

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr.med. Jürgen Deckert

**Dreidimensionaler digitaler stereotaktischer Atlas des menschlichen
Zwischenhirns: Zytoarchitektonik im Verbund mit Magnetresonanztomographie
(MRT)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Eduardo Joaquim Lopes Alho

aus São Paulo, Brasilien

Würzburg, November 2012

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Helmut Heinsen

Korreferent:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Mathias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Materialien und Methoden.....	4
2.1 Abgrenzung, Warpingtechnik, Segmentierung und computergestützte 3D-Rekonstruktion.....	5
2.2 Zentroide.....	12
2.3 Bedeutung der stereotaktischen Koordinaten.....	13
2.4 Symmetriemessungen.....	14
3. Ergebnisse.....	16
3.1 Abgrenzung, Warpingtechniken, Segmentierung, und computergestützte 3D-Rekonstruktion und ihre Bedeutung für eine 3D-Rekonstruktion des Thalamuskomplexes mit seinen Unterkernen.....	16
3.1.1 Identifikation der thalamischen Haupt- und Unterkerne	16
4. Diskussion.....	22
4.1 Diskussion der Literatur und bisherige Lösungen für die atlasbasierte Hirnlokalisierung.....	22
4.2 Diskussion unserer Lösungen und Methoden.....	25
4.2.1 Hohe Schnittdicken vermindern die Artefaktrate.....	25
4.2.2 Hohe Schnittdicken erleichtern architektonische Abgrenzungen.....	26
4.2.3 Hohe Schnittdicken erleichtern die verschiedenen Formen des Warpens.....	28
4.3 Funktionelle Bedeutung der Zentroide für die Hirnlokalisierung.....	29
5. Ausblick.....	31
5.1 Technische Neuerungen.....	31
5.2 Klinische Aspekte.....	32
6. Zusammenfassung.....	39
7. Literaturverzeichnis.....	41
8. Abbildungsverzeichnis.....	52
9. Tabellen.....	55
10. Videos.....	59
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

Neurochirurgische Eingriffe erfordern außerordentlich feine und präzise Manipulationen innerhalb eines gut durchbluteten Gewebes, das in vielen Regionen vitale Strukturen auf engstem Raum vereint. Oft müssen diese Eingriffe ohne direkte visuelle Kontrolle durchgeführt werden. Zur Verbesserung der feinmotorischen Fähigkeiten der menschlichen Hand modifizierten Spiegel und Wycsis (1947) den von Horsley und Clarke (1908) für Eingriffe an Tiergehirnen entworfenen mechanischen Apparat für neurochirurgische Interventionen am menschlichen Zentralnervensystem (ZNS). Diese Apparate werden unter dem Begriff stereotaktische Geräte oder Rahmen zusammengefasst. Äußerlich am Kopf befestigt, werden Instrumenten wie Klingen, Sonden, Nadeln oder Elektroden in diese Geräte eingespannt und können je nach Vorgabe von Koordinaten in allen drei Richtungen des Raumes mit großer Präzision bewegt werden. Nach wie vor unbefriedigend blieb die Tatsache, dass vielfach im Gehirn selbst ohne direkte Sicht, gewissermaßen blind, operiert werden musste. Zur Unterstützung wurden daher äußerlich sichtbare Referenzstrukturen festgelegt und die Koordinaten der stereotaktischen Geräte für intrazerebrale Eingriffe diesen Referenzstrukturen angepasst. Dabei stellte sich sehr bald heraus, dass die ursprünglich anvisierten knöchernen Referenzen des Schädels wegen starker individueller Variabilität als verlässliche Leitstrukturen für die mit großer Präzision arbeitenden stereotaktischen Rahmen ungeeignet waren. Um dieses Problem zu lösen, präsentierten Spiegel und Wycsis (1952) den ersten stereotaktischen Atlas des menschlichen Gehirns.

