Die Orientierung der Nervenfasern im menschlichen Gehirn sichtbar gemacht

Hubertus Axer, Timo Krings*, Markus Axer** und Diedrich Graf v. Keyserlingk

Institut für Anatomie I
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH), 52057 Aachen
*Neuroradiologie
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH), 52057 Aachen
** jetzt am Institut für Physik III b
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH), 52057 Aachen
Email: hubertus@cajal.medizin.rwth-aachen.de

Zusammenfassung. Die Architektur der Nervenfasern im menschlichen Gehirn rückt zunehmend in das Interesse der Forschung, insbesondere durch die Entwicklung der diffusionsgewichteten Kernspintomographie, die es erlaubt, Aussagen über die dreidimensionale Orientierung großer Nervenfaserbündel zu machen. Es werden hier zwei neue neuroanatomische Verfahren vorgestellt, die ähnliche Informationen geben. Die konfokale Lasermikroskopie erlaubt es, serielle optische Schnitte durch ein Präparat zu legen und diese anschließend dreidimensional darzustellen. Die Analyse sequentieller Aufnahmen von Gehirnschnitten in polarisiertem Licht ermöglicht die Berechnung von Richtungs- und Orientierungswinkeln in jedem Pixel dieser Aufnahmen. Wertigkeit und Vergleich dieser drei Methoden werden diskutiert.

1 Einleitung

Die Architektur der zentralnervösen Nervenfasern beschreibt den räumlichen Aufbau von Konnektivität im zentralen Nervensystem. Die Komplexität von Konnektivität bestimmt in starkem Maße die Funktion von miteinander verbundenen neuronalen Netzwerken und hat große funktionelle Bedeutung sowohl für Fragen der Hirnkartierung als auch in der funktionellen Neurochirurgie und der Neuronavigation.

Konventionelle anatomische Verfahren zur Darstellung der Nervenfasern im menschlichen Gehirn sind die makroskopische Präparation nach Klingler und die klassischen histologischen Färbemethoden (Weigert, Luxol-Fast-Blue, u.a). Es sollen hier neu entwickelte Methoden der medizinischen Bildgebung und -verarbeitung dargestellt werden, die eine Aussage über die Nervenfaserorientierung erlauben.

2 Diffusionsgewichtete Kernspintomographie

Die diffusionsgewichtete Kernspintomographie [1] ist ein neueres radiologisches Verfahren, das es erlaubt, die Diffusion von Molekülen in die verschiedenen Raumebenen zu messen. Diese Diffusion ist entlang der großen Faserbahnen erleichtert, während sie quer dazu stark eingeschränkt ist. Somit geben die erzeugten Bilder durch

die Wahl der Gradientensensitisierungen die Anatomie großer Faserbahnen wieder. Vorteile dieser Methode sind die nicht-invasive Untersuchung am Lebenden und die Möglichkeit zur Reihenuntersuchung. Trotzdem fehlen bisher neuroanatomische Modelle zur Validierung dieser Methode. Zwei neue anatomische Verfahren, die dafür geeignet sind, sollen hier näher dargestellt werden.

3 Konfokale Lasermikroskopie

Die Myelinscheiden der Nervenfasern können mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI angefärbt werden. Die konfokale Lasermikroskopie [2] erlaubt, bei hoher Auflösung, allerdings kleinem Gesichtsfeld, die Architektur der myelinisierten Nervenfasern zu untersuchen. Dieses Verfahren wurde konsequent zur Kartierung der Faserorientierungen in der Capsula interna angewandt.

3.1 Methodik

Formalinfixierte menschliche Gehirne wurden in zwei definierten Ebenen geschnitten (Foramen interventriculare und Vena cerebri interna). Die Schnittebenen waren parallel zur AcPc-Ebene orientiert. Aus den so erzeugten Gehirnscheiben wurden anschließend 60 µm dicke Präparate geschnitten und mit dem Farbstoff DiI (Fast-DiI Oil, Molecular Probes, Leiden) angefärbt. Sie wurden dann mit der konfokalen Lasermikroskopie (Leica TCS NT, Leica Microsystems, Heidelberg) analysiert. Bei der konfokalen Lasermikroskopie fokussiert ein Laserstrahl sequentiell bestimmte Punkte innerhalb einer Ebene im Präparat. Das durch den Fluoreszenzfarbstoff emmitierte Licht wird dann in einen „optischen“ Schnitt wieder abgebildet. Serielle optische Schnitte lassen sich zur 3D Rekonstruktion eines bestimmten Volumens nutzen.

