die mikroskopisch nur schlecht oder gar nicht darstellbar sind (Gimpel et al. 1995).

Viele biologische Strukturen zeigen nicht nur die beschriebene Form-Doppelbrechung, sondern auch eine **intrinsische**, welche durch die Eigenschaften der sie aufbauenden Moleküle begründet wird.

Die Zusammensetzung dieser beiden Doppelbrechungen kann als Gesamt-Doppelbrechung beschrieben werden.

4.4.3 Doppelbrechung der weißen Hirnsubstanz

Die weiße Substanz des Säugetiergehirns besteht aus dicht gepackten Axonfasern. Die charakteristische weiße Farbe von diesem Gewebe liegt im Myelingegehalt der Hülle begründet, die Axone größer 1 µm im Durchmesser umgibt. Diese Hüllen sind mehrlagig und erhöhen die Fortleitungsgeschwindigkeit der betreffenden Axone. Sie sind zusammengesetzt aus radial angeordneten Lipiden (70 – 85 %, z. B. Cholesterin und Sphingolipide) und Proteinen (15 – 30 %, z. B. Proteolipidprotein (PLP), Myelin – assoziiertes Glykoprotein (MAG), Myelin – Basis – Protein (MBP)), die tangential um die Axone arrangiert sind. Obwohl sie die Axone umgeben, sind die Myelinscheiden kein Bestandteil der Neurone, deren Axone in der weißen Substanz liegen. Eigentlich sind sie Teil von bestimmten Gliazellen, welche als Oligodendrozyten bekannt sind, von denen eine einzelne die Myelinscheide für 40 und mehr Axone herstellen kann.

Weißer Substanz zeigt negative uniaxiale Doppelbrechung (Fraher und MacConaill 1970). Obwohl die Struktur der weißen Substanz (parallel angeordnete Fasern) vergleichbar mit dem von Wiener (1912) analysierten Modell ist und obwohl in jedem Axon mehrere doppelbrechende Komponenten stecken (z. B. Mikrotubuli, Neurofilamente, etc.), ist die Gesamt-Doppelbrechung auf die regelmäßige Anordnung der Lipide in den Myelinscheiden zurückzuführen. Messungen der Doppelbrechung vor oder nach Behandlung der Proben (de Campos Vidal et al. 1980) haben gezeigt, dass die letztendliche negative Doppelbrechung aus der starken negativen Doppelbrechung des Myelins in der Nervenscheide resultiert, gemindert durch die positive Doppelbrechung des Proteinrahmens, in dem die Myelinmoleküle eingebettet sind.

Für einen Block von vertikal angeordneten Fasern ist die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Richtung der Schwingung wie folgt:

$n_{\bar{d}} = \left((d_x^2 + d_y^2) n_{cc}^{-2} + d_z^2 n_{ff}^{-2} \right)^{-1/2}$, wobei $n_{ff} < n_{cc}$ wegen der Doppelbrechung negativ ist.

Wenn dieser Block in einer Ebene geschnitten wird, mit der die Faserachse einen Winkel α erzeugt, dann ist der Brechungsindex resultierend aus dieser Schnittebene

$n_{\bar{d}} = \left(d_r^2 n_{cc}^{-2} + d_a^2 \left(n_{cc}^{-2} \sin^2 \alpha + n_{ff}^{-2} \cos^2 \alpha \right) \right)^{-1/2}$ in einem Koordinatensystem, in dem a die axiale Richtung entlang der Faserachse und r die orthogonale Richtung ist (Abb. 9).

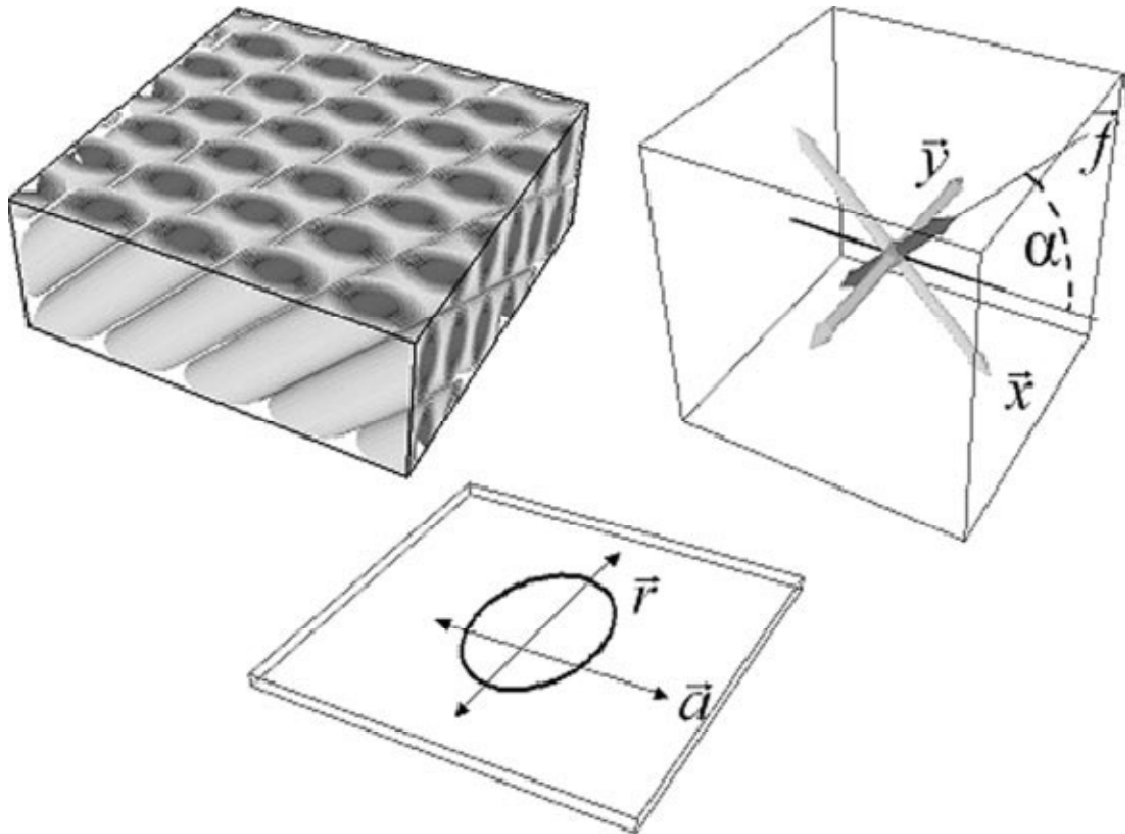


Abbildung 9:

Oben links: Illustration eines dünnen Schnittes von weißer Hirnschubstanz mit parallelen Fasern (Larsen et al. 2007).

Oben rechts: Die dicken Pfeile sind proportional zu den Brechungsindizes für Schwingungen in diesen Richtungen; der Pfeil für die Faserrichtung (\vec{f}) ist am kürzesten, die Pfeile für die anderen Richtungen (\vec{x} und \vec{y}) sind von gleicher Länge, weil weiße Hirnschubstanz ein uniaxial doppelbrechendes Medium ist (Larsen et al. 2007).

Unten: Passiert das Licht den Schnitt, kollabiert das dreidimensionale System der Brechungsindizes zu einem zweidimensionalen System. Der Brechungsindex für die Faserrichtung (\vec{a}) ist kleiner als der Brechungsindex in der kreuzenden Richtung (\vec{r}) (Larsen et al. 2007).

Die Differenz der beiden Brechungsindizes ist $\Delta n = n_{cc} - (n_{cc}^{-2} \sin^2 \alpha + n_{ff}^{-2} \cos^2 \alpha)^{-1/2}$.

Die einfachere, überschlägige Gleichung für die Phasendifferenz kann mit $\Delta n \approx (n_{cc} - n_{ff}) \cos^2 \alpha$ angegeben werden, unter der Annahme, dass die zwei Brechungsindizes des Blockes der weißen Substanz sehr ähnliche Werte annehmen,

i. e. $n_{cc} - n_{ff} \ll \frac{1}{2}(n_{cc} + n_{ff})$.

4.5 Methoden der Polarized Light Imaging (PLI)

Polarisiertes Licht wird häufig zur Darstellung von biologischen Proben benutzt (Scheuner und Hutschenreiter 1972) und ist im Besonderen sehr gut geeignet, die Faserstruktur der Nerven zu visualisieren (Göthlin 1913). In diesem Zusammenhang war die Funktion des polarisierten Lichtes lediglich deren Sichtbarkeit zu verbessern.

Jedoch konnte mit der vorliegenden und vorhergehenden Arbeiten gezeigt werden, dass polarisiertes Licht für weitere Anwendungen verwendbar ist. Es kann dazu genutzt werden, die räumlich variierende Richtung (xy-Ebene) und Steigung bzw. Neigung (über die Schnittdicke bzw. in z-Richtung) von Nervenfasern in Hirnschnitten zu detektieren (Axer et al. 2001). Die bevorzugte Methode hierbei ist die Nutzung von gekreuzten Polarisatoren und einer Viertelwellenplatte.

4.5.1 Gekreuzte Polarisatoren

Die einfachste Art der Messung von Doppelbrechung in einem histologischen Hirnpräparat ist die Positionierung des Präparates zwischen ein Paar linear polarisierender Polarisatoren mit senkrecht zueinander ausgerichteten Transmissionsachsen und der Nutzung einer unpolarisierten Lichtquelle. Der erste Polarisator filtert das unpolarisierte Licht zu linear polarisiertem Licht, welches dann das Präparat erreicht. Wenn das Präparat nicht doppelbrechend ist, dann wird sich am Polarisationszustand nichts ändern und der zweite Polarisator (Analytator) wird das Licht vollständig absorbieren. Wenn das Präparat jedoch doppelbrechend ist, dann wird aus dem linear polarisierten Licht elliptisch polarisiertes Licht, wovon ein Teil dann den Analytator passieren kann. Die Intensität dieses fortgeleiteten Lichtes kann mit der modifizierten *Fresnel'schen* Formel (Scheuner und Hutschenreiter 1972) $I_{trans} = I \sin^2 2(\theta - \varphi) \sin^2 \delta / 2$ beschrieben werden, wobei θ und δ die Richtungen der Transmissionsachsen des ersten Polarisators und der a -Achse des Präparates sind und δ die Phasendifferenz, die durch die Doppelbrechung des Präparates induziert wird. In diesem Aufbau zeigt jedes weiter geleitete Licht Doppelbrechung an. Nicht zwangsläufig weist jedoch fehlende Lichtfortleitung fehlende Doppelbrechung an, da $\theta = \varphi$ oder $\delta = 2k\pi$ sein kann. Der Fall der Anordnung $\theta = \varphi$ kann dadurch eliminiert werden, indem man die Ausrichtung des Polarisatorpaares

verändert, deren Transmissionsachsen aber senkrecht beibehält. Die Möglichkeit, dass die Phasendifferenz ein ganzzahliges Vielfaches der benutzen Wellenlänge des Lichtes ist, kann dadurch umgangen werden, dass eine Lichtquelle mit einer Mixtur verschiedener Wellenlängen verwendet wird.

4.5.2 Rotierende, gekreuzte Polarisatoren

Die Messung des transmittierten Lichtes bei differierenden Einstellungen der Polarisatoren kann ebenfalls dazu genutzt werden, quantitative Messungen durchzuführen. Die Lichtintensität beschreibt bei rotierenden, gekreuzten Polarisatoren eine Sinusfunktion. Minimale Lichtintensität tritt ein, wenn die vier Positionen der gekreuzten Polarisatoren eingestellt sind, in denen sich die Transmissionsachsen mit der a - und b -Achse des Präparates decken. Es gibt in diesem Aufbau keine Möglichkeit, zwischen diesen vier Fällen zu unterscheiden, so dass die a -Richtung des Präparates nur mit einer $\pm 90^\circ$ – Doppeldeutigkeit angegeben werden kann (Abb. 10).

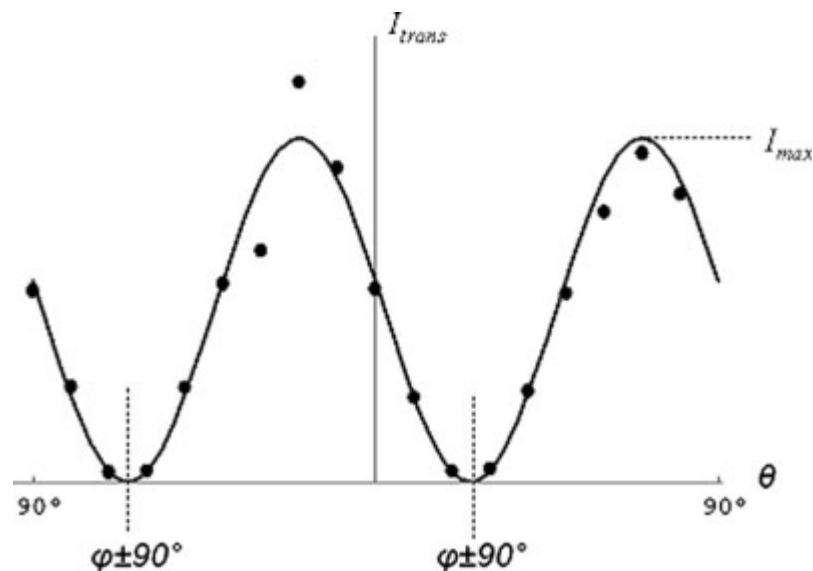


Abbildung 10:

Sinusfunktion der Lichtintensität bei gekreuzten Polarisatoren: Die maximale Intensität tritt auf, wenn eine Transmissionsachse eines Polarisators mit der Faser im Präparat deckungsgleich ist. Die minimale Intensität tritt auf, wenn die Fasern 45° zu den Transmissionsachsen stehen (Larsen et al. 2007).

Die Sinusform der Lichtintensität kann zugleich dazu genutzt werden, die Steigung der Nervenfasern zu berechnen. Diese Berechnung beruht auf drei Gleichungen:

$I_{\max} = I \sin^2 \delta/2$ (für die Konfiguration der gekreuzten Polarisatoren), $\delta = 2\pi\lambda^{-1}t\Delta n$ (für die Phasendifferenz, die durch das Präparat erzeugt wird) und $\Delta n \approx (n_{cc} - n_{ff})\cos^2 \alpha$ (für die Differenz der Brechungsindizes als Funktion der Faserneigung).

Abbildung 11 zeigt, wie das Maximum der Lichtintensität mit der Faserneigung variiert und wie es zusätzlich von der Schnittdicke des Präparats abhängt. Axer und Kollegen konnten zeigen, dass die optimale Schnittdicke bei 100 μm liegt (Axer et al. 2001).

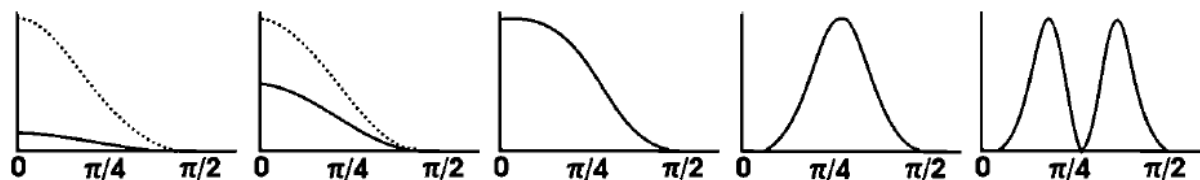


Abbildung 11:

Beziehung zwischen der Faserneigung (α)(x-Achse) und der Maximumintensität des Lichtes (y-Achse): Die mittlere Darstellung zeigt die optimale Schnittdicke. Von links nach rechts sind die Schnittdicken $1/4 x, 1/2 x, 1x, 2x, 4x$ im Vergleich zum Optimum aufgetragen. Die gepunkteten Linien dienen der besseren Vergleichbarkeit bei unterschiedlicher Skalierung (Larsen et al. 2007).

4.5.3 Rotierende, gekreuzte Polarisatoren mit Viertelwellenplatte

Die oben erwähnte Doppeldeutigkeit der Faserausrichtung beim Aufbau der gekreuzten Polarisatoren kann durch die Erweiterung einer Viertelwellenplatte eliminiert werden. Eine Viertelwellenplatte ist eine optische Standardkomponente, bestehend aus doppelbrechendem Material mit einer Schichtdicke, die so gewählt wurde, dass die Platte einen Gangunterschied von einer viertel Wellenlänge erzeugt. Die Viertelwellenplatte wird zwischen dem Polarisator und dem Analysator sowie dem Präparat eingefügt und ist so angeordnet, dass sich die optische Achse der Platte mit den Transmissionsachsen der Polarisatoren deckt. Es existieren zwei Möglichkeiten, die Viertelwellenplatte deckungsgleich zwischen die Polarisatoren zu positionieren.

Der Effekt der Viertelwellenplatte ist die Transformation von linear polarisiertem Licht des Polarisators in zirkular polarisiertes Licht. Wenn das zirkular polarisierte Licht das doppelbrechende Präparat passiert, wird es zu elliptisch polarisiertem Licht transformiert. Eine Fraktion des elliptisch polarisierten Lichts wird dann durch den Analysator treten. Die Form des Durchtritts ist abhängig von der Orientierung der Ellipse zur Transmissionsachse des Analysators. Die Anwendung des Jones-Formalismus (der Jones-Formalismus beschreibt lineare optische Abbildungen unter Berücksichtigung der Polarisation) erlaubt die Ableitung folgender Formel für die Intensität des transmittierten Lichtes: $I_{trans} = \frac{1}{2} I (1 + \sin \delta \sin 2(\theta - \varphi))$, wobei θ und δ wieder die Richtungen der Transmissionsachsen des Polarisators und der a -Achse des Präparats darstellen und δ die Phasendifferenz, die durch die Doppelbrechung des Präparates induziert wird. Die erhaltenen Daten unter verschiedenen Polarisatoreinstellungen können dann über eine Anpassung (an die Sinusfunktion) Aufschluss über die Faserorientierung im Präparat geben (Abb. 12).

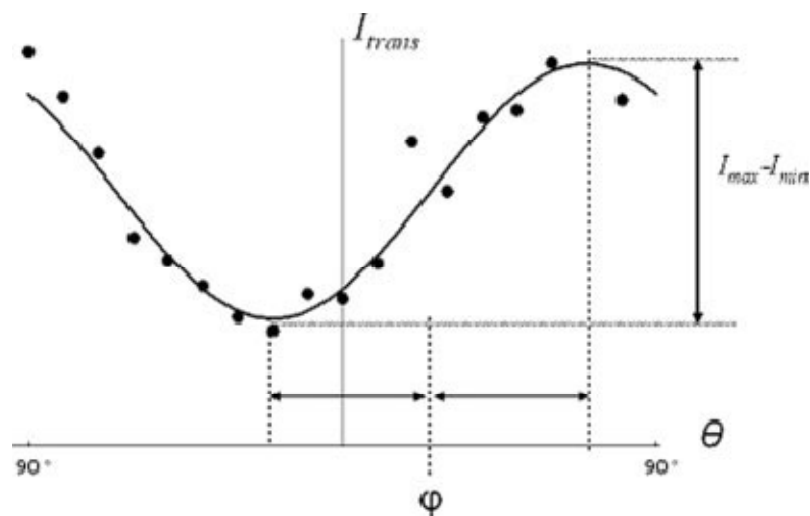


Abbildung 12:

Sinusfunktion der Lichtintensität bei gekreuzten Polarisatoren und Viertelwellenplatte: Die maximale Lichtintensität liegt vor, wenn die Achse der Viertelwellenplatte mit der Faser des Präparates deckungsgleich ist. Die minimale Lichtintensität liegt bei senkrechter Anordnung vor (Larsen et al. 2007).

4.6 Eingesetzte Polarisations-Apparatur

Die Digitalisierung der Präparate erfolgte an dem im Folgenden beschriebenen Aufbau.

Als Lichtquelle diente ein herkömmlicher Röntgenbildbetrachter mit fünf parallel hinter einer Mattscheibe angeordneten Leuchtstoffröhren (Osram GmbH, München, 13 W, Durchmesser 16 mm, Lichtfarbe 25 Universal-Weiß). Die Leuchten haben ein mehrbandiges Spektrum (Abb. 13).

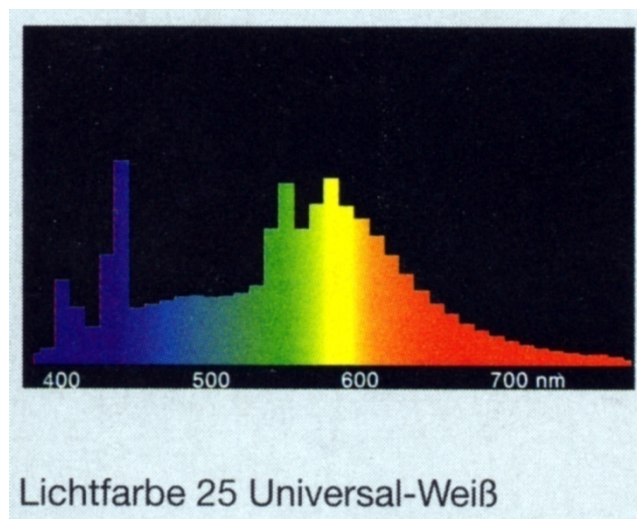


Abbildung 13:

Lichtspektrum der Osramleuchtröhre (Axer 2009)

Es folgte eine eigens für diese Studie angefertigte Vorrichtung, bestehend aus zwei gekreuzten Polarisatoren (Polarisatorfolien der Firma B+W Filter, Schneider, Bad Kreuznach), einer optional dazwischen einschwenkbaren 1/4-Wellenplatte, dem Objektträgertisch, der Digitalkamera CCD AxioCam HR (Carl Zeiss, Göttingen) und einem PC mit dem Betriebssystem Windows NT (Microsoft) (Abb. 14+15).

