

**Kombinierte histologische und
Magnetresonanztomografie-basierte Betrachtung der
Volumina des menschlichen Nucleus subthalamicus und
deren Verhalten bei Alterung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Johann Georg Zwirner

Geburtsdatum / Geburtsort:

05.10.1990 in Borna

angefertigt am: Institut für Anatomie, Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. Niels Hammer
Prof. Dr. med. habil. Ingo Bechmann

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 19.03.2019

I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	- 1 -
II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 3 -
1	EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK	- 5 -
1.1	ANATOMIE UND FUNKTION DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS	- 5 -
1.1.1	ANATOMIE DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS	- 5 -
1.1.2	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS	- 5 -
1.1.3	DER NUCLEUS SUBTHALAMICUS ALS ZIELPUNKT DER TIEFEN HIRNSTIMULATION BEI IDIOPATHISCHEM MORBUS PARKINSON	- 6 -
1.2	DAS VOLUMEN DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS	- 10 -
1.2.1	VOLUMINA DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS AUF BASIS DER MAGNETRESONANZTOMOGRAFIE	- 10 -
1.2.2	VOLUMINA DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS AUF BASIS DER HISTOLOGIE	- 10 -
1.2.3	VOLUMINA DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS AUF BASIS ANDERER METHODEN	- 12 -
1.2.4	DAS VOLUMEN DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS IM ALTERSVERLAUF	- 14 -
1.3	METHODIK	- 16 -
1.3.1	DER NUCLEUS SUBTHALAMICUS IN DER MAGNETRESONANZTOMOGRAFIE	- 16 -
1.3.2	DER NUCLEUS SUBTHALAMICUS IN DER LUXOL-FAST-BLUE-FÄRBUNG	- 18 -
1.4	ZIELE DER ARBEIT	- 20 -
2	PUBLIKATIONSMANUSKRIFT	- 21 -
3	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	- 35 -
4	LITERATURVERZEICHNIS	- 38 -
5	BEIBLATT ZUR PUBLIKATIONSPROMOTION BEI GETEILTER ERSTAUTORSCHAFT	- 46 -

6	ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT	- 48 -
7	LEBENS LAUF	- 49 -
8	PUBLIKATIONEN	- 51 -
9	DANKSAGUNG	- 52 -

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	anterior
CA	Commissura anterior
CC	Crus cerebri
CI	Capsula interna
CP	Commissura posterior
CS	Colliculus superior
DBS	Deep brain stimulation, Tiefe Hirnstimulation
et al.	et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum) oder et alia (Neutrum), und andere
F	Fornix
GPE	Globus pallidus externus
GPI	Globus pallidus internus
Hz	Hertz
I	inferior
kA	keine Angabe
L	lateral
LFB	Luxol-Fast-Blue-Färbung, Klüver-Barrera-Färbung
M	medial
MRT	Magnetresonanztomografie
NR	Nucleus ruber
NURBS	Nonuniform Rational B-Splines
P	posterior
PU	Putamen
Q	Pallidoreticuläres Bündel
S	superior
SN	Substantia nigra
STN	Nucleus subthalamicus
SWI	Susceptibility-weighted imaging, Suszeptibilitätsgewichtete Bildgebung
T	Tesla
TH	Thalamus
TMT	Tractus mamillothalamicus
TO	Tractus opticus
TSE	Turbo Spin Echo, MRT-Sequenz, 90°-180°-Pulsfolge mit mehreren 180°-Pulsen, pro Echo eine Rohdatenzeile
T1	Relaxationszeit in der Magnetresonanztomografie
T2	Relaxationszeit in der Magnetresonanztomografie
V	Volt
VTA	Volume of Tissue Activated, aktiviertes Gewebsvolumen

ZI Zona incerta
III Dritter Ventrikel

1 Einführung in die Thematik

1.1 Anatomie und Funktion des Nucleus subthalamicus

1.1.1 Anatomie des Nucleus subthalamicus

Der Nucleus subthalamicus (STN) ist eine paarige, mandelförmige Ansammlung von ca. 240.000 bis 520.000 Neuronen im Mittelhirn (Füssenich 1967, Lévesque und Parent 2005). Er zählt zu den Basalganglien. Im gesamten inferioren Bereich ist der STN von der Substantia nigra umgeben. Die Zona incerta grenzt an den superioren und posterioren Teil des STN. Die am weitesten superior gelegenen Zellen des STN werden vom Fasciculus lenticularis (H2-Feld nach Forel) tangiert. Weiterhin wird der STN an seiner antero-superioren Grenze von der Capsula interna flankiert (Massey et al. 2012). Posterior grenzen im inferioren Bereich weiterhin der nigrostriatale Trakt und das pallidoretikuläre Bündel (Q-Bündel) an den STN (Schaltenbrand und Wahren 1977, Adachi et al. 1999). Medial ist im dorsalen Bereich die Zona incerta und im ventralen Bereich die retikuläre Substantia nigra den subthalamischen Neuronen benachbart. Eine Ausnahme ist ein kleiner Teil des medio-anterioren STN, an dem Fasern der Ansa lenticularis vorbeiziehen. Lateral umgibt die Capsula interna den STN (Massey et al. 2012).

Fazit: Der STN wird zu einem großen Teil von weißer Substanz umgeben. Die Neurone der Substantia nigra grenzen im gesamten inferioren Bereich an den STN.

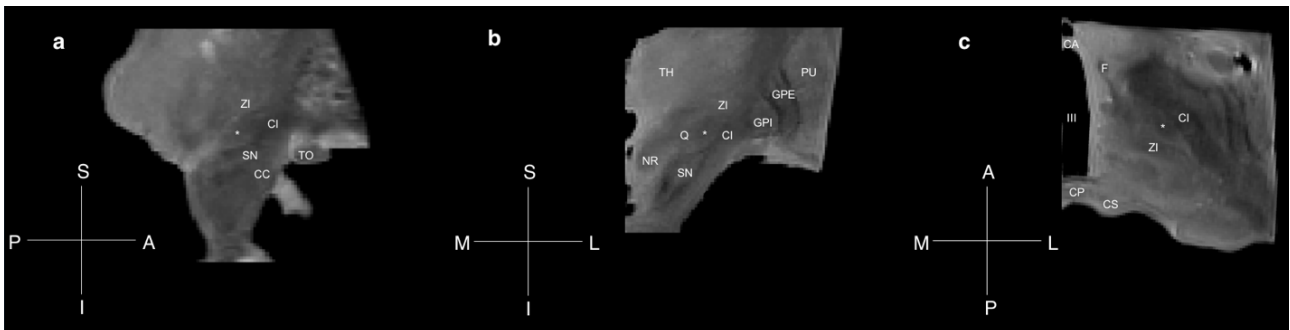


Abb.1: Anatomische Lagebeziehung des Nucleus subthalamicus (STN) in der Magnetresonanztomografie.

a - sagittale Ebene, b - koronale Ebene, c - axiale Ebene, * STN, weitere Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

1.1.2 Funktionelle Bedeutung des Nucleus subthalamicus

Dem Nucleus subthalamicus werden sowohl sensomotorische, limbische als auch assoziative Funktionen zugeschrieben. Ob diese unterschiedlichen Funktionen räumlich innerhalb des STN gegeneinander abzugrenzen sind, konnte bis zum heutigen Tag nicht bestätigt werden. Die aktuelle Leithypothese geht von einem dreigeteilten STN mit einem dorso-lateralen sensomotorischen, einem medialen limbischen und einem antero-medialen assoziativen Teil aus (Lambert et al. 2012). Erst kürzlich empfahl die Arbeitsgruppe von Anneke Alkemade und Birthe Forstmann die Hypothese eines dreigeteilten STN zu hinterfragen, da diese aus dem Tiermodell

abgeleitete Vermutung im Menschen bisher nicht hinreichend bestätigt werden konnte und eventuell eine zu starke Vereinfachung darstellt (Alkemade und Forstmann 2014). Ein Überblick über 33 Studien, die Aussagen treffen, ob es eine räumliche Trennung der verschiedenen Funktionen innerhalb des STN gibt, favorisiert mehrheitlich eine Zweiteilung. Nur vier Studien sprachen sich für eine Dreiteilung des Kerns aus (Keuken et al. 2012).

Motorisch wirkt der STN hemmend. Seine glutamatergen Projektionsneurone erregen den internen Globus pallidus und führen somit zur Verstärkung der Hemmung auf den Thalamus (Parent und Hazrati 1995). Eindrücklich zeigt sich die motorische STN-Funktion bei den beispielsweise durch einen Infarkt verursachten Läsionen des STN, welche zu choreatischen Symptomen und dem Krankheitsbild des Ballismus / Hemiballismus führen können (Postuma und Lang 2003, Zijlmans 2011). Beim idiopathischen Morbus Parkinson führt die Degeneration der dopaminergen Neurone der Substantia nigra letztlich zur gesteigerten Projektionsaktivität der Basalganglien, welche möglicherweise aus der gesteigerten exzitatorischen Aktivität des STN resultiert (McIntyre et al. 2004, DeLong und Benabid 2014). Dies wirkt sich hemmend auf die Bewegung aus (Wichmann et al. 2011). Die Beteiligung des STN an limbischen und assoziativen Funktionen wird im Zusammenhang mit DBS-assoziierten Nebenwirkungen deutlich. Depressionen, Angst, Manie und Halluzinationen repräsentieren mit dem limbischen System verknüpfte Nebenwirkungen (Temel et al. 2005, Ugurlu et al. 2014). Eine beeinträchtigte Aufmerksamkeit und ein gestörtes Arbeitsgedächtnis zeigen die Verbindung zum assoziativen System (Temel et al. 2005).

Fazit: Der STN hat sowohl limbische, assoziative als auch motorische Funktionen. Beeinträchtigungen dieser Funktionen können vielgestaltige Symptome hervorrufen.

1.1.3 Der Nucleus subthalamicus als Zielpunkt der Tiefen Hirnstimulation bei idiopathischem Morbus Parkinson

Der STN ist seit ca. 25 Jahren das bevorzugte Zielgebiet der Tiefen Hirnstimulation bei idiopathischem Morbus Parkinson. Die hochfrequente elektrische Stimulation des STN mittels einer Elektrode führt reversibel zur Linderung der Parkinsonsymptome wie etwa Tremor, Rigidity und Akinese (Limousin et al. 1995). Stimulationsfrequenzen zwischen 100 und 200 Hz werden als besonders effektiv angesehen (Benabid 2014). Wenngleich der genaue Mechanismus weiterhin unbekannt ist, so wirkt die Stimulation modulierend auf die gesteigerte exzitatorische Aktivität des STN innerhalb der Basalganglienschleife (Mogilner et al. 2004, DeLong und Benabid 2014). Sie beeinflusst die medikamentösen End-of-Dose-Dyskinesien (bezeichnet einen gestörten physiologischen Bewegungsablauf, häufig als Folge lang dauernder Medikation mit Levodopa) positiv und bessert die Lebensqualität der betroffenen Patienten wesentlich (Kleiner-Fisman et al. 2006, DeLong und Benabid 2014). Limitiert wird die Tiefe Hirnstimulation durch assoziierte Nebenwirkungen. Unter der Stimulation leiden einige Patienten unter anderem an Depressionen,

gehäufte Suizidalität oder Manie (Bejjani et al. 1999, Voon et al. 2008, Ugurlu et al. 2014). Teilweise können die Nebenwirkungen auf die verminderte Levodopa-Medikation nach Implantation des Hirnschrittmachers oder eine nicht optimale Platzierung der Elektroden erklärt werden (Benabid et al. 2009).

Fazit: Die hochfrequente Stimulation des STN führt reversibel zur Linderung der Symptome des idiopathischen Morbus Parkinson. Unter der Stimulation auftretende Nebenwirkungen mindern die Lebensqualität der Betroffenen beträchtlich.

Ideal für den klinischen Alltag wäre bei Morbus Parkinson eine selektive Stimulation eines sensomotorischen Teils des STN, ohne dessen limbische oder assoziative Funktionen oder dem STN angrenzende Bahnsysteme nachteilig zu beeinflussen. Dem steht entgegen, dass die aus dem Tiermodell abgeleitete Dreiteilung bei Menschen bis heute nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte und der STN als Ganzes eine im klinischen Alltag schwer zu lokalisierende Struktur darstellt (Bejjani et al. 2000, Massey und Yousri 2010, Alkemade und Forstmann 2014). Eine Lokalisierung etwaiger Substrukturen ist ungleich schwerer. Ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Tiefen Hirnstimulation wird in der Planung der Elektrodenlage gesehen, welche sich zwischen den Anwendern der Neurochirurgie zum Teil erheblich unterscheidet (Brunenberg et al. 2011). Der Zielpunkt STN kann mittels indirekter und direkter Methoden bestimmt werden. Bei der indirekten Zielpunktbestimmung wird der STN nicht „direkt“ visualisiert, sondern dessen Position „indirekt“ mithilfe verschiedener Zusatzinformationen bestimmt. Eine Möglichkeit der indirekten Bestimmung der Position des STN erfolgt anhand „anatomischer Landmarken“, wie des Mittelpunktes der Strecke zwischen der Commissura anterior und der Commissura posterior (midcommissuraler Punkt), der medialen Grenze des STN oder unter Zuhilfenahme des Nucleus ruber (Starr 2002, Houshmand et al. 2014, Bot et al. 2018). Von diesen Punkten ausgehend erfolgt mithilfe stereotaktischer Hirnatlanten, wie des Schaltenbrand-Wahren Atlas, die Bestimmung der STN-Lokalisation anhand definierter Abstände (Schaltenbrand und Wahren 1977). Basierend auf empirischen Daten wird dabei angenommen vom midcommissuralen Punkt ausgehend 12 mm lateral, 3 mm posterior, 4 mm inferior liegend, das Zentrum des motorischen STN anzutreffen (Pollo et al. 2007). Eine weitere indirekte Methode den STN zu lokalisieren ist die Nutzung von Hirnatlanten in Verbindung mit einer präoperativen MRT-Aufnahmen des Patienten (Schaltenbrand und Wahren 1977, Machado et al. 2006). Bei der indirekten Zielpunktbestimmung findet das Alter des Patienten und damit verbundene eventuelle morphologische Veränderungen keine Berücksichtigung. Der Schaltenbrand-Wahren Atlas, welcher einer der am häufigsten genutzten Atlanten in der stereotaktischen und funktionellen Neurochirurgie ist, basiert auf nur drei menschlichen Hirnen. Von den ausschließlich männlichen Spendern waren zwei 40 Jahre und einer 51 Jahre alt (Vayssiere et al. 2002). Aufgrund der unzureichenden Darstellung von individuellen Variationen in Größe und Position des STN mithilfe indirekter Zielpunktbestimmung, wird von anderen Gruppen die direkte Methode auf Basis der

Magnetresonanztomografie bevorzugt (Richter et al. 2004, Patel et al. 2008). Die T2-Wichtung ist die im klinischen Alltag am häufigsten genutzte MRT-Kontrastdarstellung zur STN-Visualisierung. Es ist bisher ungeklärt, ob der für die Stimulation bevorzugte dorso-laterale Teil des STN in der T2-Wichtung hinreichend dargestellt wird (Patil et al. 2012). Mit der für die Darstellung des STN vielversprechenden suszeptibilitätsgewichteten Bildgebung (SWI) fehlen noch langfristige Erfahrungswerte.

Fazit: Die Lage des STN wird mittels indirekter und direkter Methoden bestimmt. Das Alter des Patienten spielt bei der indirekten Bestimmung bisher noch keine Rolle. Indirekte Methoden können interindividuelle Unterschiede in Volumen und Lage des STN nicht abbilden. Die direkte Zielpunktbestimmung mittels der MRT visualisiert den STN möglicherweise nur unvollständig.

Claire et al. analysierten 13 Studien, in denen anatomische Positionen von Elektrodenkontakten aufgeführt wurden, die zu einer Linderung der Parkinsonsymptome führten. Von den 466 Elektroden der 260 Patienten befanden sich nur 60 Prozent innerhalb des STN oder am Übergang zwischen dem Kern und den benachbarten Strukturen. Die verbliebenen 40 Prozent der Elektrodenkontakte befanden sich außerhalb des STN (Claire et al. 2013). Derartige Untersuchungen erfordern genaue anatomische Kenntnisse darüber, in welcher räumlichen Ausdehnung subthalamische Neurone im Mittelhirn zu erwarten sind. Die bisher ermittelten STN-Volumina von 20 mm³ bis 457 mm³ weichen jedoch stark voneinander ab (Slavin et al. 2006, Marani et al. 2008). Für Zentren, welche die Zielpunktplanung der Elektrode rein MRT-basiert durchführen, erscheinen magnetresonanztomografisch ermittelte STN-Volumina zwischen 42 mm³ bis 270 mm³ ungenau (Colpan und Slavin 2010, Johnsen et al. 2010, Camlidag et al. 2014). Bei der elektrischen Stimulation des STN wird abhängig von der Elektrodenform und der elektrischen Leitfähigkeit des Hirngewebes ein schwer zu quantifizierendes Gewebsvolumen (aktiviertes Gewebsvolumen = Volume of Tissue Activated, VTA) angeregt (McIntyre und Grill 2001, McIntyre und Grill 2002). Hartmann et al. stimulierten 20 Patienten mit einer Amplitude von 3 V, einer Frequenz zwischen 141 und 150 Hz und einer Pulslänge zwischen 69 und 80 Mikrosekunden. Ein initiales VTA von 114 mm³ wurde ermittelt, das sich zehn Jahre nach Implantation der Elektroden auf 221 mm³ vergrößert hatte. Als mögliche Ursache dieses sich vergrößernden VTAs wird die fortschreitende neuronale Degeneration im Stimulationsgebiet gesehen. Von den insgesamt 40 aktiven Kontakten (ein aktiver Kontakt pro Patientenhemisphäre) wurden drei Kontakte bipolar stimuliert und fünf multipolar. Die restlichen Kontakte waren monopolar (Hartmann et al. 2015). Eine andere Gruppe berichtet von VTAs von durchschnittlich 71 mm³. Die ausschließlich monopolare Stimulation wurde mit einer Frequenz von 130 bis 185 Hz, einer Pulslänge von 60 Mikrosekunden und einer Amplitude von -1,5 bis -3,6 V durchgeführt (Maks et al. 2009). Darüber hinaus erschien eine Arbeit, welche durch ein spezielles Design der Elektrode die Möglichkeit der selektiven Stimulation eines Volumens von nur 4,2 mm³ vorstellte. Die verwendeten Stimulationsparameter waren eine Frequenz von 130 Hz, eine Pulslänge von 90 Mikrosekunden

und eine Amplitude von 1 V. Die Stimulation erfolgte monopolar (Pollo et al. 2014). Um sinnvoll darzustellen, wie groß der Anteil des STN ist, der durch die Stimulation erregt wird oder wie viel des erregten Hirngewebes sich außerhalb des STN befindet, ist das Volumen des STN eine wesentliche Größe.

Fazit: Die räumliche Ausdehnung des STN ist wesentlich für die Interpretation bisher empirisch ermittelter indirekter Zielpunktkoordinaten. Die Kenntnis des STN-Volumens ist die Grundlage, um eine räumliche Beziehung des Kerns zu dem durch die Stimulation elektrisch erregten Gewebes herzustellen.