Fast gleichzeitig beziehungsweise alternativ wurden bildgebende Verfahren als Navigationshilfen bei neurochirurgischen Eingriffen eingesetzt. Die chemische Zusammensetzung des Gehirns und seine physikalischen Eigenschaften erschwerten in der frühen Entwicklungsphase der radiologischen Untersuchungstechniken den Einsatz dieser Verfahren. Daher wurden die Ergebnisse der Ventrikulographie (Dandy, 1918) und ihrer Modifikationen unter Verwendung verschiedener Kontrastmittel (Heimbürger et al., 1966; Radovici und Meller, 1932) unmittelbar in die Planung und Ausführung stereotaktischer Eingriffe aufgenommen. Relativ früh schon konnten Talairach et al. (1957) zeigen, dass die vordere (AC) und die hintere (PC) Kommissur als zuverlässige Wegweiser in stabilen topographischen Beziehungen mit den umliegenden tiefen

Hirnstrukturen verknüpft sind. Auf die individuell variablen AC-PC-Abstände lassen sich bestimmte orthogonale Ebenen projizieren und auf diesen Ebenen wiederum die Umrisse kortikaler, subkortikaler oder anderer Hirnstrukturen abbilden und ihre Lage relativ zu den AC-PC-Abständen in Form von Koordinaten beschreiben. Dieser mathematische Kunstgriff ermöglicht die Lokalisation identischer Strukturen in einzelnen Gehirnen, die sich erheblich in Größe und Form unterscheiden.

In den folgenden zwei Jahrzehnten erfuhren die bildgebenden Verfahren durch die Einführung der Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) einen „Quantensprung“. Seitdem lassen sich unter Verwendung des Talairachschen proportionalen Referenz-Systems auch viele Hirnstrukturen indirekt auf Aufnahmen lokalisieren, die auf Grund ihrer geringen Größe oder ihres geringen Kontrastes auf CT- oder MRT-Bildern unsichtbar bleiben.

Auf die Veröffentlichung des Atlas von Spiegel und Wycsis (1952) folgten zahlreiche andere Gehirnatlanten (Afshar et al., 1978; Andrew und Watkins, 1969; Chakravarty et al., 2006; Emmers und Tasker, 1975; Krauth et al., 2010 ; Mai et al., 1997; Morel, 2007; Morel et al., 1997; Nowinski und Below, 2003; Nowinski et al., 2004; Ono et al., 1990; Schaltenbrand und Bailey, 1959; Schaltenbrand und Wahren, 1977 ; Talairach et al., 1957; Talairach und Tournoux, 1988; Van Buren und Borke, 1972; Yelnik et al., 2007; Yoshida, 1987). Jeder dieser Atlanten hat seine Vor- und Nachteile, so bieten beispielsweise Atlanten, die primär auf histologischen und immunhistochemischen Methoden basieren, eine hervorragende Auflösung und gute Abgrenzung einschließlich einer neurochemischen Kompartimentierung. Allerdings schränken Gewebeschrumpfung und mechanische Verformung beim Schneiden, Färben und Eindecken der histologischen Schnitte die Anwendung dieser Art von Atlas in der klinischen Praxis ein (Alho et al., 2011).

Computergestützte Bildverarbeitungsalgorithmen erlauben die Fusion klassischer Atlanten mit MR- und CT-Bildern. Diese Algorithmen ermöglichten auch die Projektion von histologischen Schnitten in 3D-Strukturen. Dennoch erschienen derartige 3D-Rekonstruktionen vielfach verformt und inkonsistent (Nieman et al., 1994; Nowinski et al., 2006a, 2006b). Die Ursache der Inkonsistenz ist primär in unvermeidbaren Artefakten, die bei der histologischen Verarbeitung von Nervengewebe auftreten, zu