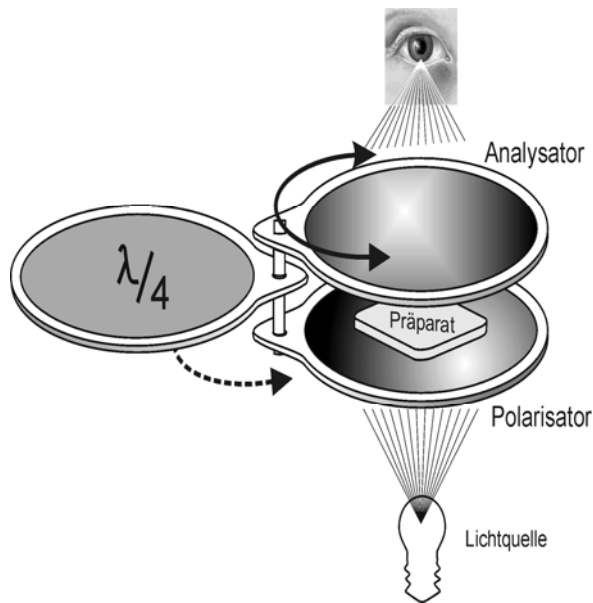


Abbildung 14:

Prinzip der Polarisationsoptik
(Axer et al. 2001)

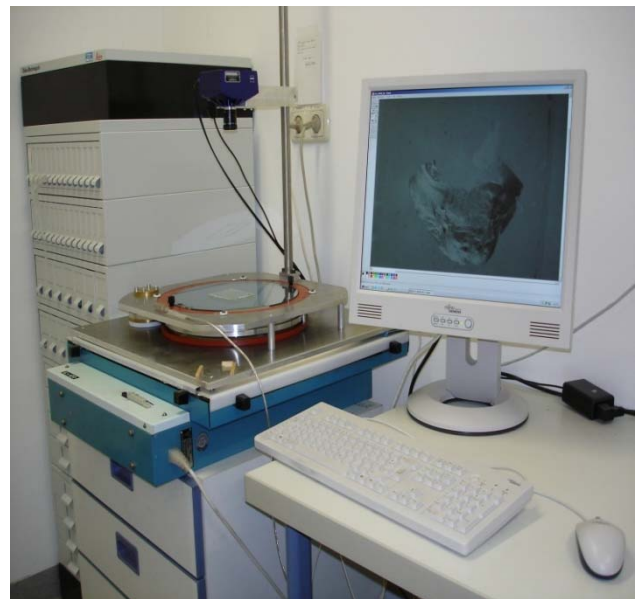


Abbildung 15:

Arbeitsplatz Polarisationsoptik mit
Bildverarbeitungseinheit

Das Licht tritt von unten durch den Aufbau, die Kamera ist nach unten gerichtet. Das System erlaubt die Rotation der Polarisationsfilter. Die senkrecht zueinander stehenden Transmissionsachsen bleiben von der Rotation unberührt. Das Präparat bleibt bei der Messung an einem Ort fixiert.

Die Entfernung und die Auflösung der Kamera wurden so gewählt, dass ein Pixel des Digitalbildes einer Fläche von $64 \times 64 \mu\text{m}$ im histologischen Schnitt entspricht.

Im Ausgangszustand sind die beiden Polarisatoren senkrecht zueinander angeordnet. Sie sind in Ihrer Lagerung in einem Umfang von $0^\circ - 180^\circ$ frei drehbar, wobei die zueinander senkrechte Anordnung der Polarisatoren jeweils beibehalten bleibt. Mit der dazwischen geschobenen $1/4$ -Wellenplatte wurden neun digitale Bilder unter Drehwinkeln von $0^\circ - 160^\circ$ in Schritten von 20° erzeugt. Weitere neun Bilder wurden ohne die $1/4$ -Wellenplatte bei Drehwinkeln von $0^\circ - 80^\circ$ in Schritten von 10° erzeugt. Diese 18 Digitalbilder wurden mittels einer Bildverarbeitungssoftware (AxioVision, Carl Zeiss, Göttingen) benannt und archiviert.

4.7 Kalibrierung mittels definiert geschnittenem Nervus opticus

Als Kalibrierung und Kontrolle diente ein definiert geschnittener Nervus opticus, welcher – unter Annahme, dass die Faserarchitektur homogen parallel zur Hauptfaserrichtung (Nervenverlauf in Längsrichtung) verläuft – in den Winkeln 0°, 30°, 45°, 60° und 90° zur Hauptfaserrichtung seriell mit einer Dicke von ebenfalls 100 µm geschnitten wurde. Auch diese Schnitte wurden in der Polarisationsoptik analog zu den Hirnstammschnitten digitalisiert und die maximalen Intensitätswerte für jedes Pixel bestimmt. Wie Axer und Kollegen (Axer et al. 2001) zeigen konnten, lassen sich mit einer Schnittdicke von 100 µm und den Messungen der maximalen Lichtintensität die genauesten Winkel der Faserorientierung in der Probe bestimmen. Wie Axer und Kollegen (Axer et al. 2001, Axer und Keyserlingk 2000) mit einem konfokalen Lasermikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)) präsentieren konnten, ist die Architektur der Fasern tatsächlich homogen parallel, weshalb dieses Modell dazu benutzt wurde, eine Funktion zur Winkelbestimmung der Faserneigung abzuleiten. Abbildung 16 zeigt die grafische Darstellung der Kalibrierungsfunktion, die mathematisch als lineare Gleichung imponiert:

$$\text{Neigungswinkel} = \frac{(\text{Max} - 240,47)}{-1,8115}$$

Nach jedem neu digitalisierten Datensatz (Hirnstamm) wurde die Kalibrierung und Messung mittels der Schnitte des Nervus opticus wiederholt, um systematische Fehler im Messaufbau zu detektieren und bei Bedarf auszugleichen.

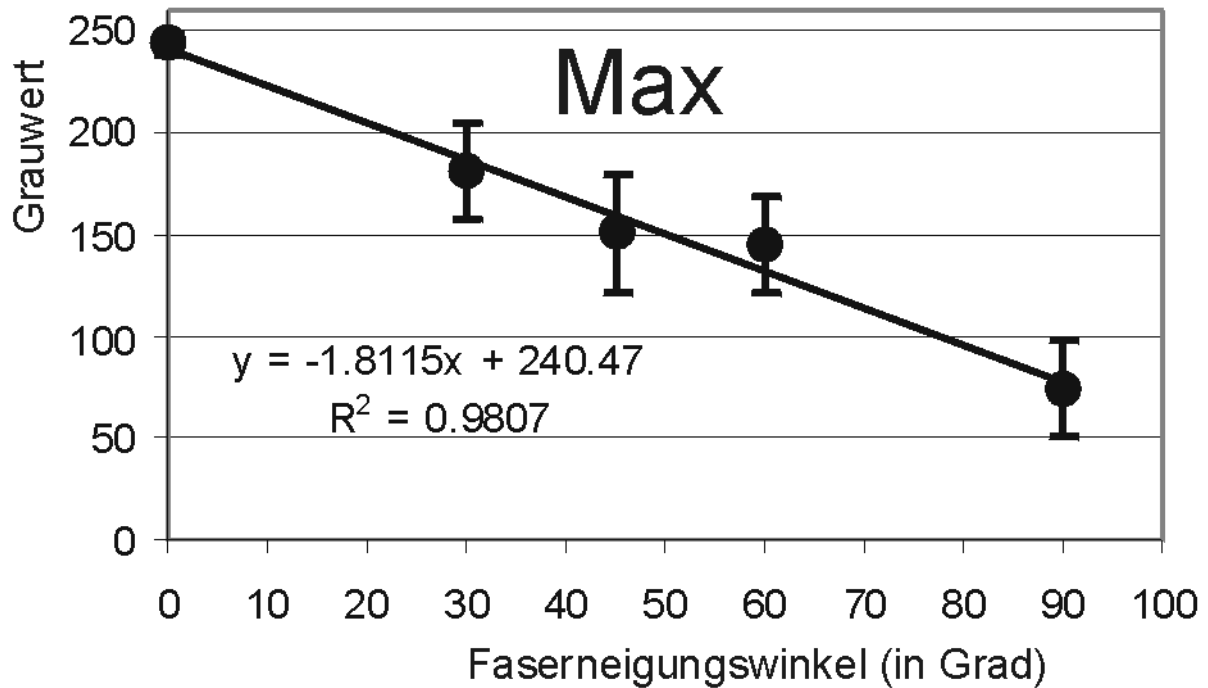


Abbildung 16:

Grauwerte-Neigungswinkel-Relationen. R^2 ist ein Maß für die Güte der Kurvenanpassung

4.8 Analyse von Polarisationssequenzen

In der Messreihe der zwei gekreuzten Polarisatoren wurden Datensätze erzeugt, mit denen die Faserneigung von $0^\circ - 90^\circ$ im Querschnitt (z -Richtung) des Präparates bestimmt werden kann. Es wurden hierfür unter Rotation der Polarisationsfilter in 10° - Schritten digitale Aufnahmen jeden Präparates angefertigt. Für die in diesen neun Aufnahmen gemessenen „Grauwerte“ wurde schließlich in jedem Pixel eine Sinusfunktion (MATLAB-Algorithmus) angepasst, die es erlaubt, den hellsten Grauwert der Sinusfunktion zu ermitteln. Diesem hellsten Grauwert kann über die oben erwähnte Kalibrierung ein definierter Neigungswinkel zugewiesen werden.

In einer zweiten Messreihe mit zusätzlicher Viertelwellenplatte wurden Datensätze erzeugt, mit denen die Faserrichtung von $0^\circ - 180^\circ$ in der Schnittebene des Präparates (xy -Richtung) bestimmt werden kann. Hier wurden in 20° - Schritten jeweils neun digitale Bilder erzeugt. Auch diese Grauwerte können nun genutzt werden, um über einen MATLAB-Algorithmus die Anpassung einer Sinusfunktion zu

gewährleisten. Hierbei entspricht der Winkel mit dem niedrigsten Grauwert der Faserrichtung. Abbildung 17 veranschaulicht diesen Zusammenhang.

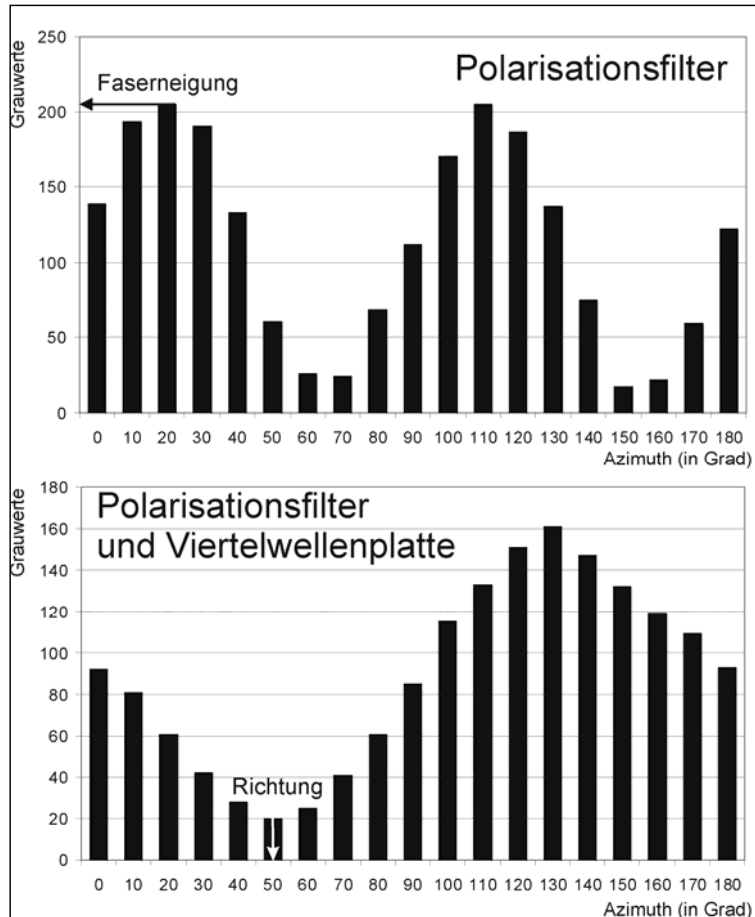


Abbildung 17:

Gemessene Grauwerte in einem Pixel unter Rotation der Filterkombination: Ohne Viertelwellenplatte findet man zwei Maximal- und zwei Minimalwerte, mit Viertelwellenplatte nur noch einen eindeutigen Maximal- und Minimalwert. Die Pfeile zeigen beispielhaft die den Grauwerten zugeordnete Faserorientierung an.

Um die Ausrichtung des Koordinatensystems parallel zur x-Achse des Bildes zu erreichen, wurde zusätzlich ein Korrekturwinkel in die Berechnung integriert, da die Polarisatoren aufgrund der baulichen Anordnung des Messaufbaues nicht exakt horizontal zu liegen kommen.

Das Dateiformat des Einzelbildes / Einzeldatensatzes ist ein unkomprimiertes und verlustfreies Windows Bitmap-Format.

4.9 Registrierung der Faserorientierungskarten

Die Einzeldatensätze der Faserorientierungskarten müssen zum Erhalt eines dreidimensionalen Datensatzes wieder aufeinander ausgerichtet und in einem Datensatz zusammengeführt werden. Dieser Schritt der Bearbeitung wird als **Registrierung** bezeichnet.

Dabei wurden zwei aufeinander folgende Schnitte seriell gegeneinander verschoben. Zum Einsatz kamen hier nur rigide Translationen, d. h. Verschiebungen in x- und y-Richtung und Rotationen. Als Kriterium für die optimale Anpassung beider Schnitte wurde die Euklidische Distanz gewählt, die an ihrem Minimum die optimale Anpassung beschreibt (Fit – Kriterium). Die Euklidische Distanz hatte sich in verschiedenen Vorversuchen für unsere Datensätze als günstig erwiesen (Axer et al. 2002), da diese gegenüber den anderen möglichen Kriterien die geringste Fehler- bzw. Abweichungsquote aufwies.

Die digitale Datenbearbeitung erfolgte mit Hilfe verschiedener Algorithmen, die in der Arbeitsgruppe mit MATLAB 6.0 (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) geschrieben wurden.

4.10 Manuelle Segmentierung der Pyramidenbahn

Die von MATLAB erhaltenen Datensätze konnten im Folgenden in die Software 3D-Slicer (Free Open Source Software (FOSS), Massachusetts Institute of Technology, USA) importiert werden. Aufgrund einer Inkompatibilität musste hierzu eine Umwandlung vom Windows Bitmap-Format in das Slicer-Format (Raw-Datafile) erfolgen, welches wiederum mit einem MATLAB-Algorithmus durchgeführt wurde. In diesem Spezialprogramm fand die Segmentierung der Faserbahnen von Hand statt. Hierzu wurde mit den verschiedenen Werkzeugen des Programms die Pyramidenbahn manuell umfahren und segmentiert. Hierdurch lässt sich mit einer speziellen Programmfunktion ein dreidimensionaler Datensatz errechnen und darstellen, welcher die Grundlage unseres Atlas bildet.

5 Ergebnisse

5.1 Digitalisierung

Von den 18 menschlichen Hirnstämmen wurden alle seriell geschnitten, so dass sich je nach Hirngröße 1000 – 1500 Präparate ergaben. Jedes einzelne wurde in der Polarisationsoptik neunmal mit gekreuzten Polarisatoren und zusätzlich neunmal mit eingeschobener Viertelwellenplatte digitalisiert. Hieraus ergeben sich über 400.000 Einzeldatensätze (Abb. 18+19).

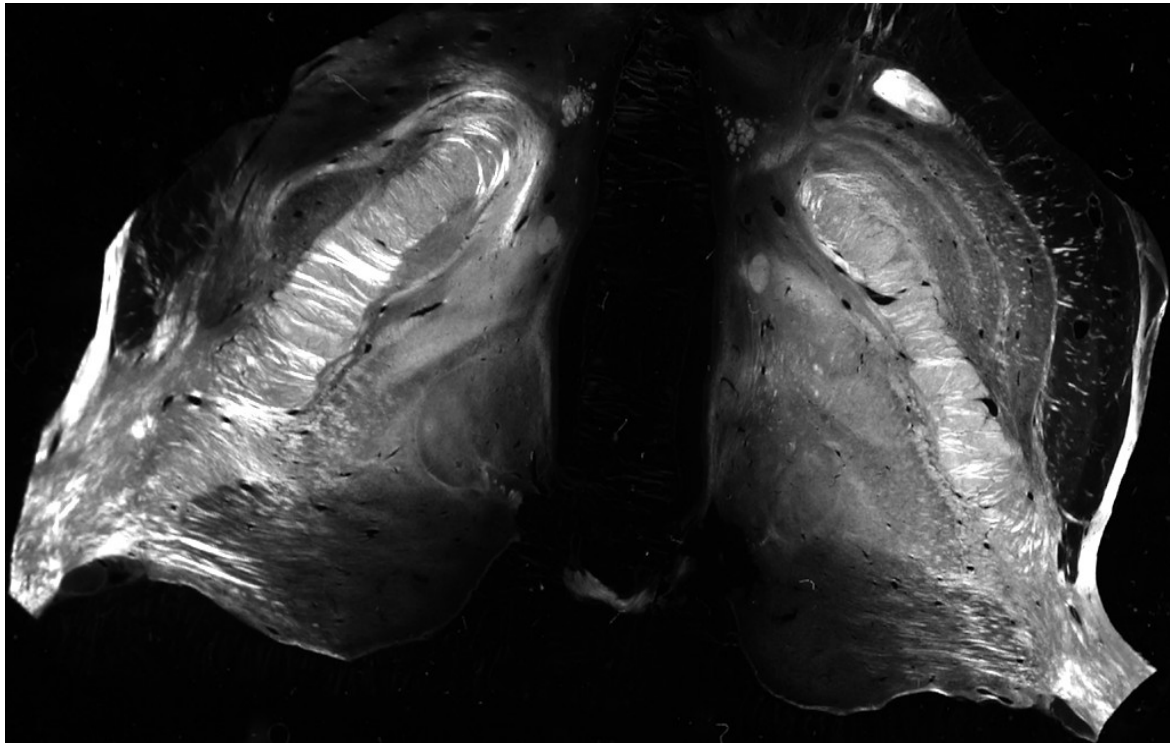


Abbildung 18:

Hirnstammschnitt auf Höhe der Crus cerebri, gekreuzte Polarisatoren

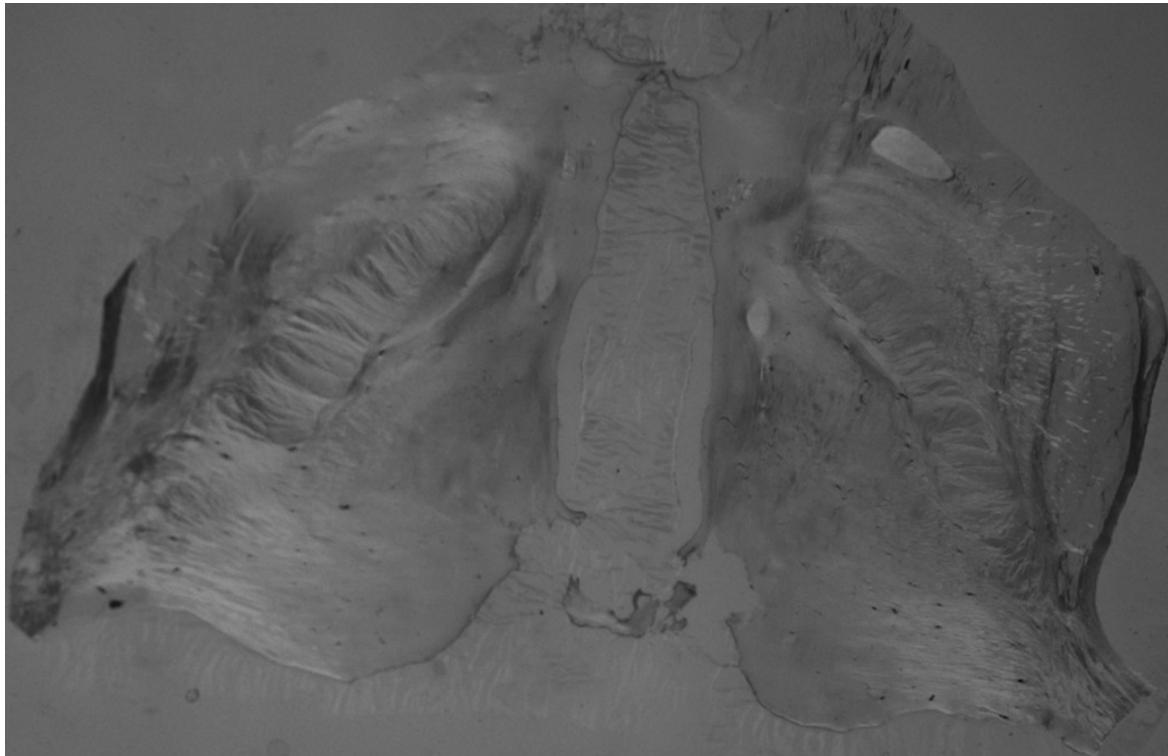


Abbildung 19:

Hirnstammschnitt auf Höhe der Crus cerebri, zusätzlich mit Viertelwellenplatte

Diese wurden nicht wie bei einem Metripol – Polarisationsmikroskopie – System (Glazer et al. 1996) halbautomatisch (mittels „Stepper“ – Motor für die Rotation der Polarisatorplatten) gewonnen, es wurde vielmehr jede Einstellung von Hand durchgeführt.

Die einzelnen Datensätze wurden unverwechselbar benannt, durchnummeriert mit Zahlen von 1 bis 18 und entsprechend dem zugehörigen Hirnstamm abgespeichert.