1.2 Das Volumen des Nucleus subthalamicus

1.2.1 Volumina des Nucleus subthalamicus auf Basis der Magnetresonanztomografie

Zwischen 2009 und 2015 erschienen zwölf MRT-basierte Arbeiten, welche Volumenangaben zum menschlichen STN enthalten (vgl. Tabelle 1 sowie Abb. 2; Shen et al. 2009, Colpan und Slavin 2010, Schlaier et al. 2011, Forstmann et al. 2012, Lambert et al. 2012, Massey et al. 2012, Schäfer et al. 2012, Keuken et al. 2013, Camlidag et al. 2014, Keuken et al. 2014, Xiao et al. 2014, Weiss et al. 2015). Die berichteten STN-Volumina variieren zwischen 42 mm^3 und 270 mm^3 (Colpan und Slavin 2010, Camlidag et al. 2014). Demnach ist anzunehmen, dass es sich beim STN um eine in der MRT hochgradig volumeninkonsistente Struktur handelt. Auch innerhalb der jeweiligen Feldstärken ergeben sich teilweise erhebliche Differenzen. Die Mittelwerte der STN-Volumina der drei Arbeiten, in denen MRT-Aufnahmen mit einer magnetischen Feldstärke von 1,5T aufgenommen wurden, variieren zwischen 42 mm^3 und 235 mm^3 (Shen et al. 2009, Schlaier et al. 2011, Camlidag et al. 2014). Die nach der Feldstärke der MRT mit 3T nächsthöhere Kategorie bilden drei Arbeiten zu STN-Volumina im Menschen ???. Während zwei Gruppen ein nahezu identisches Durchschnittsvolumen von ca. 155 mm^3 ermittelten, gibt es eine über 100 mm^3 große Differenz zum höchsten mit 3T erhobenen Wert von 270 mm^3 (Colpan und Slavin 2010, Lambert et al. 2012, Xiao et al. 2014). Mit einer Feldstärke von 7T ermittelte Volumina sind in fünf Publikationen vorhanden (Forstmann et al. 2012, Schäfer et al. 2012, Keuken et al. 2013, Keuken et al. 2014, Weiss et al. 2015). In dieser Feldstärke ist der größte ermittelte Durchschnittswert mit 109 mm^3 mehr als doppelt so groß wie der kleinste mit 48 mm^3 (Schäfer et al. 2012, Weiss et al. 2015). Die technisch besten Voraussetzungen für hochaufgelöste Aufnahmen bieten Feldstärken von 9,4T. Die einzige Publikation dieser Kategorie zeigt einen Wert von 106 mm^3 (Massey et al. 2012).

Fazit: Bisher magnetresonanztomografisch ermittelte STN-Volumina variieren zwischen 42 mm^3 und 270 mm^3 (vgl. Tabelle 1 sowie Abb. 2). Es kann daher angenommen werden, dass entweder der STN in der MRT nicht konsistent dargestellt wird oder es große interindividuelle Volumenunterschiede gibt.

1.2.2 Volumina des Nucleus subthalamicus auf Basis der Histologie

Bisher erschienen sechs Arbeiten, in denen das Volumen des STN mit histologischen Methoden bestimmt wurde (vgl. Tabelle 1 sowie Abb. 2; Von Bonin und Shariff 1951, Füssenich 1967, Lange et al. 1976, Hardman et al. 1997, Hardman et al. 2002, Lévesque und Parent 2005). Die ermittelten STN-Volumina variieren zwischen 64 mm^3 und 175 mm^3 (Füssenich 1967, Lévesque und Parent 2005). Die histologisch bestimmten STN-Volumina basierten meist auf geringen Fallzahlen. Nur in zwei dieser Arbeiten wurden mehr als zehn STN untersucht (Lange et al. 1976, Hardman et al. 1997). 14 einzelne STN sind die bisher größte untersuchte Anzahl zur Ermittlung

des STN-Volumens auf histologischer Basis (Lange et al. 1976). Die älteste dieser Veröffentlichungen beruht auf der Untersuchung nur eines menschlichen Hirns (Von Bonin und Shariff 1951). Mit Ausnahme der Arbeit von Von Bonin und Shariff, die keine Angaben zur Färbemethodik macht, wurden die STN-Volumina anhand Kresylviolett-gefärbter Schnitte erhoben (Von Bonin und Shariff 1951, Füssenich 1967, Lange et al. 1976, Hardman et al. 1997, Hardman et al. 2002, Lévesque und Parent 2005). Grundlage der Volumenberechnungen bildet in allen Arbeiten das Prinzip von Cavalieri (Coggeshall 1992). Die zwischen 1951 und 1975 erschienen ersten drei Arbeiten umfuhren den STN auf dem histologischen Schnitt mithilfe eines Rollplanimeters, um den erhaltenen Flächeninhalt nachfolgend manuell mit Schnittdicke und Schnittabstand zu multiplizieren (Von Bonin und Shariff 1951, Füssenich 1967, Lange et al. 1976). Der aktuellere Teil der Arbeiten nutzt automatisierte Mikroskope und die Neurolucidasoftware (MicroBrightField, Williston, VT) zur Datenerhebung und Volumengenerierung (Hardman et al. 1997, Hardman et al. 2002, Lévesque und Parent 2005).

Fazit: Es existieren nur wenige Arbeiten, in denen das STN-Volumen histologisch bestimmt wurde. Die ermittelten Werte zwischen 64 mm^3 und 175 mm^3 lassen den STN in der Histologie als volumeninkonsistente Struktur erscheinen (vgl. Tabelle 1 sowie Abb. 2).

1.2.3 Volumina des Nucleus subthalamicus auf Basis anderer Methoden

Neben der Histologie und der MRT existieren in der Literatur noch weitere Methoden, auf deren Grundlage STN-Volumina berechnet wurden. In zwei Publikationen finden sich darüber hinaus keine Angaben zur Methode der Volumenermittlung. Diese STN-Volumina entsprechen mit 20 mm^3 und 40 mm^3 den kleinsten in der Literatur überhaupt zu findenden Angaben (Slavin et al. 2006, Akakin et al. 2016 [Paper nach Einreichung des Publikationsmanuskriptes zurückgezogen]). Nowinski et al. rekonstruierten den STN dreidimensional mithilfe der Daten des Schaltenbrand-Wahren Atlas (Schaltenbrand und Wahren 1977, Nowinski et al. 2006). Das STN-Volumen wurde auf Basis koronaler Daten, als auch ergänzend je auf axialen und sagittalen Daten rekonstruiert. Es ergaben sich mit koronal 150 mm^3 , axial 163 mm^3 und sagittal 207 mm^3 orientierungsabhängig unterschiedliche Volumina (Nowinski et al. 2006). Das durchschnittliche Volumen dieses im Klinikalltag häufig gebrauchten Atlas liegt mit 183 mm^3 im oberen Bereich der bisher methodenübergreifend für den humanen STN errechneten Werte (Nowinski et al. 2005). Yelnik ermittelte unter Zuhilfenahme der Formel von Pullen ein STN-Volumen von 158 mm^3 (Yelnik 2002). Mithilfe der Ellipsoidformel berechneten Schäfer et al. mit den von Richter publizierten STN-Maßen ein STN-Volumen von 60 mm^3 (Schäfer et al. 2012). Marani et al. ermittelte auf Grundlage derselben Daten ohne Angabe der Berechnungsmethode ein Volumen von 457 mm^3 . Dies stellt das größte in der Literatur zu findende Volumen für einen einzelnen STN dar (Marani et al. 2008).

Fazit: Neben der Histologie und der MRT existieren noch weitere Verfahren, auf deren Grundlage STN-Volumina bestimmt wurden. Die mit 20 mm^3 bis 457 mm^3 große Spanne ermittelter STN-Volumina stellt den STN ebenfalls als volumeninkonsistente Struktur dar (vgl. Tabelle 1 sowie Abb. 2).

Autor	Quelle Abb. 2	Methode	Alter	Altersspanne	STN-Volumen
			[Durchschnitts- alter]	[Jahre]	[mm ³]
Akakin et al. 2016*	1	kA	kA	kA	40
Weiss et al. 2015	2	MRT 7T	67	44-91	109
Camlidag et al. 2014	3	MRT 1.5T	56	45-65	42 ¹
Keuken et al. 2014	4	MRT 7T	24	kA	56
Xiao et al. 2014	5	MRT 3T	61	kA	156 ²
Keuken et al. 2013	6	MRT 7T	24	22-28	62
Keuken et al. 2013	7	MRT 7T	51	40-59	75
Keuken et al. 2013	8	MRT 7T	72	67-77	52
Lambert et al. 2012	9	MRT 3T	34	kA	155 ³
Massey et al. 2012	10	MRT 9.4T	75	38-94	106
Schäfer et al. 2012	11	MRT 7T	24	22-28	48
Forstmann et al. 2012	12	MRT 7T	24	18-33	58
Schlaier et al. 2011	13	MRT 1.5T	63	46-73	235
Colpan und Slavin 2010	14	MRT 3T	62	kA	270
Shen et al. 2009	15	MRT 1.5T	♂:44; ♀: 46	21-80	132 ⁴
Nowinski et al. 2006	16	NURBS-Rekonstruktion	kA	Atlas-basiert	174 ⁵
Slavin et al. 2006	17	kA	kA	kA	20
Lévesque und Parent 2005	18	Histologie (55µm Ge- frierschnitt)	51	22-85	175
Richter et al. 2004	19	MRT 1.5T	55	39-68	60 ⁶
Richter et al. 2004	20	MRT 1.5T	55	39-68	457 ⁷
Hardman et al. 2002	21	Histologie (50µm Ge- frierschnitt)	74	kA	120 ⁸
Yelnik 2002	22	Computer-assistierte-3D- Kartographie	kA	kA	158
Hardman et al. 1997	23	Histologie (50µm Ge- frierschnitt)	75	61-84	127 ⁸
Schaltenbrand und Wah- ren 1977	24	Stereotaxieatlas	kA	Atlas-basiert	183 ⁹
Lange et al. 1976	25	Histologie (20µm Paraffin)	50	24-99	139 ¹⁰
Füssenich 1967	26	Histologie (20µm Paraffin)	70	58-91	64
Von Bonin und Shariff 1951	27	Histologie	kA	kA	157

Tabelle 1: Vergleich der in der Literatur veröffentlichten STN-Volumina.

¹ berechnet aus Anteil des gesamten Hirnvolumens; ² nativer Raum gemessen an Commissura anterior und posterior; ³ Mittelwert des linken und rechten STN-Volumens; ⁴ Mittelwert von männlichem und weiblichem STN-Volumen unter Einbeziehung beider Hemisphären; ⁵ Mittelwert der aus axialen, sagittalen und koronalen Modellen berechneten STN-Volumina; ⁶ Rückrechnung von Schäfer et al. (Schäfer et al. 2012) auf Basis der gegebenen Daten von Richter et al. (Richter et al. 2004) mithilfe der Ellipsoidformel; ⁷ Rückrechnung von Marani et al. (Marani et al. 2008) auf Basis der gegebenen Daten von Richter et al. (Richter et al. 2004); ⁸ Halbierung des aus linkem und rechtem STN bestehenden Gesamt-STN-Volumens ; ⁹ Näherung von Nowinski et al. (Nowinski et al. 2005); ¹⁰ Mittelwert der männlichen und weiblichen STN-Volumina; *Arbeit nach Einreichung des Publikationsmanuskriptes zurückgezogen; Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis

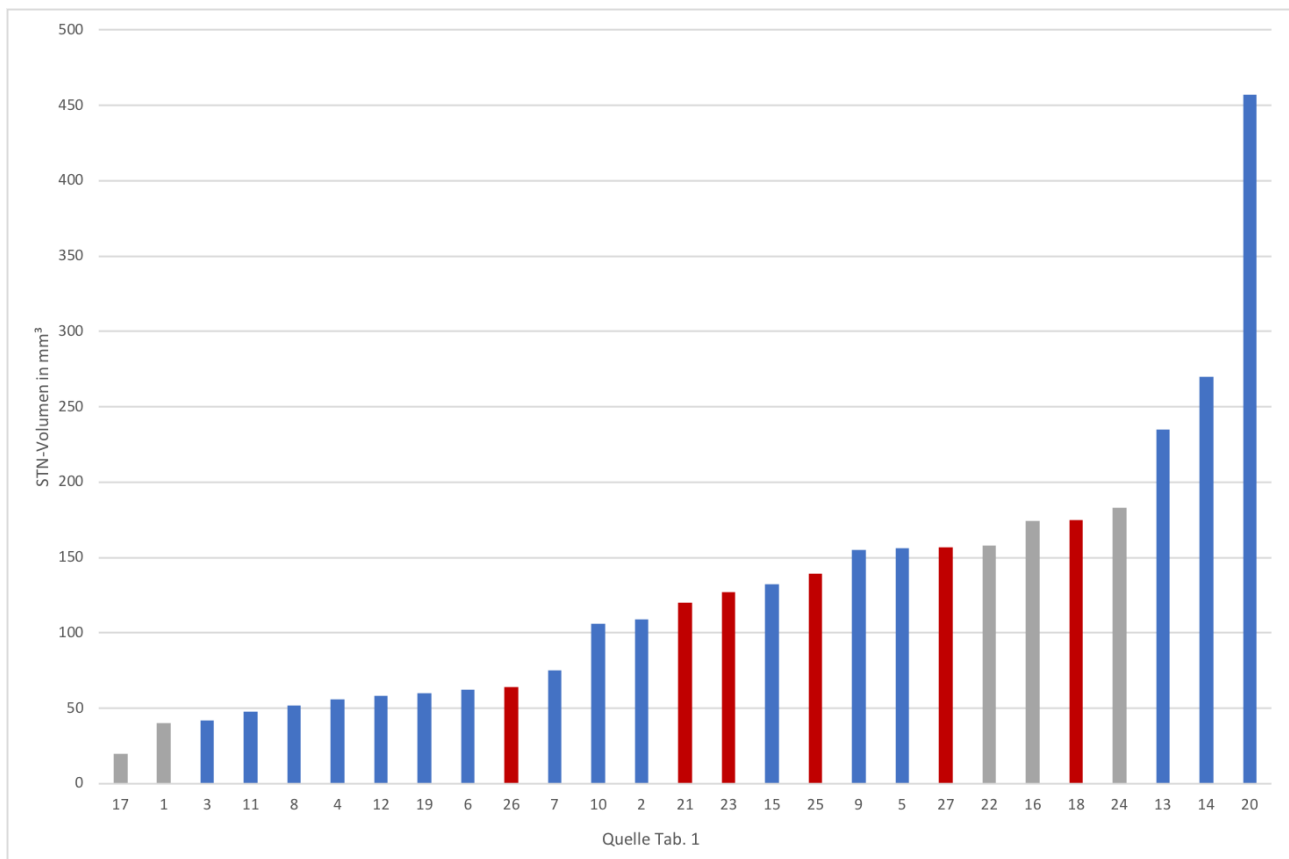


Abb. 2: Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 1.

grau – STN-Volumina auf Basis anderer Methoden (alle Methoden außer MRT oder Histologie), blau – STN-Volumina auf Basis der Magnetresonanztomografie, rot – STN-Volumina auf Basis der Histologie

1.2.4 Das Volumen des Nucleus subthalamicus im Altersverlauf

Nur wenige Studien treffen Aussagen über das STN-Volumen im Altersverlauf. Shen et al. bestimmten die STN-Volumina in einer Studie mit 120 gesunden Personen in der 1,5T MRT. Die zwischen 21 und 80 Jahre alten Personen wurden in sechs Subgruppen eingeteilt, sodass jeweils 20 Personen aus zehn aufeinanderfolgenden Jahren eine Subgruppe bildeten. Hierbei ergab sich eine signifikante Abnahme des STN-Volumens mit zunehmendem Alter (Shen et al. 2009). Diese Feststellung ist vereinbar mit der Abnahme grauer Substanz während des normalen Alterns und der damit einhergehenden Volumenabnahme von Hirnstrukturen (Sowell et al. 1999, Raz und Rodrigue 2006, Giorgio et al. 2010). Zwei weitere Gruppen, welche STN-Volumina mithilfe der MRT untersuchten, stellten keine Abhängigkeit der STN-Volumina vom Alter fest (Massey et al. 2012, Keuken et al. 2013). Keuken et al. untersuchten dabei STN Volumina von 30 Teilnehmern zwischen 22 und 77 Jahren mithilfe der 7T MRT. Als mögliche Erklärung des fehlenden Zusammenhangs zwischen STN-Volumen und Alter führten die Autoren an, dass bestimmte strukturelle Veränderungen erst in höherem Lebensalter auftreten könnten (Keuken et al. 2013). Massey et al. untersuchten mit 38 bis 94 Jahren eine größere Altersspanne unter Nutzung einer magnetischen Feldstärke von 9,4T. Mit sieben untersuchten STN-Volumina ist die Fallzahl als klein anzusehen (Massey et al. 2012). Die Korrelation zwischen STN-Volumen und

Alter mithilfe histologischer Untersuchungen ist in der Literatur selten. Lévesque und Parent haben fünf STN mit einer Altersspanne von 22 bis 85 Jahren untersucht, wobei keine Abhängigkeit zwischen STN-Volumen und Alter gefunden wurde (Lévesque und Parent 2005).

Fazit: Der Zusammenhang zwischen dem Alterungsprozess und dem Volumenverhalten des STN ist bisher wenig untersucht. Vorliegende Ergebnisse liefern kein einheitliches Bild.

1.3 Methodik

1.3.1 Der Nucleus subthalamicus in der Magnetresonanztomografie

Die Visualisierung des STN mithilfe der MRT ist anspruchsvoll aufgrund der geringen Größe und schrägen Ausrichtung der Struktur im Gehirn (Bejjani et al. 2000, Massey et al. 2012). Bisherige Studien deuten auf eine Verbesserung der Darstellbarkeit des STN hin, je höher die verwendete magnetische Feldstärke ist (Slavin et al. 2006, Abosch et al. 2010, Massey und Yousry 2010, Massey et al. 2012). Eine magnetische Feldstärke von 3T bietet gegenüber einer Feldstärke von 1,5T eine erhebliche Erhöhung des Kontrast-Rausch-Verhältnisses, was die Differenzierbarkeit unterschiedlicher Gewebe erhöht (Kerl et al. 2012). Das bei höheren Feldstärken ebenfalls größere Signal-Rausch-Verhältnis wirkt sich zudem positiv auf die Bildqualität aus, indem es die Grenzen des STN „glatter“ und „weniger körnig“ erscheinen lässt (Abosch et al. 2010). Dies erleichtert die Abgrenzbarkeit des STN gegen Umgebungsstrukturen. Bei höheren Feldstärken verringert sich die benötigte Messzeit (Cho et al. 2010). Im Vergleich mit 1,5T zeigt eine mit 3T Feldstärke erhobene Aufnahme einen erhöhten Suszeptibilitätseffekt für Eisen (Massey und Yousry 2010). Daher ist es möglich mit einer Feldstärke von 3T Gebiete mit niedrigerem Eisengehalt, wie den dorso-lateralen STN, noch zu detektieren, wohingegen diese bei 1,5T unentdeckt bleiben (Patil et al. 2012). Nachteilig wirkt sich die erhöhte Anfälligkeit höherer Feldstärken für Bewegungsartefakte aus, was insbesondere in der klinischen STN-Visualisierung bei Patienten mit einer eingeschränkten motorischen Kontrolle, wie Parkinsonpatienten, ein Problem darstellt (Weiss et al. 2015). Der breiten klinischen Anwendung von Spulen mit hohen magnetischen Feldstärken stehen zudem die Sicherheitsbedenken bei Patienten mit ferromagnetischen Metallimplantaten entgegen (Massey und Yousry 2010).