3.2 Ergebnisse

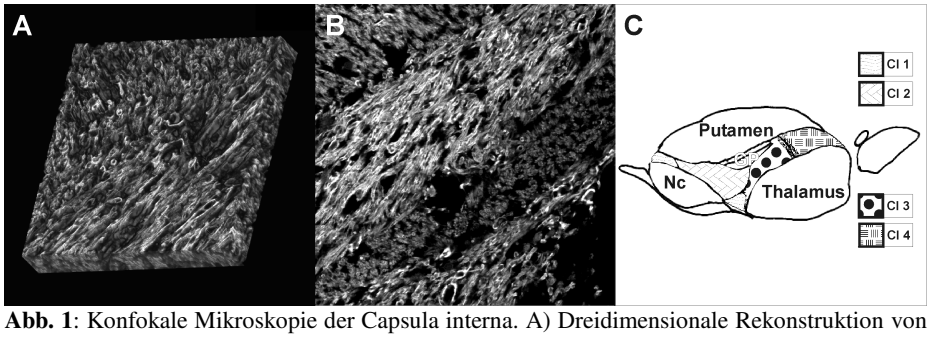

Abb. 1: Konfokale Mikroskopie der Capsula interna. A) Dreidimensionale Rekonstruktion von Fasern in der Region CI3. Steile Pyramidenbahnfasern werden durchflochten von flacheren Fasern aus dem oberen Thalamusstiel. B) Konfokaler, optischer Schnitt durch die Region CI3. Größe des Bildes: 158,7 × 158,7 µm. C) Kartierung der Capsula interna.

Es können vier verschiedene Areale (Abb. 1C) in der Capsula interna beschrieben werden. Im lateralen Ende des vorderen Schenkels (CI1) finden sich bevorzugt hori-

zontal geschnittene Fasern, die zum vorderen Thalamusstiel gehören. Diese verbinden den Ncl. dorsomedialis thalami mit dem Frontallappen. Vereinzelt finden sich hier Fasern, die das Caput nuclei caudati mit dem Linsenkern verbinden. Weiter medial im vorderen Schenkel (CI2) finden sich horizontal geschnittene Fasern des vorderen Thalamusstiels durchmischt mit steileren Bündeln des Tractus frontopontinus. Rechts-Links-Vergleiche dieser Bündel zeigen [3], dass links kleinere, dafür aber mehr frontopontine Faserbündel zu finden sind als rechts. Im Knie und im vorderen Teil des hinteren Schenkels (CI3, Abb. 1) finden sich senkrecht verlaufende Fasern der Pyramidenbahn, welche mit relativ flachen Fasern des oberen Thalamusstiels durchmischt sind. Das hinterste Ende des hinteren Schenkels ist das Gebiet CI4, in dem sich umeinander verdrehte Faserbündel aus dem Tractus parieto-occipito-pontinus befinden.

4 Die Polarisationsmethode

Die Polarisationsmikroskopie ermöglicht ebenfalls eine orientierungsabhängige Darstellung von Faserbündeln bei geringerer Auflösung, aber großem Gesichtsfeld [4]. Das Licht wird durch einen Polarisationsfilter (Polarisator) polarisiert. Anisotrope Substanzen wie die Myelinbestandteile in einem Präparat können polarisiertes Licht drehen, so dass es einen senkrecht zum Polarisator angeordneten zweiten Polarisationsfilter, den Analysator, passieren kann. Die Helligkeit in jedem Pixel des Bildes unter Rotation der Polarisationsfilter erlaubt eine Aussage über die Orientierung der Nervenfasern.