5.2 Faserorientierungskarten

Nach dem Schritt der Digitalisierung erfolgte als nächstes die Kalkulation der Grauwerte in jedem einzelnen Pixel der vorliegenden Hirnstammschnitte und zwar jeweils einzeln für die verschiedenen Drehwinkel der Polarisatoren.

Die Messreihe der gekreuzten Polarisatoren zeigt eine sinusförmige Abhängigkeit der gemessenen Grauwerte von der Polarisatoreinstellung (Gradzahl, Azimuth).

Mithilfe einer MATLAB-Routine kann zunächst eine Sinusfunktion an die gemessenen Werte angeglichen werden, aus welcher in einem weiteren Algorithmus über eine Grenzwertbestimmung die Maxima und Minima der Lichtintensität als Grauwert bestimmt werden können. Für die Berechnung der Faserneigung wird in diesem Fall die maximale Lichtintensität verwendet, weshalb so genannte Maximum – Intensitäts – Karten generiert werden (Abb. 20).

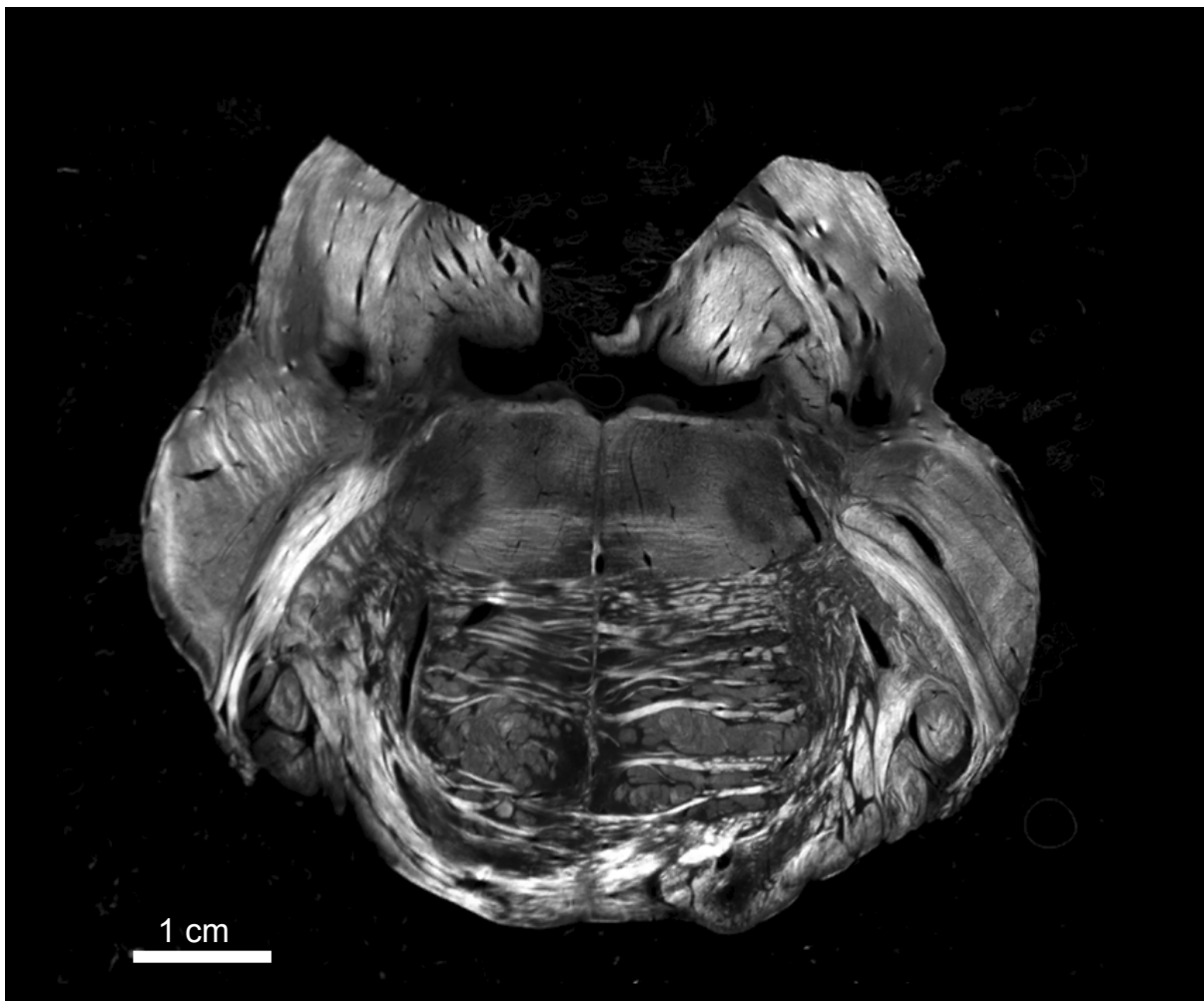


Abbildung 20:
Maximum – Intensitäts – Karte eines Ponschnittes

Wie bereits im Methodenteil erwähnt, kann über die Funktion der Grauwert – Neigungswinkel – Relation die Bestimmung der Faserneigung in jedem Pixel erfolgen. Grafisch resultieren hieraus so genannte Neigungskarten, aus denen die

Faserneigung von 0° – 90° (in z-Richtung des Hirnschnittes) abgelesen werden kann (Abb. 21).

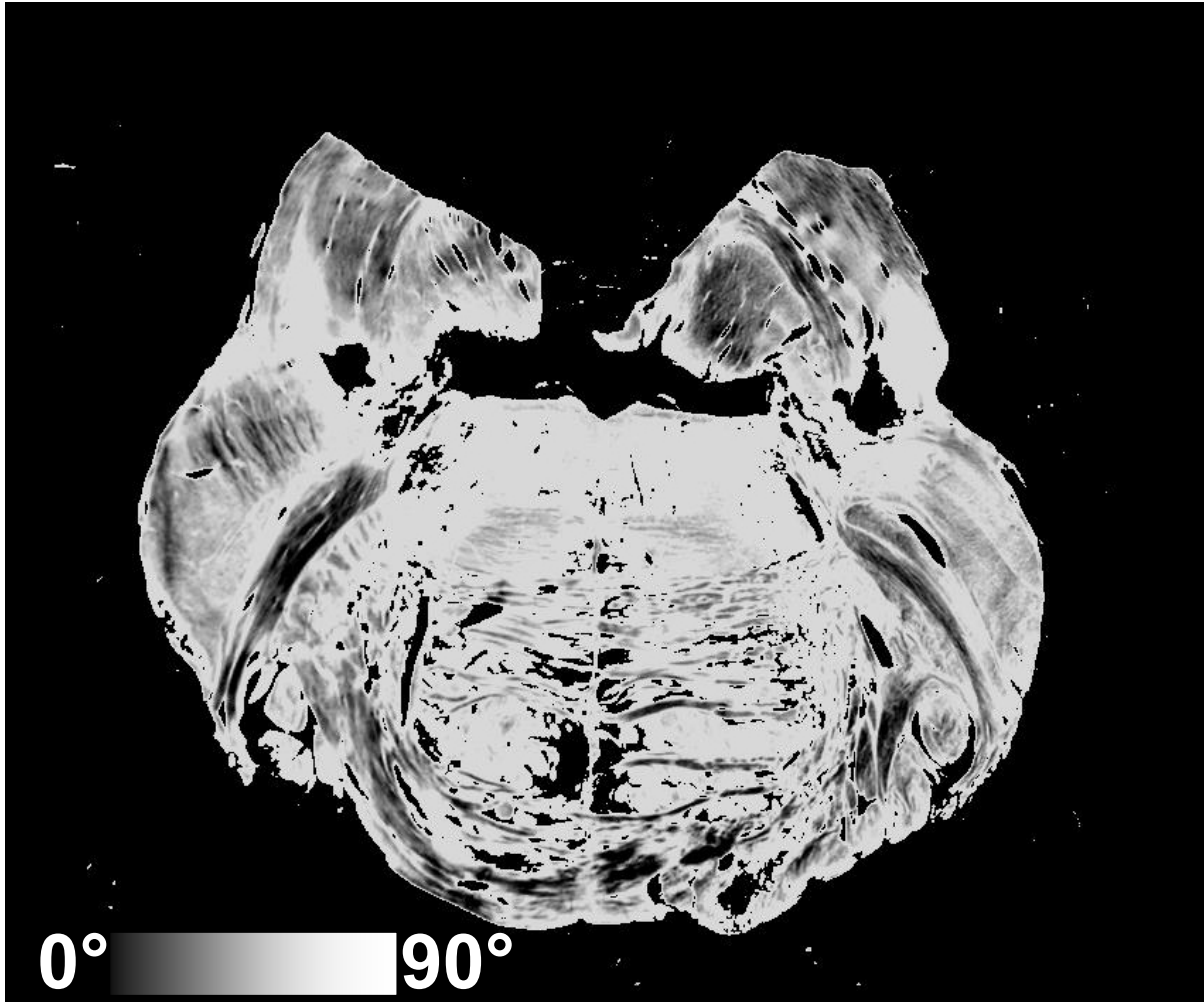


Abbildung 21:

Neigungskarte eines Ponsschnittes

In der Messreihe der gekreuzten Polarisatoren mit zusätzlicher Viertelwellenplatte zeigt sich ebenso eine sinusförmige Abhängigkeit der Grauwerte von der Polarisatoreinstellung. Analog erhält man in diesem Fall über die Anpassung der Sinusfunktion jedoch eine minimale Lichtintensität, aus der sich direkt die Faserrichtung von 0° – 180° (xy-Richtung des Hirnschnittes) ablesen lässt. Abbildung 22 zeigt diesen Zusammenhang wieder an einem Schnitt durch den Pons als so genannte Richtungskarte.

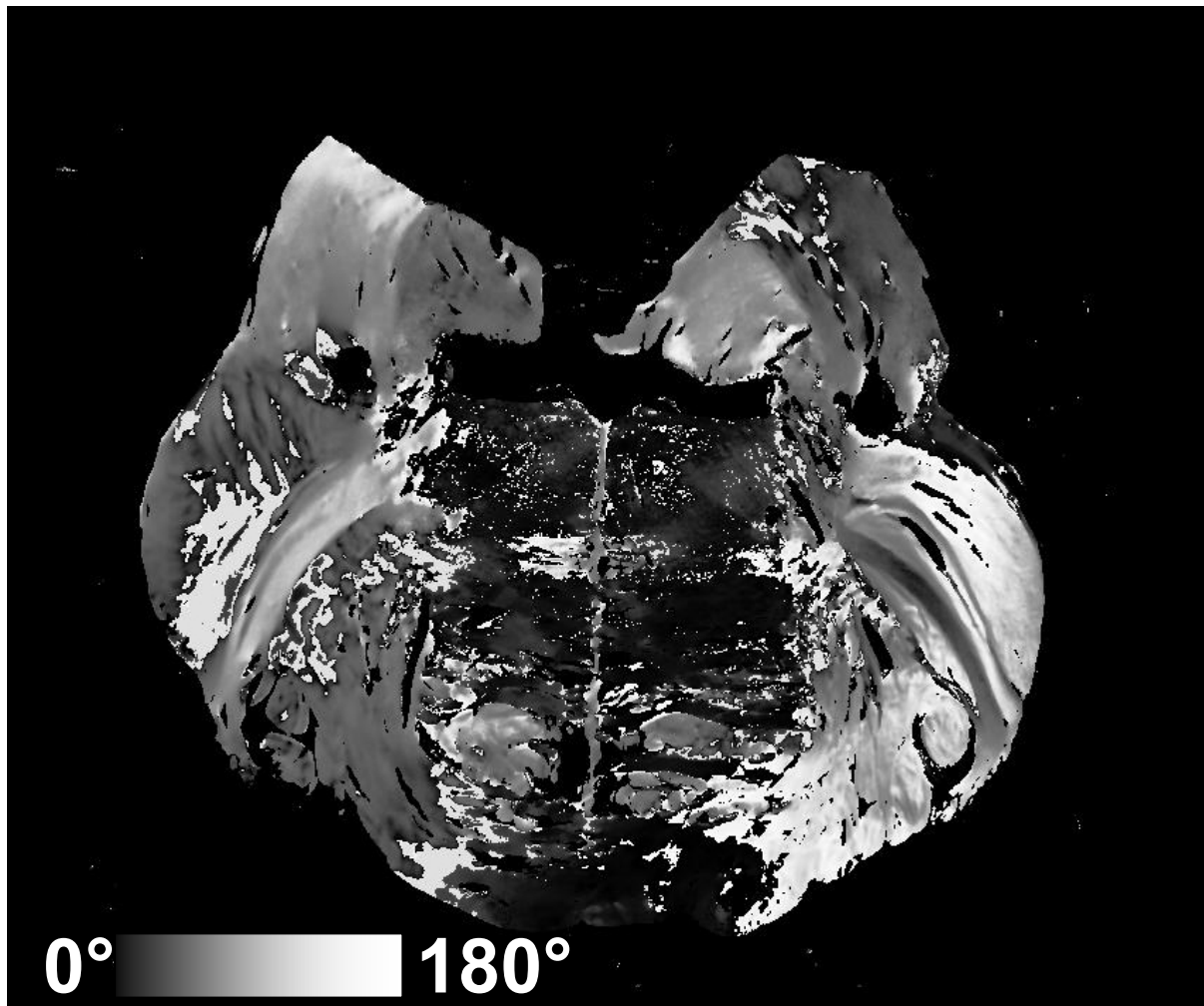


Abbildung 22:
Richtungskarte eines Ponsschnittes

Die Informationen aus den vorher gezeigten Karten der Faserneigung, -richtung und maximalen Lichtintensität können in bunt kodierten Faserorientierungskarten zusammengefasst werden. Hierzu wird den Grauwerten eine Farbe des RGB-Farbenraumes (rot, grün, blau) zugeordnet. Rote Farbe visualisiert Faserverläufe von rechts nach links, grüne Farbe signalisiert einen Verlauf von oben nach unten und blaue Farbe den Verlauf in der Achse des Hirnstammes. Auf diese Weise kann die Faserorientierung in einer Abbildung abgelesen werden (Abb. 23).

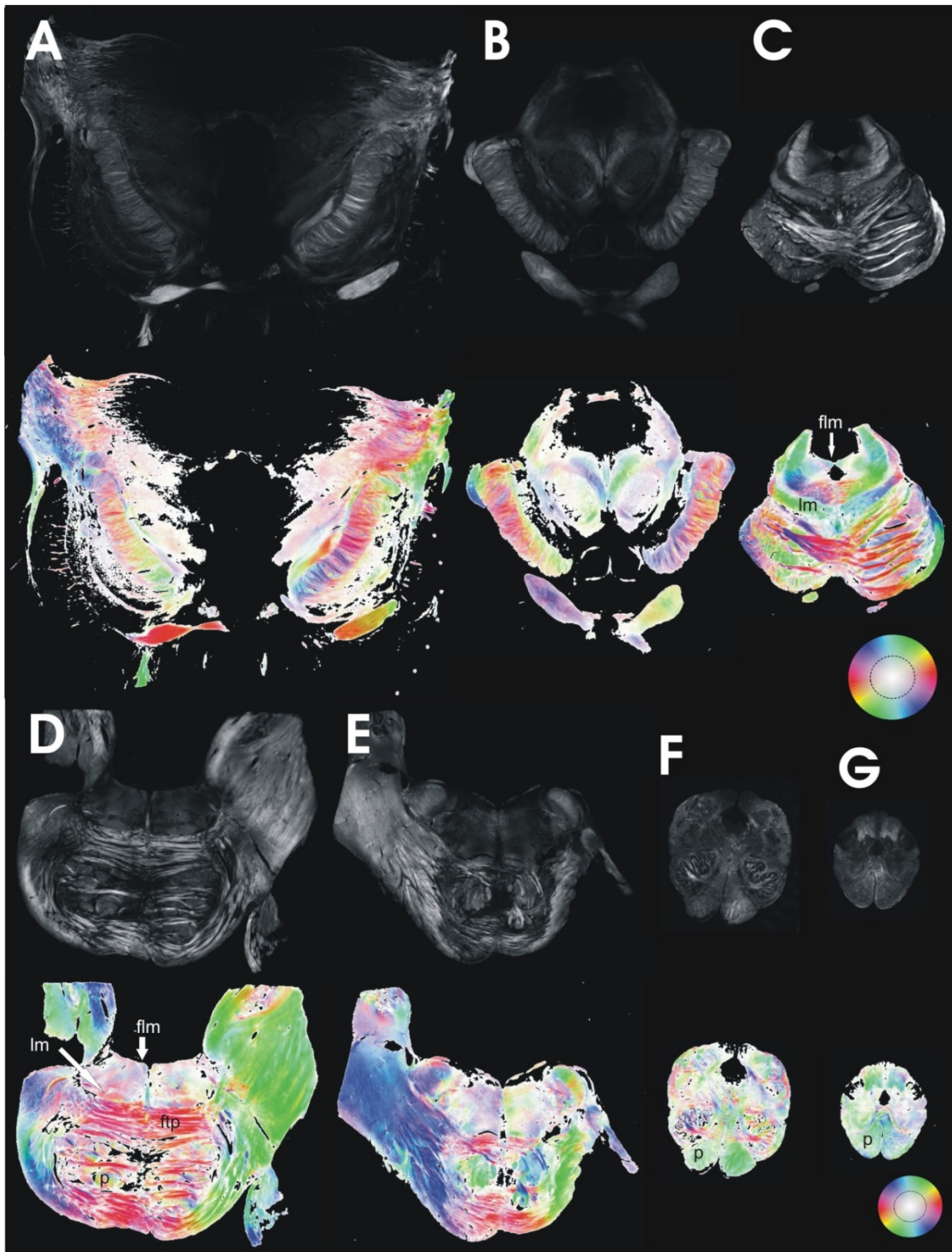


Abbildung 23:

Axiale Schnitte durch den menschlichen Hirnstamm. A–Diencephalon und Capsula interna. B–Mesencephalon. C bis E–Pons. F und G–Medulla oblongata. Die erste und dritte Reihe zeigen Maximum – Intensitäts – Karten. Die zweite und vierte Reihe zeigen Faseroorientierungskarten mit einer Farbkodierung für die Faserrichtung und einer Farbsättigungskodierung für die Faserneigung. Der gestrichelte Kreis in der Legende bildet annähernd die 45° – Neigung ab. Fasern, die steiler verlaufen, sind nur noch sehr blass koloriert. p–Pyramidenbahn, lm–Lemniscus medialis, ftp–Fibrae transversae pontis, flm–Fasciculus longitudinalis medialis.

Wie deutlich in den Beispielen F und G der Abbildung 23 zu erkennen ist, verläuft die in der Medulla oblongata ventral liegende Pyramidenbahn in der Achse des Hirnstammes. Daher erscheint sie vornehmlich grün, blau und blass und kann anhand der Legende einer $\sim 90^\circ$ – Neigung in z-Richtung und $\sim 90^\circ$ – Richtung in xy-Richtung als Ausdruck des Verlaufes in die Tiefe des Präparates zugeordnet werden.

Im Beispiel D der Abbildung 23 sind die Fibrae transversae pontis, die in den mittleren Kleinhirnstiel hinein verlaufen, gut an der satten roten Farbe erkennbar als Ausdruck ihres Verlaufes in der Ebene des Präparates (entsprechend einer Neigung nahe 0°) mit einer Richtung von annähernd 0° respektive 180° (entsprechend einem Verlauf von rechts nach links im Präparat). Auch hier lässt sich die Aufsplitterung der Pyramidenbahn im Pons an der blass grün-blauen Farbe nachvollziehen.

5.3 Registrierung

Mithilfe der Methoden der rigiden Transformation und der minimalen Euklidischen Distanz wurden die Einzeldatensätze durch einen MATLAB-Algorithmus translatiert und rotiert und somit wieder aufeinander ausgerichtet. Dieser Bearbeitungsschritt der Registrierung (bestmögliche Übereinstimmung mit den jeweils angrenzenden Datensätzen) ist die Voraussetzung für die darauf folgende Segmentierung. Abbildung 24 veranschaulicht diesen Arbeitsschritt bildlich anhand eines Maximum – Intensitäts – Datensatzes.