Fazit: Die Darstellbarkeit des STN in der MRT ist umso besser, je höher die verwendete magnetische Feldstärke ist. Die gesteigerte Anfälligkeit höherer magnetischer Feldstärken für Bewegungsartefakte ist bei Patienten mit eingeschränkter motorischer Kontrolle hingegen nachteilig.

Neben der magnetischen Feldstärke unterscheidet sich die Darstellbarkeit des STN in der MRT erheblich abhängig von der gewählten Kontrastdarstellung. Die T2-gewichtete Bilddarstellung ist die klinisch am häufigsten zur STN-Visualisierung genutzte Kontrastdarstellung (Dormont et al. 2004). In T2-gewichteter Darstellung erscheint der STN als eine hypointense (dunkle) Struktur (Bejjani et al. 2000, Hariz et al. 2003, Lv et al. 2015). Hamani et al. führten die Hypointensität des STN in der T2-Wichtung auf die Neuronendichte zurück (Hamani et al. 2005). Mehrheitlich jedoch wird die Hypointensität auf das Vorhandensein des paramagnetischen Eisens zurückgeführt, welches die transversen Relaxationszeiten verringert (Dormont et al. 2004, Schäfer et al. 2012). Der hypointense ventro-mediale STN ist im Vergleich zum dorso-lateralen vermehrt hyperintens

STN im T2-gewichteten Bild besser visualisierbar (Dormont et al. 2004, Massey et al. 2012). Mit der Berliner Blau Reaktion nach Perls, welche dreiwertiges Eisen nachweist, konnte ein höherer Eisengehalt im ventro-medialen STN im Vergleich zum dorso-lateralen STN dargestellt werden (Massey et al. 2012). Besonders bei Aufnahmen, die mit einer niedrigen Feldstärke von 1,5T erhoben werden, kann sich die Visualisierbarkeit des eisenarmen dorso-lateralen STN als anspruchsvoll erweisen (Patil et al. 2012). Im T2-gewichteten Bild stellt die Abgrenzung des STN zur inferior direkt anliegenden Substantia nigra vor allem bei niedrigen Feldstärken eine Herausforderung dar (Kerl et al. 2012, Patil et al. 2012). Die Substantia nigra erscheint in der T2-Wichtung aufgrund ihres Eisenvorkommens wie der STN hypointens (Coenen et al. 2008, Patil et al. 2012). Der Gehalt an Eisen im menschlichen Gehirn nimmt im Verlauf des Lebens zu (Drayer et al. 1986). Ein fortschreitender Anstieg an Eisengehalt gilt als spezifisches Charakteristikum der Basalganglien (Rutledge et al. 1987). Wenngleich die Zunahme an Eisen im Altersverlauf für den STN nicht explizit untersucht wurde, kann eine sich im Altersverlauf im T2-gewichteten Bild unterschiedlich darstellende Struktur vermutet werden.

Fazit: Die T2-gewichtete Bildgebung wird klinisch am häufigsten eingesetzt. Das vor allem ventro-medial vorkommende paramagnetische Eisen lässt den STN in der T2-Wichtung hypointens erscheinen. Die Abgrenzung des STN gegen die in der T2-Wichtung ebenfalls hypointense Substantia nigra ist oft schwierig.

Die T1-Wichtung bietet in Grenzgebieten zwischen grauer und weißer Substanz einen sehr guten Kontrast, wodurch sich die beiden Hauptkomponenten des Gehirns gut gegeneinander abgrenzen lassen. Obwohl es zwischen den Neuronen des STN und der benachbarten Capsula interna ein derartiges Grenzgebiet gibt, ist der STN, wie die Mittelhirnregion, der Thalamus oder der Globus pallidus kontrastarm in der T1-Wichtung (Abosch et al. 2010). Zur Darstellung des STN und dessen Abgrenzung gegen benachbarte Strukturen ist die T1-Wichtung ungeeignet.

Fazit: Die T1-Wichtung eignet sich nicht zur Darstellung tiefer Hirnstrukturen wie des STN.

Mit dem neueren Verfahren der SWI ist eine gute Visualisierung des STN möglich (Haacke et al. 2004, Vertinsky et al. 2009, Abosch et al. 2010). Die SWI-Bildgebung ermöglicht eine der herkömmlichen T1- und T2-Wichtung überlegene Abgrenzung von Strukturen innerhalb grauer Substanz (Duyn et al. 2007). Ein Vorteil der SWI-Bildgebung ist die im Gegensatz zur T2-Wichtung gute Abgrenzbarkeit des STN von der Substantia nigra (Abosch et al. 2010, Kerl et al. 2012). Jedoch wird darauf verwiesen, dass die Bilderzeugung mittels magnetischer Suszeptibilität vor allem bei höheren magnetischen Feldstärken zur Bildverzerrung neigt und somit die STN Grenzen nicht präzise dargestellt sein könnten (O’Gorman et al. 2011, Patil et al. 2012). Bot et al. verweisen auf eine fehlende Korrespondenz des elektrophysiologischen STN-Signals mit den mittels SWI akquirierten Daten. Während die T2-basierten STN nahezu vollständig mit den

elektrophysiologischen STN vereinbar waren, wurde das elektrophysiologische Signal in 21 Prozent von was? außerhalb der mithilfe von SWI bestimmten STN-Grenzen ermittelt. Die klinisch bedeutende laterale Begrenzung des STN wird, gemessen an den elektrophysiologisch ermittelten STN im Suszeptibilitätsgewichteten Bild, unzureichend abgebildet (Bot et al. 2016).

Fazit: Die Suszeptibilitätswichtung ermöglicht eine gute Abgrenzung des STN gegen die benachbarte Substantia nigra. Insbesondere bei höheren magnetischen Feldstärken neigt die Bildgebung mittels SWI möglicherweise zur Bildverzerrung, welche die korrekte Abbildung der Grenzen des STN beeinträchtigen könnte.

1.3.2 Der Nucleus subthalamicus in der Luxol-Fast-Blue-Färbung

Mithilfe der Luxol-Fast-Blue-Färbung (LFB), welche auch als Klüver-Barrera-Färbung bezeichnet wird, sowie der konsekutiven Gegenfärbung mit Kresylechtviolett lässt sich innerhalb eines histologischen Schnittes des zentralen Nervensystems sowohl die Zyto- als auch die Myeloarchitektur darstellen (vgl. Abb. 3). Somit bietet sich sowohl ein guter Kontrast gegen den STN umgebende myelinreiche Faserzüge, wie der Capsula interna, als auch eine klare Unterscheidung der STN-Neurone von den morphologisch differierenden Neuronen der Substantia nigra. Sulfonylierte Phorphyrinderivate ermöglichen die Visualisierung von Myelinscheiden in Formalin-fixierten Geweben (Klüver und Barrera 1953). In der LFB färben sich, basierend auf dem alkohollöslichen Aminosalz des sulfonierten Kupfer-Phthalozyanin, die den STN umgebenden Faserzüge an. Der Kontrastunterschied der Capsula interna, der Ansa lenticularis, des Fasciculus lenticularis und der Zona incerta zu den STN Neuronen in der LFB ermöglichen die Abgrenzung des STN von diesen, den Kern umgebenden, myelinreichen Strukturen. Der basische Farbstoff Kresylechtviolett bindet Strukturen mit negativer Ladung wie Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure. Zellkerne, raues Endoplasmatisches Retikulum und freie Ribosomen nehmen bei Zusatz von Kresylechtviolett einen dunkelvioletten Farbton an. Nucleoli erscheinen blau. In der Gegenfärbung mit Kresylechtviolett stellen sich dopaminerge Zellen aufgrund des höheren Anteils an rauem Endoplasmatischem Retikulum dunkler dar als nicht dopaminerge Neurone (Domesick et al. 1983). Die Gegenfärbung mit Kresylechtviolett ermöglicht somit die Abgrenzung der nicht-dopaminergen Neurone des STN gegen die dopaminergen Neurone der Substantia nigra. Weiterhin grenzen sich die Myelinscheiden nach der Gegenfärbung mit Kresylechtviolett schärfer gegen den Hintergrund ab.

Fazit: Die Luxol-Fast-Blue-Färbung visualisiert die Abgrenzung des STN gegen die umliegende weiße Substanz. Die konsekutive Kresylechtviolett-Gegenfärbung verbessert diese Abgrenzung zusätzlich und ermöglicht die Unterscheidung der STN-Neurone von den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra.

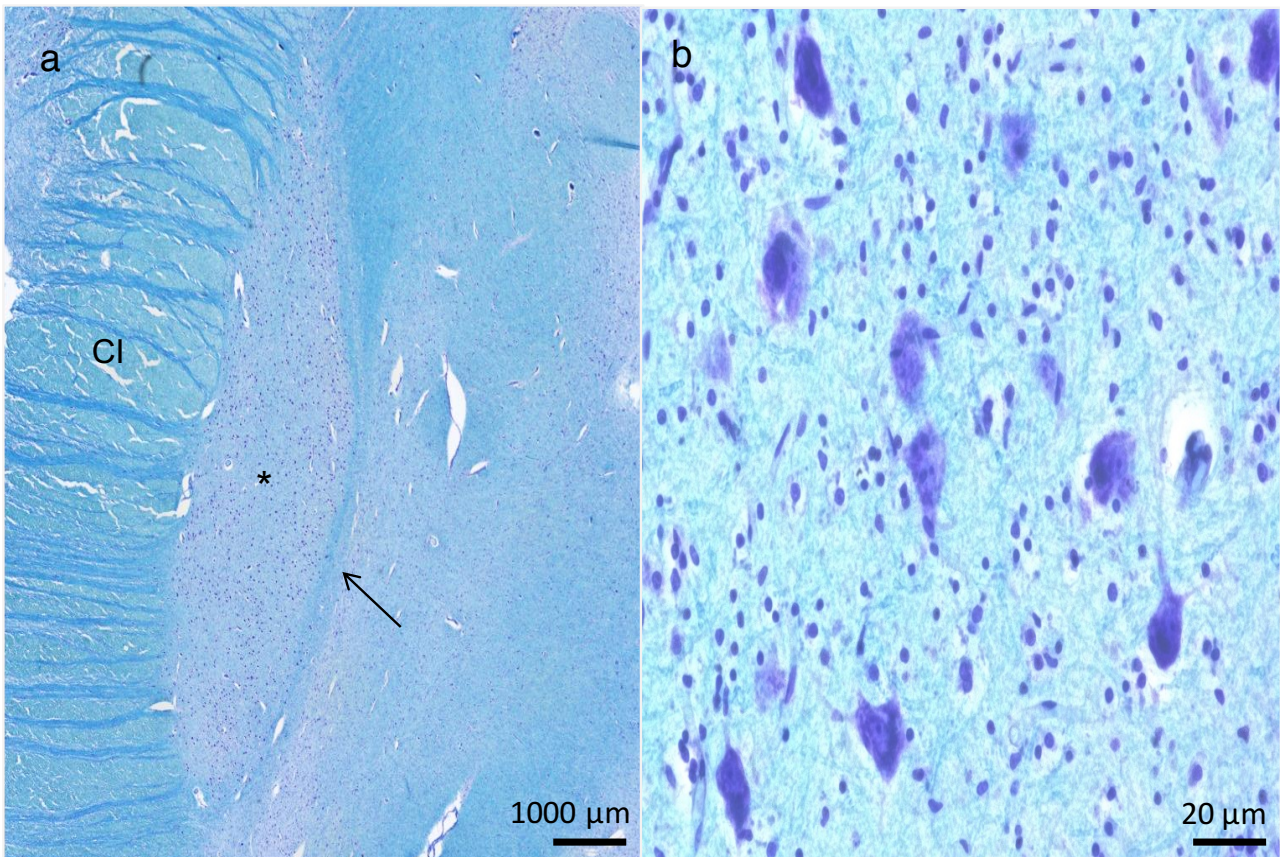


Abb. 3: Der STN in der Luxol-Fast-Blue-Färbung mit Kresylechtviolett-Gegenfärbung.

a - gute Abgrenzbarkeit des STN (*) gegenüber der ihn umgebenden weißen Substanz (Pfeil - Zona incerta); b - Gegenfärbung mit Kresylechtviolett bringt Neurone des STN zur Darstellung und erleichtert zusätzlich die Abgrenzung gegen die umgebende weiße Substanz

1.4 Ziele der Arbeit

In der Literatur der vergangenen 65 Jahre finden sich bis zum heutigen Tag inkonsistente Resultate für das Volumen des STN. Die Angaben reichen von 20 mm^3 bis zu 457 mm^3 (Slavin et al. 2006, Marani et al. 2008). Darauf basierend kann angenommen werden, dass der STN eine volumeninkonsistente Struktur darstellt, deren mehrheitlich praktizierte indirekte Zielpunktbestimmung insbesondere vor dem Hintergrund assoziierter Nebenwirkungen kritisch zu hinterfragen ist. Untersuchungen zur Abhängigkeit des STN-Volumens vom Alter zeigten bisher keine einheitlichen Ergebnisse. Während einerseits über die Abnahme der Volumina im Altersverlauf berichtet wird, konnten andere Forschungsgruppen keinen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern feststellen (Lévesque und Parent 2005, Shen et al. 2009, Massey et al. 2012, Keuken et al. 2013).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Volumen des menschlichen STN vergleichend durch Histologie und MRT zu untersuchen. Weiterhin soll ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen Alter und Volumen des STN festgestellt werden kann. Folgende Hypothesen werden adressiert:

1. Der STN ist eine in der MRT und Histologie volumenkonsistente Struktur.
2. Das Volumen des STN ist altersabhängig.

Die Klärung dieser Fragestellung kann helfen, abzuschätzen, innerhalb welcher räumlichen Ausdehnung subthalamische Neurone im Mittelhirn zu erwarten sind. Diese Erkenntnisse können einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Nebenwirkungen der Tiefen Hirnstimulation leisten. Eine Analyse der Altersabhängigkeit von STN-Volumina kann zeigen, ob dieser Parameter bei indirekten Targetingmethoden Berücksichtigung finden sollte.

Subthalamic Nucleus Volumes Are Highly Consistent but Decrease Age-Dependently—A Combined Magnetic Resonance Imaging and Stereology Approach in Humans

Johann Zwirner,¹ Dustin Möbius,¹ Ingo Bechmann,¹ Thomas Arendt,² Karl-Titus Hoffmann,³ Carsten Jäger,² Donald Lobsien,³ Robert Möbius,¹ Uwe Planitzer,⁴ Dirk Winkler,⁴ Markus Morawski,² and Niels Hammer^{1,5,*}

¹Faculty of Medicine, Institute of Anatomy University of Leipzig, Leipzig, Germany

²Paul-Flechsig-Institute for Brain Research University of Leipzig, Leipzig, Germany

³Department of Neuroradiology, University Clinic of Leipzig, Faculty of Medicine, Leipzig, Germany

⁴Department of Neurosurgery, University Clinic of Leipzig, Faculty of Medicine, Leipzig, Germany

⁵Department of Anatomy, University of Otago, Dunedin, New Zealand

Abstract: The subthalamic nucleus (STN) is a main target structure of deep brain stimulation (DBS) in idiopathic Parkinson's disease. Nevertheless, there is an ongoing discussion regarding human STN volumes and neuron count, which could potentially have an impact on STN-DBS. Moreover, a suspected functional subdivision forms the basis of the tripartite hypothesis, which has not yet been morphologically substantiated. In this study, it was aimed to investigate the human STN by means of combined magnetic resonance imaging (MRI) and stereology. STN volumes were obtained from 14 individuals (ranging from 65 to 96 years, 25 hemispheres) in 3 T MRI and in luxol-stained histology slices. Neuron number and cell densities were investigated stereologically over the entire STN and in pre-defined subregions in anti-human neuronal protein HuC/D-stained slices. STN volumes measured with MRI were smaller than in stereology but appeared to be highly consistent, measuring on average $99 \pm 6 \text{ mm}^3$ (MRI) and $132 \pm 20 \text{ mm}^3$ (stereology). The neuron count was $431,088 \pm 72,172$. Both STN volumes and cell count decreased age-dependently. Neuron density was different for the dorsal, medial and ventral subregion with significantly higher values ventrally than dorsally. Small variations in STN volumes in both MRI and stereology contradict previous findings of large variations in STN size. Age-dependent decreases in STN volumes and neuron numbers might influence the efficacy of STN-DBS in a geriatric population. Though the study is limited in sample size, site-dependent differences for the STN subregions form a morphological basis for the tripartite theory. *Hum Brain Mapp* 38:909–922, 2017. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: 3 Tesla magnetic resonance imaging; deep brain stimulation; HuC/D; neuron density; stereology; tripartite hypothesis

*Correspondence to: Niels Hammer, M.D., Department of Anatomy, University of Otago, Lindo Ferguson Building, 270 Great King St, Dunedin 9016, New Zealand. E-mail: nlshammer@googlemail.com
Johann Zwirner and Dustin Möbius contributed as equally to this manuscript as first authors.
Markus Morawski and Niels Hammer contributed as equally to this manuscript as senior authors.

Received for publication 4 October 2015; Revised 8 September 2016; Accepted 26 September 2016.

DOI: 10.1002/hbm.23427

Published online 11 October 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

INTRODUCTION

Deep brain stimulation (DBS) of the subthalamic nucleus (STN) is a routinely performed treatment in advanced idiopathic Parkinson's disease (IPD) [Benabid et al., 2000; Limousin and Martinez-Torres, 2008]. Although this method has been applied for a quarter of a century now [Benazzouz et al., 1993], side effects such as severe speech and voice disorders [Tsuboi et al., 2014], mania [Toker Ugurlu et al., 2014], suicides [Voon et al., 2008] and associated restrictions in patients' quality of life illustrate the need for further research in the field of DBS. Some side effects can be attributed to the reduction of dopaminergic drugs [Castrìoto et al., 2014; Limousin et al., 1998], the suboptimal placement of electrodes [Benabid et al., 2009] or the spread of the electric current to adjacent structures [Castrìoto et al., 2014] during stimulation. Reported STN volumes of the last 65 years give a first impression of the discrepancies in research varying from 20 mm³ [Slavin et al., 2006] to 235 mm³ [Schlaier et al., 2011]. If we take Marani's recalculation [Marani et al., 2008] of Richter's data [Richter et al., 2004] into account, a single STN can reach a maximum of 457 mm³. Previously reported stereology-based volumes ranged from 120 mm³ [Hardman et al., 2002] to 175 mm³ [Hardman et al., 1997, 2002; Lévesque and Parent, 2005; Von Bonin and Shariff, 1951]. In magnetic resonance imaging (MRI) as state-of-the-art *in vivo* technique for visualizing the STN [Aviles-Olmos et al., 2014; Lefranc et al., 2014; Longhi et al., 2015; Schlaier et al., 2014], even larger discrepancies were reported, ranging from 42 mm³ [Camlidag et al., 2014] to 235 mm³ [Schlaier et al., 2014]. Based on the divergent volumes reported elsewhere, one could conclude that STN visualization might be less reliable in MRI than in histology or stereology [Weise et al., 2013].