suchen. Hirngewebe wird bereits bei der Entnahme und Fixierung verformt (Bauchot, 1967; Schulz et al., 2011; Small und Peterson, 1982). Die Einbettung sowie das Schneiden, Färben und Eindecken sind zusätzliche Quellen von Gewebsverzerrungen. Art und Richtung dieser Verformungen lassen sich grob in homogene (lineare) und heterogene (nichtlineare) Verzerrungen einteilen. Zusätzlich schrumpfen graue und weiße Substanz in unterschiedlichem Ausmaß (Simmons und Swanson, 2009; Kretschmann et al., 1982). Selbst komplexe Algorithmen sind nicht in der Lage, diese durch histologische Bearbeitung verursachten Gewebsverzerrungen zu korrigieren.

In der vorliegenden Studie soll eine neuartige, einfache und zuverlässige Technik vorgestellt werden, mit der diese Fehlerquellen teils vermieden, teils umgangen, teils korrigiert werden können. *Post mortem in situ* kernspintomographische Aufnahmen von Gehirnen, Formalinfixierung, modifizierte Zelloidineinbettung, hohe Schnittdicken, die Verwendung einer progressiven Nissl-Färbung und manuelle computergestützte lineare und nicht-lineare Kompensation histologischer Artefakte ermöglichen eine 3D-Rekonstruktion des menschlichen Thalamus und seine zytoarchitektonische Einteilung nach Hassler (1982) und letztlich ihre Registrierung mit den MR-Dimensionen desselben Gehirns. Diese Technik ermöglicht ferner die Herausgabe eines hochpräzisen computergestützten dreidimensionalen stereotaktischen Atlas des menschlichen Gehirns.

2. Materialien und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gehirne von drei Verstorbenen untersucht: Fall 1, ein 56-jähriger Mann; Fall 2, ein 68-jähriger Mann und Fall 3, eine 36-jährige Frau. Nähere Angaben zu den Todesursachen und *post mortem*-Zeiten sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das Gehirn von Fall 1 wurde *post mortem in cranio* und *ex cranio* am Institut für Radiologie der Medizinischen Fakultät Sao Paulo mit einem 3,0 T Kernspintomographen (Philips Achieva) unter Verwendung einer Achtkanal- Kopfspule durchleuchtet. Für die Aufnahmen des Falles 1 wurde ein übliches kernspintomographisches Protokoll verwendet: Axial FLAIR (TR = 8613 ms; TI = 2800 ms; TE = 130 ms; 0,65 mm x 0,87 mm; 1 NEX; 3 mm/0,3mm; FOV 230 mm x 183 mm, 2D), T1 (TR = 6,3ms; TE = 2,9ms; TI = 791 ms; 240 x 240; 3D) and DTI (b= 3000; TE = 65 ms; TR 23650 ms; 1/0,0mm; FOV 256 mm x 256 mm; 1,0 mm x 1,0 mm; 2 NEX. 32 directions, SENSE = 2 (AP). Die Gehirne der Fälle 2 und 3 wurden keiner kernspintomographischen Untersuchung unterzogen.

Nach Formalinfixierung wurden die Gehirne in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Die frontopolaren, okzipitopolaren und dorsalen Teile des Prosenzephalons wurden entfernt, um die histologische Verarbeitung zu erleichtern. Die verbleibenden hemisphärischen Blöcke (nach unserer Terminologie „zentrale Blöcke“) wurden in eine 8%ige Zelloidinlösung eingelegt. Durch Vakuumextraktion in einem Exsikkator wurde das Zelloidin auf 16% konzentriert und anschließend mit Chloroformdämpfen und zuletzt durch Eintauchen in 70%igen Alkohol gehärtet. Die gehärteten Zelloidinblöcke mitsamt den Hemisphären wurden auf einem Großschnitt-Schlittenmikrotom (Polycut, Cambridge Instruments, UK) bei einer Dicke von 400 µm in Serie geschnitten. Während des Schneidens wurde jeder neue Schnitt auf der Oberfläche des Blockes mit einer digitalen Spiegelreflexkamera fotografiert. Die 400µm dicken Serienschnitte wurden mit einer modifizierten Gallozyanin-Technik gefärbt (Heinsen und Heinsen, 1991).

Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Universität von Sao Paulo, Brasilien (Projekt-Nummer 0086/09 von der Nationalen Kommission für Ethik in der Forschung (CONEP) unter der Nummer 16029) und der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, Deutschland genehmigt.

2. 1 Abgrenzung, Warpingtechnik, Segmentierung und computergestützte 3D-Rekonstruktion

Die Gallozyanin-gefärbten Schnitte wurden mit einer Canon® EOS 5D Mark II 21.1 Megapixel Spiegelreflexkamera (Tokyo, Japan) und einem Olympus Zuiko® Auto-Makro 50mm 1:3.5 Makro-Objektiv (Tokyo, Japan) fotografiert. Zusätzlich wurden die Schnitte mit einem Stereo-Mikroskop (Olympus SZH, Tokyo, Japan) und einem binokularen Mikroskop bei stärkerer und starker Vergrößerung untersucht und der mikroskopische Feinbau des Thalamus und seiner Kerngebiete mit den makroskopisch sichtbaren Grenzen bei schwacher photographischer Vergrößerung verglichen. Diese kombinierten Untersuchungsschritte ermöglichten die Abgrenzung zytoarchitektonischer Felder und Subregionen in kortikalen und sub kortikalen Strukturen. Im Hinblick auf die zytoarchitektonische Einteilung des Thalamus diente die Abgrenzung nach Hassler (1982) zur Orientierung.

Anschnitte durch den Thalamus wurden auf 77 Gallozyanin-gefärbten Schnitten im Fall 1, 70 im Fall 2 und 86 im Fall 3 beobachtet. Die Untersuchung lückenloser Serienschnitte durch den Thalamus, der kombinierte Einsatz von Fotos in hoher Auflösung und die Verwendung eines Stereo-Mikroskops erleichterte die Abgrenzung der einzelnen thalamischen Kerngebiete und die Abgrenzung von Subregionen gegen Artefakte, wie sie durch An-, Schräg-, oder Tangentialschnitte entstehen. Fall 3 wurde nur für zytoarchitektonische und myeloarchitektonische Studien nicht aber für 3D-Rekonstruktionen verwendet.

Gallozyanin-gefärbte Serienschnitte durch den Thalamus können ohne besondere Maßnahmen nicht direkt für die computergestützte räumliche Rekonstruktion des Thalamus und seiner Unterkerne verwendet werden. Es liegt in der Natur der Sache, dass einzelne gefärbte Schnitte ihren strengen räumlichen Zusammenhang verlieren. Außerdem lässt es sich nicht immer vermeiden, dass beim Schneiden des Zelloidinblockes oder beim anschließenden Färben, Dehydrieren und Eindecken chemische und physikalische Kräfte den einen oder anderen Schnitt verformen. Das Ergebnis sind unvorhersehbare Gewebsverzerrungen. Bei 3D-Rekonstruktionen aus Schnittserien müssen diese Artefakte kompensiert werden. Das Übereinanderlegen von einzelnen Schnitten aus einer Serie oder die Registrierung von Bildern wird im