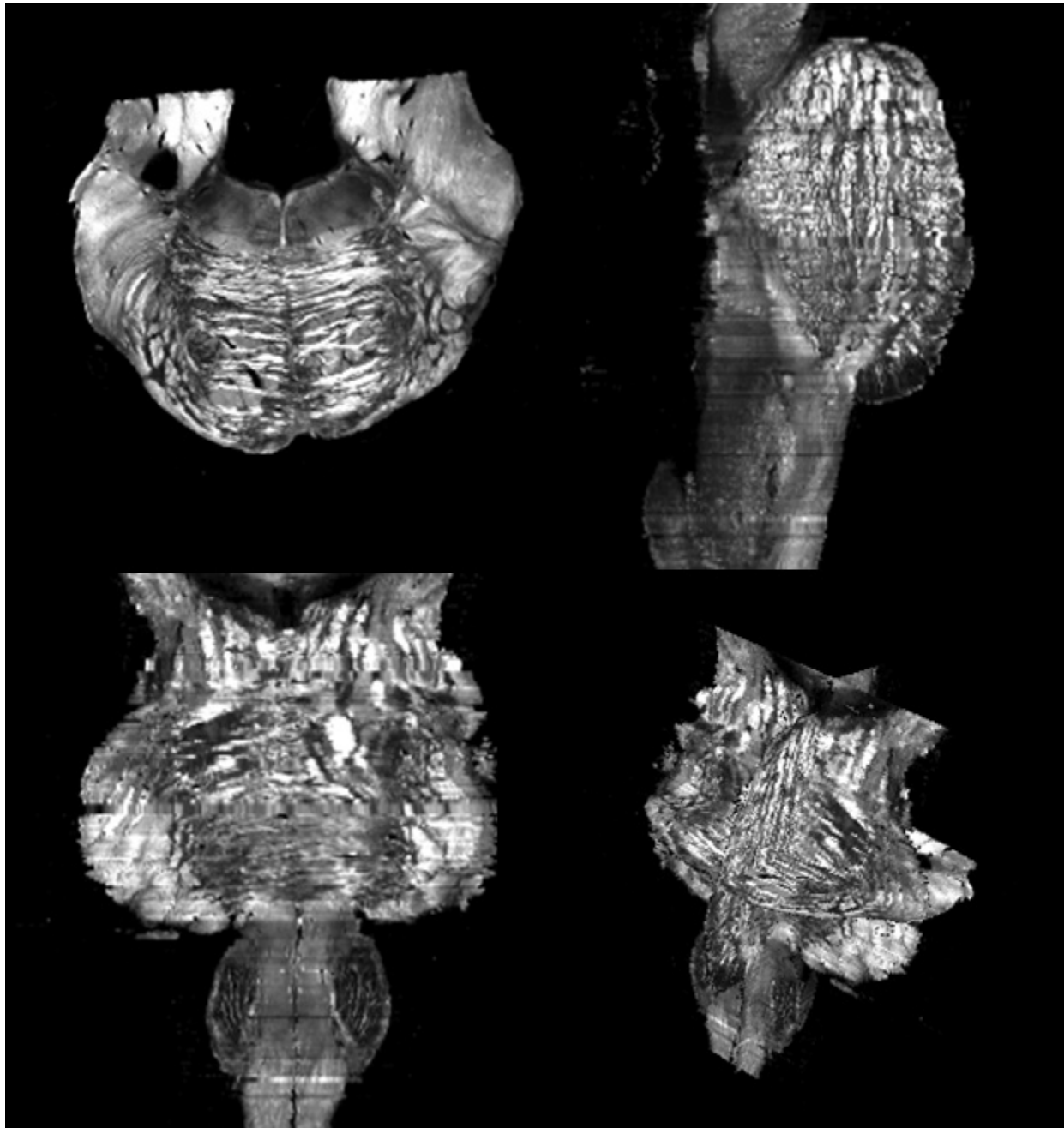


Abbildung 24:

Registrierter Datensatz des digitalisierten menschlichen Hirnstammes: **Oben links** ein einzelner der axialen Hirnschnitte, aus denen der komplette digitale Datensatz errechnet wird. **Oben rechts** - sagittaler Schnitt, **unten links** – frontaler Schnitt und **unten rechts** dreidimensionale Darstellung des registrierten Datensatzes.

5.4 Segmentierungskarten

Beim Schritt der Segmentierung wurden die registrierten Datensätze von bisher sieben Hirnstämmen in das Format des 3D-Slicers umgewandelt und von der Medulla oblongata (wenige Schnitte caudal der Decussatio pyramidum) bis auf Höhe

der Corpora mamillaria bzw. Lamina tecti die Pyramidenbahn von Hand detektiert und als eigenständiger Datensatz gespeichert. Abbildung 25 zeigt einen Ponsschnitt, auf dem bereits auf einer Seite die Pyramidenbahn entsprechend segmentiert wurde. Durch die Einfärbung werden die kortikonukleären und kortikospinalen Fasersysteme sichtbar, welche auf der Gegenseite als noch nicht segmentierte Faserbündel erkennbar sind. Um im Verlauf eine Unterscheidung von rechter und linker Seite zu ermöglichen, wurde jeweils eine Farbe zugeordnet, so dass auch nur die Faserbahnen der linken respektive rechten Seite allein betrachtet werden können. Die Betrachtung und Bearbeitung der Hirnschnitte erfolgt analog zur Darstellung der Schnittbilddiagnostik (CT, MRT) von inferior nach superior. Die linke Präparatseite (im Bild rechts) erhielt die Farbe „skin“ (entsprechend hautfarben) und die rechte Seite (im Bild links) die Farbe „brain“ (eher grau). Die Farben waren vom 3D-Slicer her frei wählbar, die Wahl der Farbe hat keinen fachlichen Hintergrund.

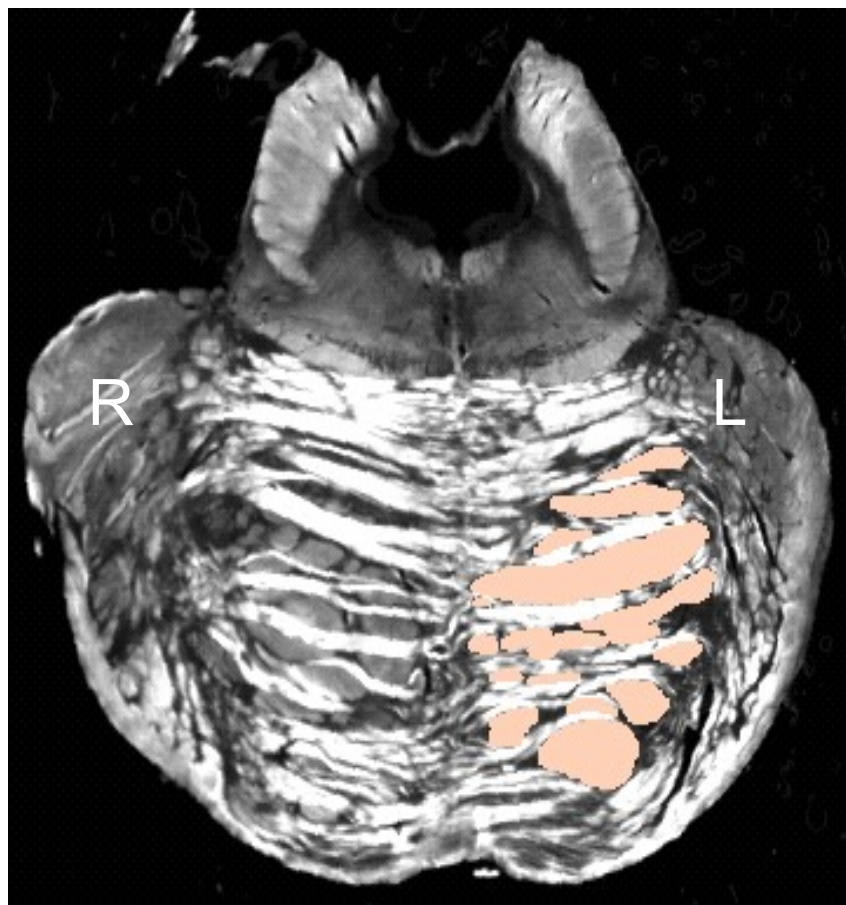


Abbildung 25:

Ponsschnitt mit segmentierter Pyramidenbahn

Des Weiteren zeigt sich in Abbildung 26 caudalwärts in der Medulla oblongata die Pyramidenbahn im ventralen Anteil des Schnittes als noch nicht aufgesplittertes einzelnes, großes Faserbündel.

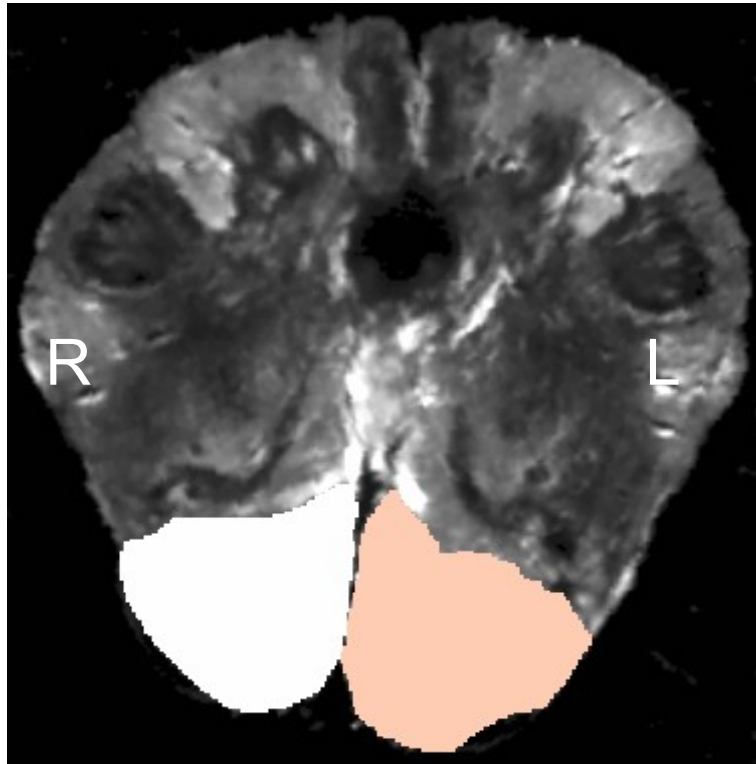


Abbildung 26:

Schnitt durch die Medulla oblongata mit segmentierter Pyramidenbahn in beiden Hirnhälften

5.5 Dreidimensionaler Datensatz / Volumendatensatz

Nach der Segmentierung ist es mit einem speziellen Werkzeug des 3D-Slicers möglich, aus den einzelnen Segmentierungsdaten einen dreidimensionalen Datensatz zu erstellen. Dies erfolgte für bisher sieben der 18 Hirnstämme. Abbildung 27 zeigt ein dreidimensionales Modell der Pyramidenbahn. Im unteren Anteil ist die Decussatio pyramidum sichtbar. Ebenfalls deutlich erkennbar sind die leichten Verschiebungen der einzelnen „Datenscheiben“, die nach der Registrierung noch verblieben sind und eine nicht vollständige, nicht deckungsgleiche Ausrichtung der Daten erkennen lassen.

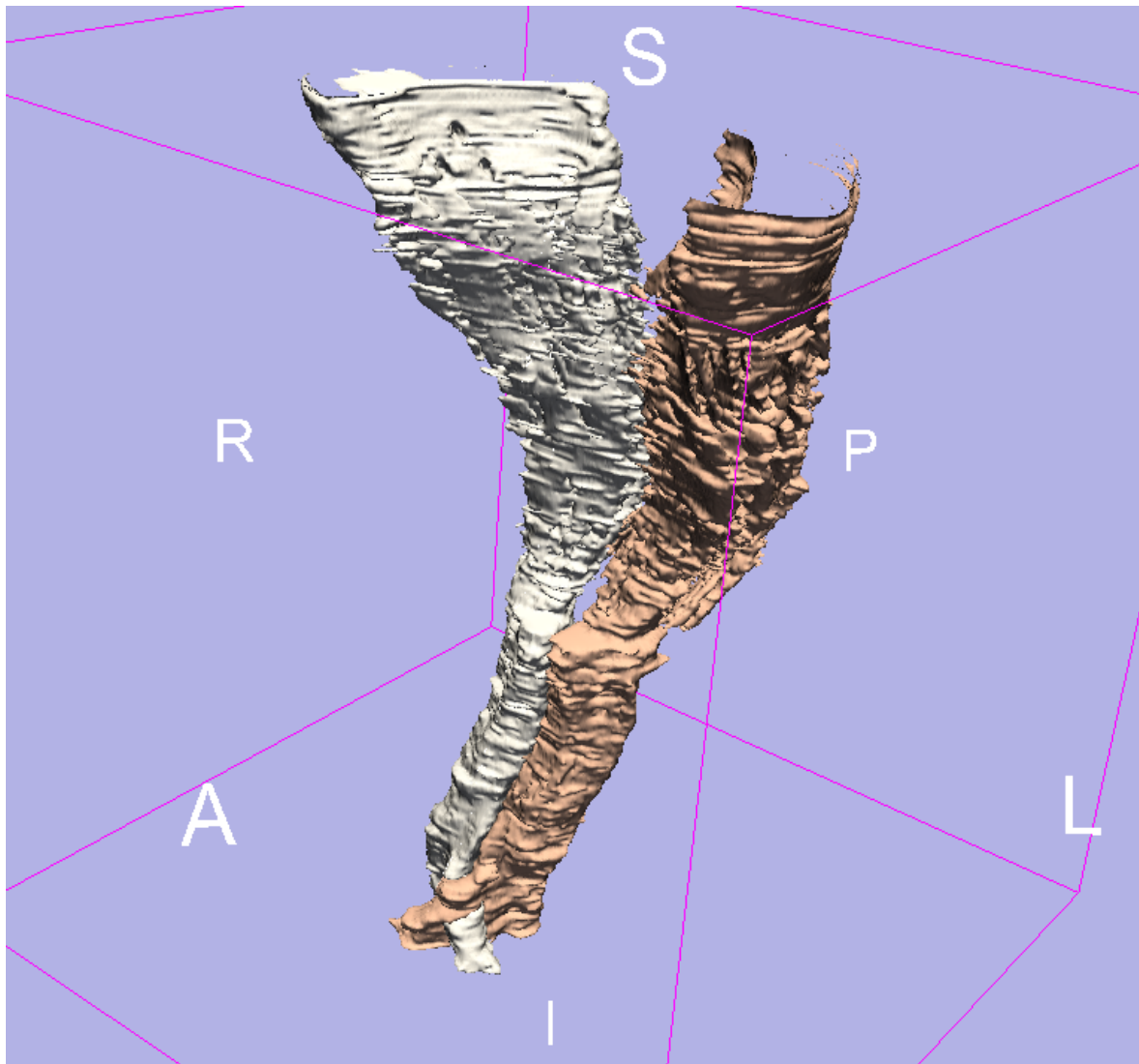


Abbildung 27:

Dreidimensionales Modell der Pyramidenbahn im Hirnstamm (A-anterior, P-posterior, L-links, R-rechts, S-superior, I-inferior)

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 28 nochmals das gleiche dreidimensionale Modell zu sehen, jedoch wurde zusätzlich ein Einzeldatensatz auf Höhe des Pons belassen.

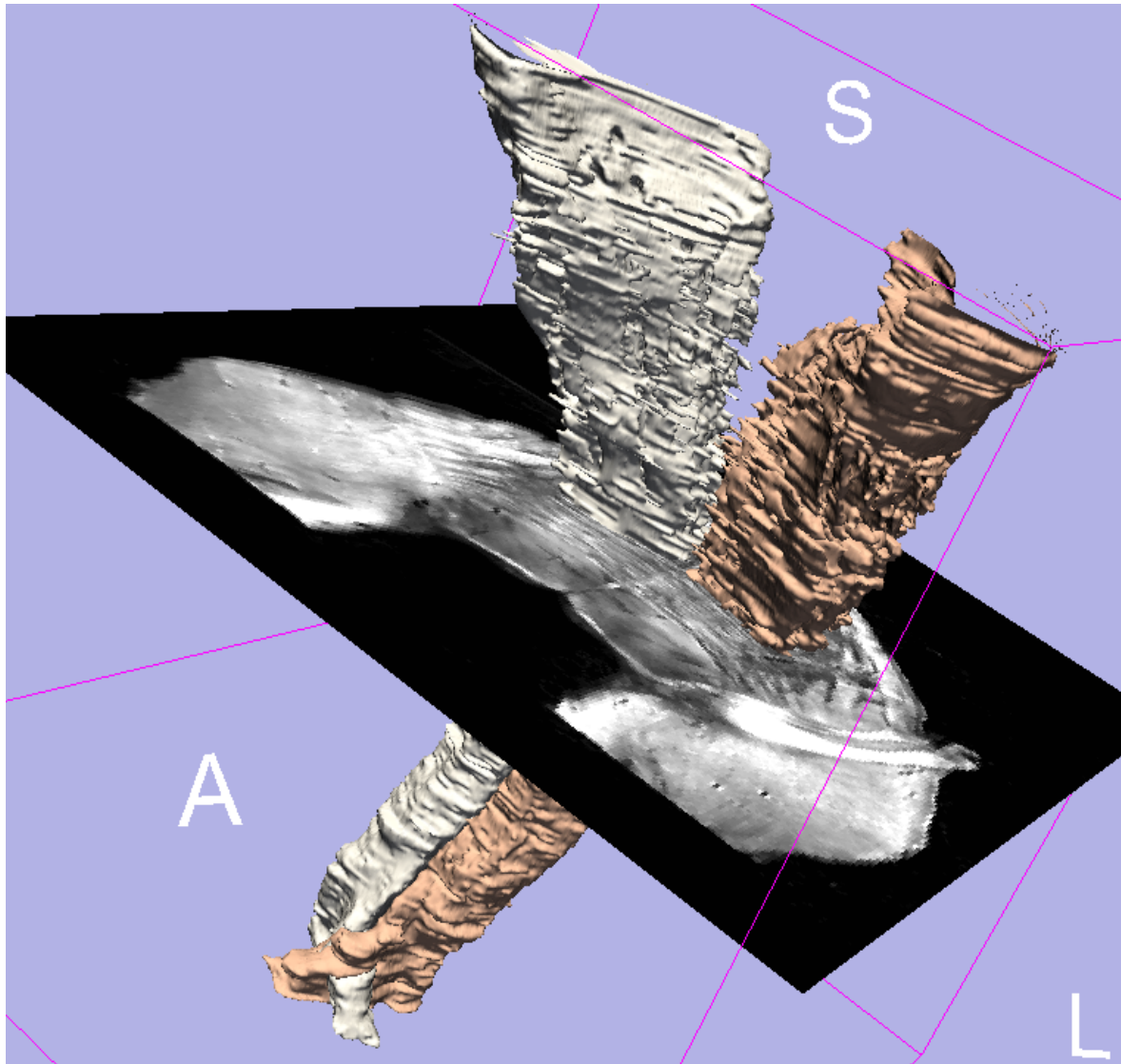


Abbildung 28:

Dreidimensionales Modell der Pyramidenbahn mit einer Ebene des dreidimensionalen Schnittsatzes (A-anterior, L-links, S-superior)

Abbildung 29 lässt im Detail nochmals die Decussatio pyramidum mit ihrer Durchflechtung der hier kreuzenden kortikospinalen Faserstrukturen erkennen.

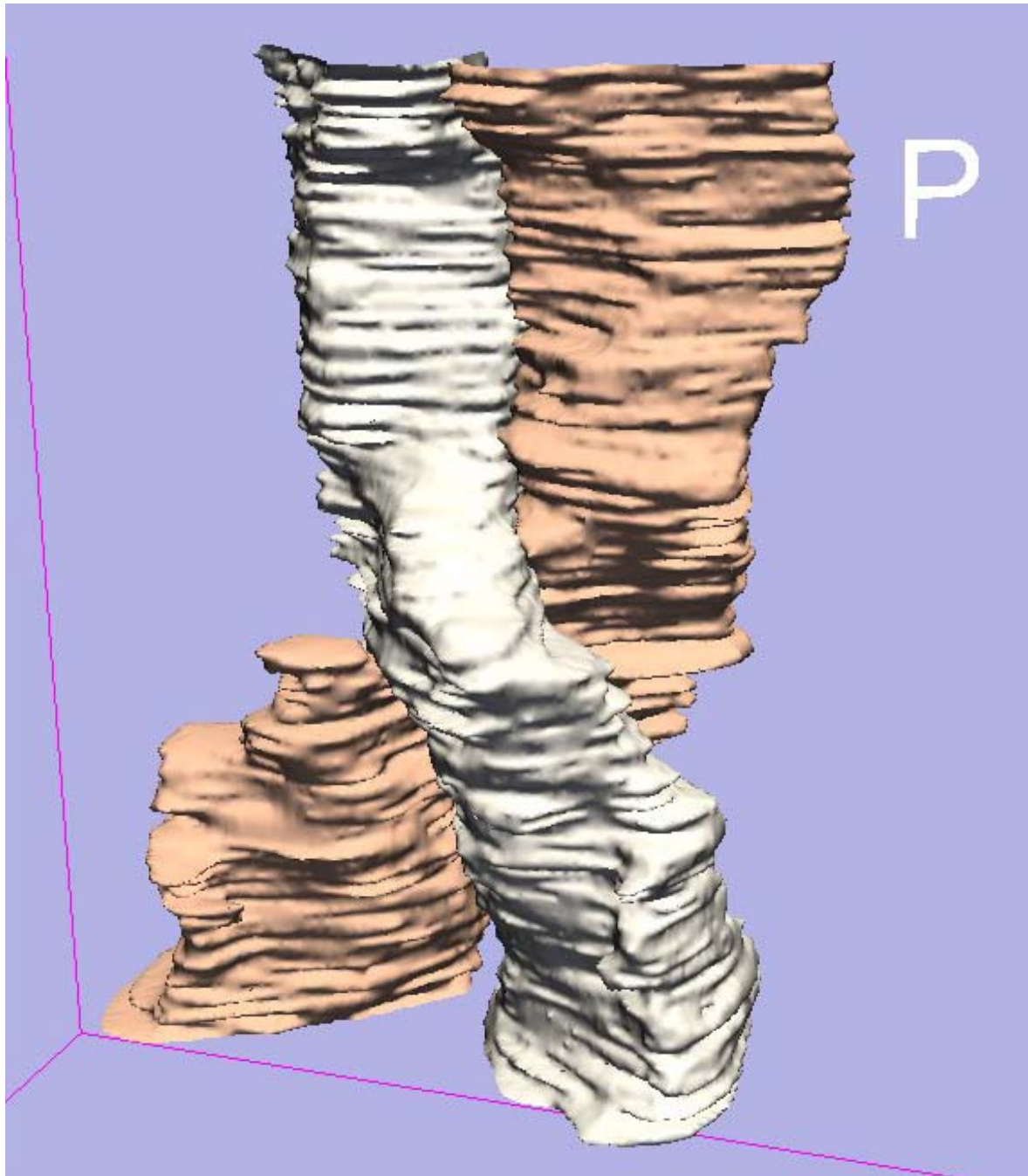


Abbildung 29:

Dreidimensionales Modell der Pyramidenbahn im Hirnstamm, Detailblick auf die Decussatio pyramidum (P-posterior)

5.6 Volumina der Pyramidenbahn

Durch die bei Beginn einer Segmentierung durchgeführten Konfiguration des 3D-Slicers wurde jedem Einzeldatensatz eine Schichtdicke 1,0 zugeordnet, entsprechend der Größe eines Pixels bzw. 100 μm , identisch mit der tatsächlichen

Schnittdicke der Präparate. Mit einem weiteren Werkzeug des Programms konnten anschließend die Volumina der einzelnen Faserbahnen bestimmt werden. Abbildung 30 beinhaltet die entsprechenden Werte.