Furthermore, the number of STN neurons in humans given in literature is based on few studies with very limited numbers of specimens, ranging from 239,500 [Lévesque and Parent, 2005] to 520,300 neurons [Füssenich, 1967]. In this context, the dependency of both volume and neuron count on age is an interesting aspect. As the STN is a grey matter structure, aging should be accompanied with a volumetric and cellular reduction due to neuronal loss [Giorgio et al., 2010; Sowell et al., 1999]. Shen and coworkers investigated a large sample size in MRI and found age-dependent decreases in STN volumes [Shen et al., 2009]. However, the age-dependent decreases in STN volumes could not be confirmed in other MRI-based studies [Keuken et al., 2013; Massey et al., 2012]. Also, concerning the number of STN neurons, no correlations were yet reported in relation to age [Lévesque and Parent, 2005]. Regarding brain atlases commonly used in DBS, age-dependent alterations in STN volumes would have implications concerning the target site.

Another aspect which could provide essential information for neurosurgeons is the functional and spatial subdivision of the STN into clearly distinguishable regions. The current leading hypothesis that the STN is divided into

three subregions is widely spread and was recently demonstrated *in vivo* using diffusion weighted imaging [Lambert et al., 2012]. Since this assumption is based on few clinical observations or primate tracing studies, Alkemade and Forstmann stated that this hypothesis deserves re-evaluation [Alkemade and Forstmann, 2014].

Keuken et al. summarized 33 studies about the number of subthalamic subdivisions including non-human primates [Keuken et al., 2012]. They found scant evidence for the tripartite hypothesis whereas a division into two parts was adopted by two thirds [Keuken et al., 2012]. Moreover, they proposed ultra-high resolution MRI and histology to be the methods of choice to find evidence of assumed subdivisions within the human STN. While the selective stimulation of a certain sensomotoric subdivision within the STN remains attractive to alleviate motor symptoms in IPD, no histological evidence has to date been published supporting the tripartite hypothesis in humans. Morphologic differences in suspected subregions might be indicative of functionally different zones, which was our rationale to investigate the STN neuron density in predefined subvolumes. The goal of our investigation was therefore to provide an updated assessment of STN volumes in a direct MRI-histology comparison and related STN neuron densities.

The following hypotheses were addressed:

1. The STN is a volume-consistent structure both in MRI and related stereology.
2. STN volume and number of neurons are age-dependent.
3. Varying neuron densities provide morphological implications for the tripartite hypothesis of a subdivided STN.

MATERIAL AND METHODS

Dissection and STN Preparation

14 post-mortem human brains were obtained from body donors. While alive, all donors gave their informed and written consent to the donation of their bodies for teaching and research purposes. Being part of the body donor program regulated by the Saxonian Death and Funeral Act of 1994 (third section, paragraph 18 item 8), institutional approval for the use of the post-mortem tissues of human body donors was obtained from the Institute of Anatomy, University of Leipzig. The authors declare that all experiments have been conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. The mean age of the 4 male and 10 female body donors was 82.6 ± 10.0 years. The post-mortem delay was 24–72 hours (Table I). All brains were fixed in a mixture of 4-mass % paraformaldehyde (PFA) and 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH = 7.4) solution and stored away from light at 4°C. To prevent anatomical deformation the brains were suspended at the vessels of the *circulus arteriosus cerebri*. The PFA was

TABLE I. Clinical data on body donors used in this study

No.	Age (years)	Gender	Body weight (kg)	Brain weight (g)	Post-mortem delay (h)	Cause of death
1	65	F	98	1,123	24	Cancer of the biliary tree
2	69	F	64	1,304	72	Ovarian cancer
3	72	F	106	1,196	24	Sepsis
4	74	M	78	1,142	48	Sudden cardiac death
5	75	M	74	1,362	24	Acute kidney injury
6	81	F	56	1,186	24	Acute kidney injury
7	84	M	68	1,253	24	Subdural hematoma
8	85	F	64	1,126	24	Pulmonary edema
9	90	F	47	1,220	24	Cardiac insufficiency
10	90	F	84	1,344	24	Respiratory insufficiency
11	91	F	66	1,189	24	Heart attack
12	92	M	89	1,283	24	Heart attack
13	93	F	37	1,024	48	Cerebral infarction
14	96	F	67	1,336	24	Pneumonia
Mean value	82.6		71.3	1,220.6	30.85	
Standard deviation	10.0		18.8	98.7	14.67	

F, female; M, male.

changed once weekly to ensure optimal preservation of the specimens. After fixating the specimens for 30 days, tissue blocks including the STN and adjacent structures were removed from the brains. Therefore, a horizontal section was cut dorsal to the corpus callosum. Following this, a coronal section rostral to the optic chiasm was cut. Both hemispheres were then separated from the block sectioning lateral to the internal capsule. Caudally, a section in the axial plane just below the inferior colliculi defined boundaries.

MRI Acquisition

For MRI the PFA-fixed specimens were transferred to a plastic container. The bottom of the container was filled with gelatin (20-mass %) to minimize artifacts. The boxes were then filled with Fomblin (Y LVAC25/6; Solvay Solaxis Inc., Bollate, Italy) according to Benveniste et al. [1999] and D'Arceuil et al. [2007]. The prepared containers including the specimens were evacuated to 14 mbar using a vacuum pump (VP0221; Busch Produktions GmbH, Maulburg, Germany) to remove air bubbles and dissolved air within the box and the specimens. The scanning procedure was performed at room temperature using a 3 T MRI scanner (Magnetom Trio, Siemens AG, Erlangen, Germany) and a 12 channel head coil. T2-weighted images were obtained [Connolly et al., 2012; Lefranc et al., 2014], using the following parameters: T2 turbo spin echo; isovoxel size 0.4 mm, imaging time = 144 min, TR = 1,000 ms, TE = 32 ms, number of averages = 3, number of connections = 1, flip angle = 87°, band width = 180 Hz/pixel, turbo factor = 15. The MRI data were analyzed using Mimics software (Materialise, Leuven, Belgium; Fig. 1). In both hemispheres the STN were outlined manually twice by

two independent investigators (JZ, DM) blinded to each other's and their respective ratings before the volumes of each particular STN were calculated. These volumes were averaged and the obtained values were again averaged between the raters. Cronbach's alpha on the intra-rater reliability of the MRI-based STN volumes values was 0.89 ± 0.02 . Cronbach's alpha on the inter-rater reliability of the MRI-based STN volumes was 0.77 ± 0.01 . While segmenting in an axial plane, the internal capsule was used for defining the lateral border of the STN. In a coronal view the inferior and lateral aspect of the STN is bordered by the substantia nigra which was detected as a more hyperintense structure enveloping the ventral part of the STN. Sagittally, the superior-posterior border of the nucleus is demarcated by the zona incerta.

Histology

After MRI acquisition, the fixed specimens underwent a sequence of 70, 80, 96 and 100-volume % ethanol for dehydration. Subsequently the tissues were cleared in xylene for 16 hours with a renewal of the solvent after 8 hours. Dehydrating and clearing was performed on a shaking table with a gentle setting of 40 motions per minute. The blocks were preserved in paraffin with a melting point of 52°C–54°C for 12 hours followed by paraffin with a melting point of 56°C–58°C for 12 hours before they were embedded in paraffin. To evaluate shrinkage of the specimens, ten tissue blocks with a size similar to the samples were obtained from five of the PFA-fixed brains in proximity to the midbrain region. These blocks were treated in the same manner as the midbrain specimens. Volumes were determined before dehydrating the specimens in ethanol as well as after incubation in paraffin wax, measuring

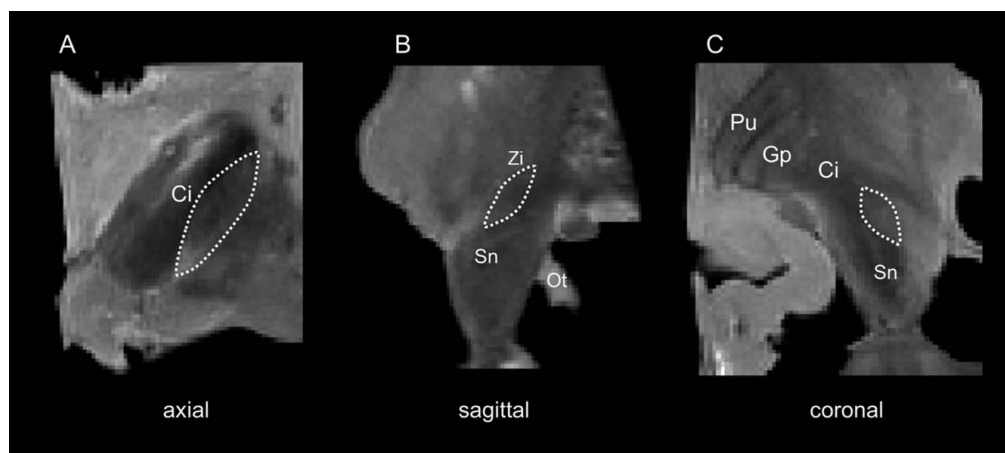


Figure 1.

T2-weighted magnetic resonance images of the human midbrain showing the subthalamic nucleus (STN). A: axial plane; B: sagittal plane; C: coronal plane; Ci, capsula interna; Gp, globus pallidus; Ot, optical tract; Pu, putamen; Sn, substantia nigra; Zi, zona incerta; dashed line, STN.

the displaced volume in 70-volume % ethanol and xylene, respectively. On basis of the shrinkage values, a correctional factor was computed to adjust the STN volumes in the histology specimens to the PFA-fixed condition.

Sections of 20 μm were obtained using a sliding microtome (Histoslide 2000R, Leica, Nussloch, Germany) similar to the study of Al-Helli and coworkers [Al-Helli et al., 2015]. The specimens were cut axially. The paraffin sections were dewaxed in xylene and rehydrated in a decreasing series of ethanol. One part of the sections was stained histochemically with luxol fast blue using cresyl fast violet as counter staining (luxol; Fig. 2A,B) [Klüver and Barrera, 1953]. Sections cut for immunohistochemical staining were pre-treated with an initial antigen retrieval step by heating to 90°C in trishydroxymethylamin-buffered saline (TRIS; pH = 8.0). Following a washing step with PBS-Tween (PBS-T) the sections were treated with 2-volume % hydrogen peroxide in 60-volume % methanol for 30 minutes to reduce endogenous peroxidase activity and rinsed with PBS-T. After that, a blocking step with 2% bovine serum albumin (Serva, Heidelberg, Germany), 0.5% donkey serum (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) and 0.3% casein (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) in PBS-T was performed for 30 minutes at room temperature to prevent non-specific antibody binding. Sections were incubated over two nights with primary antibody (1:500) at 4°C. Anti-human neuronal protein HuC/HuD mouse antibody 16A11 (HuC/D, Life Technologies, Darmstadt, Germany) was chosen to selectively stain the neurons [Marusich et al., 1994]. After incubation tissues were rinsed with PBS-T. Immunoreactivity was visualized using

a secondary donkey-anti-rat IgG (H + L)-biotin antibody (Dianova, Hamburg, Germany). Following a washing step with PBS-T slices were incubated with an ExtrAvidin[®] peroxidase complex (Sigma, Munich, Germany). After PBS-T washing and rinsing with TBS the peroxidase binding was visualized by nickel-enhanced Diaminobenzidine (black) as a chromogen (Sigma, Munich, Germany) for 1–6 minutes. After one last washing step with PBS and TBS the sections were transferred into distilled water. Finally, sections were dehydrated in an increasing ethanol series, cleared in toluene, and mounted in Entellan (in toluene; Merck, Darmstadt, Germany).

Stereological Analysis

Stereological analysis was performed using the optical fractionator method according to West et al. [1991] and Morawski et al. [2012] to estimate numerical densities of HuC/D-stained neurons. The Stereo Investigator software (Version 7, MicroBright field, Williston, VT) was used and neuron counts were performed on a Zeiss Axioscop 2 plus (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a motorized stage, a Ludl MAC 5000 (LEP, Hawthorne, NY) and a digital camera dv9000 (MicroBrightField, Williston, VT). The histological slices were segmented manually and neuron counts were performed by one rater. A final section thickness of $19.4 \pm 2.4 \mu\text{m}$ was received on average. This permitted to a dissector height of 16 μm using a guard zone of 2 μm on either side of the section. HuC/D-stained sections were used every $200 \pm 40 \mu\text{m}$ (corresponding to every 10th section) and luxol sections every $400 \pm 40 \mu\text{m}$ (corresponding

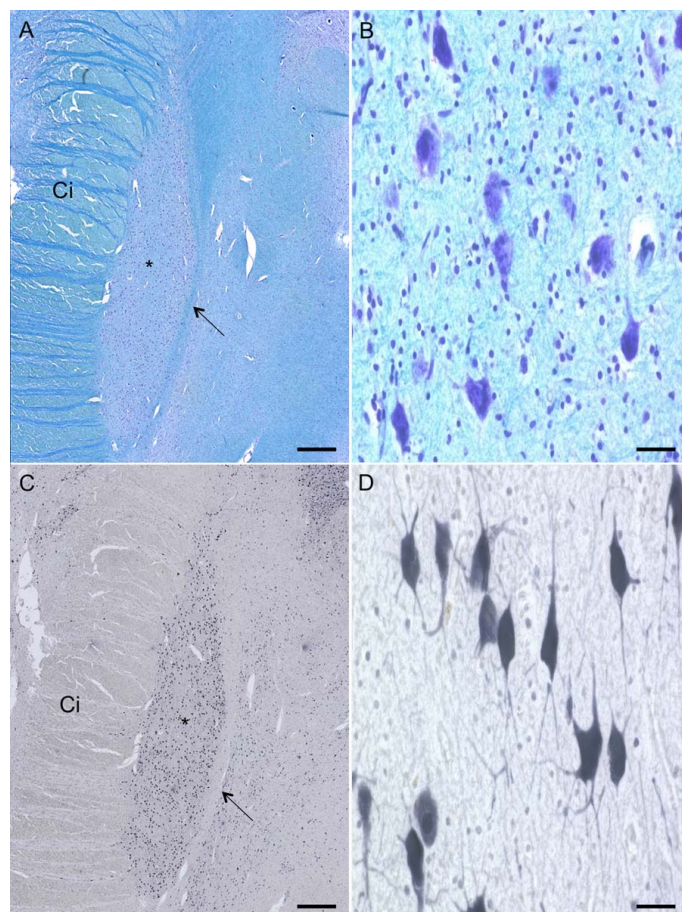


Figure 2.

Luxol-fast-blue/cresyl-violet- and HuC/D-staining of the human subthalamic nucleus (STN). The STN (*) can be depicted as an almond shaped structure surrounded by the capsula interna (Ci) at its lateral border and zona incerta (arrow) at its medial border (A,C). Neurons in luxol staining appear less distinguishable and glia

cells were stained (A,B). In the HuC/D-stained slices dendrites and axons of the neurons (C,D) are explicitly definable. Scale bar: 1,000 μm (A,C), 20 μm (B,D) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

to every 20th section). Depending on the precise dimensions of each individual STN 25 ± 5 and 12 ± 3 sections per case were evaluated for the HuC/D and luxol staining, respectively. The STN was first outlined under $4\times$ magnification and counting frames of $150 \times 150 \mu\text{m}$ were placed systematically into the delineated area. To figure out a reliable grid size, a pilot study of six different grid sizes including the most accurate one of $150 \times 150 \mu\text{m}$ was performed on one section. With an estimated deviation of

less than one percent from the most precise value of 1,750 cells, a grid size of $400 \times 400 \mu\text{m}$ was considered appropriate for further measurements. Neurons falling within these evenly distributed positions on the grid were then counted at $40\times$ magnification (Fig. 2C,D). Cells were considered if they were explicitly stained and at least fifty percent of their soma and one dendritic branch was visible within the counting frame. Neurons, which did not fulfill these criteria, were excluded. The absolute number of

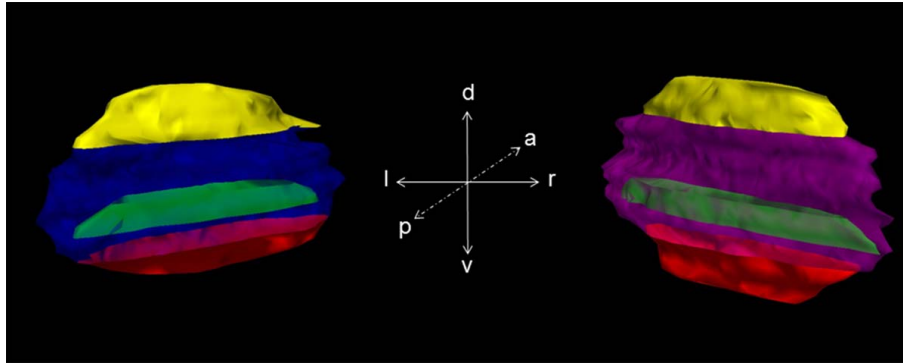


Figure 3.

The 3D reconstruction of the histological subthalamic nucleus (STN) from HuC/D-stained slices. Posterior view on the right and left STN including the predefined subvolumes. a: anterior; d: dorsal; l: left; p: posterior; r: right; v: ventral; yellow: dorsal subvolume; green: medial subvolume; red: ventral subvolume; blue: left STN; purple: right STN. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

neurons N of each STN was evaluated with the following formula:

$$N = \sum Q^- \cdot \frac{t_2}{h} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}$$

$\sum Q^-$ represents the total counts of neurons from each individual nucleus. Every 10th section was used, so the section sampling fraction (ssf) was 1/10. The area of the cumulated counting frame was $22,500 \mu\text{m}^2$ and the associated area over the section surface was $160,000 \mu\text{m}^2$, leading to an area sampling fraction (asf) of 0.14. The final section thickness after embedding and staining (t_2) resulted in $19.4 \pm 2.4 \mu\text{m}$. The height of the dissector (h) was $16 \mu\text{m}$. The volume (V) of each STN was calculated with the following formula, using the Cavalieri method:

$$V = \sum A \cdot t_1 \cdot n.$$

$\sum A$ represents the total enclosed area of all sections sampled. The section thickness as determined by the microtome (t_1) was $20 \mu\text{m}$. As every 10th section was sampled in HuC/D-stained slices and every 20th in luxol stained slices, n was 10, respectively, 20. The coefficient of error (CE) was calculated by the Stereo Investigator software as:

$$CE = \frac{\sqrt{\left(\frac{1}{f} - \frac{1}{F}\right) s^2}}{\bar{Q}}$$

with the number of counting frames f , the total possible sampling sites F , the estimated variance s^2 and the average number of particles \bar{Q} . In our study the CE ranged from 0.015 to 0.070.