4.1 Methodik

Die Richtung ist als die Orientierung der Fasern in xy-Ebene des Präparates definiert und kann durch den Azimuth der Polarisationsfilter ermittelt werden, an dem die geringste Lichtintensität erzeugt wird. Die Neigung der Fasern ist definiert als die Orientierung der Fasern in z-Richtung des Präparates und ist durch die maximale Lichtintensität bei Rotation der Filter bestimmt. In einem Vorversuch wurde der Zusammenhang zwischen Faserneigung und Lichtintensität experimentell anhand von definierten Schnitten durch den Tractus opticus ermittelt. Die optimale Schnittdicke ließ sich auf 100 µm festlegen und eine lineare Funktion wurde ermittelt, die den Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Faserneigung wiedergibt. Auf diese Weise läßt sich die Faserorientierung (Neigungs- und Richtungswinkel) in jedem Pixel aus Sequenzen polarisationsoptischer Bilder automatisiert gewinnen.

4.2 Ergebnisse

Dieses Verfahren wurde auf 400 komplette, sagittale Hirnschnitte angewandt. Es lassen sich so Richtungs- (0°-180°) als auch Neigungskarten (0°-90°) der Hirnschnitte erzeugen, die eine deutlich höhere Auflösung haben als Bilder der diffusionsgewichteten Kernspintomographie. Ein Beispiel hierfür gibt die Abb. 2. Es lassen sich Fasersysteme wie die Pyramidenbahn, die Kleihirnstiele, der Fasciculus arcuatus, die Sehstrahlung und noch einige mehr auf den Orientierungskarten lokalisieren.

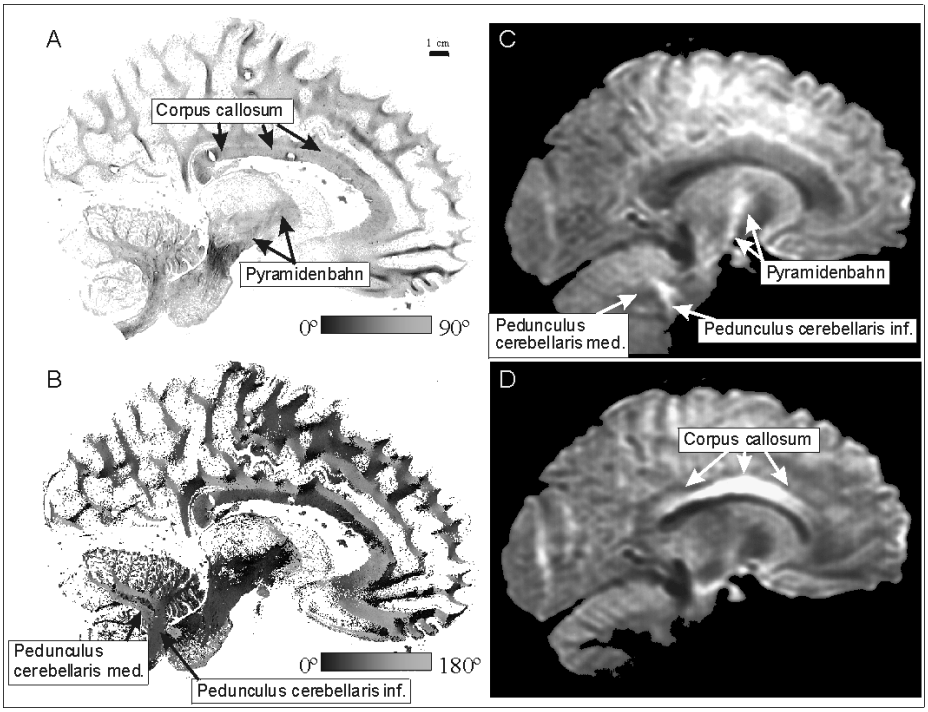

Abb. 2: Analoge, sagittale Schnitte mit der Polarisationsmethode (A: Neigungskarte, B: Richtungskarte) und mit diffusionsgewichteter Kernspintomographie (C und D). Eine Validierung läßt sich durch den direkten Vergleich der abgebildeten Faserbahnen durchführen.