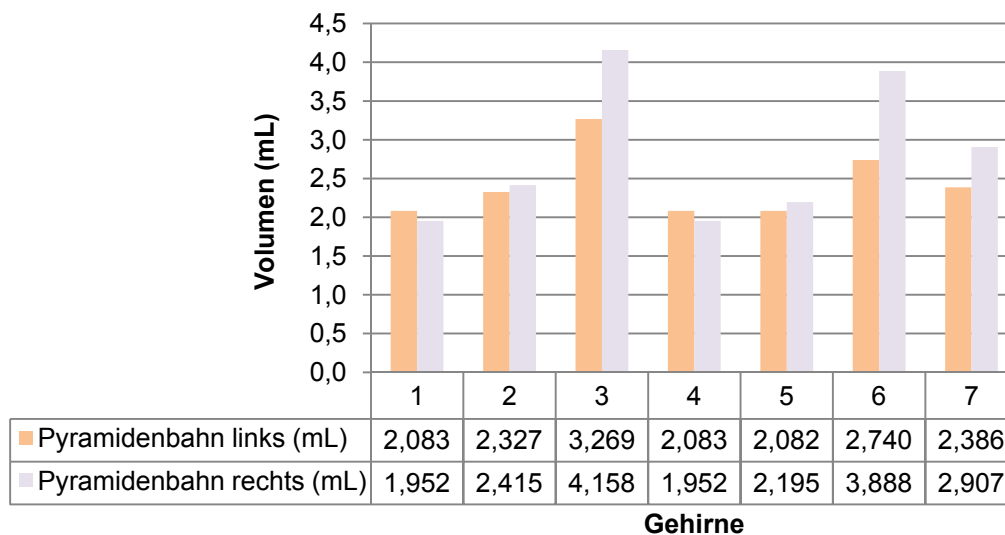


Abbildung 30:

Pyramidenbahnvolumina der segmentierten Hirnstammdatensätze in mL

Wie anhand der Zahlen ablesbar, variieren die gemessenen Volumina teils sehr deutlich (1,952 bis 4,158 mL). Die gemessenen Werte lassen jedoch weder eine signifikante Aussage über die Unterschiede der einzelnen Gehirne zu, noch über rechts – links Unterschiede. Im Wilcoxon-Test (verbundener nicht-parametrischer Test) liegt der z-Wert bei $z = -1,185$ und die Signifikanz bei 0,24.

Das einzig signifikante Ergebnis der Messung der Volumina ist die Korrelation letzterer mit dem Alter der Probanden. Hier ergeben sich für die Korrelation nach Pearson Korrelationskoeffizienten von $p = -0,96$ für die Korrelation Pyramidenbahn rechts – Alter und von $p = -0,92$ für die Korrelation Pyramidenbahn links – Alter. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass bei höherem Alter das Pyramidenbahnvolumen kleiner ist, also eine gegenläufige Korrelation vorliegt. Die folgenden beiden Abbildungen 31 und 32 stellen die Korrelation grafisch dar.

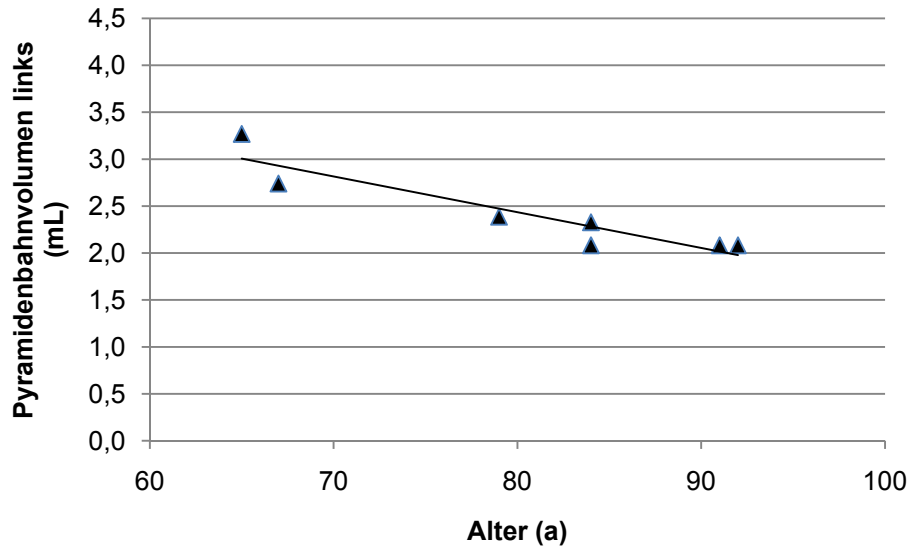


Abbildung 31:

Korrelation nach Pearson: Pyramidenbahnvolumen links – Alter

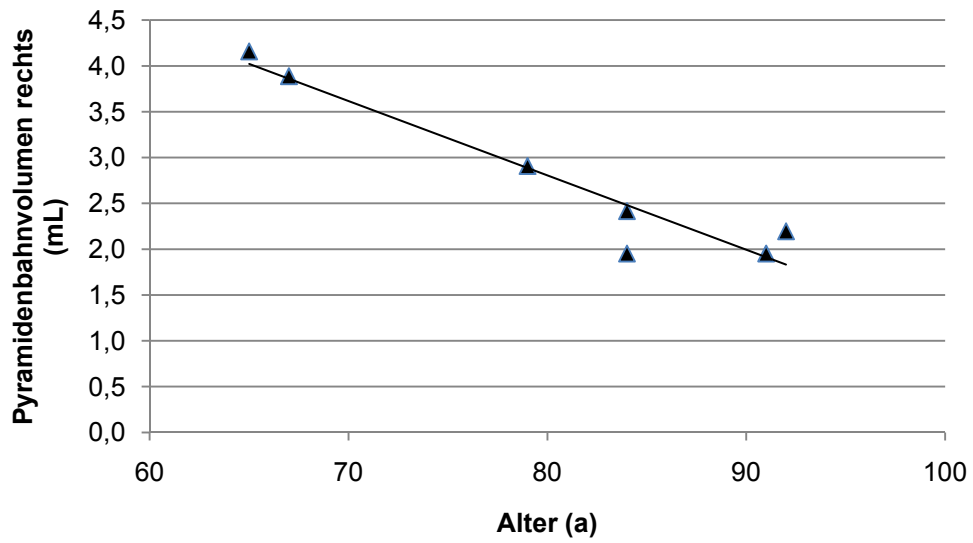


Abbildung 32:

Korrelation nach Pearson: Pyramidenbahnvolumen rechts – Alter

6 Diskussion

In diesem Projekt ist es gelungen, die vorhandenen 18 menschlichen Hirnstämme nach entsprechender Formalinfixierung seriell zu schneiden, in der Polarisationsoptik zu digitalisieren, über einen speziellen Algorithmus zu rekonstruieren und nach manueller Segmentierung ein dreidimensionales Fasermodell der Pyramidenbahn zu generieren. Hiermit zeigt sich eine weitere alternative Methode zur Darstellung der Architektur der weißen Hirnsubstanz. Beginnend in den ersten Jahren des 20. Jahrhunderts mit der Myelin – selektiven Färbung von Hirnschnitten nach Weigert (Dejerine 1895, Vogt 1902) wurde Mitte des Jahrhunderts die Gefrierpräparation nach Klingler (Ludwig und Klingler 1956) verfolgt, wobei die Separation der Faserstrukturen durch mehrmaliges Einfrieren erfolgte. Bis heute werden die Methoden untersucht, die axonale Transportmechanismen sichtbar machen, um Nervenfaserverbindungen zu eruieren, das sogenannte Tract-Tracing (Heimer und Robards 1981, Haber 1988, Ralston 1990, Friedman et al. 1991, Lanciego und Wouterlood 2000).

6.1 DT-MRI und PLI

In letzter Zeit erhielt außerdem die Methode der Diffusionstensorbildgebung (DT-MRI – Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging) zunehmende Bedeutung und wird als grundlegender Fortschritt auf diesem Gebiet angesehen. Diese Methode basiert auf der bevorzugten Diffusion von Wasser entlang der Nervenfasern, während die Diffusion senkrecht dazu limitiert ist, obwohl die genauen Determinanten der Richtungsabhängigkeit nicht bekannt sind (Douek et al. 1991, Le Bihan et al. 1993, Coremans et al. 1994, Mori und Barker 1999). Da die Diffusionstensorkarten auf Anisotropie beruhen und eben diese Anisotropie auch die Effekte der weißen Hirnsubstanz bei der Polarisationsmikroskopie hervorrufen, ist ein weiterer Vergleich dieser beiden Methoden unabdingbar. Eine weitere Validierung der DT-MRI ist auch in der Literatur mehrfach gefordert worden (Mori und van Zijl 2002, Mazziotta et al. 2001), denn weitgehende Untersuchungen auf diesem Gebiet fehlen bis heute (Ciccarelli et al. 2007) oder beziehen sich auf spezielle Patientengruppen (Ducreux et al. 2006, Voss et al. 2006).

Die Interpretation der diffusionsgewichteten Bilder bezog sich bisher hauptsächlich auf grobe anatomische Atlanten und die Hauptfaserbahnen (Makris et al. 1997). Mit der Methode der PLI konnte gezeigt werden, dass sich mittels digitaler Prozessierung des polarisierten Lichtes Faserorientierungskarten von einer weit höheren Auflösung ergeben, welche kleinere Faserstrukturen abbilden.

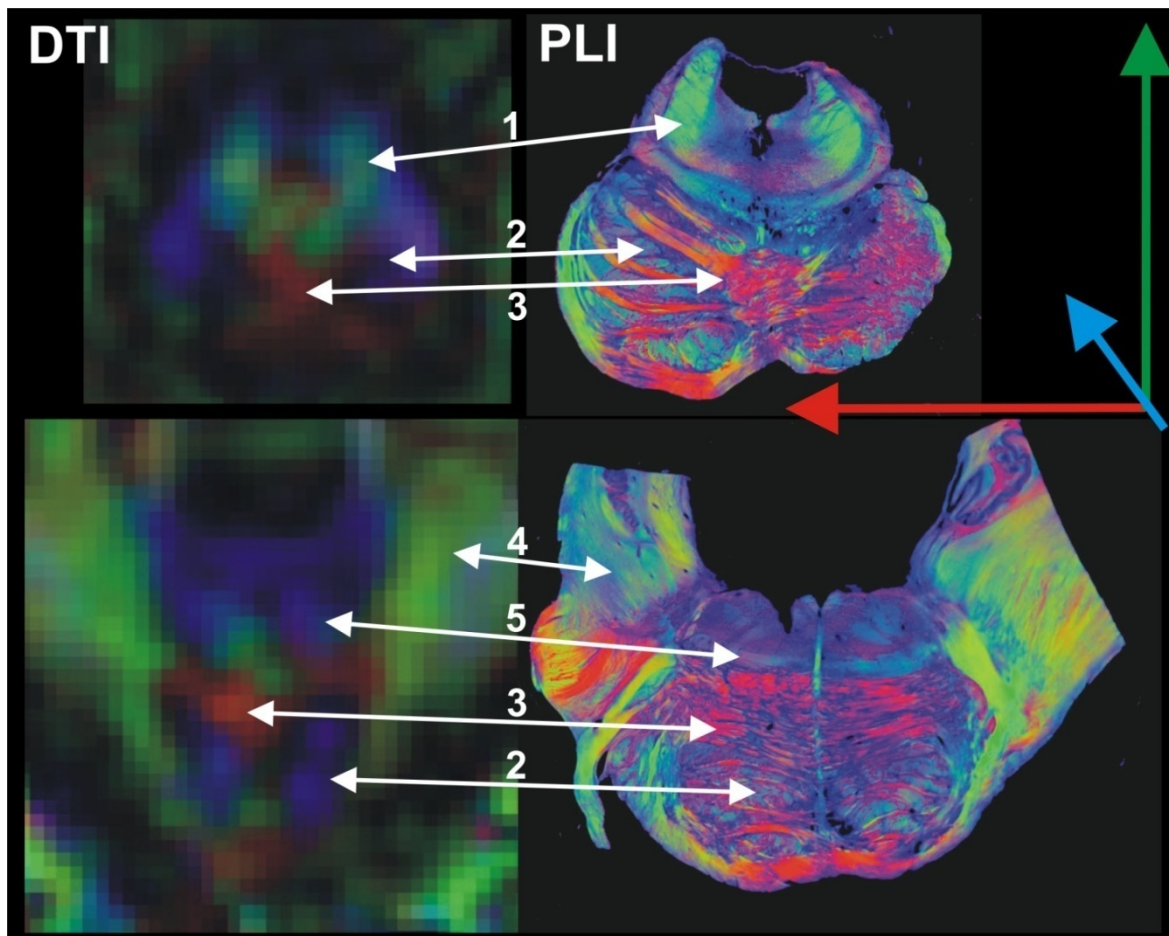


Abbildung 33:

DT-MRT Farbkarten (1,5 – T – MRT) werden auf der linken Seite gezeigt und die Farbkarten der Polarisationsoptik auf der rechten. Beachte die höhere Auflösung der Darstellung mit der Polarisationsoptik. Jedoch werden Gemeinsamkeiten der Identifikation von verschiedenen Faserbahnen ersichtlich. 1–Pedunculus cerebellaris superior, 2–Fasern der Pyramidenbahn, 3–Fibrae transversae pontis, 4–Pedunculus cerebellaris medius, 5–Lemniscus medialis, DTI–Diffusion Tensor Imaging, PLI–Polarized Light Imaging. Die farbliche Kodierung der Faserorientierung entspricht den Pfeilen der Legende: Fasern, die von rechts nach links verlaufen stellen sich rot dar, von oben nach unten grün und in die Tiefe des Präparates entsprechend blau.

Auch wenn die Auflösung stetig verbessert wird, so ist sie jedoch zur Zeit mit einer Auflösung unter Nutzung eines MR-Standardequipments (1,5 – Teslagerät) von

$(1 - 5 \text{ mm})^3$ (Mori und van Zijl 2002) sehr grob, wenn eine Zielauflösung von $(10 \text{ }\mu\text{m})^3$ angestrebt wird, um die Faserarchitektur eindeutig anzeigen zu wollen (Keyserlingk und Schramm 1984). Veranschaulicht wird diese Problematik anhand Abbildung 33, in der DT-MRT und Polarisationsoptik jeweils farbkodiert miteinander verglichen werden.

Für eine höhere Auflösung existieren zwar aufwendige Spezialgeräte, die teilweise mit bis zu 9,4 Tesla arbeiten und im besten Fall eine maximale Auflösung von $(39 \times 47 \times 47 \text{ }\mu\text{m})^3$ erzeugen können (Mori et al. 2001). Diese setzen aber eine sehr lange Scanperiode von letztlich sehr kleinen Proben voraus, die eine in-vivo-Diagnostik am Menschen unmöglich macht und auf postmortem Gewebe oder Tierexperimente zurückgreifen muss.

Demgegenüber zu stellen ist die Methode der Polarized Light Imaging (PLI). Unter Ausnutzung der doppelbrechenden Eigenschaften der Faserstrukturen im Hirn, ist mit einer Polarisationsoptik und einer hoch auflösenden Digitalkamera insgesamt eine sehr viel höhere Bildauflösung in diesem Fall $(60 \times 60 \times 100 \text{ }\mu\text{m})^3$ zu erreichen. Die Konsequenz daraus sind aussagekräftigere Bilder, die eine genauere Unterscheidung von einzelnen Faserstrukturen ermöglichen, da diese durch die höhere Auflösung erst unterscheidbar werden. Eine optimale Annäherung an die geforderte $10 \text{ }\mu\text{m}^3$ – Auflösung ist auch mit dem vorliegenden Aufbau nicht erreicht worden. Für eine Validierung der DT-MRI ist sie zunächst jedoch als ausreichend anzunehmen.

Es existieren verschiedene Faktoren, welche zu einer Verbesserung der bisherigen Auflösung führten. Die optimale Dicke der Hirnschnitte liegt im vorliegenden Aufbau bei $100 \text{ }\mu\text{m}$. Bei einer höheren Dicke größer als $120 \text{ }\mu\text{m}$ interferieren die Polarisationseffekte zu sehr. Unter einer Dicke von $80 \text{ }\mu\text{m}$ ist die Lichtintensität zu gering, um aus der Funktion der Intensitätsmaxima einen reliablen Wert zur Abschätzung der Faserneigung zu errechnen (Axer et al. 2001). Daraus leitet sich die Möglichkeit ab, eine monochromatische und intensivere Lichtquelle zu nutzen, um die Schnittdicke reduzieren zu können. Die Benutzung einer anderen Schnittdicke der Präparate setzt aber die Kalkulation einer unterschiedlichen, Dicke – spezifischen Kalibrierungsfunktion voraus. Es konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise und mit zusätzlicher Verwendung einer mikroskopischen Vergrößerung (z. B. Metripol – System) Präparate mit einer Schnittdicke von $20 \text{ }\mu\text{m}$ zu digitalisieren wären. Herausgestellt hat sich, dass die Bearbeitung und Schnittdarstellung am Kryostaten

bei einer Schnittdicke von 20 µm nicht ausreichend durchführbar ist. Der Informationsverlust durch Verformung und anschließende Registrierung der einzelnen Schichten hebt den zusätzlichen Gewinn an Auflösung durch eine systematische Ungenauigkeit und Verzerrung wieder auf (Larsen et al. 2007). Außerdem gestaltet sich die mikroskopische Erfassung größerer Präparate (ganzer Hirnschnitte) schwierig.

Zur Lösung dieses Problems könnte eventuell die Entwicklung einer Auflichtvariante beitragen, anstatt eines hier benutzten Durchlichtaufbaues. In diesem Fall könnte noch am Kryostaten die Digitalisierung stattfinden und die Registrierung überflüssig machen. Auf diese Weise wäre eine Zielauflösung von $(10\text{ }\mu\text{m})^3$ denkbar und damit in einem Bereich, der von der DT-MRI in naher Zukunft wahrscheinlich nicht zu erreichen ist.

Abbildung 34 zeigt einen menschlichen Hirnstammschnitt, welcher mittels PLI erstellt wurde. Dieser wurde nicht mit der in dieser Studie üblichen Kamera-Auflösung von $64 \times 64\text{ }\mu\text{m}$ aufgenommen, sondern mit einer weit höheren Auflösung, die durch die Nutzung eines Mikroskops und der Erfassung von einzelnen Bildausschnitten, die sekundär wieder zu einem Gesamtbild zusammengesetzt wurden, erreicht wurde. Es wird zwar deutlich, dass mit dieser Ausnutzung der technischen Möglichkeiten eine höhere Detailgenauigkeit erzielt wird, jedoch das Aufkommen eines Vielfachen der Datenmenge ($\sim 1\text{ MB}$ vs. $\sim 12\text{ MB}$) zu einer deutlichen Erhöhung der Bildverarbeitungszeit geführt hätte. Diese stand in keinem Verhältnis zum Erkenntnisgewinn und führte zudem an die Leistungsgrenzen des zur Verfügung stehenden PCs.

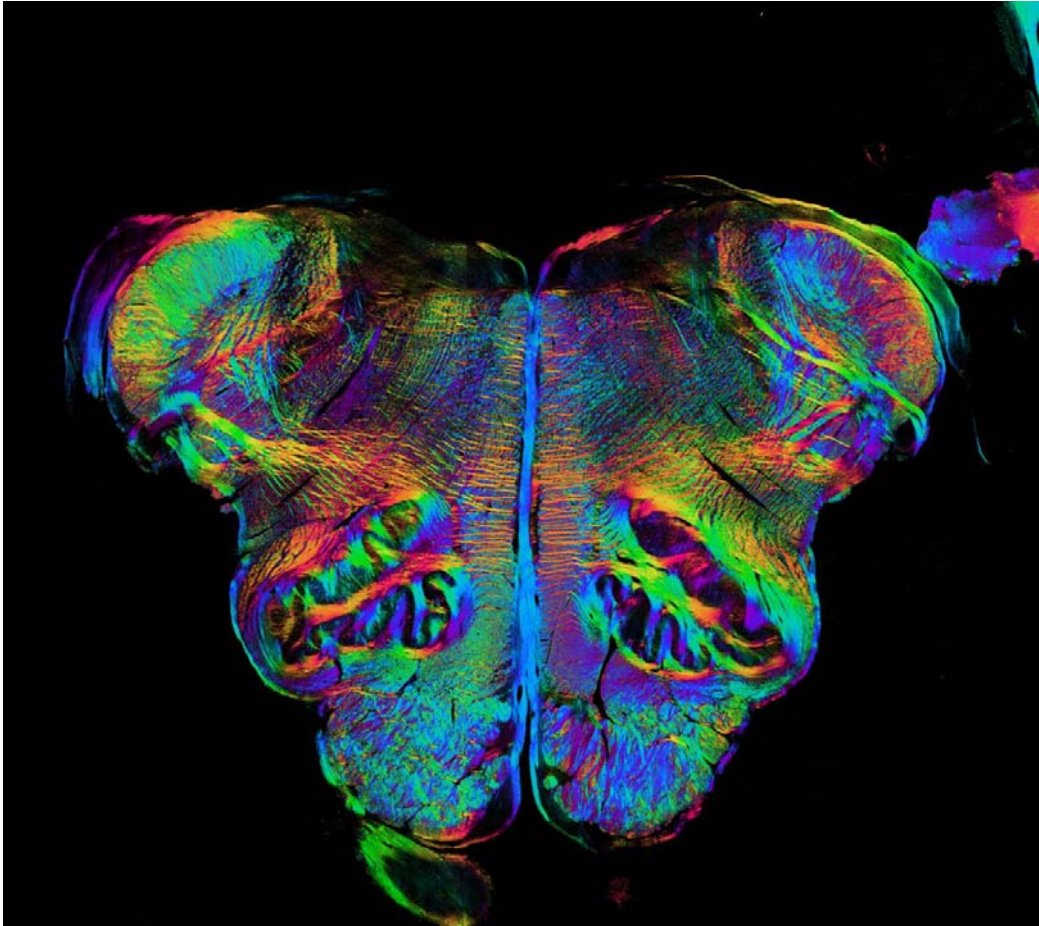


Abbildung 34:

Buntkodierte Faserorientierungskarte eines menschlichen Hirnstammschnittes auf Höhe der Oliven mittels PLI erstellt (3840 × 3413 Pixel)

Neben der Auflösung der verschiedenen Methoden der Darstellung der weißen Hirnsubstanz spielen noch weitere Eigenschaften eine Rolle bei deren Bewertung.