Delineation of the STN and Definition of Subvolumes

The STN is an almond shaped structure. With HuC/D staining a precise method was chosen to stain neurons selectively. In the luxol sections neurons were additionally counter-stained using cresyl fast violet. Both stainings allowed to differentiate the STN from adjacent structures. When cutting in an axial plane from dorsal to ventral the first neurons belonging to the STN were detected closely posterior to the lenticular fasciculus, which forms the superior border of the nucleus [Massey et al., 2012]. This fascicle can clearly be depicted both in HuC/D and in luxol-stained slices. The zona incerta (Fig. 2) runs alongside the posterior-medial border of the STN. The lateral border of the nucleus is formed by the internal capsule. Both zona incerta and internal capsule completely border the nucleus enabling to exactly define the superior and posterior aspect of the STN. The anterior and inferior part of the nucleus is formed by the substantia nigra (Sn) on the ventro-medial side and still by the internal capsule laterally. Subvolumes were placed in the dorsal, medial and ventral region of the STN (Fig. 3). These regions were much smaller than the presumed functional regions to ensure proper discrimination, averaging 5 mm^3 from consecutive slices as given from the Stereo Investigator software. The dorsal volume was defined by the very first consecutive slices containing STN neurons when cutting from dorsal to ventral. Respectively, when cutting in the described axis the last slices include the ventral part of the STN. For medial subvolumes we have chosen the slice showing the widest extension of the STN, which was close to the third ventricle. Segmentation was performed in this

slice as well as in one slice above and below. Therefore a line from the posterior to the anterior tip of the segmented STN area was drawn and areas even smaller than half of the STN were placed in this medial part of the nucleus.

Statistical Analyses

Microsoft Excel version 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) and SPSS version 20 (Chicago, IL) were used for statistical comparison. Cronbach's alpha was used to compare the intra- and inter-rater reliability of the volumes obtained from MRI. A Bland–Altman plot was utilized to compare the volumes derived from the MRI with stereology. Side- or gender-related differences were compared with the Kolmogorov–Smirnov test for equal distribution of the data, followed by an independent sample *t*-test with post correction using the Bonferroni method. A one-way ANOVA for multiple comparisons test with post-hoc analyses was used to compare cell densities within the subregions of the STN. Correlations were determined using Pearson's correlation coefficient (CC). *P* values of 0.05 or less were considered as statistically significant.

RESULTS

A total of 14 brain specimens (25 hemispheres) including the STN were processed by means of MRI and subsequent luxol staining. In six of these specimens, HuC/D-staining was performed with a focus on the STN. In three specimens, only one hemisphere could be investigated stereologically resulting from artifacts, which occurred while sectioning. Body weight and age did not vary significantly between the genders. Moderate age-dependent decreases in body weight were observed (CC = -0.48, *P* = 0.01). From the brain specimens taken to determine the shrinkage caused by the fixation and embedding, a volume decrease of 46% ± 5% was calculated, resulting in a correctional factor of 1.85.

Though STN Volumes Were Different in MRI and Stereology, STN Volumes Appear to Be Highly Consistent but Decreased with Age

The STN volumes in the MRI datasets averaged 99 ± 6 mm³ (Fig. 4; Table II). In the luxol-stained slices, the STN volumes averaged 71 ± 11 mm³ without shrinkage correction and 132 ± 20 mm³ with shrinkage correction (Table II). Similar values were obtained in the HuC/D-stained samples with 68 ± 12 mm³ and 126 ± 22 mm³ without and with shrinkage correction, respectively. In each of the volumes obtained by the different methods, the variations in the STN volumes appeared to be small. Comparison of left and right STN volumes did not show differences on a statistically significant level. However, MRI-based STN volumes were significantly larger in females compared with males with 100.63 ± 5.82 mm³ and 95.34 ± 8.86 mm³, respectively (*P* = 0.03). The side difference was not statistically significant in the

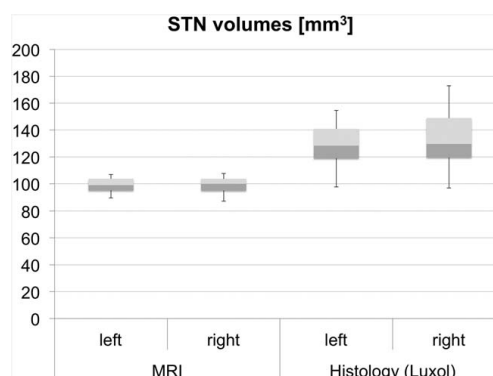


Figure 4.

Volumes of the subthalamic nucleus (STN) in magnetic resonance imaging (MRI) and histology. Volumes calculated from histology appear to be higher than those gained from MRI. The boxplots show the 25th percentile, median and the 75th percentile. The error bars reflect the minima and maxima.

luxol-stained tissues (69.89 ± 9.28 vs. 72.97 ± 12.38 mm³; *P* = 0.08). In the Bland–Altman plot comparing the volumes from MRI with the luxol-based volumes, differences of the mean values of 32.93 mm³ were found (Fig. 5). Moreover, increasing STN volumes tended to give a larger spread between the single mean values obtained in both methods (CC = 0.851, *P* < 0.01). Moderate age-dependent decreases were observed for the stereology-based STN volumes in luxol (CC = -0.59, *P* < 0.01). Also, luxol-based STN volumes correlated negatively with brain weight (CC = -0.50, *P* = 0.01).

The Number of STN Neurons Was Approximately 430,000 and Decreased Age-Dependently

The number of HuC/D-positive neurons in the STN region was on average 431,088 ± 72,172 cells. Side-comparison yielded non-significantly different results with 441,731 ± 82,821 and 418,317 ± 63,829 cells for the left and right side, respectively (Table III). Also, gender comparison revealed non-significantly neuron numbers for females and males with 390,426 ± 44,089 and 464,974 ± 76,362 cells, respectively. Moderate positive correlations were found for the cell count of HuC/D-positive STN neurons and STN volumes (CC = 0.68, *P* = 0.02). Moreover, a strong age-dependent decrease was observed in the cell count of HuC/D-positive STN neurons (CC = -0.75, *P* < 0.01).

Cell Density Varied Significantly in the Dorsal Compared with the Ventral STN Subvolumes

Within the predefined STN subvolumes, cell densities were as follows: in the dorsal region, density was 4,884 ± 1,321

TABLE II. Volumes of the subthalamic nucleus obtained from magnetic resonance imaging (MRI) and luxol fast blue/cresyl violet stained slices

No.	Subthalamic nucleus volume (mm ³)					
	MRI		Luxol		Luxol ^a	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right
1	102.97	103.58	83.83	90.75	154.55	167.31
2	106.88	104.63	83.13	*	153.26	*
3	94.96	95.44	77.64	93.80	143.14	172.93
4	100.27	99.99	76.05	79.17	140.21	145.96
5	89.43	87.01	66.36	68.44	122.35	126.18
6	92.41	94.96	52.96	72.20	97.64	133.11
7	97.78	98.25	59.28	61.42	109.29	113.23
8	105.34	105.61	71.39	80.45	131.62	148.32
9	92.27	88.82	62.20	62.94	114.68	116.04
10	106.76	107.61	69.61	66.82	128.33	123.20
11	97.02	*	76.41	*	140.87	*
12	95.45	94.58	64.54	52.51	118.99	96.81
13	103.8	102.85	*	81.59	*	150.42
14	103.57	102.46	65.22	65.53	120.24	120.81
Mean ± SD	99.21 ± 5.80	98.91 ± 6.42	69.89 ± 9.28	72.97 ± 12.38	128.86 ± 17.10	134.52 ± 22.82
Total	99.06 ± 5.99		71.37 ± 10.76		131.58 ± 19.83	

^a, corrected with shrinkage factor; SD, standard deviation; *, excluded due to artifacts.

cells/mm³, in the medial region, cell density was 6,345 ± 913 cells/mm³. In the ventral region, density averaged 8,000 ± 2,169 cells/mm³ (Fig. 6; Table III) Cell densities did not vary side- or gender-dependently on a statistically significant level. Comparison between the three subregions showed significantly lower cell densities in the dorsal compared with the

ventral region ($P < 0.001$) as tested with the ANOVA followed by post-hoc testing. Comparison of the cell density of the ventral region compared with the medial region ($P = 0.06$) and comparison of the dorsal to the medial region ($P = 0.11$) yielded non-significant differences. No age- or body weight-dependent alterations were observed in the cell densities.

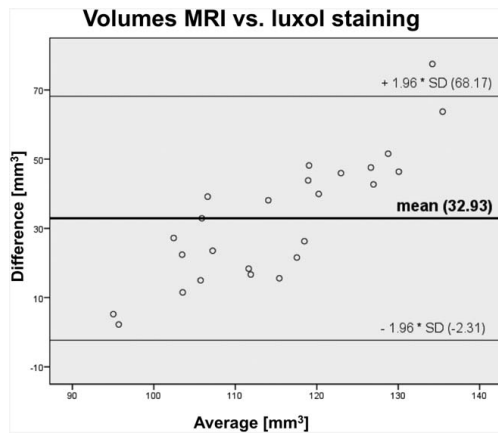


Figure 5.

Bland–Altman plot comparing the volumes obtained from magnetic resonance imaging with histology. The plot indicates that methods give different but consistent results with increasing errors at increasing volumes.

DISCUSSION

A glance at literature reveals that 150 years after Jules Bernard Luys first characterized the STN [Luys, 1865], several fundamentals of this small diencephalic structure, such as a functional subdivision, are still open to debate [Keuken et al., 2012; Lambert et al., 2012]. Our study is the first to substantiate STN volumes in a correlative 3 T T2-weighted MRI and stereology approach. Both methods were proven to give different but consistent results, indicated by the Bland–Altman plots (Fig. 5). In our study, STN volumes were obtained stereologically in a sample size of 25 STN, which is higher than in previous studies with one to fourteen STN [Füssenich, 1967; Hardman et al., 1997, 2002; Lange et al., 1976; Lévesque and Parent, 2005; Von Bonin and Shariff, 1951].

STN Volumes Are Highly Consistent in Stereology and Decrease Age-Dependently

The STN volumes determined with the luxol staining were highly consistent among the samples from the different individuals of our group. Our obtained STN volumes confirm the

TABLE III. Numbers of neurons obtained from stereological analysis and calculated neuron densities within the predefined subvolumes

No.	Neuron count		Neuron density (cells/mm ³)					
			Dorsal		Medial		Ventral	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
4	572,054	483,361	4,189	3,328	5,609	5,660	8,239	6,677
7	484,303	487,669	5,061	7,412	7,272	6,668	9,389	10,252
9	321,438	379,175	2,784	6,442	7,837	4,853	5,558	5,023
10	416,136	346,323	4,396	5,293	6,243	7,592	9,395	10,533
11	425,994	*	4,198	*	6,025	*	4,538	*
14	430,465	395,062	5,173	5,451	5,904	6,132	8,885	9,507
Mean ± SD	441,731 ± 82,821	418,318 ± 63,829	4300 ± 857	5,585 ± 1,522	6,482 ± 874	6,181 ± 1,033	7,667 ± 2,098	8,398 ± 2,428
Total	431,089 ± 72,172		4884 ± 1321		6,345 ± 913		8,000 ± 2,169	

SD, standard deviation; *, excluded due to artifacts.

results of the Hardman group (single STN ~ 124 mm³) which applied comparable pre-conditions for the stereological analysis [Hardman et al., 1997, 2002]. Further, our data support the older work of the Lange group reporting volumes of approximately 139 mm³ [Lange et al., 1976]. However, Von Bonin and Shariff [1951] as well as Lévesque and Parent [2005] reported larger volumes from 157 to 175 mm³, respectively. Possible explanations for the deviation in STN volumes from our data might be related to the different methods applied and also to the sample sizes being much smaller in their study. During the embedding process, we observed volume decreases of approximately 46% compared with the initial volume, which was our rationale to adjust the STN

volumes for shrinkage. Vice versa, STN volumes are unlikely to be smaller than the minimum volumes computed from the embedded samples without adjusting these data for shrinkage (Fig. 4; Table II). Taking into account the unadjusted minimum values and age-dependent decreases of the geriatric population under investigation shown here, it is highly unlikely for STN volumes *in vivo* to have values less than our lowest reported STN volume of 53 mm³. Although, even smaller values have been reported elsewhere but appear to be the effects of estimations [Akakin et al., 2015; Camlidag et al., 2014; Schäfer et al., 2012; Slavin et al., 2006]. Conclusively, STN volume can be considered consistent in both MRI and stereology, confirming our first hypothesis.

Another relevant finding in our study was that STN volume significantly decreased with age, confirming our second hypothesis. Though this finding is in accordance with an expected age-dependent atrophy of grey matter structures [Giorgio et al., 2010; Sowell et al., 1999], it has not yet been proven for the STN stereologically. Earlier histological studies on age-dependent alterations of STN volume could not substantiate this finding [Hardman et al., 1997, 2002; Lévesque and Parent, 2005]. Our finding of brain-weight dependent decreases in STN volumes cannot be entirely explained on the basis of the given data and needs further substantiation in a functional context.

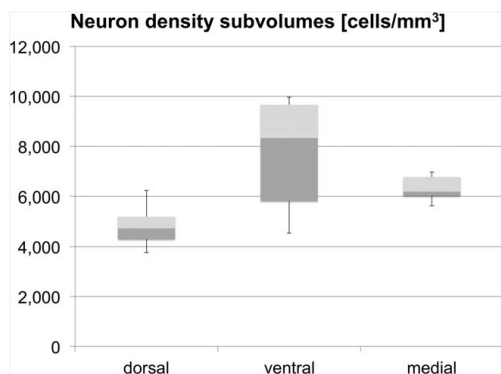


Figure 6.

Neuron densities in predefined subvolumes within the human subthalamic nucleus (STN). Densities calculated in the dorsal subregion of the STN were significantly lower than those in the ventral part. The boxplots show the 25th percentile, median and the 75th percentile. The error bars reflect the minima and maxima.

MRI Volumes Complement the Volumes Obtained from Histology

In accordance to published literature, MRI-based human STN volumes show large variations, ranging between 42 mm³ [Camlidag et al., 2014] and 235 mm³ [Schlaier et al., 2011]. Table IV summarizes existing investigations on STN volumes. In contrast to the existing values reported in these studies, the MRI-based STN volumes in our study were considerably consistent (Table II). Additionally, in spite of the fact that the manual STN volume rendering appears to introduce a measurement error largely dependent on the investigator's experience, intra- and

TABLE IV. Comparison of subthalamic nucleus (STN) volumes published in literature

Author	Method	Age (mean age)	Age range (years)	Volume (mm ³)	Segmentation
<i>Our values</i>	MRI 3.0 T	83	65–96	99 ^a	SA
<i>Our values</i>	Histology (20 µm paraffin)	83	65–96	131	SA
Akakin et al., 2015 [retracted]	n/g	n/g	n/g	40	n/g
Xiao et al., 2014	MRI 3.0 T	61	n/g	156 ^b	SA
Camlidag et al., 2014	MRI 1.5 T	56	45–65	42 ^{b,c}	SA
Keuken et al., 2014	MRI 7.0 T	24	n/g	56 ^d	SA
Weiss et al., 2015	MRI 7.0 T	67	44–91	109 ^d	SA
Keuken et al., 2013	MRI 7.0 T	24	22–28	62 ^d	SA
Keuken et al., 2013	MRI 7.0 T	51	40–59	75 ^d	SA
Keuken et al., 2013	MRI 7.0 T	72	67–77	52 ^d	SA
Lambert et al., 2012	MRI 3.0 T	34	n/g	155 ^e	SA
Massey et al., 2012	MRI 9.4 T	75	38–94	106	SA
Schäfer et al., 2012	MRI 7.0 T	24	22–28	48	SA
Forstmann et al., 2012	MRI 7.0 T	24	18–33	58 ^d	SA
Schlaier et al., 2011	MRI 1.5 T	63	46–73	235	SA
Colpan and Slavin, 2010	MRI 3.0 T	62	n/g	270	SA
Shen et al., 2009	MRI 1.5 T	♂:44; ♀: 46	21–80	132 ^f	SA
Nowinski et al., 2006	NURBS-reconstruction	n/g	atlas-based	174 ^g	A
Slavin et al., 2006	n/g	n/g	n/g	20	SA
Lévesque and Parent, 2005	Histology (55 µm freezing microtome)	51	22–85	175	SA
Richter et al., 2004	MRI 1.5 T	55	39–68	60 ^h	M
Richter et al., 2004	MRI 1.5 T	55	39–68	457 ⁱ	M
Hardman et al., 2002	Histology (50 µm cryostat)	74	n/g	120 ^j	SA
Yelnik, 2002	Computer-aided 3D cartography	n/g	n/g	158	A
Hardman et al., 1997	Histology (50 µm cryostat)	75	61–84	127 ^j	SA
Schaltenbrand and Wahren, 1977	Atlas of stereotaxy	n/g	atlas-based	183 ^k	M
Lange et al., 1976	Histology (20 µm paraffin)	50	24–99	139 ^l	M
Füssenich, 1967	Histology (20 µm paraffin)	70	58–91	64	M
von Bonin and Shariff, 1951	Histology	n/g	n/g	157	M

^aVolume calculation is based on average mask of raters.

^bAC-PC native space.

^cProportion of the entire brain volume.

^dVolume calculation is based on conjunction mask of raters.

^eAverage of left and right STN volumes.

^fAverage of male and female STN volumes including both hemispheres.

^gAverage of volumes obtained from axial, coronal, and sagittal models.

^hRecalculation of Schäfer et al. [2012].

ⁱRecalculation of Marani et al. [2008].

^jGiven total STN volume of both hemispheres divided by 2.

^kApproximated by Nowinski et al. [2005].

^lAverage of male and female STN volumes; A—“automatic”: segmentation is fully based on a computer software without manual segmentation as a part of the process; M—“manual”: no computer software was involved in the segmentation process and in volume calculating; MRI—magnetic resonance imaging; n/g—not given; NURBS—Nonuniform Rational B-Splines; SA—“semiautomatic”: segmentation is done manually and a computer software (e.g., NeuroLucida, Image J) was used to calculate the volume.

inter-individual ratings proved our results to be reliable. Determining the STN volumes from MRI is influenced by several factors, like quality of images (acquisition time, field strength, image weighting and size) which might crucially influence outlining the STN shape [Kerl et al., 2012; Massey et al., 2012; Weise et al., 2013]. However, even if imaging conditions were similar the obtained volumes varied widely [Camlidag et al., 2014; Schlaier et al., 2011], which is in contrast to our data.

Consequently, MRI-based segmentations are highly affected by the conventions of the research groups regarding what is recognized to be the STN in MRI. This issue is related to so-called “problem zones” which are difficult to visualize even with excellent imaging parameters, no matter if using a 1.5 T or a 9.4 T MRI scanner [Massey et al., 2012; Rijkers et al., 2007].

Contrary to stereology, MRI volumes of the STN revealed no correlation with age. Shen and colleagues have shown

age-dependent decreases of STN volumes [120 participants, range 20–80 years, 1.5 T MRI scanner; Shen et al., 2009]. They observed volume decreases from approximately 135 mm³ (20–30 years) to approximately 122 mm³ (70–80 years) in their cohorts. The body donors used in our study had a mean age of 83 ± 10 years. This age is significantly older than the mean age at first diagnosis of IPD averaging 60 years [Samii et al., 2004]. Patients with an average age as in our study usually present symptoms if suffering from IPD. Therefore, we consider our sample likely to be valid as a non-IPD control. Taking this into account, the MRI-based volumes of 99 ± 6 mm³ obtained in our study complement the age-dependent decreases of the STN volumes reported by Shen et al. [2009]. Massey et al. obtained volumes of 106 mm³ per STN in 9.4 T MRI [Massey et al., 2012]. Female STN volumes obtained in MRI were significantly larger than male ones, contradicting the findings of Shen et al. [2009]. The fact that we could not substantiate age-related changes of STN volumes in MRI may be related to the limited resolution in our setting. Also the above-mentioned difficulties in outlining the STN and the relatively low case number within an age span ranging between 65 and 96 years might be a reason. Abosch et al. showed a highly improved demarcation of the STN to surrounding structures *in vivo* obtained in a 7 T scanner using susceptibility-weighted imaging [Abosch et al., 2010]. Moreover, Cho et al. could significantly prove the advantages of 7 T MR images regarding spatial resolution and contrast to adjacent tissues compared with 1.5 and 3 T MRI [Cho et al., 2010]. These points enhance the need for ultra-high field MRI to visualize the STN both in anatomical as well as in clinical settings.