5 Diskussion: Vergleich, Wertigkeit, Validierung der Methoden

Die Polarisationsmethode liefert Bilder des gesamten Gehirns mit einer guten Auflösung. Diese ist höher als die Auflösung von Bildern der diffusionsgewichteten Kernspintomographie (Tabelle 1). Die Information, die sich aus beiden Verfahren gewinnen läßt, ist aber analog zueinander (Abb. 2). Beide Verfahren zeigen wichtige große Faserbahnen des menschlichen Gehirns. Die Polarisationsmethode hat eine höhere Auflösung, so dass auch kleinere Faserbündel zur Darstellung kommen. Die weiße Substanz besteht nicht aus soliden getrennten Faserbahnen, sondern aus sich durchflechtenden Bündeln komplexer Fasersysteme.

Insgesamt stehen somit neue Verfahren zur Verfügung, die eine genauere Darstellung der Zusammensetzung der weißen Substanz ermöglichen. Diese Verfahren stehen nicht konkurrierend zueinander, sondern können komplementär angewandt werden. Die diffusionsgewichtete Kernspintomographie kann am Lebenden durchgeführt werden, während die beiden anatomischen Methoden zwar an menschlichem Leichenmaterial durchgeführt werden, jedoch eine deutlich höhere Auflösung besitzen. Dabei erlaubt die Polarisationsmethode eine Visualisierung von Faserbündeln in kompletten Schnitten menschlicher Gehirne („larger-scale architectural pattern“). Die konfokale Methode hingegen ermöglicht die bildliche Darstellung von einzelnen Nervenfasern

Tabelle 1. Vergleich der drei Methoden.

	Diffusionsgewichtete Kernspintomographie	Polarisation	Konfokale Mikroskopie
Grundprinzip	Gerichtete Diffusion	Doppelbrechung	Fluoreszenz
Ergebnis	Diffusionstensor	2 Winkel (Richtung und Neigung)	z-Serie
Vergrößerung	[5]: ca. 240 × 240 mm Feld mit max. 512 × 512 Matrix, [In-plane voxel resolution: 469 µm × 469 µm] [6]: Effective voxel size: 7.3 × 2.7 × 1.8 mm³, Matrix: 127 × 128, [Voxel resolution: 7300 µm × 2700 µm × 1800 µm]	1 Pixel repräsentiert 200 µm × 200 µm (in-plane voxel resolution), Schnittdicke: 100 µm Matrix: 760 × 574	Matrix: 1024 × 1024 Pixel Gesichtsfeld: 158,7 × 158,7 µm In-plane voxel resolution: 0,15 µm × 0,15 µm
Objekt/Material	In vivo Untersuchung des Gehirns	Komplettes Leichengehirn	Gehirngewebe

und kleineren Faserbündeln. So sind diese Methoden im Verbund die Grundlage für die Erarbeitung eines aussagekräftigen, dreidimensionalen Fasermodells für das menschliche Gehirn und erlauben die gezielte Bearbeitung von Fragestellungen in Bereichen des Human Brain Mapping.

6 Literatur

1. Mori S, Barker BP: Diffusion magnetic resonance imaging: Its principle and applications. Anat. Rec. (New Anat.) 257:102-109, 1999.
2. Axer H, Keyserlingk DGv: Mapping of fiber orientation in human internal capsule by means of polarized light and confocal scanning laser microscopy. J. Neurosci. Meth. 94:165-175, 2000.
3. Axer H, Lippitz BE, Keyserlingk DGv: Morphological asymmetry in anterior limb of human internal capsule revealed by confocal laser and polarized light microscopy. Psych. Res.: Neuroimaging 91:141-154, 1999.
4. Axer H, Berks G, Keyserlingk DGv: Visualization of nerve fiber architecture in gross histological sections of the human brain. Micr. Res. Tec. 51:481-492, 2000.
5. Nakada T, Nakayama N, Fujii Y, Kwee IL: Clinical application of three-dimensional anisotropy contrast magnetic resonance axonography. J. Neurosurg. 90:791-795, 1999.
6. Peled S, Gudbjartsson H, Westin C-F, Kikinis R, Jolesz FA: Magnetic resonance imaging shows orientation and asymmetry of white matter fiber tracts. Brain. Res. 780:27-33, 1998.