Als eine spezielle Wichtung in der Technik der Magnetresonanztomografie profitiert auch die DT-MRI von den Vorteilen dieser Methode: Nicht invasiv, in vivo Untersuchung möglich, keine Strahlenbelastung und beliebig wiederholbar (Rye 1999). Speziell in dem Rahmen der DT-MRI beinhaltet sie auch eine intrinsische Dreidimensionalität und ein Referenzkoordinatensystem. Zwar sind postmortem Analysen möglich (Ahrens et al. 1998, Mori et al. 2001, Englund et al. 2004). Diese lassen sich aber aufgrund der abnehmenden Wasserdiffusion (Sun et al. 2003) eingeschränkt oder gar nicht beurteilen (Pfefferbaum et al. 2004, Kier et al. 2004). Das Hauptaugenmerk liegt letztendlich in der klinischen Verwendbarkeit und diagnostischen Wertigkeit am Lebenden, der Detektion von Veränderungen bei einer Krankheit, anatomischen Normvarianten und unentdeckten Pathologien.

Des Weiteren können von derselben Stichprobe oder demselben Patienten Verlaufsuntersuchungen gemacht werden, die wiederum den Verlauf einer bestimmten Veränderung anzeigen, z. B. im Sinne einer fortschreitenden Pathologie (Diffusionsverlust bei de- / dysmyelinisierenden Erkrankungen, Altersdegeneration). Eventuelle Regenerationen oder Entwicklung und Reifung sind ebenfalls darstellbar.

Im Gegenteil dazu zeigt sich die Verwendbarkeit der PLI. Die Benutzung der Polarisationsoptik ist nur mit fixiertem Gewebe möglich. Eine klinische Anwendbarkeit entfällt daher.

Ein weiterer Nachteil der Polarisationsoptik liegt in der physikalisch-optischen Grundlage der Technik. Obwohl die PLI im Präparat die Faserorientierung in der Präparatebene und die Neigung senkrecht zur Schnittebene bestimmen kann, ist diese Abschätzung der dreidimensionalen Orientierung nicht vollständig erreicht. Das Problem stellt sich in der Form dar, dass für einige Abschätzungen der Neigungen zwei mögliche dreidimensionale Orientierungen existieren, die mit der vorangegangenen Messung übereinstimmen. Dies offenbart sich am deutlichsten für intermediäre Neigungen um 45° , bei denen die denkbaren dreidimensionalen Orientierungen um 90° auseinander liegen. Für Fasern in der Ebene des Präparates oder senkrecht zu diesem besteht keine Zweideutigkeit.

Diese mangelnde Eindeutigkeit ist für den Fall tolerabel, wie die Resultate der PLI von einer Schicht, einem einzelnen Präparat, betrachtet werden. Es wird jedoch problematisch, wenn aus multiplen Schichten ein dreidimensionales Volumen zusammengesetzt werden soll. In einem solchen Fall ist es das Ziel, eine umfassende dreidimensionale Anordnung einer dreidimensionalen Faserorientierung zu generieren, um eine Faserverfolgung zu initiieren.

Um die Zweideutigkeit der Neigung zu beheben, muss in jeder Lokalisation zwischen den beiden Möglichkeiten entschieden werden. Eine Methode, diese Entscheidung zu lenken, wurde von (Larsen und Griffin 2004) postuliert. Eine Lösung des Problems konnte jedoch auch durch diese Arbeit nicht abschließend erreicht werden.

Eine weitere Analyse dieser Zweideutigkeit zeigt zwar, dass sich diese fehlende Bestimmtheit als überall vorhanden herausstellte, jedoch neben einer Reihe von uneindeutigen Fasern auch ausreichend solche Fasern laufen, deren Neigung hinreichend bestimmt werden kann. Daher ist es möglich, durch neuroanatomische

Expertise „manuell“ eine Entscheidung des Faserverlaufes herbei zu führen. Aber auch diese Expertise kann als fehlerbehaftet betrachtet werden.

Nichtsdestotrotz kann die PLI Faserorientierungskarten für jedes einzelne Pixel automatisch erzeugen. Die Orientierung der Teilfasern kann helfen, die Faserbahnen zu identifizieren (Axeur und Keyserlingk 2000).

Ein Arbeitsschritt bei der Erstellung des dreidimensionalen Fasermodells ist die Segmentierung. Im vorliegenden Fall wurde die Pyramidenbahn auf beiden Seiten segmentiert. Konkret wurde im 3D-Slicer mit einer speziellen Funktion „Draw“ (Zeichnen) manuell die entsprechende Pyramidenbahnstruktur als Polygon umfahren. Das Programm erstellt dann aus diesen umfahrenen Pixeln ein Volumen, denn beim Einlesen der einzelnen Datensätze wird in den Einstellungen jedem Datensatz / Hirnschnitt eine Schichtdicke zugeordnet, in diesem Fall die tatsächliche Schnittdicke von 100 µm. Nach dem Fertigstellen eines Datensatzes wurde der jeweils nächste aufgerufen und auf gleiche Weise verfahren. Auf Höhe der Medulla oblongata gestaltete sich dieser Arbeitsschritt als leicht praktikabel, weil hier die Pyramidenbahn als kompaktes Faserbündel eindeutig detektierbar ist. Schwierig wurde diese Aufgabe zunehmend auf Höhe des Pons. Hier verzweigen sich die Fibrae corticospinales deutlich und erschweren die Segmentierung. Es stellte sich die Frage der Automatisierung dieser Arbeitsschritte. Zudem wäre eine digitale Erkennung der Faserstrukturen oder deren Abhebung von den umliegenden Strukturen (Nuclei pontis, Fibrae pontis transversae, etc.) wünschenswert gewesen. Sie wäre außerdem vom Bediener unabhängig. Die verschiedenen Einstellungen im 3D-Slicer – Ein-/Ausblenden, Kontrastierung, Kantenbetonungen, Farbzuzuordnung zu quantitativen Pixelwerten, etc. – und die Nutzung aller Informationen aus den Datensätzen zur Festlegung der Richtung und Neigung der Fasern im Präparat (im 3D-Slicer können beide Datensätze gleichzeitig eingelesen und über die Ein- / Ausblenden-Funktion sichtbar gemacht werden) haben dies jedoch nicht möglich gemacht. Bei dem Versuch, z. B. der rechtsseitigen Pyramidenbahn in der Medulla oblongata oder den rechtsseitigen Fibrae corticospinales in der Pons eine bestimmte Farbe zuzuordnen, erschienen andere, definitiv nicht zu diesen Strukturen zuzählende Elemente, in der gleichen Farbe. Dies könnte zum einen mit der oben beschriebenen Doppeldeutigkeit der Neigung zusammenhängen. Zudem könnte dies

auf Strukturen hinweisen, die in direkter Nachbarschaft zu den vakanten Fasern eine gleiche Richtung und um 90° verschiedene Neigung aufweisen. Zum anderen ist hier auf die Tatsache zu verweisen, dass das menschliche Gehirn nicht aus strikt parallel verlaufenden Fasern besteht, sondern aus durchflochtenen, durchwachsenen und eingesprengten Fasern (Axer et al. 2000). Die Winkel der Faserorientierung sind demnach ein Summationseffekt aus allen in einem Volumenelement vorhandenen Fasern, repräsentiert als Pixel, solange die Auflösung nicht derart hoch gewählt ist, dass jedes einzelne Faserbündel als solches sichtbar gemacht werden kann. Eine Automatisierung und Vereinfachung der Segmentierung durch optische Auswahl im Sinne einer Region of interest (ROI) war nicht praktikabel. Die Segmentierung erfolgte vielmehr nach histologischen Gesichtspunkten und basierte damit größtenteils auf der neuroanatomischen Expertise der bearbeitenden Person. In Zweifelsfällen wurden bereits bestehende neuroanatomische Werke als Grundlage genommen, um die Abgrenzung gegenüber Nachbarstrukturen vorzunehmen. Bei fraglichen Entscheidungen wurde außerdem die segmentierte Struktur über die nächstfolgenden Schnitte verfolgt und somit sichergestellt, dass diese tatsächlich zu der gesuchten Pyramidenbahn oder aber zu einer lokalen anderen Struktur gehört.

Eine weitere Schwierigkeit stellte sich auf Höhe der Crura cerebri heraus. Hier war eine Unterscheidung der Fibrae temporopontinae, corticospinales, corticonucleares und frontopontinae und demnach eine Segmentierung der Pyramidenbahn als solche nicht mehr ausführbar. Hier wurde die Segmentierung auf die Crura cerebri als Ganzes beschränkt, um eine Vergleichbarkeit und Konsequenz in der Darstellung zu erhalten.

6.2 Volumina

Die Hauptaussagen aus der Berechnung der Volumina der segmentierten Hirnstammpräparate sind:

- Volumenabnahme der Pyramidenbahn mit zunehmendem Alter
- starke interindividuelle Variabilität
- fehlende Unterschiede zwischen rechter und linker Hirnhälfte.

Es sei noch erwähnt, dass durch die Schwierigkeit der Segmentierung auf Höhe der Crura cerebri (s. o.) ein systematischer Fehler begangen wurde, der zu einem verfälschten, hohen Volumen führt, im Vergleich zum tatsächlichen. Dieses konnte aufgrund der fehlenden makroskopischen respektive mikroskopischen Unterscheidbarkeit der Fibrae nicht bestimmt werden. Im vorliegenden Volumen sind Fibrae temporo-pontinae, cortico-spinale, cortico-nucleares und fronto-pontinae vollständig eingeschlossen. Das isolierte Volumen der Pyramidenbahn konnte in diesem Bereich nicht gemessen werden. Es ist jedoch neben den Nicht – Pyramidenbahnfasern Teil des Volumens. Das Volumen der Nicht – Pyramidenbahnfasern ist als feste Größe bei jedem der Gehirne addiert worden. Als systematischer Fehler sollte sich diese Größe jedoch nicht auf die Grundaussage der Ergebnisse auswirken.

Bei der Pyramidenbahn handelt es sich um einen Teil der weißen Substanz des menschlichen Gehirns. Bereits einige andere Autoren haben sich mit den altersbedingten morphologischen Veränderungen des Gehirns auseinandergesetzt (Raz et al. 1997, Lim et al. 1992, Pfefferbaum et al. 1994, Ge et al. 2002, Courchesne et al. 2000, Bartzokis et al. 2001). Diese erheben ihre Daten ausnahmslos durch die Verwertung von MRT-Studien und beziehen sich zumeist auf Großhirnschnitte und nicht, wie in dieser Arbeit, speziell auf den Hirnstamm.

Einige der genannten Autoren kommen zu ähnlichen Ergebnissen wie diese Studie. Sie postulieren ebenso eine signifikante Volumenabnahme der weißen Substanz im hohen Alter (Courchesne et al. 2000, Bartzokis et al. 2001, Ge et al. 2002). Andere wiederum können diese Annahme nicht unterstützen und sprechen von einem konstanten Volumen bzw. von einer nicht signifikanten Abnahme (Lim et al. 1992, Raz et al. 1997, Sullivan et al. 1995, Passe et al. 1997, Jernigan et al. 1991). Ein Vergleich der verschiedenen Arbeiten muss kritisch erfolgen. In den erwähnten Studien waren entweder die gesamte weiße Substanz oder einzelne Gehirnregionen nicht jedoch der Hirnstamm Gegenstand der Messungen. Ein weiteres Problem der Vergleichbarkeit liegt auch darin, dass in den genannten Studien das mittlere Alter deutlich niedriger lag als in unserer Untersuchung. So liegt das mittlere Alter der älteren Proben in der Studie von Lim und Kollegen (Lim et al. 1992) lediglich bei 72,5 Jahren (in unserem Kollektiv bei 80,2 Jahren und der Median bei 84 Jahren). In den

anderen Arbeiten liegt das Alter noch weit darunter, wie beispielsweise mit 46,5 Jahren bei Raz und Kollegen (Raz et al. 1997).

Bei der Betrachtung der Variabilität sind die Ergebnisse jedoch eindeutig. Liegen die einzelnen Pyramidenbahnvolumina (rechts) von Gehirn 1 und 3 (der segmentierten Gehirne) um 213 % auseinander, sind Unterschiede von bis ca. 300 % in z. B. der inferioren parietalen weißen Substanz keine Ausnahme (Raz et al. 1997).

Bezüglich der Rechts – Links – Asymmetrie können keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden, was sich nicht mit entsprechenden Literaturangaben deckt, in denen ein Rechts – Links – Unterschied nachgewiesen werden konnte (Rademacher et al. 2001, Hatta 2007).

6.3 Alternativmethoden

Alternativmethoden in der Beschreibung von Faserorientierungen und der weißen Hirnsubstanz existieren, sind jedoch aus heutiger Sicht zu vernachlässigen. Sie sind beispielsweise bei speziellen Anwendungen wie der Stereotaxie zu verwenden oder dienen der Weiterentwicklung der DT-MRI. Als alleinige Methode zur Beschreibung der Hirnsubstanz wurden sie nicht entwickelt.

Die Möglichkeit der Impedanzmessung erlaubt eine Unterscheidung von grauer und weißer Hirnsubstanz (Axer et al. 1999, Johansson et al. 2009) und wird in erster Linie als zusätzliches Instrument in der neurochirurgischen Stereotaxie verwandt, um bei einer Nadelapplikation weitere Informationen über die Trajektorie zu erhalten. Diese dient der Schonung von Gewebe, welches auf dem Weg der Trajektorie zu tiefer liegenden Strukturen durchstoßen wird. Insgesamt hat diese Methode jedoch eher qualitativen Charakter und beansprucht durch die Invasivität ihren Stellenwert in der Stereotaxie bei neurochirurgischen Eingriffen, wie der Thermokoagulation oder elektrischen Stimulation über einen Schrittmacher bei Krankheitsbildern wie Epilepsie und Morbus Parkinson.

Eine weitere Annäherung an diese Thematik publizierten Tuch und Kollegen (Tuch et al. 2001). Sie postulierten einen engen Zusammenhang vom Tensor der elektrischen Leitfähigkeit und dem Diffusionstensor der DT-MRI. Mit der Messung von elektrischen Strömen, die wiederum mittels Elektroenzephalografie (EEG) oder

Magnetoenzephalografie (MEG) elektromagnetische Felder erzeugen, sind Aussagen über die räumliche, dreidimensionale Anordnung der zugrunde liegenden Gewebe möglich. Zusammenfassend werden diese Techniken von den Autoren als ESI – Electromagnetic Source Imaging bezeichnet.

Ein wissenschaftlicher Fortschritt ist durch die Weiterentwicklung der DT-MRI zur so genannten DSI – Diffusion Spectrum Imaging zu erwarten. Unter Nutzung von neuen Untersuchungsprotokollen und Wellenlängen kann über die spektrale Beschreibung des Diffusionskoeffizienten eine Detektierung der weißen Substanz und deren Fasern erfolgen. Durch die Betrachtung jedes einzelnen Voxel soll die für die Unterscheidung von Faserstrukturen notwendige Auflösung erreicht werden. (Does et al. 2003, Chen et al. 2004).

6.4 Ausblick

Abschließend stellt sich die Frage der zukünftigen Forschung auf diesem Gebiet. Nach der Vorliegenden Auswertung stellt die PLI keine Methode dar, die mit der DT-MRI konkurrieren kann. Dies liegt zum einen an der fehlenden klinischen Anwendbarkeit, zum anderen an der fehlenden Flexibilität und der nicht vorhandenen Möglichkeit, die Untersuchung zu wiederholen. Dennoch hat die PLI als ergänzende Methode zur DT-MRI ihren Stellenwert bei der Differenzierung von Faserorientierungen und kann für weitere Untersuchungen verwendet werden. Bei folgenden Analysen von Asymmetrien der weißen Substanz und bei interindividuellen Vergleichen bezüglich Alter und Geschlecht kann sie einen Beitrag leisten. Zudem zeigen Ansätze in der Ausweitung der Methode auf Großhirnstrukturen gute Ergebnisse. Mit der Methode der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) wurden die Ergebnisse validiert. Abbildung 35 zeigt eine Serie der Faserorientierungskarten und Abbildung 36 den Vergleich zu entsprechenden MRT-Sequenzen. Hier bestätigt sich, dass die PLI auch im Großhirn entsprechende Faserstrukturen beschreiben kann und analog zum Hirnstamm eine Validierung der DT-MRI möglich ist.

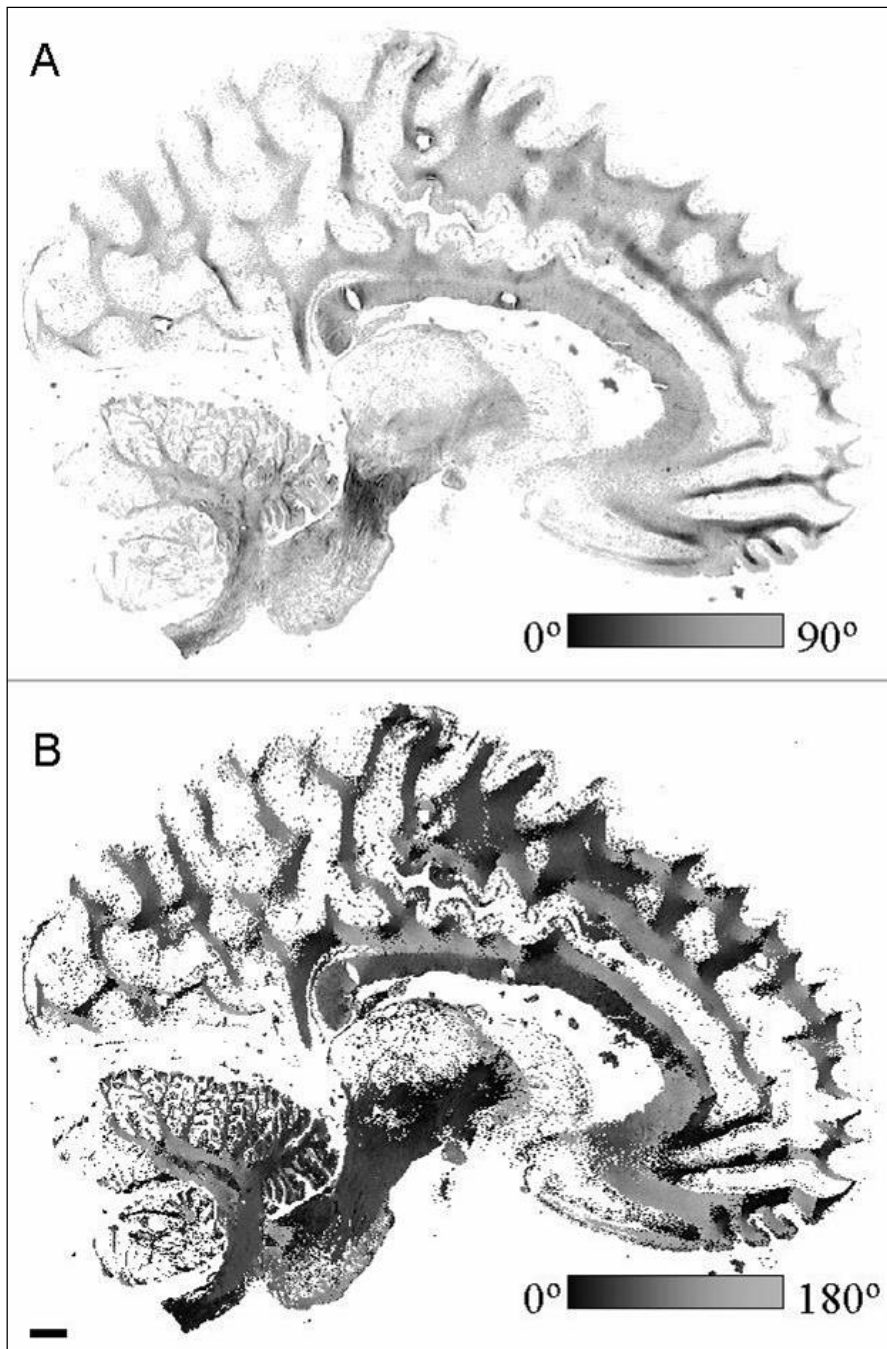


Abbildung 35:

Faserorientierungskarten eines kompletten Gehirnschnittes. Skala: 10 mm. A-Neigungskarte. B-Richtungskarte.