The Number of STN Neurons Appears to Be Higher than Reported Recently and Decreases with Age

An average number of 431,000 neurons was computed for a single STN in our study based on stereological investigations in HuC/D-stained slices. HuC/D is selectively staining neuron-specific RNA. The number of false-negative neurons or false-positive cells is low compared with Nissl or other histochemical stains. Consequently, the number of neurons computed from histology appears to be quite accurate [Marusich et al., 1994]. Most recent investigations using Nissl staining report lower STN neuron numbers. Lévesque et al. computed 239,500 neurons per STN in 5 male hemispheres [Lévesque and Parent, 2005]. Hardman and coworkers reported similar values of approximately 280,000 neurons in 5 brains [Hardman et al., 1997, 2002]. The largest number of STN samples was investigated by Lange et al., determining 297,000 STN neurons within 14 hemispheres [Lange et al., 1976]. The highest numbers of STN neurons were reported by Füssenich with 530,000 cells in 5 brains [Füssenich, 1967]. To our best knowledge our study is the first to report significant decreases of STN neuron count with age. This number is

in line with a continuous loss of neurons accompanied with normal ageing [Terry et al., 1987] and might have an impact on the STN as a target site in deep brain stimulation for the treatment of IPD.

Neuron Density in Subvolumes Appears to Be Site Dependent, Forming a Morphological Basis for the Tripartite Theory of the STN

Lambert et al. [2012] as well as Haynes and Haber [2013] gave evidence for the existence of a topologically-organized STN in humans and in primates, respectively. Furthermore, they argue that there is no strict anatomical border between the suspected parts of the STN. In our study, while examining the histological slices, we could not detect any evidence for a physical border between the neurons such as septa. Addressing the tripartite hypothesis, neuron density was determined in three predefined regions within the STN (Figs. 3 and 6). These were a dorsal, medial and ventral subregion. In our experiments, investigating neuron densities within the respective regions, significant differences were observed between the dorsal and the ventral part of the STN. These data expand the findings of Lévesque et al. describing an increase in cell density from the dorsal to the ventral part of the STN [Lévesque and Parent, 2005]. Such an idea of a gradient as well as the differences of neuron density we observed within the predefined subvolumes might be an anatomical implication for a subdivision of the STN. These findings need to be substantiated *in vivo*.

Moreover, both the shape and volumetric analyses of STN neurons were not in focus of our investigation. In future studies it is therefore necessary to analyze the STN neurons in the subvolumes with regard to their potential function as well as their morphological characteristics. Even though imaging methods like diffusion weighted imaging, fiber tracking or MRI using higher field strengths provide proper evidence for a subdivided STN, we still consider histology to be the basis of investigation. Combining both methods will therefore expand the results in future research. One of our hypotheses stating that the functional separation of the STN is reflected by differences in STN morphology can therefore be accepted in part - comparing the dorsal with the ventral subregion.

Though Age-Dependent Decline in STN Volumes and Neuron Number Was Observed, the STN Appears to Be a Highly Consistent Structure for DBS Due to the Small Variation in Volume

Our study reveals decline of human STN volume and cell count with age (ranging between 65 and 96 years). Independent of STN changes, which may be affected functionally and structurally by Parkinson's disease itself [Bronstein et al., 2011; Samii et al., 2004], the natural decrease of STN volume and neuron count with age could be an influencing factor on the efficacy and the side effects

following DBS. The demonstrated age-dependency could result in a lower number of neurons in the target region. This fact and the findings on the STN shifting in an age-dependent manner [Den Dunnen and Staal, 2005; Kitajima et al., 2008; Mavridis et al., 2014] might also influence the efficacy of STN-DBS especially if the STN is localized indirectly [Savas et al., 2013; Schuepbach et al., 2013]. Moreover, the smaller the STN, the more precise the accuracy of electrode placing should be in order to have the desired clinical effects. Electrode placement in a smaller structure might as well be influenced by intraoperative brain-shift [Winkler et al., 2005], which is likely to increase age-dependently due to cortical atrophy. However, based on our theoretical investigations, the neurosurgeon may expect a consistent STN volume of $132 \pm 20 \text{ mm}^3$ in the subthalamic region. The accuracy in which the STN was visualized in our experiments may however not be realized in a clinical setting due to the extremely long image acquisition times. Therefore, in quite a few cases the STN is not clearly definable in clinical routine due to e.g. low scanning time, resulting in indirect [Schuepbach et al., 2013] rather than in direct targeting [Houshmand et al., 2014; Lefranc et al., 2014; Longhi et al., 2015; Savas et al., 2013]. Nevertheless, knowing that the STN is a consistent structure concerning its volume may explain the reliability of DBS in most cases.

Limitations

First, the brains used in this study were obtained from elderly and therefore mostly multimorbid donors. Severity of diseases, premortal pharmacological treatments as well as post-mortem delay might influence the tissue quality. To minimize these effects, we carefully screened our donors and excluded the ones with known neurological disorders. In all 14 specimens no neurodegenerative changes could be observed histologically. Moreover, we only used brains with a relatively short post mortem delay (maximum 72 hours), undergoing subsequent cooling post mortem. Secondly, even though we calculated an adjustment factor to compensate for the shrinkage following the embedding of the tissues, it remains unclear whether the shrinkage occurring within the STN is different from the surrounding tissues. Inhomogeneous shrinkage could partly explain the differences between the stereology- and the MRI-based volumes. It also needs to be taken into account that the post-mortem magnetic properties of tissues change with prolonged fixation [Shepherd et al., 2009]. Thirdly, despite using a guarding zone for the cell count, it cannot be excluded that the stereological results might be affected in terms of an over-estimation of neurons, which has to be weighed against a slight underestimation in HuC/D staining. Finally, the predefined subvolumes used to investigate neuron densities only partly reflect the layout of subdivisions commonly proposed in literature [Hamani et al., 2004; Joel and Weiner, 1997; Massey and Yousry, 2010; Parent and Hazrati, 1995; Smith et al., 1990;

Temel et al., 2006]. Especially the medial subregion in our observations extends far more into the center of the nucleus than described there.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their gratitude to the body donors for donating their corpses for this research project after passing away. The authors also thank their families for supporting their valuable decision. Dr. Reinhard Braul from MicroBrightfield kindly supported us with the 3D reconstruction and analysis of the stereological data. Furthermore, we would like to acknowledge Sabine Löffler, Uwe Deubel and Matthias Oehme for their support obtaining the tissues.

REFERENCES

- Abosch A, Yacoub E, Ugurbil K, Harel N (2010): An assessment of current brain targets for deep brain stimulation surgery with susceptibility-weighted imaging at 7 tesla. *Neurosurgery* 67:1745–1756.
- Akakin A, Yilmaz B, Kilic T, Rhoton AL Jr (2015): Anatomy of the subthalamic nucleus, with correlation of deep brain stimulation. *J Neurosurg* [recently retracted by the author due to anatomical incorrectness; doi:10.3171/2014.10.JNS145].
- Alkemade A, Forstmann BU (2014): Do we need to revise the tripartite subdivision hypothesis of the human subthalamic nucleus (STN)? *Neuroimage* 95:326–329.
- Al-Helli O, Thomas DL, Massey L, Foltynie T, Limousin P, Holton JL, Yousry TA, Zrinzo L (2015): Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus: Histological verification and 9.4-T MRI correlation. *Acta Neurochir* 157:2143–2147.
- Aviles-Olmos I, Kefalopoulou Z, Tripoliti E, Candelario J, Akram H, Martinez-Torres I, Jahanshahi M, Foltynie T, Hariz M, Zrinzo L, Limousin P (2014): Long-term outcome of subthalamic nucleus deep brain stimulation for Parkinson's disease using an MRI-guided and MRI-verified approach. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:1419–1425.
- Benabid AL, Koudsie A, Benazzouz A, Fraix V, Ashraf A, Le Bas JF, Chabardes S, Pollak P (2000): Subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Arch Med Res* 31:282–289.
- Benabid AL, Chabardes S, Mitrofanis J, Pollak P (2009): Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 8:67–81.
- Benazzouz A, Gross C, Féger J, Bourad T, Bioulac B (1993): Reversal of Rigidity and Improvement in Motor Performance by Subthalamic High-frequency Stimulation in MPTP-treated Monkeys. *Eur J Neurosci* 5:382–389.
- Benveniste H, Einstein G, Kim KR, Hulette C, Johnson GA (1999): Detection of neuritic plaques in Alzheimer's disease by magnetic resonance microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14079–14084.
- Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL, Lozano AM, Volkmann J, Stefani A, Horak FB, Okun MS, Foote KD, Krack P, Pahwa R, Henderson JM, Hariz MI, Bakay RA, Rezaei A, Marks WJ, Jr, Moro E, Vitek JL, Weaver FM, Gross RE, DeLong MR (2011): Deep brain stimulation for Parkinson disease: An expert consensus and review of key issues. *Arch Neurol* 68:165.
- Camlidag I, Kocabicak E, Sahin B, Jahanshahi A, Incesu L, Aygun D, Yildiz O, Temel Y, Belet U (2014): Volumetric analysis of

- the subthalamic and red nuclei based on magnetic resonance imaging in patients with Parkinson's disease. *Int J Neurosci* 124:291–295.
- Castrioto A, Lhomme E, Moro E, Krack P (2014): Mood and behavioural effects of subthalamic stimulation in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 13:287–305.
- Cho ZH, Min HK, Oh SH, Han JY, Park CW, Chi JG, Kim YB, Paek SH, Lozano AM, Lee KH (2010): Direct visualization of deep brain stimulation targets in Parkinson disease with the use of 7-tesla magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 113:639–647.
- Colpan ME, Slavin KV (2010): Subthalamic and red nucleus volumes in patients with Parkinson's disease: Do they change with disease progression? *Parkinsonism and Related Disorders* 16:398–403.
- Connolly PJ, Halpern CH, Baltuch GH, Danish SF, Jaggi JL (2012): Implications for programming strategy of the location of the active contact in subthalamic nucleus deep brain stimulation. *J Clin Neurosci* 19:1029–1031.
- D'Arceuil HE, Westmoreland S, de Crespigny AJ (2007): An approach to high resolution diffusion tensor imaging in fixed primate brain. *Neuroimage* 35:553–565.
- Den Dunnen WFA, Staal MJ (2005): Anatomical Alterations of the Subthalamic Nucleus in Relation to Age: A Postmortem Study. *Mov Disord* 20(7).
- Forstmann BU, Keuken MC, Jahfari S, Bazin PL, Neumann N, Schäfer A (2012): Cortico-subthalamic white matter tract strength predict interindividual efficacy in stopping a motor response. *NeuroImage* 60:370–375.
- Füssenich M (1967): Vergleichend anatomische Studien über den Nucleus subthalamicus (Corpus Luys) bei Primaten. In: Frieburg, C.O.V.I.f.H.A.-L.-U., editor. Dissertation.
- Giorgio A, Santelli L, Tomassini V, Bosnell R, Smith S, De Stefano N, Johansen-Berg H (2010): Age-related changes in grey and white matter structure throughout adulthood. *Neuroimage* 51:943–951.
- Hamani C, Saint-Cyr JA, Fraser J, Kaplitt M, Lozano AM (2004): The subthalamic nucleus in the context of movement disorders. *Brain* 127:4–20.
- Hardman CD, Halliday GM, McRitchie DA, Morris JG (1997): The subthalamic nucleus in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:132–142.
- Hardman CD, Henderson JM, Finkelstein DL, Horne MK, Paxinos G, Halliday GM (2002): Comparison of the basal ganglia in rats, marmosets, macaques, baboons, and humans: Volume and neuronal number for the output, internal relay, and striatal modulating nuclei. *J Comp Neurol* 445:238–255.
- Haynes WI, Haber SN (2013): The organization of prefrontal-subthalamic inputs in primates provides an anatomical substrate for both functional specificity and integration: Implications for Basal Ganglia models and deep brain stimulation. *J Neurosci* 33:4804–4814.
- Houshmand L, Cummings KS, Chou KL, Patil PG (2014): Evaluating indirect subthalamic nucleus targeting with validated 3-tesla magnetic resonance imaging. *Stereotact Funct Neurosurg* 92:337–345.
- Joel D, Weiner I (1997): The connections of the primate subthalamic nucleus: Indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 23:62–78.
- Kerl HU, Gerigk L, Pechlivanis I, Al-Zghloul M, Groden C, Nolte IS (2012): The subthalamic nucleus at 7.0 Tesla: Evaluation of sequence and orientation for deep-brain stimulation. *Acta Neurochir* 154:2051–2062.
- Keuken MC, Uylings HB, Geyer S, Schäfer A, Turner R, Forstmann BU (2012): Are there three subdivisions in the primate subthalamic nucleus?. *Front Neuroanat* 6:14.
- Keuken MC, Bazin PL, Schäfer A, Neumann J, Turner R, Forstmann BU (2013): Ultra-high 7T MRI of structural age-related changes of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 33:4896–4900.
- Keuken MC, Bazin PL, Crown L, Hootsmans J, Laufer A, Müller-Axt C, Sier R, van der Putten EJ, Schäfer A, Turner R, Forstmann BU (2014): Quantifying inter-individual anatomical variability in the subcortex using 7T structural MRI. *NeuroImage* 94:40–46.
- Kitajima M, Korogi Y, Kakeda S, Moriya J, Ohnari N, Sato T, Hayashida Y, Hirai T, Okuda T, Yamashita Y (2008): Human subthalamic nucleus: evaluation with high-resolution MR imaging at 3.0 T. *Neuroradiology* 50:675–681.
- Klüver H, Barrera E (1953): A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 12:400–403.
- Lambert C, Zrinzo L, Nagy Z, Lutti A, Hariz M, Foltynie T, Draganski B, Ashburner J, Frackowiak R (2012): Confirmation of functional zones within the human subthalamic nucleus: Patterns of connectivity and sub-parcellation using diffusion weighted imaging. *NeuroImage* 60:83–94.
- Lange H, Thorer G, Hopf A (1976): Morphometric-statistical structure analysis of human striatum, pallidum and nucleus subthalamicus. III. Nucleus subthalamicus. *J Hirnforsch* 17:31–41.
- Lefranc M, Derrey S, Merle P, Tir M, Constans JM, Montpellier D, Macron JM, Le Gars D, Peltier J, Baledent O, Krystkowiak P (2014): High-resolution 3-dimensional T2*-weighted angiography (HR 3-D SWAN): an optimized 3-T magnetic resonance imaging sequence for targeting the subthalamic nucleus. *Neurosurgery* 74:615–626.
- Lévesque JC, Parent A (2005): GABAergic interneurons in human subthalamic nucleus. *Movement Disord* 20:574–584.
- Limousin P, Martinez-Torres I (2008): Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 5:309–319.
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998): Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339:1105–1111.
- Longhi M, Ricciardi G, Tommasi G, Nicolato A, Foroni R, Bertolasi L, Beltramello A, Moretto G, Tinazzi M, Gerosa M (2015): The role of 3t magnetic resonance imaging for targeting the human subthalamic nucleus in deep brain stimulation for parkinson disease. *J Neurol Surg a Cent Eur Neurosurg* 76:181–189.
- Luys, JB (1865): Recherches sur le système nerveux cérébro-spinal, sa structure, ses fonctions et ses maladies. Paris. J.B. Baillière et fils.
- Marani E, Heida T, Lakke EAJF, Usunoff KG (2008): The subthalamic nucleus. Part I: Development, cytology, topography and connections. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 198:1–113.
- Marusich MF, Furneaux HM, Henion PD, Weston JA (1994): Human neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J Neurobiol* 25:143–155.
- Massey LA, Yousry TA (2010): Anatomy of the substantia nigra and subthalamic nucleus on mr imaging. *Neuroimaging Clin N Am* 20:7–27.
- Massey LA, Miranda MA, Zrinzo L, Al-Helli O, Parkes HG, Thornton JS, So PW, White MJ, Mancini L, Strand C, Holton JL, Hariz MI, Lees AJ, Revesz T, Yousry TA (2012): High resolution MR anatomy of the subthalamic nucleus: Imaging at 9.4 T with histological validation. *Neuroimage* 59:2035–2044.

- Mavridis I, Boviatsis E, Anagnostopoulou S (2014): Stereotactic anatomy of the human subthalamic nucleus: Providing coordinates for accurate electrode placement. *J Neurol Surg a Cent Eur Neurosurg* 75:289–298.
- Morawski M, Bruckner G, Jager C, Seeger G, Matthews RT, Arendt T (2012): Involvement of perineuronal and perisynaptic extracellular matrix in Alzheimer's disease neuropathology. *Brain Pathol* 22:547–561.
- Nowinski WL, Belov D, Pollak P, Benabid AL (2005): Statistical analysis of 168 bilateral subthalamic nucleus implantations by means of the probabilistic functional atlas. *Neurosurgery* 57 (ONS suppl 3):319–330.
- Nowinski WL, Liu J, Thirunavuukarasuu A (2006): Quantification and visualization of the three-dimensional inconsistency of the subthalamic nucleus in the Schaltenbrand-Wahren brain atlas. *Stereotact Funct Neurosurg* 84:46–55.
- Parent A, Hazrati LN (1995): Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Rev* 20:128–154.
- Richter EO, Hoque T, Halliday W, Lozano AM, Saint-Cyr JA (2004): Determining the position and size of the subthalamic nucleus based on magnetic resonance imaging results in patients with advanced Parkinson disease. *J Neurosurg* 100:541–546.
- Rijkers K, Temel Y, Visser-Vandewalle V, Vanormelingen L, Vandersteen M, Adriaensens P, Gelan J, Beuls EA (2007): The microanatomical environment of the subthalamic nucleus. Technical note. *J Neurosurg* 107:198–201.
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004): Parkinson's disease. *Lancet* 363:1783–1793.
- Savas A, Bozkurt M, Akbostanci C (2013): A comparison between stereotactic targeting methods of the subthalamic nucleus in cases with Parkinson's disease. *Acta Neurochir Suppl* 117:35–41.
- Schäfer A, Forstmann BU, Neumann J, Wharton S, Mietke A, Bowtell R, Turner R (2012): Direct visualization of the subthalamic nucleus and its iron distribution using high-resolution susceptibility mapping. *Hum Brain Mapp* 33:2831–2842.
- Schaltenbrand, G, Wahren, W (1977): Atlas for Stereotaxy of the Human Brain. Stuttgart: Thieme.
- Schlaier JR, Habermeyer C, Wamat J, Lange M, Janzen A, Hochreiter A, Proescholdt M, Brawanski A, Fellner C (2011): Discrepancies between the MRI- and the electrophysiologically defined subthalamic nucleus. *Acta Neurochir* 153:2307–2318.
- Schlaier JR, Hanson C, Janzen A, Fellner C, Hochreiter A, Proescholdt M, Brawanski A, Lange M (2014): Deep brain stimulation in Parkinson's disease: Motor effects relative to the MRI-defined STN. *Neurosurg Rev* 37:461–470.
- Schuepbach WM, Rau J, Knudsen K, Volkmann J, Krack P, Timmermann L, Halbig TD, Hesekamp H, Navarro SM, Meier N, Falk D, Mehdorn M, Paschen S, Maarouf M, Barbe MT, Fink GR, Kupsch A, Gruber D, Schneider GH, Seigneuret E, Kistner A, Chaynes P, Ory-Magne F, Brefel Courbon C, Vesper J, Schnitzler A, Wojtecki L, Houeto JL, Bataille B, Maltete D, Damier P, Raoul S, Sixel-Doering F, Hellwig D, Gharabaghi A, Kruger R, Pinsker MO, Amtage F, Regis JM, Witjas T, Thobois S, Mertens P, Kloss M, Hartmann A, Oertel WH, Post B, Speelman H, Agid Y, Schade-Brittinger C, Deuschl G, Group ES (2013): Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *N Engl J Med* 368:610–622.
- Shen WG, Wang HY, Lin ZG, Shen H, Chen XG, Fu YL, Gao WP (2009): Stereotactic localization and visualization of the subthalamic nucleus. *Chin Med J (Engl)* 122:2438–2443.
- Shepherd TM, Thelwall PE, Stanisz GJ, Blackband SJ (2009): Aldehyde fixative solutions alter the water relaxation and diffusion properties of nervous tissue. *Magn Reson Med* 62:26–34.
- Slavin KV, Thulborn KR, Wess C, Nersesyan H (2006): Direct visualization of the human subthalamic nucleus with 3T MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:80–84.
- Smith Y, Hazrati LN, Parent A (1990): Efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as studied by the PHA-L anterograde tracing method. *J Comp Neurol* 294:306–323.
- Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, Bath R, Jernigan TL, Toga AW (1999): Localizing age-related changes in brain structure between childhood and adolescence using statistical parametric mapping. *Neuroimage* 9:587–597.
- Temel Y, Kessels A, Tan S, et al. (2006): Behavioural changes after bilateral subthalamic stimulation in advanced Parkinson disease: A systematic review. *Parkinsonism Relat Disord* 12:265–272.
- Terry RD, DeTeresa R, Hansen LA (1987): Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Ann Neurol* 21:530–539.
- Toker Ugurlu T, Acar G, Karadag F, Acar F (2014): Manic Episode Following Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus for Parkinson's Disease: A Case Report. *Turk Neurosurg* 24:94–97.
- Tsuboi T, Watanabe H, Tanaka Y, Ohdake R, Yoneyama N, Hara K, Nakamura R, Watanabe H, Senda J, Atsuta N, Ito M, Hirayama M, Yamamoto M, Fujimoto Y, Kajita Y, Wakabayashi T, Sobue G (2014): Distinct phenotypes of speech and voice disorders in Parkinson's disease after subthalamic nucleus deep brain stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1–9.
- Von Bonin G, Shariff GA (1951): Extrapyramidal nuclei among mammals; a quantitative study. *J Comp Neurol* 94:427–438.
- Voon V, Krack P, Lang AE, Lozano AM, Dujardin K, Schüpbach M, D'Ambrosia J, Thobois S, Tamma F, Herzog J, Speelmann JD, Samanta J, Kubu C, Rossignol H, Poon Y, Saint-Cyr JA, Ardouin C, Moro E (2008): A multicentre study on suicide outcomes following subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Brain* 131:2720–2728.
- Weise LM, Seifried C, Eibach S, Gasser T, Roeper J, Seifert V, Hilker R (2013): Correlation of active contact positions with the electrophysiological and anatomical subdivisions of the subthalamic nucleus in deep brain stimulation. *Stereotact Funct Neurosurg* 91:298–305.
- Weiss M, Alkemade A, Keuken MC, Muller-Axt C, Geyer S, Turner R, Forstmann BU (2015): Spatial normalization of ultrahigh resolution 7 T magnetic resonance imaging data of the postmortem human subthalamic nucleus: A multistage approach. *Brain Struct Funct* 220:1695–1703.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991): Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482–497.
- Winkler D, Tittgemeyer M, Schwarz J, Preul C, Strecker K, Meixensberger J (2005): The first evaluation of brain shift during functional neurosurgery by deformation field analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1161–1163.
- Xiao Y, Jannin P, D'Albis T, Guizard N, Haegelen C, Lalys F, Vérin M, Collins DL (2014): Investigation of morphometric variability of subthalamic nucleus, red nucleus, and substantia nigra in advanced parkinson's disease patients using automatic segmentation and pca-based analysis. *Hum Brain Mapp* 35:4330–4344.
- Yelnik J (2002): Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov Disord* 17 Suppl 3:S15–S21.

3 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Kombinierte histologische und Magnetresonanztomografie-basierte Betrachtung der Volumina des menschlichen Nucleus subthalamicus und deren Verhalten bei Alterung

eingereicht von:

Johann Georg Zwirner

angefertigt am:

Institut für Anatomie, Universität Leipzig

betreut von:

Prof. Dr. med. Niels Hammer

Prof. Dr. med. Ingo Bechmann

März 2018

Die hochfrequente Stimulation des Nucleus subthalamicus (STN) ist ein seit 25 Jahren durchgeführtes Prozedere, um die motorischen Symptome von Patienten mit bestimmten Formen des idiopathischen Morbus Parkinson effektiv zu lindern. Unter dieser Therapie könne Betroffene unter anderem an Manie oder einer gehäuften Suizidalität leiden. Genaue Kenntnisse der anatomischen Verhältnisse des STN sind essenziell für eine sichere Elektrodenplatzierung. Da der STN eine im klinischen Alltag häufig unzureichend zu lokalisierende Struktur darstellt, basiert die Zielpunktbestimmung in vielen Kliniken auf Hirnatlantenn. Der am häufigsten eingesetzte Schaltenbrand-Wahren Atlas wurde mithilfe von nur drei menschlichen Hirnen erstellt und berücksichtigt weder interindividuelle Größenunterschiede von Hirnstrukturen noch deren Veränderung im Altersverlauf. Die große Spannweite bisher ermittelter STN Volumina von 20 mm³ bis 457 mm³ lässt den STN hinsichtlich des Volumens als inkonsistente Struktur erscheinen. Vor

diesem Hintergrund ist die indirekte Zielpunktbestimmung zu hinterfragen, um mögliche Risikofaktoren für das Auftreten von stimulationsassoziierten Nebenwirkungen zu minimieren. Eine Abhängigkeit des STN-Volumens vom Alter ist bisher nicht hinreichend geklärt und es ist offen, ob indirekte Zielpunktbestimmungen altersabhängig anzupassen sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Volumen des STN mittels 3T MRT T2-gewichteter Datensätze *ex vivo* zu ermitteln. Im Anschluss wurden die Gewebe histologisch aufgearbeitet und mithilfe stereologischer Verfahren erneut die STN-Volumina bestimmt. Eine vergleichende Untersuchung von histologischen und MRT-basierten Volumina derselben Gewebe ist in der Literatur nicht beschrieben.

Die Untersuchungen erfolgten an 25 STN von 14 Körperspendern (10 weibliche, 4 männliche). Die STN-Volumina zeigten sowohl in der Histologie als auch im MRT eine hohe Konsistenz. Die hohen interindividuellen STN-Volumenunterschiede der Literatur konnten in der vorliegenden Studie in gesteigerter Fallzahl nicht bestätigt werden. MRT basierte STN-Volumina waren mit einem durchschnittlichen Volumen von $99 \pm 6 \text{ mm}^3$ kleiner als die histologisch ermittelten Volumina von $132 \pm 20 \text{ mm}^3$. Eine mögliche Ursache ist die aufgrund des niedrigen Eisengehaltes unzureichende Visualisierung des dorso-lateralen STN in der verwendeten T2-gewichteten Bildgebung. Weiterhin ist im T2-gewichteten Bild die Abgrenzung zur Substantia nigra schwierig. Die histologische Identifikation der STN-Grenzen mithilfe der Luxol-Fast-Blue-Färbung erlaubt eine eindeutige Identifikation der STN-Grenzen. Dies führt möglicherweise zur Unterschätzung des STN-Volumens in T2-gewichteter MRT-Bildgebung. Während in der Histologie eine Abnahme des STN-Volumens im Altersverlauf beobachtet wurde, konnte dies in der MRT bei den vorliegenden Fällen nicht bestätigt werden. Die 3T T2 MRT Bildgebung ist möglicherweise nicht sensitiv genug, um derartige Abhängigkeiten in einer zwischen 65 bis 96 Jahre alten und 25 STN umfassenden Spendergruppe adäquat abzubilden. Die erhobenen MRT-Volumina komplettieren jedoch kürzlich von einer anderen Gruppe erhobene Daten, welche, MRT-basiert, in einer größeren Altersspanne die Abnahme des STN-Volumens im Altersverlauf ermittelte.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass bei der Tiefen Hirnstimulation weitgehend interindividuell konsistente STN-Volumina erwartet werden können. Dies ist als Argument zu werten, weshalb trotz der Verwendung einer indirekten Zielpunktbestimmung die Tiefe Hirnstimulation in der Mehrzahl der Fälle ein zufriedenstellendes klinisches Ergebnis liefert. Weiterhin verdeutlicht die vorliegende Arbeit die Unterschätzung des STN-Volumens bei der Verwendung eines 3T MRT T2-TSE Datensatzes. Der in dieser MRT-Wichtung nicht hinreichend visualisierbare Teil des STN betrifft überwiegend den als klinisch bedeutsam eingeschätzten dorso-lateralen Teil des STN. Das bei der Elektrodenimplantation erwartbare STN-Volumen ist umso geringer, je älter der Patient ist. Dies sollte bei der indirekten Planung Berücksichtigung finden. Eine Untersuchung mit einer größeren Probenanzahl gestaffelt nach verschiedenen

Altersgruppen wird daher für zukünftige Untersuchungen vorgeschlagen. Derartige Befunde können helfen zu quantifizieren, in welchem Umfang ein zu erwartendes „Standard-STN-Volumen“ nach dem Alter zu korrigieren ist, um das reale STN-Volumen möglichst genau abzubilden.

Die Limitierungen dieser Arbeit bestehen in der eingeschränkten Fallzahl und der relativ geringen Altersspanne der untersuchten Spender. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die pharmakologische Behandlung der Spender zu Lebzeiten und die postmortalen Veränderungen der Spendergewebe einen Einfluss auf die STN-Volumina haben. Zur Ermittlung des Korrekturfaktors aufgrund der Schrumpfung des Gewebes im Rahmen der histologischen Aufarbeitung wurden dem STN benachbarte Gewebsblöcke verwendet. Es bleibt unklar, ob diese Gewebe ein identisches Schrumpfungsverhalten wie die STN-Region zeigen.

4 LITERATURVERZEICHNIS

Abosch A, Yacoub E, Ugurbil K, Harel N (2010) An assessment of current brain targets for deep brain stimulation surgery with susceptibility-weighted imaging at 7 tesla. *Neurosurgery* 67(6):1745-56

Adachi M, Hosoya T, Haku T, Yamaguchi K, Kawanami T (1999) Evaluation of the substantia nigra in patients with Parkinsonian syndrome accomplished using multishot diffusion-weighted MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 20(8): 1500-6.

Akakin A, Yılmaz B, MD, Kılıç T, Rhoton AL (2016) Anatomy of the subthalamic nucleus, with correlation of deep brain stimulation. *J Neurosurg* 124(1):278 [ARTICLE RETRACTED]

Alkemade A, Forstmann BU (2014) Do we need to revise the tripartite subdivision hypothesis of the human subthalamic nucleus (STN)? *Neuroimage* 5;95:326-9

Bejjani BP, Damier P, Arnulf I, Thivard L, Bonnet AM, Dormont D, Cornu P, Pidoux B, Samson Y, Agid Y (1999) Transient acute depression induced by high-frequency deep-brain stimulation. *N Engl J Med* 13;340(19):1476-80

Bejjani BP, Dormont D, Pidoux B, Yelnik J, Damier P, Arnulf I, Bonnet AM, Marsault C, Agid Y, Philippon J, Cornu P (2000) Bilateral subthalamic stimulation for Parkinson's disease by using three-dimensional stereotactic magnetic resonance imaging and electrophysiological guidance. *J Neurosurg* 92(4):615-25

Benabid AL, Chabardes S, Mitrofanis J, Pollak P (2009) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 8(1):67-81

Benabid AL (2014) Lasker Award winner Alim Louis Benabid. *Nat Med* 20(10):1121-3

Bot M, Bour L, de Bie RM, Contarino MF, Schuurman PR, van den Munckhof P (2016) Can We Rely on Susceptibility-Weighted Imaging for Subthalamic Nucleus Identification in Deep Brain Stimulation Surgery? *Neurosurgery* 78(3):353-60

Bot M, Schuurman PR, Odekerken VJJ, Verhagen R, Contarino FM, De Bie RMA, van den Munckhof P (2018) Deep brain stimulation for Parkinson's disease: defining the optimal location within the subthalamic nucleus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Epub ahead of print]

Brunenberg EJ, Platel B, Hofman PA, Ter Haar Romeny BM, Visser-Vandewalle V (2011)

Magnetic resonance imaging techniques for visualization of the subthalamic nucleus. *J Neurosurg* 115(5):971-84

Camlidag I, Kocabicak E, Sahin B, Jahanshahi A, Incesu L, Aygun D, Yildiz O, Temel Y, Belet U (2014) Volumetric analysis of the subthalamic and red nuclei based on magnetic resonance imaging in patients with Parkinson's disease. *Int J Neurosci* 124(4):291-5

Cho ZH, Min HK, Oh SH, Han JY, Park CW, Chi JG, Kim YB, Paek SH, Lozano AM, Lee KH (2010) Direct visualization of deep brain stimulation targets in Parkinson disease with the use of 7-tesla magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 113(3):639-47

Caire F, Ranoux D, Guehl D, Burbaud P, Cuny E (2013) A systematic review of studies on anatomical position of electrode contacts used for chronic subthalamic stimulation in Parkinson's disease. *Acta Neurochir* 155(9):1647-54

Coenen VA, Prescher A, Schmidt T, Picozzi P, Gielen FL (2008) What is dorso-lateral in the subthalamic Nucleus (STN)?--a topographic and anatomical consideration on the ambiguous description of today's primary target for deep brain stimulation (DBS) surgery. *Acta Neurochir* 150(11):1163-5

Coggeshall RE (1992) A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci* 15(1):9-13

Colpan ME, Slavin KV (2010) Subthalamic and red nucleus volumes in patients with Parkinson's disease: do they change with disease progression? *Parkinsonism Relat Disord* 16(6):398-403

DeLong MR, Benabid AL Discovery of high-frequency deep brain stimulation for treatment of Parkinson disease: 2014 Lasker Award. (2014) *JAMA* 312(11):1093-4

Domesick VB, Stinus L, Paskevich PA (1983) The cytology of dopaminergic and nondopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat: a light- and electron-microscopic study. *Neuroscience* 8(4):743-65

Dormont D, Ricciardi KG, Tandé D, Parain K, Menuel C, Galanaud D, Navarro S, Cornu P, Agid Y, Yelnik J (2004) Is the subthalamic nucleus hypointense on T2-weighted images? A correlation study using MR imaging and stereotactic atlas data. *AJNR Am J Neuroradiol* 25(9):1516-23

Drayer B, Burger P, Darwin R, Riederer S, Herfkens R, Johnson GA (1986) MRI of brain iron. *AJR Am J Roentgenol* 147(1):103-10

Duyn JH, van Gelderen P, Li TQ, de Zwart JA, Koretsky AP, Fukunaga M (2007) High-field MRI of brain cortical substructure based on signal phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(28):11796-801

Forstmann BU, Keuken MC, Jahfari S, Bazin PL, Neumann J, Schäfer A, Anwender A, Turner R (2012) Cortico-subthalamic white matter tract strength predicts interindividual efficacy in stopping a motor response. *Neuroimage* 60(1):370-5

Füssenich MSU (1967) Vergleichend anatomische Studien über den Nucleus subthalamicus (Corpus Luysi) bei Primaten. Freiburg. Dissertation

Giorgio A, Santelli L, Tomassini V, Bosnell R, Smith S, De Stefano N, Johansen-Berg H (2010) Age-related changes in grey and white matter structure throughout adulthood. *Neuroimage* 51(3):943-51

Haacke EM, Xu Y, Cheng YC, Reichenbach JR (2004) Susceptibility weighted imaging (SWI). *Magn Reson Med* 52(3):612-8

Hamani C, Richter EO, Andrade-Souza Y, Hutchison W, Saint-Cyr JA, Lozano AM (2005) Correspondence of microelectrode mapping with magnetic resonance imaging for subthalamic nucleus procedures. *Surg Neurol* 63(3):249-53

Hardman CD, Halliday GM, McRitchie DA, Morris JG (1997) The subthalamic nucleus in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(2):132-42

Hardman CD, Henderson JM, Finkelstein DI, Horne MK, Paxinos G, Halliday GM (2002) Comparison of the basal ganglia in rats, marmosets, macaques, baboons, and humans: volume and neuronal number for the output, internal relay, and striatal modulating nuclei. *J Comp Neurol* 445(3):238-55

Hariz MI, Krack P, Melvill R, Jorgensen JV, Hamel W, Hirabayashi H, Lenders M, Wesslen N, Tengvar M, Yousry TA (2003) A quick and universal method for stereotactic visualization of the subthalamic nucleus before and after implantation of deep brain stimulation electrodes. *Stereotact Funct Neurosurg* 80(1-4):96-101

Hartmann CJ, Wojtecki L, Vesper J, Volkmann J, Groiss SJ, Schnitzler A, Südmeyer M (2015) Long-term evaluation of impedance levels and clinical development in subthalamic deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 21(10):1247-50