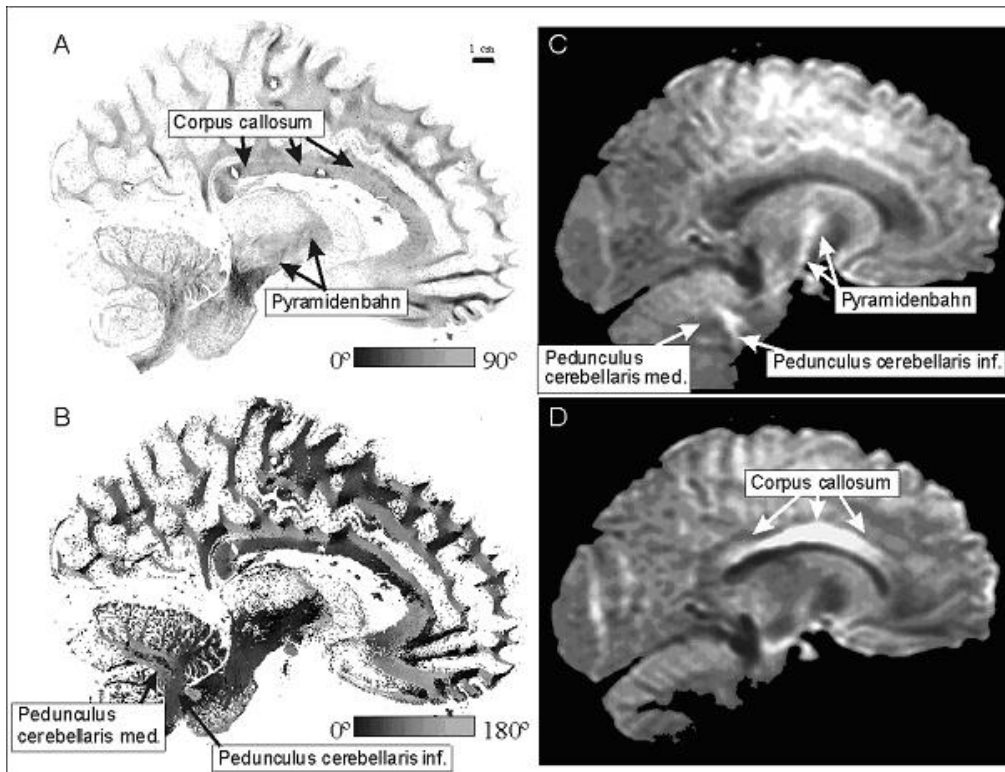


Abbildung 36:

Links: Faserorientierungskarten eines kompletten Gehirnschnittes. Skala: 10 mm. A-Neigungskarte. B-Richtungskarte.

Rechts: Faserorientierungskarten in vivo mittels DT-MRT. In C sind die superior-inferior verlaufenden Fasern gewichtet und in D die von rechts nach links verlaufenden Fasern.

Abbildung 35 zeigt einen sagittalen Schnitt, der nahe an der Mediansagittal-Achse liegt. Die Gebiete der grauen Substanz bleiben weiß, während die Gebiete die reich an myelinisierten Fasern sind, entsprechend den Grauwerten Grauwert – kodiert sind. Deutlich sichtbar ist das Corpus callosum, auf Höhe des Cerebellums die Kleinhirnstiele (Pedunculus cerebelli medius und Pedunculus cerebelli inferius) und die Capsula interna, die sich in den Pedunculus cerebri hinein fortsetzt.

In einem weiteren Schritt müssen die fehlenden, noch nicht segmentierten Strukturen des Hirnstamms vervollständigt werden, was die eigentliche Generierung des Atlas erlaubt. Darauf basierend sind schließlich Aussagen über die Validierung der DT-MRI und den zusätzlichen Erkenntnisgewinn möglich. Zudem werden nach Abschluss der vollständigen Segmentierung weitere Aussagen über Geschlechtsunterschiede und Asymmetrien möglich sein. Vorliegende Ergebnisse bestätigen die hohen intra- und interindividuellen Unterschiede.

Die weiteren Fortschritte der DT-MRI sind nicht vorhersagbar. Die Übertragbarkeit der Beschreibung der weißen Substanz für das Großhirn auf die Hirnstammdarstellung wird zu überprüfen sein. Eine Auflösung von $(2,5 \text{ mm})^3$ als Richtwert für die nicht experimentelle, sondern klinische Standard-Untersuchung kann schlussendlich nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen führen. Hierzu sind die zu beschreibenden Strukturen zu klein und die klinische Relevanz von Läsionen auf Hirnstammniveau zu groß. Auf Basis möglicher weiterer Forschung könnte die reliable Zuordnung von Pathologien zunächst der großen Faserstrukturen ermöglicht werden. Abbildung 37 zeigt eine derzeitige Studie von Epstein und Kollegen (Epstein et al. 2007), in der ein Mausgehirn zunächst einer DT-MRT-Untersuchung unterzogen und postmortem mit der Methode der PLI überprüft wurde. Die beschriebenen Ergebnisse zeigten eine hohe Übereinstimmung in der ermittelten Faserorientierung.

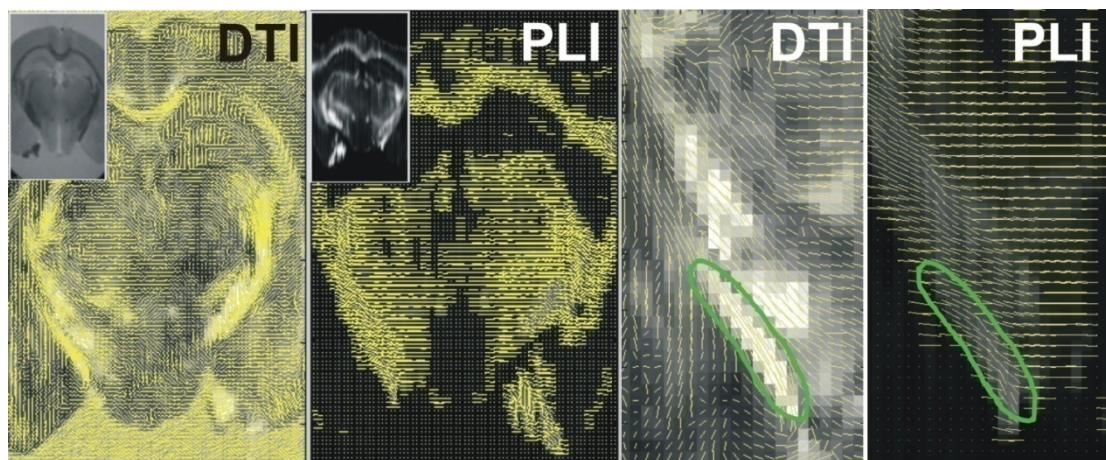


Abbildung 37:

Vergleich zwischen DT-MRT und PLI-Daten vom gleichen Mausgehirn: Die Faserorientierungen sind anhand von kleinen Pfeilen dargestellt. Die Vergrößerung auf der rechten Seite zeigt in der Markierung den Tractus opticus (Epstein et al. 2007).

Die PLI kann durch weitere Verbesserungen der eigenen Auflösung, Lösung des Problems der zweideutigen Neigung und durch eine Weiterentwicklung der Segmentierung (Automatisierung, digitale Nachverfolgung der Faserbahnen, etc.) ihre Wertigkeit als Validierungsmethode bestätigen. Eigentlich als Methode zur Bestimmung der Faserorientierung der weißen Substanz entwickelt, sind auch

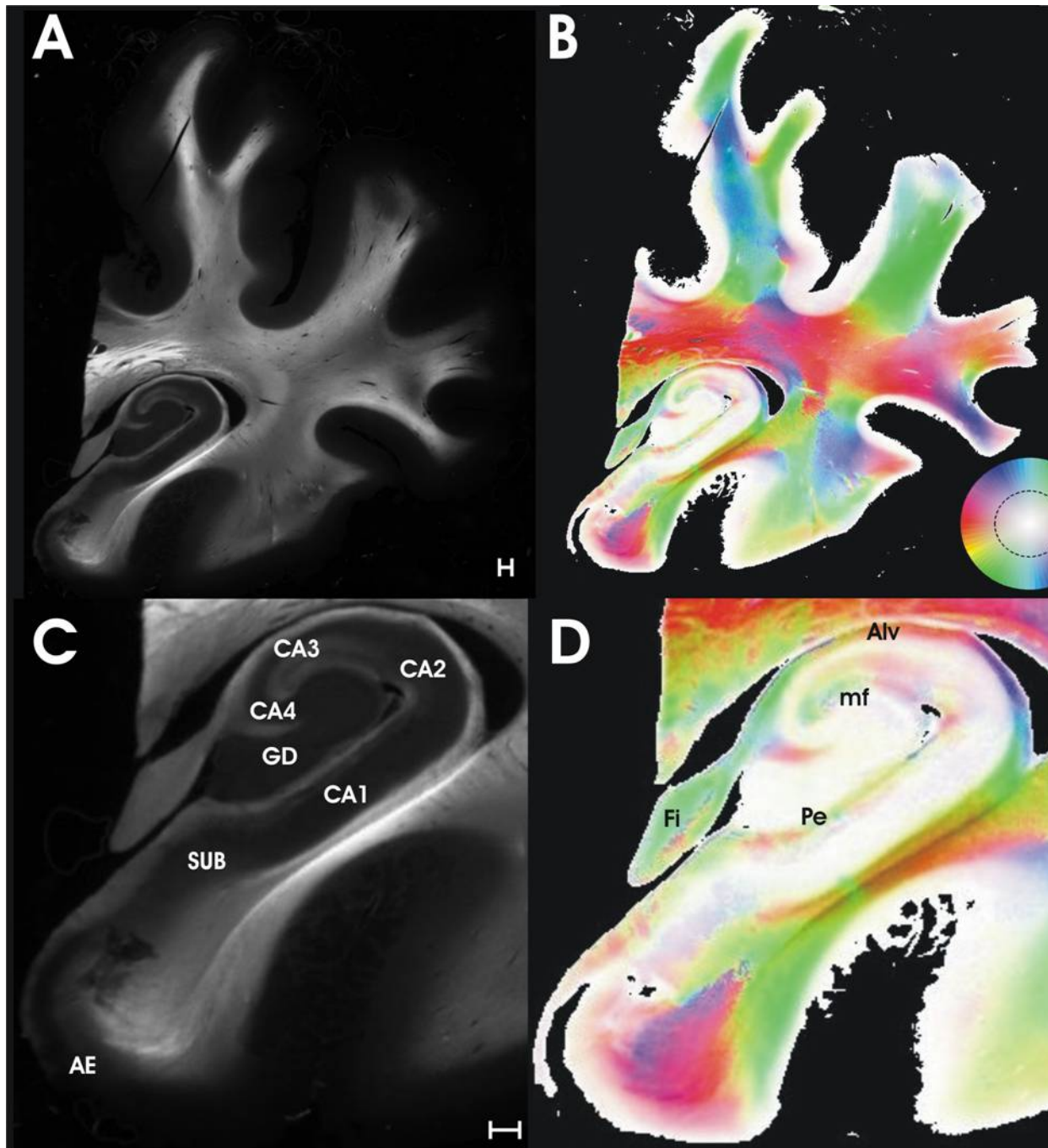


Abbildung 38:

Frontalschnitt durch einen menschlichen Temporallappen, welcher die Struktur des Hippocampus beinhaltet. A und C sind Maximumintensitätskarten und zeigen die maximale Lichtintensität der Polarisationssequenz. B und D sind farbcodierte Faserorientierungskarten mit einer Farbkodierung für die Faserrichtung und einer Farbsättigungskodierung für die Faserneigung. Der gestrichelte Kreis in der Legende bildet annähernd die 45° -Neigung ab. Fasern, die steiler verlaufen, sind nur noch sehr blass koloriert. AE – enthorinaler Kortex/Gyrus parahippocamcalis, SUB–Subiculum, GD–Gyrus dentatus, CA1–CA4–Felder des Hippocampus, Pe–Tractus perforans, mf–Moosfasern, Alv–Alveus, Fi–Fimbria hippocampi (Beginn des Fornix). Skala: 1 mm

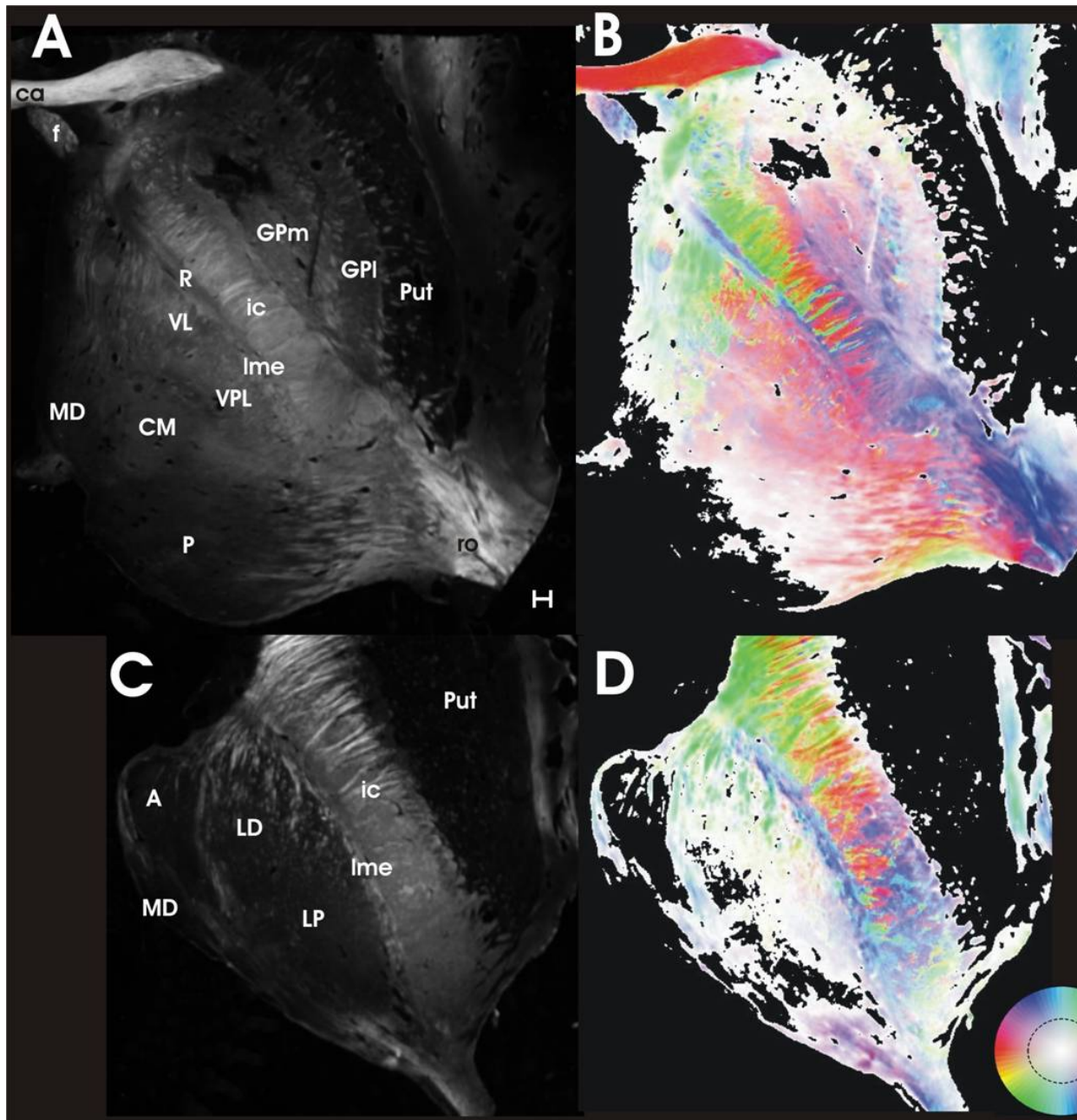


Abbildung 39:

Horizontalschnitt durch einen menschlichen Thalamus. A und C sind Maximumintensitätskarten. B und D sind farbcodierte Faserorientierungskarten mit einer Farbkodierung für die Faserrichtung und einer Farbsättigungskodierung für die Faserneigung. ca–Commissura anterior, ic–capsula interna, f–Fornix, lme–Lamina medullaris externa, ro–Radiatio optica/Sehstrahlung, GPM–Globus pallidus med., GPI–Globus pallidus lat., Put–Putamen, A–Ncl. (Nucleus) anterior, CM–Ncl. centromedianus, LP–Ncl. lateralis posterior, MD–Ncl. mediodorsalis, P–Pulvinar, R–Ncl. reticularis, VL–Ncl. ventralis lateralis, VPL–Ncl. ventralis posterolateralis. Skala: 1 mm.

nähere Untersuchungen der grauen Substanz mit dieser Methode durchführbar, wie die folgenden Abbildungen vermuten lassen. In den Beispielen der Abbildungen 38 und 39 sind Thalamus und Hippocampus zu erkennen. Die detailgetreuen

Darstellungen lassen eine analoge Anwendbarkeit wie beim Hirnstamm auf Großhirnstrukturen vermuten. Wie voranstehend erwähnt, sind komplette Hirnschnitte der Bearbeitung mittels PLI zugänglich, aber auch gezielte Strukturen wie der Hippocampus und die Thalami.

Die oben gezeigten Thalamusschnitte stammen von denselben 18 Gehirnen wie die Hirnstämme und wurden im gleichen Arbeitsschritt bereits digitalisiert. Diese dienen einem Folgeprojekt und können in Zukunft über die Faserorientierung im Thalamus Ergebnisse liefern.

7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit ist es gelungen, die zur Verfügung stehenden 18 menschlichen Hirnstämme nach seriellem Schneiden mittels Polarisationsmikroskopie zu digitalisieren und entsprechender Aufarbeitung zu rekonstruieren respektive zu segmentieren. Die Möglichkeit der Darstellung von Faserstrukturen und deren Orientierung im Raum führte zu folgenden Schlussfolgerungen.

In einigen Vorstudien konnte die Anwendbarkeit der Methode im Einzelnen bereits belegt und die genaue Arbeitsweise festgelegt werden. In der histologischen Beurteilung von Geweben ist die Polarisationsmikroskopie schon über ein Jahrhundert etabliert. Diese kann in der Faserdarstellung als eigenständige Methode und Alternative angesehen werden. Insbesondere durch die weitaus höhere Auflösung im Vergleich zu den schnittbildgebenden Verfahren wie der Magnetresonanztomografie oder Positronen – Emissions – Tomografie ist das Polarized Light Imaging (PLI) als Validierungsmethode anzusehen, da entsprechende Nachweise nicht in hinreichender Form vorliegen.

Als derzeitige Standarduntersuchungstechnik in der Faserdarstellung von Gehirnstrukturen kann jedoch das Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging (DT-MRI) angesehen werden. Die DT-MRI wird hauptsächlich in der Analyse von Großhirnstrukturen und funktioneller Bildgebung verwendet. Mit der PLI ist die genaue Illustration der Hirnstammstrukturen möglich. Im Vergleich mit der DT-MRI ist bei der PLI nur eine post mortem Untersuchung durchführbar und nicht eine in vivo Diagnostik, die eine Wiederholung und gegebenenfalls notwendige Verlaufsuntersuchungen ermöglicht. Analog zur DT-MRI ist die Anwendbarkeit nicht auf die weiße Hirnsubstanz beschränkt. Eine Beschreibung der grauen Substanz scheint ebenso ausführbar zu sein. Es können Faserstrukturen, wie in diesem Beispiel die Pyramidenbahn, beschrieben werden. Zusätzlich sind Kerngebiete wie der Thalamus, Kortexstrukturen wie Hippocampus oder komplette Hirnschnitte untersuchbar. Ferner bestehen auch bei der PLI weitere Möglichkeiten der Weiterentwicklung und Automatisierung. Beispielsweise die Auflösung sowie die Genauigkeit der Darstellung lassen eine Verbesserung in weiteren Schritten erwarten, ebenso ist eine Automatisierung der einzelnen Arbeitsschritte wahrscheinlich.

Anhand der Analyse der bisher segmentierten Pyramidenbahn lassen sich einige Aussagen treffen. Mit zunehmendem Alter lässt sich eine signifikante Volumenabnahme der Pyramidenbahn feststellen. In der Literatur wurde eine Schrumpfung des Gehirns mit fortschreitendem Alter schon mehrfach beschrieben, eine spezifische Ausföhrung speziell für den Hirnstamm ist jedoch als neu anzusehen. Bestätigen lässt sich des Weiteren die starke interindividuelle Variabilität mit zum Teil sehr großen Abweichungen in den einzelnen Volumina der Pyramidenbahn. Überraschend sind abschließend die fehlenden Unterschiede zwischen rechter und linker Gehirnhälfte, die sich nicht mit der derzeitigen Literatur in Übereinstimmung bringen lassen. Die Einbindung der noch nicht segmentierten Hirnstämme in diese Thematik wird zu überprüfen sein.

Die beschriebenen Alternativmethoden sind lediglich für Spezialanwendungen nutzbar. Eine ebenso vielfältige Anwendbarkeit wie bei der DT-MRI und der PLI ist bei Elektroenzephalografie, Magnetenzephalografie, Impedanzmessung nicht erreicht. Das Diffusion Spectrum Imaging (DSI) als Weiterentwicklung der DT-MRI lässt einen Fortschritt erwarten. Aussichtsreich sind die Ergebnisse der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und die Weiterentwicklung der PLI unter Nutzung einer monochromatischen Lichtquelle sowie die Anwendung der maximal möglichen Auflösung.