- Houshmand L, Cummings KS, Chou KL, Patil PG (2014) Evaluating indirect subthalamic nucleus targeting with validated 3-tesla magnetic resonance imaging. *Stereotact Funct Neurosurg* 92(6):337-45
- Johnsen EL, Sunde N, Mogensen PH, Ostergaard K (2010) MRI verified STN stimulation site--gait improvement and clinical outcome. *Eur J Neurol* 17(5):746-53
- Kerl HU, Gerigk L, Pechlivanis I, Al-Zghloul M, Groden C, Nölte IS (2012) The subthalamic nucleus at 7.0 Tesla: evaluation of sequence and orientation for deep-brain stimulation. *Acta Neurochir* 154(11):2051-62
- Keuken MC, Uylings HB, Geyer S, Schäfer A, Turner R, Forstmann BU (2012) Are there three subdivisions in the primate subthalamic nucleus? *Front Neuroanat* 10;6:14
- Keuken MC, Bazin PL, Schäfer A, Neumann J, Turner R, Forstmann BU (2013) Ultra-high 7T MRI of structural age-related changes of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 13;33(11):4896-900
- Keuken MC, Bazin PL, Crown L, Hootsmans J, Laufer A, Müller-Axt C, Sier R, van der Putten EJ, Schäfer A, Turner R, Forstmann BU (2014) Quantifying inter-individual anatomical variability in the subcortex using 7 T structural MRI. *Neuroimage* 1;94:40-6
- Kleiner-Fisman G, Herzog J, Fisman DN, Tamma F, Lyons KE, Pahwa R, Lang AE, Deuschl G (2006) Subthalamic nucleus deep brain stimulation: summary and meta-analysis of outcomes. *Mov Disord* 14:S290-304
- Klüver H, Barrera E (1953) A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 12(4):400-3
- Lambert C, Zrinzo L, Nagy Z, Lutti A, Hariz M, Foltynie T, Draganski B, Ashburner J, Frackowiak R (2012) Confirmation of functional zones within the human subthalamic nucleus: patterns of connectivity and sub-parcellation using diffusion weighted imaging. *Neuroimage* 60(1):83-94
- Lange H, Thörner G, Hopf A, Schröder KF (1976) Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic diseases. *J Neurol Sci* 28(4):401-25
- Lévesque JC, Parent A (2005) GABAergic interneurons in human subthalamic nucleus. *Mov Disord* 20(5):574-84

Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 14;345(8942):91-5

Lv H, Geng Z, Zhu Q, Wang L, Song Z, Chang R, Wang Y (2015) MRI localization of the subthalamic nucleus in normal adults and its relation with age. *Neuroreport* 11;26(16):972-80

Machado A, Rezai AR, Kopell BH, Gross RE, Sharan AD, Benabid AL (2006) Deep brain stimulation for Parkinson's disease: surgical technique and perioperative management. *Mov Disord* 21 Suppl 14:S247-58

Maks CB, Butson CR, Walter BL, Vitek JL, McIntyre CC. (2009) Deep brain stimulation activation volumes and their association with neurophysiological mapping and therapeutic outcomes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(6):659-66

Marani E, Heida T, Lakke EA, Usunoff KG (2008) The subthalamic nucleus. Part I: development, cytology, topography and connections. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 198:1-113

Massey LA, Yousry TA (2010) Anatomy of the substantia nigra and subthalamic nucleus on MR imaging. *Neuroimaging Clin N Am* 20(1):7-27

Massey LA, Miranda MA, Zrinzo L, Al-Hellli O, Parkes HG, Thornton JS, So PW, White MJ, Mancini L, Strand C, Holton JL, Hariz MI, Lees AJ, Revesz T, Yousry TA (2012) High resolution MR anatomy of the subthalamic nucleus: imaging at 9.4 T with histological validation. *Neuroimage* 1;59(3):2035-44

McIntyre CC, Grill WM (2001) Finite element analysis of the current-density and electric field generated by metal microelectrodes. *Ann Biomed Eng* 29(3):227-35

McIntyre CC, Grill WM (2002) Extracellular stimulation of central neurons: influence of stimulus waveform and frequency on neuronal output. *J Neurophysiol* 88(4):1592-604

McIntyre CC, Savasta M, Kerkerian-Le Goff L, Vitek JL (2004) Uncovering the mechanism(s) of action of deep brain stimulation: activation, inhibition, or both. *Clin Neurophysiol* 115(6):1239-48

Mogilner AY, Benabid AL, Rezai AR (2004). Chronic Therapeutic Brain Stimulation: History, Current Clinical Indications, and Future Prospects. Markov, M, Paul J Rosch Bioelectromagnetic medicine 133–51 ISBN 0-8247-4700-3

Nowinski WL, Belov D, Pollak P, Benabid AL (2005) Statistical analysis of 168 bilateral subthalamic nucleus implantations by means of the probabilistic functional atlas. *Neurosurgery*. 57(4 Suppl):319-30

Nowinski WL, Liu J, Thirunavuukarasuu A (2006) Quantification and visualization of the three-dimensional inconsistency of the subthalamic nucleus in the Schaltenbrand-Wahren brain atlas. *Stereotact Funct Neurosurg* 84(1):46-55

O'Gorman RL, Shmueli K, Ashkan K, Samuel M, Lythgoe DJ, Shahidiani A, Wastling SJ, Footman M, Selway RP, Jarosz J (2011) Optimal MRI methods for direct stereotactic targeting of the subthalamic nucleus and globus pallidus. *Eur Radiol* 21(1):130-6

Patil PG, Conrad EC, Aldridge JW, Chenevert TL, Chou KL (2012) The anatomical and electrophysiological subthalamic nucleus visualized by 3-T magnetic resonance imaging. *Neurosurgery* 71(6):1089-95

Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20(1):128-54

Patel NK, Khan S, Gill SS (2008) Comparison of atlas- and magnetic-resonance-imaging-based stereotactic targeting of the subthalamic nucleus in the surgical treatment of Parkinson's disease. *Stereotact Funct Neurosurg* 86(3):153-61

Pollo C, Vingerhoets F, Pralong E, Ghika J, Maeder P, Meuli R, Thiran JP, Villemure JG (2007) Localization of electrodes in the subthalamic nucleus on magnetic resonance imaging. *J Neurosurg* 106(1):36-44.

Pollo C, Kaelin-Lang A, Oertel MF, Stieglitz L, Taub E, Fuhr P, Lozano AM, Raabe A, Schüpbach M (2014) Directional deep brain stimulation: an intraoperative double-blind pilot study. *Brain* 137(Pt 7):2015-26

Postuma RB, Lang AE (2003) Hemiballism: revisiting a classic disorder. *Lancet Neurol* 2(11):661-8

Raz N, Rodrigue KM (2006) Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav* 30(6):730-48

Richter EO, Hoque T, Halliday W, Lozano AM, Saint-Cyr JA (2004) Determining the position and size of the subthalamic nucleus based on magnetic resonance imaging results in patients with advanced Parkinson disease. *J Neurosurg* 100(3):541-6

Rutledge JN, Hilal SK, Silver AJ, Defendini R, Fahn S (1987) Study of movement disorders and brain iron by MR. *AJR Am J Roentgenol* 149(2):365-79

Schaltenbrand G, Wahren W (1977) *Atlas for Stereotaxy of the Human Brain*.

Schäfer A, Forstmann BU, Neumann J, Wharton S, Mietke A, Bowtell R, Turner R (2012) Direct visualization of the subthalamic nucleus and its iron distribution using high-resolution susceptibility mapping. *Hum Brain Mapp* 33(12):2831-42

Schlaier JR, Habermeyer C, Warnat J, Lange M, Janzen A, Hochreiter A, Proescholdt M, Brawanski A, Fellner C (2011) Discrepancies between the MRI- and the electrophysiologically defined subthalamic nucleus. *Acta Neurochir* 153(12):2307-18

Shen WG, Wang HY, Lin ZG, Shen H, Chen XG, Fu YL, Gao WP (2009) Stereotactic localization and visualization of the subthalamic nucleus. *Chin Med J* 20;122(20):2438-43

Slavin KV, Thulborn KR, Wess C, Nersesyan H (2006) Direct visualization of the human subthalamic nucleus with 3T MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 27(1):80-4

Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, Batth R, Jernigan TL, Toga AW (1999) Localizing age-related changes in brain structure between childhood and adolescence using statistical parametric mapping. *Neuroimage* 9:587-97

Starr PA (2002) Placement of deep brain stimulators into the subthalamic nucleus or Globus pallidus internus: technical approach. *Stereotact Funct Neurosurg* 79(3-4):118-45

Temel Y, Blokland A, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V (2005) The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Prog Neurobiol* 76(6):393-413

Ugurlu TT, Acar G, Karadag F, Acar F (2014) Manic episode following deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for Parkinson's disease: a case report. *Turk Neurosurg* 24(1):94-7

Vayssiere N, Hemm S, Cif L, Picot MC, Diakonova N, El Fertit H, Frerebeau P, Coubes P (2002) Comparison of atlas- and magnetic resonance imaging-based stereotactic targeting of the globus pallidus internus in the performance of deep brain stimulation for treatment of dystonia. *J Neurosurg* 96(4):673-9

Vertinsky AT, Coenen VA, Lang DJ, Kolind S, Honey CR, Li D, Rauscher A (2009) Localization of the subthalamic nucleus: optimization with susceptibility-weighted phase MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 30(9):1717-24

Von Bonin G, Shariff GA (1951) Extrapyramidal nuclei among mammals; a quantitative study. *J Comp Neurol* 94(3):427-38

Voon V, Krack P, Lang AE, Lozano AM, Dujardin K, Schüpbach M, D'Ambrosia J, Thobois S, Tamma F, Herzog J, Speelman JD, Samanta J, Kubu C, Rossignol H, Poon YY, Saint-Cyr JA, Ardouin C, Moro E (2008) A multicentre study on suicide outcomes following subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Brain* 131(Pt 10):2720-8

Weiss M, Alkemade A, Keuken MC, Müller-Axt C, Geyer S, Turner R, Forstmann BU (2015) Spatial normalization of ultrahigh resolution 7 T magnetic resonance imaging data of the postmortem human subthalamic nucleus: a multistage approach. *Brain Struct Funct* 220(3):1695-703

Wichmann T, DeLong MR, Guridi J, Obeso JA (2011) Milestones in research on the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26(6):1032-41

Xiao Y, Jannin P, D'Albis T, Guizard N, Haegelen C, Lalys F, Vérin M, Collins DL (2014) Investigation of morphometric variability of subthalamic nucleus, red nucleus, and substantia nigra in advanced Parkinson's disease patients using automatic segmentation and PCA-based analysis. *Hum Brain Mapp* 35(9):4330-44

Yelnik J (2002) Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov Disord* 3:S15-21

Zijlmans JC (2011) Vascular chorea in adults and children. *Handb Clin Neurol* 100:261-70

5 BEIBLATT ZUR PUBLIKATIONSPROMOTION BEI GETEILTER ERSTAUTORSCHAFT

Nachfolgend wird durch den Promovenden, **Herrn Johann Zwirner** sowie durch den korrespondierenden Mitautor, Herrn Prof. Dr. med. habil. Niels Hammer, und mindestens die Hälfte der Mitautoren per Unterschrift bestätigt, dass **Johann Zwirner** als gleichrangiger Erstautor 50 Prozent des wissenschaftlichen Beitrages zur Erstellung der zur Promotion genutzten Publikation geleistet hat. Mit der erteilten Unterschrift erfolgt in gleicher Weise die Bestätigung der ausgeführten inhaltlichen und zeitlichen Spezifizierung des jeweilig geleisteten Beitrags zur Erstellung und Abfassung der Publikationsschrift.

Subthalamic nucleus volumes are highly consistent but decrease age-dependently – A combined magnetic resonance imaging and stereology approach in humans

Zwirner J, Möbius D, Bechmann I, Arendt T, Hoffmann KT, Jäger C, Lobsien D, Möbius R, Planitzer U, Winkler D, Morawski M, Hammer N.

Hum Brain Mapp. 2016 Oct 11. doi: 10.1002/hbm.23427. PMID: 27726278 [Epub ahead of print]

Johann Zwirner.....

(Literaturstudium 2013 - 2016, Probenprozessierung 2013 - 2015 (Entwässerung, Einbettung), Erstellung der Schnittserien 2013 - 2015, Luxol-Fast-Blue/ Kresylviolett-Färbung 2014/15, manuelle Segmentierung des Nucleus subthalamicus in den Datensätzen der Magnetresonanztomografie 2014/15, Volumenbestimmung des Nucleus subthalamicus mittels Stereologie 2014/15, Erstellung der Erstfassung des Manuskripts 2015, Tabelle zur Primärliteratur 2015, Ergebnisdiskussion 2015/16)

Dustin Möbius.....

(Literaturstudium 2013 - 2016, Probenprozessierung 2013 - 2015 (Fixation), Probenvorbereitung für die Bildgebung 2013 - 2015, manuelle Segmentierung des Nucleus subthalamicus in den Datensätzen der Magnetresonanztomografie 2014/15, Anti-HuC/D-Immunfärbung 2014/15, Neuronenquantifizierung und Neuronendichtebestimmung des Nucleus subthalamicus mittels Stereologie 2014/15, Erstellung der Erstfassung des Manuskriptes 2015, Graphiken 2015, Ergebnisdiskussion 2015/16, Revision 2016)

Prof. Dr. med. habil. Niels Hammer.....

(Literaturstudium 2013 - 2016, Anleitung zur Präparation 2013, Anleitung zur Probenvorbereitung für die Bildgebung 2013, Anleitung für die Segmentierung 2014, Anleitung für die Erstellung der Graphiken 2015, Ergebnisdiskussion 2015/16, Projektkonzeption, technische und inhaltliche Unterstützung bei der Durchführung der Datenakquise 2013 - 2015, Anleitung zur Erstellung des Manuskripts 2015, Korrekturen, kritische Überarbeitung der Ersteinreichung und der Revision 2015/16)

Prof. Dr. med. Ingo Bechmann.....


(Betreuer 2013 - 2016, Projektkonzeption, Korrektur und kritische Überarbeitung der Ersteinreichung und der Revision des Manuskripts 2015/16)

Dr. rer. med. Carsten Jäger.....

(Anleitung Anti-HUC/D-Immunfärbung / Luxol-Fast-Blue/Kresylviolett-Färbung 2014/15)


Dr. med. Donald Lobsien.....

(Durchführung der MRT-Scans 2013 - 2015, Etablierung der Scanprotokolle und Optimierung der klinischen Bildgebung für die Magnetresonanztomographie 2013 - 2015, Unterstützung bei der Auswertung der Datensätze 2013 - 2015)

Robert Möbius.....
(Unterstützung in der Durchführung und Interpretation der Statistik 2014 - 2016, Datenaufbereitung)

Dr. med. Uwe Planitzer.....
(Projektkonzeption, kritische Revision des Manuskripts 2015/16)

PD Dr. med. Dirk Winkler.....
(Projektkonzeption, kritische Revision des Manuskripts 2015/16)

PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. Markus Morawski.....
(Anleitung Stereologie 2014/15, Ergebnisdiskussion 2015/16, technische und inhaltliche Unterstützung in der Durchführung der Probenhistologie und Immunhistochemie 2014/15, kritische Revision des Manuskripts 2015/16)

6 ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

22.03.2018

Datum



Unterschrift

7 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum: 05.10.1990
Geburtsort: Borna
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

07/2009 Allgemeine Hochschulreife (Prüfungsfächer: Deutsch, Biologie, Mathematik, Geschichte), Note: 1,1
09/2001 - 07/2009 Gymnasium „Am Breiten Teich“, Borna

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

11/2016 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0
10/2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
09/2012 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,5
10/2010 bis 12/2016 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig

KLINISCHE AUSBILDUNG

08/2016 - 10/2016 III. Teil des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Sana Klinikum, Borna
06/2016 - 08/2016 III. Teil des Praktischen Jahres, Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Leipzig
03/2016 - 06/2016 II. Teil des Praktischen Jahres, Gynäkologie, Klinikum St. Georg, Leipzig
11/2015 - 03/2016 I. Teil des Praktischen Jahres, Chirurgie, Sana Klinikum, Borna
09/2014 - 10/2014 4-wöchige Famulatur Allgemeinmedizin Praxis Eva Hager, Leipzig
07/2014 - 08/2014 4-wöchige Famulatur Notfallmedizin, Sana Klinikum, Borna
02/2014 - 03/2014 4-wöchige Famulatur Chirurgie, Bougainvillea Klinik, Road Town, Britische Jungferninseln
08/2013 - 09/2013 4-wöchige Famulatur Kinderchirurgie, Inselspital, Bern, Schweiz

BERUF

ab 04/2018 wissenschaftlicher Mitarbeiter Abteilung für klinische Anatomie, Universität von Otago, Dunedin, Neuseeland

WEITERE TÄTIGKEITEN

- 09/2012 Betreuung Wahlfach „Präparieren für Fortgeschrittene“, Institut für Anatomie, Leipzig
- 04/2012 - 07/2012 studentische Hilfskraft als Tischassistent im Präparierkurs, Institut für Anatomie, Leipzig
- 08/2009 - 04/2010 Zivildienst Heliosklinikum, Abteilung Gynäkologie, Borna

DIVERSES

- 12/2016 - 02/2018 Weltreise
- 09/2016 Kongressteilnahme: Vortrag auf der 111. Jahresversammlung der Anatomischen Gesellschaft, Göttingen
- 01/2015 Teilnahme Vorlesung zur „Guten Wissenschaftlichen Praxis“, Universität Leipzig

8 PUBLIKATIONEN

Zwirner J, Möbius D, Bechmann I, Arendt T, Hoffmann KT, Jäger C, Lobsien D, Möbius R, Planitzer U, Winkler D, Morawski M, Hammer N (2016) Subthalamic nucleus volumes are highly consistent but decrease age-dependently - a combined magnetic resonance imaging and stereology approach in humans. *Hum Brain Mapp* 38(2):909-922

Zwirner J, Bayer R, Hädrich C, Bollmann A, Klein N, Dreßler J, Ondruschka B (2016) Pulmonary artery perforation and coronary air embolism-two fatal outcomes in percutaneous left atrial appendage occlusion. *Int J Legal Med* 131(1):191-197

Zwirner J, Bayer R, Japes A, Eplinius F, Dreßler J, Ondruschka B (2017) Suicide by the intraoral blast of firecrackers – experimental simulation using a skull simulant model. *Int J Legal Med* 131(6):1581-1587

VERÖFFENTLICHTE ABSTRACTS

Zwirner J, Möbius D, Hammer N, Morawski M, Jäger C, Bechmann I, Lobsien D, Winkler D (2014) Morphological basics of the human subthalamic nucleus: An attempt to improve DBS in Parkinson's Disease. Poster zum 13. Leipziger Researchfestival für Naturwissenschaften

Zwirner J, Möbius D, Bechmann I, Arendt T, Hoffmann KT, Jäger C, Lobsien D, Möbius R, Planitzer U, Winkler D, Morawski M, Hammer N (2016) Subthalamic nucleus volumes are highly consistent but decrease age-dependently - a combined magnetic resonance imaging and stereology approach in humans. Vortrag zur 111. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Göttingen, 22.09.2016

9 DANKSAGUNG

An erster Stelle gebührt mein größter Respekt den Körperspendern.

Mein Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. med. habil. Niels Hammer und meinem Mitdoktoranden Dustin Möbius für deren uneingeschränkte Unterstützung während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit. In beiden fand ich nicht nur konstruktive und geduldige Kritiker, sondern vor allem gute Freunde.

Prof. Dr. med. habil. Ingo Bechmann danke ich für die Überlassung des Themas und viele wertvolle Hinweise. Besonders hervorheben möchte ich PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. Markus Morawski für die wissenschaftliche und methodische Unterstützung während des gesamten Bearbeitungsprozesses. Die jahrelange Laborerfahrung von Dr. rer. med. Carsten Jäger und Angela Ehrlich war mir eine große Hilfe. Dr. med. Donald Lobsien danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit und für die gute Qualität der MRT-Datensätze. Robert Möbius gebührt Dank für dessen Unterstützung in statistischen Fragen.

Meiner Freundin Saskia danke ich für ihre liebevolle Art und ihre bedingungslose Unterstützung. Meiner Familie gebührt Dank für das andauernde Daumendrücken, ohne das die Experimente niemals geklappt hätten.