8 Literaturverzeichnis

- Ahrens ET, Laidlaw DH, Readhead C, Brosnan CF, Fraser SE, Jacobs RE. 1998. MR microscopy of transgenic mice that spontaneously acquire experimental allergic encephalomyelitis. *Magn Reson Med*, 40 (1):119-132.
- Avoli M, Hwa GG, Kostopoulos G, Olivier A, Villemure JG. 1991. Electrophysiological analysis of human neocortex in vitro: experimental techniques and methodological approaches. *Can J Neurol Sci*, 18 (4 Suppl):636-639.
- Axer H. 2009. Lichtspektrum der Osramleuchtröhre Jena: Universität Jena.
- Axer H, Keyserlingk DG. 2000. Mapping of fiber orientation in human internal capsule by means of polarized light and confocal scanning laser microscopy. *J Neurosci Methods*, 94 (2):165-175.
- Axer H, Stegelmeyer J, Graf von Keyserlingk D. 1999. Comparison of tissue impedance measurements with nerve fiber architecture in human telencephalon: value in identification of intact subcortical structures. *J Neurosurg*, 90 (5):902-909.
- Axer H, Berks G, Keyserlingk DG. 2000. Visualization of nerve fiber orientation in gross histological sections of the human brain. *Microsc Res Tech*, 51 (5):481-492.
- Axer H, Axer M, Krings T, Keyserlingk DG. 2001. Quantitative estimation of 3-D fiber course in gross histological sections of the human brain using polarized light. *J Neurosci Methods*, 105 (2):121-131.
- Axer H, Leunert M, Murkoster M, Grassel D, Larsen L, Griffin LD, Graf v Keyserlingk D. 2002. A 3D fiber model of the human brainstem. *Comput Med Imaging Graph*, 26 (6):439-444.
- Bartzokis G, Beckson M, Lu PH, Nuechterlein KH, Edwards N, Mintz J. 2001a. Age-related changes in frontal and temporal lobe volumes in men: a magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*, 58 (5):461-465.
- Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. 1994. Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo. *J Magn Reson B*, 103 (3):247-254.
- Beaulieu C. 2002. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR Biomed*, 15 (7-8):435-455.
- Berger H. 1929. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Arch f Psychiatr* 87:527-570.
- Bohm C, Greitz T, Eriksson L. 1989. A computerized adjustable brain atlas. *Eur J Nucl Med*, 15 (11):687-689.
- Brodmann K. 1909. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Principien, dargestellt auf grund des Zellenbaues. Leipzig: Johann Ambrosius Barth Verlag.
- Chen J, Chen H, Yen C. 2004. High-Field MRI of Brain Activation and Connectivity. *Chinese Journal of Physics*, 42 (4-II):520-525.

- Ciccarelli O, Wheeler-Kingshott CA, McLean MA, Cercignani M, Wimpey K, Miller DH, Thompson AJ. 2007. Spinal cord spectroscopy and diffusion-based tractography to assess acute disability in multiple sclerosis. *Brain*, 130 (8):2220-2231.
- Coremans J, Luypaert R, Verhelle F, Stadnik T, Osteaux M. 1994. A method for myelin fiber orientation mapping using diffusion-weighted MR images. *Magn Reson Imaging*, 12 (3):443-454.
- Courchesne E, Chisum HJ, Townsend J, Cowles A, Covington J, Egaas B, Harwood M, Hinds S, Press GA. 2000a. Normal brain development and aging: quantitative analysis at in vivo MR imaging in healthy volunteers. *Radiology*, 216 (3):672-682.
- Damasio H. 1995. *Human brain anatomy in computerized images*. New York: Oxford University Press.
- Dandy W. 1918. Ventriculography following the injection of air into the cerebral ventricles. *Annals of Surgery*, 68 (1):5-11.
- de Campos Vidal B, Mello M, Caseiro-Filho A, Godo C. 1980. Anisotropic properties of the myelin sheath. *Acta Histochem*, 66 (1):32-39.
- Dejerine J. 1895. *Anatomie des centres nerveux*. Paris: Rueff et Cie.
- Does M, Parsons EC, Gore JC. 2003a. Oscillating gradient measurements of water diffusion in normal and globally ischemic rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, 49 (2):206-215.
- Douek P, Turner R, Pekar J, Patronas N, Le Bihan D. 1991. MR color mapping of myelin fiber orientation. *J Comput Assist Tomogr*, 15 (6):923-929.
- Dubin M, *Brodman Areas in the Human Brain with an Emphasis on Vision and Language* <http://spot.colorado.edu/~dubin/talks/index.html>.
- Ducieux D, Lepeintre JF, Fillard P, Loureiro C, Tadie M, Lasjaunias P. 2006. MR diffusion tensor imaging and fiber tracking in 5 spinal cord astrocytomas. *AJNR Am J Neuroradiol*, 27 (1):214-216.
- Englund E, Sjobeck M, Brockstedt S, Latt J, Larsson EM. 2004. Diffusion tensor MRI post mortem demonstrated cerebral white matter pathology. *J Neurol*, 251 (3):350-352.
- Epstein A, Axer H, Shimony J, Witte O, Wang Q, Snyder A, Song SK. 2007. Covalidation of anisotropy using polarized light microscopy and diffusion tensor imaging in white matter of a mouse. *Proc Intl Soc Mag Reson Med*, 15:822.
- Fraher J, MacConaill M. 1970. Fiber bundles in the CNS revealed by polarized light. *J Anat*, 106 (1):170.
- Friedman DI, Johnson JK, Chorsky RL, Stopa EG. 1991. Labeling of human retinohypothalamic tract with the carbocyanine dye, Dil. *Brain Res*, 560 (1-2):297-302.
- Ge Y, Grossman RI, Babb JS, Rabin ML, Mannon LJ, Kolson DL. 2002b. Age-related total gray matter and white matter changes in normal adult brain. Part I: volumetric MR imaging analysis. *AJNR Am J Neuroradiol*, 23 (8):1327-1333.

- Geyer S, Schleicher A, Zilles K. 1997. The somatosensory cortex of human: cytoarchitecture and regional distributions of receptor-binding sites. *Neuroimage*, 6 (1):27-45.
- Gimpel JA, Lahpor JR, van der Molen A-J, Damen J, Hitchcock JF. 1995. Reduction of reperfusion injury of human myocardium by allopurinol: A clinical study. *Free Radical Biology and Medicine*, 19 (2):251-255.
- Glazer AM, Lewis JG, Kaminsky W. 1996. An Automatic Optical Imaging System for Birefringent Media *Proc Math Phys Eng Sci*, 452 (1955):2751-2765.
- Göthlin G. 1913. Die doppelbrechenden Eigenschaften des Nervengewebes, ihre Ursachen und ihre biologischen Konsequenzen. Uppsala: Almqvist & Wiksell.
- Greitz T, Bohm C, Holte S, Eriksson L. 1991. A computerized brain atlas: construction, anatomical content, and some applications. *J Comput Assist Tomogr*, 15 (1):26-38.
- Haber S. 1988. Tracing intrinsic fiber connections in postmortem human brain with WGA-HRP. *J Neurosci Methods*, 23 (1):15-22.
- Haskell RC, Carlson FD, Blank PS. 1989. Form birefringence of muscle. *Biophys J*, 56 (2):401-413.
- Hatta T. 2007. Handedness and the brain: a review of brain-imaging techniques. *Magn Reson Med Sci*, 6 (2):99-112.
- Heimer L, Robards MJ. 1981. *Neuroanatomical tract-tracing methods*. New York: Plenum Press.
- Holmes CJ, Hoge R, Collins L, Woods R, Toga AW, Evans AC. 1998. Enhancement of MR images using registration for signal averaging. *J Comput Assist Tomogr*, 22 (2):324-333.
- Jernigan TL, Archibald SL, Berhow MT, Sowell ER, Foster DS, Hesselink JR. 1991. Cerebral structure on MRI, Part I: Localization of age-related changes. *Biol Psychiatry*, 29 (1):55-67.
- Johansson JD, Blomstedt P, Haj-Hosseini N, Bergenheim AT, Eriksson O, Wårdell K. 2009. Combined Diffuse Light Reflectance and Electrical Impedance Measurements as a Navigation Aid in Deep Brain Surgery. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 87 (2):105-113.
- Jones DK, Griffin LD, Alexander DC, Catani M, Horsfield MA, Howard R, Williams SC. 2002. Spatial normalization and averaging of diffusion tensor MRI data sets. *Neuroimage*, 17 (2):592-617.
- Kaminsky W, Claborn K, Kahr B. 2004. Polarimetric imaging of crystals. *Chemical Society Reviews*, 33 (8):514-525.
- Keyserlingk DGv, Schramm U. 1984. Diameter of axons and thickness of myelin sheaths of the pyramidal tract fibres in the adult human medullary pyramid. *Anat Anz*, 157(2):97-111.
- Kier EL, Staib LH, Davis LM, Bronen RA. 2004. Anatomic dissection tractography: a new method for precise MR localization of white matter tracts. *AJNR Am J Neuroradiol*, 25 (5):670-676.
- Lanciego JL, Wouterlood FG. 2000. Neuroanatomical tract-tracing methods beyond 2000: what's now and next. *J Neurosci Methods*, 103 (1):1-2.

- Larsen L, Griffin L. 2004. Can a continuity constraint be used to resolve the inclination ambiguity of polarised light imaging? . *Computer Vision and Mathematical Methods in Medical and Biomedical Image Analysis*. Berlin, Heidelberg: Springer, 365-375.
- Larsen L, Griffin LD, Grassel D, Witte OW, Axer H. 2007. Polarized light imaging of white matter architecture. *Microsc Res Tech*, 70 (10):851-863.
- Le Bihan D. 1996. Functional MRI of the brain principles, applications and limitations. *J Neuroradiol*, 23 (1):1-5.
- Le Bihan D, Turner R, Douek P. 1993. Is water diffusion restricted in human brain white matter? An echo-planar NMR imaging study. *Neuroreport*, 4 (7):887-890.
- Lim KO, Zipursky RB, Watts MC, Pfefferbaum A. 1992b. Decreased gray matter in normal aging: an in vivo magnetic resonance study. *J Gerontol*, 47 (1):B26-30.
- LOC Publisher description for The rat brain in stereotaxic coordinates / George Paxinos, Charles Watson.
<http://catdir.loc.gov/catdir/enhancements/fy0745/2006937142-d.html>.
- Ludwig E, Klingler J. 1956. Atlas cerebri humani. Der innere Bau des Gehirns dargestellt auf Grund makroskopischer Präparate. The inner structure of the brain demonstrated on the basis of macroscopical preparations. Boston: Little, Brown.
- Makris N, Worth AJ, Sorensen AG, Papadimitriou GM, Wu O, Reese TG, Wedeen VJ, Davis TL, Stakes JW, Caviness VS, Kaplan E, Rosen BR, Pandya DN, Kennedy DN. 1997. Morphometry of in vivo human white matter association pathways with diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*, 42 (6):951-962.
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ. 1995. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat*, 8 (4):283-305.
- Maunsell JH, van Essen DC. 1983. The connections of the middle temporal visual area (MT) and their relationship to a cortical hierarchy in the macaque monkey. *J Neurosci*, 3 (12):2563-2586.
- Mazziotta J, Toga A, Evans A, Fox P, Lancaster J, Zilles K, Woods R, Paus T, Simpson G, Pike B, Holmes C, Collins L, Thompson P, MacDonald D, Iacoboni M, Schormann T, Amunts K, Palomero-Gallagher N, Geyer S, Parsons L, Narr K, Kabani N, Le Goualher G, Boomsma D, Cannon T, Kawashima R, Mazoyer B. 2001. A probabilistic atlas and reference system for the human brain: International Consortium for Brain Mapping (ICBM). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356 (1412):1293-1322.
- Mega MS, Chen SS, Thompson PM, Woods RP, Karaca TJ, Tiwari A, Vinters HV, Small GW, Toga AW. 1997. Mapping histology to metabolism: coregistration of stained whole-brain sections to premortem PET in Alzheimer's disease. *Neuroimage*, 5 (2):147-153.
- Minoshima S, Koeppe RA, Frey KA, Ishihara M, Kuhl DE. 1994. Stereotactic PET atlas of the human brain: aid for visual interpretation of functional brain images. *J Nucl Med*, 35 (6):949-954.
- Mori S, Barker PB. 1999. Diffusion magnetic resonance imaging: its principle and applications. *Anat Rec*, 257 (3):102-109.

- Mori S, van Zijl PC. 2002. Fiber tracking: principles and strategies - a technical review. *NMR Biomed*, 15 (7-8):468-480.
- Mori S, Itoh R, Zhang J, Kaufmann WE, van Zijl PC, Solaiyappan M, Yarowsky P. 2001. Diffusion tensor imaging of the developing mouse brain. *Magn Reson Med*, 46 (1):18-23.
- Moseley ME, Cohen Y, Kucharczyk J, Mintorovitch J, Asgari HS, Wendland MF, Tsuruda J, Norman D. 1990a. Diffusion-weighted MR imaging of anisotropic water diffusion in cat central nervous system. *Radiology*, 176 (2):439-445.
- Moseley ME, Kucharczyk J, Mintorovitch J, Cohen Y, Kurhanewicz J, Derugin N, Asgari H, Norman D. 1990b. Diffusion-weighted MR imaging of acute stroke: correlation with T2-weighted and magnetic susceptibility-enhanced MR imaging in cats. *AJNR Am J Neuroradiol*, 11 (3):423-429.
- Niemann K, van den Boom R, Haeselbarth K, Afshar F. 1999. A brainstem stereotactic atlas in a three-dimensional magnetic resonance imaging navigation system: first experiences with atlas-to-patient registration. *J Neurosurg*, 90 (5):891-901.
- Ono M, Kubik S, Abernathy CD. 1990. Atlas of the cerebral sulci. Stuttgart, New York: G. Thieme Verlag ; Thieme Medical Publishers.
- Passe TJ, Rajagopalan P, Tupler LA, Byrum CE, MacFall JR, Krishnan KR. 1997. Age and sex effects on brain morphology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 21 (8):1231-1237.
- Paxinos G, Watson C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd Aufl. Sydney ; Orlando: Academic Press.
- Paxinos G, Huang XF. 1995. Atlas of the human brainstem. San Diego: Academic Press.
- Penfield W, Boldrey E. 1937. Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain*, 60 (4):389-443.
- Pfefferbaum A, Sullivan EV, Adalsteinsson E, Garrick T, Harper C. 2004. Postmortem MR imaging of formalin-fixed human brain. *Neuroimage*, 21 (4):1585-1595.
- Pfefferbaum A, Mathalon DH, Sullivan EV, Rawles JM, Zipursky RB, Lim KO. 1994. A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood. *Arch Neurol*, 51 (9):874-887.
- Pierpaoli C, Jezzard P, Basser PJ, Barnett A, Di Chiro G. 1996. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology*, 201 (3):637-648.
- Rademacher J, Burgel U, Geyer S, Schormann T, Schleicher A, Freund HJ, Zilles K. 2001b. Variability and asymmetry in the human precentral motor system. A cytoarchitectonic and myeloarchitectonic brain mapping study. *Brain*, 124 (Pt 11):2232-2258.
- Rajkowska G, Goldman-Rakic PS. 1995. Cytoarchitectonic definition of prefrontal areas in the normal human cortex: II. Variability in locations of areas 9 and 46 and relationship to the Talairach Coordinate System. *Cereb Cortex*, 5 (4):323-337.
- Ralston HJ, 3rd. 1990. Analysis of neuronal networks: a review of techniques for labeling axonal projections. *J Electron Microscop Tech*, 15 (4):322-331.

- Raz N, Gunning FM, Head D, Dupuis JH, McQuain J, Briggs SD, Loken WJ, Thornton AE, Acker JD. 1997a. Selective aging of the human cerebral cortex observed in vivo: differential vulnerability of the prefrontal gray matter. *Cereb Cortex*, 7 (3):268-282.
- Rye DB. 1999. Tracking neural pathways with MRI. *Trends Neurosci*, 22 (9):373-374.
- Schaltenbrand G, Bailey P. 1959. Introduction to stereotaxis with an atlas of the human brain. New York, Stuttgart: Thieme Verlag.
- Schaltenbrand G, Wahren W. 1977. Atlas for stereotaxy of the human brain. 2nd Aufl. New York, Stuttgart: Thieme Verlag.
- Scheperjans F, Eickhoff SB, Homke L, Mohlberg H, Hermann K, Amunts K, Zilles K. 2008. Probabilistic Maps, Morphometry, and Variability of Cytoarchitectonic Areas in the Human Superior Parietal Cortex. *Cereb Cortex*, 18 (9):2141-2157.
- Scheuner G, Hutschenreiter J. 1972. *Polarisationsmikroskopie in der Histophysik*. Leipzig: G. Thieme Verlag.
- Smith GE. 1907. A New Topographical Survey of the Human Cerebral Cortex, being an Account of the Distribution of the Anatomically Distinct Cortical Areas and their Relationship to the Cerebral Sulci. *J Anat Physiol*, 41 (Pt 4):237-254.
- Sullivan EV, Marsh L, Mathalon DH, Lim KO, Pfefferbaum A. 1995. Age-related decline in MRI volumes of temporal lobe gray matter but not hippocampus. *Neurobiol Aging*, 16 (4):591-606.
- Sun SW, Neil JJ, Song SK. 2003. Relative indices of water diffusion anisotropy are equivalent in live and formalin-fixed mouse brains. *Magn Reson Med*, 50 (4):743-748.
- Swanson LW. 1992. *Brain maps : structure of the rat brain*. Amsterdam ; New York: Elsevier.
- Talairach J. 1967. *Atlas d'anatomie stéréotaxique du télencéphale, études anatomoradiologiques*. Paris: Masson et Cie.
- Talairach J, Tournoux P. 1988. *Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain*. New York: Thieme.
- Thompson PM, Schwartz C, Lin RT, Khan AA, Toga AW. 1996. Three-Dimensional Statistical Analysis of Sulcal Variability in the Human Brain. *Journal of Neuroscience*, 16 (13):4261-4274.
- Tuch DS, Wedeen VJ, Dale AM, George JS, Belliveau JW. 2001. Conductivity tensor mapping of the human brain using diffusion tensor MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (20):11697-11701.
- Van Buren JM, Maccubbin DA. 1962. An outline atlas of the human basal ganglia with estimation of anatomical variants. *J Neurosurg*, 19:811-839.
- Van Buren JM, Borke RC. 1972. *Variations and connections of the human thalamus*. Berlin, New York,: Springer-Verlag.
- Vogt O. 1902. *Neurobiologische Arbeiten. Erste Serie: Beiträge zur Hirnfaserlehre*. Jena: Gustav Fischer.
- Voss HU, Watts R, Ulug AM, Ballon D. 2006. Fiber tracking in the cervical spine and inferior brain regions with reversed gradient diffusion tensor imaging. *Magn Reson Imaging*, 24 (3):231-239.

Wakana S, Jiang H, Nagae-Poetscher LM, van Zijl PC, Mori S. 2004. Fiber tract-based atlas of human white matter anatomy. *Radiology*, 230 (1):77-87.

Wiener O. 1912. Die Theorie des Mischkörpers für das Feld der stationären Strömung. Abhandlung der mathematisch-physischen Klasse der königlich sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften. Leipzig, 507-604.

Wolman M. 1975. Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology. *J Histochem Cytochem*, 23 (1):21-50.

9 Anhang

9.1 Veröffentlichungen

Heepe J, Riedel M. 2006. Dreidimensionaler Nervenfaseratlas des menschlichen Hirnstammes. 1. Preis des Posterbeitrages anlässlich des 3. Tages der Nachwuchswissenschaftler des FZL, FSU Jena. 19.06.2006

Heepe J, Riedel M, Franke J, Gräßel D, Prescher A, Witte OW, Axer H. PLI-Faserorientierungskarten des menschlichen Hirnstammes. 23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg vom 27.09. bis 29.09.2006

Franke J, Heepe J, Riedel M, Gräßel D, Witte OW, Axer H. Dreidimensionale Rekonstruktion des Hirnstammatlas von Paxinos und Huang. 23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg vom 27.09. bis 29.09.2006

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jörn Heepe, geb. 13.05.1977, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. O.W. Witte,

PD Dr. med. H. Axer,

Prof. Dr. med. A. Prescher,

D. Gräßel,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Haibach,

Jörn Heepe

9.3 Lebenslauf

Name, Vorname	Heepe, Jörn
Geburtsdatum	13.05.1977
Geburtsort	Haan / Rheinland
Familienstand	Lebensgemeinschaft mit Dr. med. Bianka Heinrich, Tochter Maja (4 Jahre), Tochter Linda (1 Jahr)
Anschrift	Büchelbergstr. 59, 63808 Haibach

Ausbildung

1983 – 1987	Grundschule Haan
1987 – 1996	Städt. Gymnasium Haan mit Abschluss Abitur
1996 – 1997	Ersatzdienst: Sozialpädagogische Werkstätten, Wuppertal
1998 – 2000	Ausbildung zum Tischler, Firma B. Bergmann, Hilden
2000 – 2006	Studium der Humanmedizin, FSU Jena
Dezember 2006	Approbation

Beruflicher Werdegang

seit Januar 2007	Assistenzarzt für Orthopädie und Unfallchirurgie im Klinikum Aschaffenburg Chirurgische Klinik II Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wilhelm Friedl
------------------	--

Haibach,

Jörn Heepe

9.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. O. W. Witte gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation und die optimale Gestaltung des Arbeitsumfeldes.

Herrn PD Dr. med. H. Axer danke ich für die unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation. Er stand mir immer mit Rat und Tat zu Seite und hat durch seine Hilfe die Fertigstellung dieser Dissertation erst ermöglicht.

Danken möchte ich weiterhin Herrn D. Gräßel, der mir bei den physikalischen Grundlagen sowie der digitalen Bild- und Datenverarbeitung behilflich war.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Prescher und dem Anatomischen Institut der RWTH Aachen für die Bereitstellung der Präparate, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bedanken möchte ich mich bei D. Hoffmann, S. Böhm und allen voran C. Döring für die technische Unterstützung und Aufbereitung der Präparate.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei meinen wissenschaftlichen Kollegen J. Franke und M. Riedel bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Frau Dr. med. B. Heinrich und meinen Töchtern Maja und Linda für die Geduld und Motivation bedanken, bei meinen Eltern, ohne deren Unterstützung Studium und Dissertation nicht denkbar gewesen wären und bei meiner Schwester A. Görß, meinem Bruder L. Heepe und G. Fellrath für die Korrektur dieser Arbeit.