Englischen auch Warping genannt (Fischer und Modersitzki, 2008; Zitova und Flusser, 2003). Bildhaft kann man es sich vorstellen, als ob man nach dem Zerschneiden eines Apfels die Größe und Form des Apfels durch Übereinanderlegen der einzelnen Schnitte wiederherstellt. Warpingverfahren umfassen einfache direkte Manipulationen wie Skalierung, Translation und Rotation. In diesem Falle wären die einzelnen Apfelscheiben von konstanter Dicke, allenfalls gleichmäßig vergrößert oder verkleinert (d.h., durch das Schneiden weder gestaucht noch gedehnt oder zerrissen) oder gegeneinander verdreht und die Schwerpunkte der einzelnen Scheiben untereinander verschoben. Warpingverfahren implizieren aber auch komplexe lokale Transformationen (Arad und Reisfeld, 1994; Fischer und Modersitzki, 2008; Zitova und Flusser, 2003). Es ist leicht einsehbar, dass mehrere gleichzeitig auftretende Gewebsdeformationen unterschiedlichen Ausmaßes erhebliche Anforderungen selbst an High-End-Computersysteme (Wolberg, 1992) stellen. Einige Lösungen für diese Probleme wurden unter anderem bei Arad und Reisfeld (1994), Arad et al. (1994), Arad (1995), Bajcsy und Kovacic (1989), Brookstein (1989), Bro-Nielsen und Gramkow (1996), Buhmann (2000) und Moshfeghi (1991) vorgestellt. Viele dieser vorgeschlagenen Lösungen können durch Photoshop ® CS5 -wie weiter unten beschrieben- erreicht werden.

Beim seriellen Schneiden der Zelloidinblöcke auf dem Mikrotom wurde jeder neue Anschnitt photographiert. Diese oberflächlichen Anschnitte sind noch nicht aus dem Verband des Gehirns herausgelöst und besitzen somit eine invariable z-Achse. Folglich kann also der Anschnitt photographisch als Matrize für den späteren gefärbten Schnitt und der Wiederherstellung seiner durch die Färbeprozedur unweigerlich gestörten ursprünglichen Ausrichtung dienen. Zur Wiederherstellung dieser Anordnung wurden zwei Bilder in Photoshop CS5 ® importiert: ein Foto von einem 400 µm Gallozyanin-gefärbten Abschnitt (primäres Bild) und sein entsprechend ungefärbter Anschnitt des Zelloidinblock. Die primären Bilder wurden auf 20 bis 30% Transparenz gesetzt, so dass die Konturen der Zielbilder durch die Primärbilder schimmerten. Durch Skalieren, Drehen und Verschieben seiner Umrisse wurde das primäre Bild grob an das Zielbild ausgerichtet. Diese Art von Kompensation der linearen Verzerrung ist auch als affine Transformation (Abb. 1A) bekannt. Diese Technik ermöglicht eine eins-zu-eins-Korrelation zwischen Histologie und ihrem Anschnitt auf dem Zelloidinblock (Abb.

1D). Nach grober Ausrichtung der Schnitte (Abb. 1A), passen einige Strukturen des Zielbildes nicht ganz perfekt auf das Primärbild, weil sie zusätzlich durch die histologischen Verfahren (Abb.1E) verzerrt wurden. Die ungewöhnliche Dicke der histologischen Schnitte (400µm) minimiert, verhindert aber nicht vollständig die durch Schneiden, Färben, Dehydrierung und Eindecken verursachten Verzerrungen.

Die Kompensation dieser Art von Artefakten ist Gegenstand nicht-linearer Verfahren. Ebenfalls in Photoshop CS5® wurde ein verformbares Netz auf die Oberfläche der primären Bilder projiziert und Ankerpunkte wurden auf dem Gitter festgelegt (Abb. 1B). Diese Punkte fixieren das Bild an den festgelegten Stellen und verhindern ungewollte globale Transformationen. Wählt der Bearbeiter einen der Stifte, so kann er mit Hilfe eines Vektors einen stark verzerrten Teil des gefärbten Primärbildes dem unverzerrten Zielbild (Abb. 1C) anpassen. Eine perfekte Ausrichtung erfolgt über mehrere Referenzstrukturen, wie kortikale Anschnitte, Gefäße, Gehirnstrukturen (einschließlich Artefakte), wie in beiden Bildern (Abb. 1E) sichtbar. Das Warpingverfahren ist in video 1 (Die Videos können in der elektronischen Version dieses Manuskripts betrachtet werden) dargestellt.

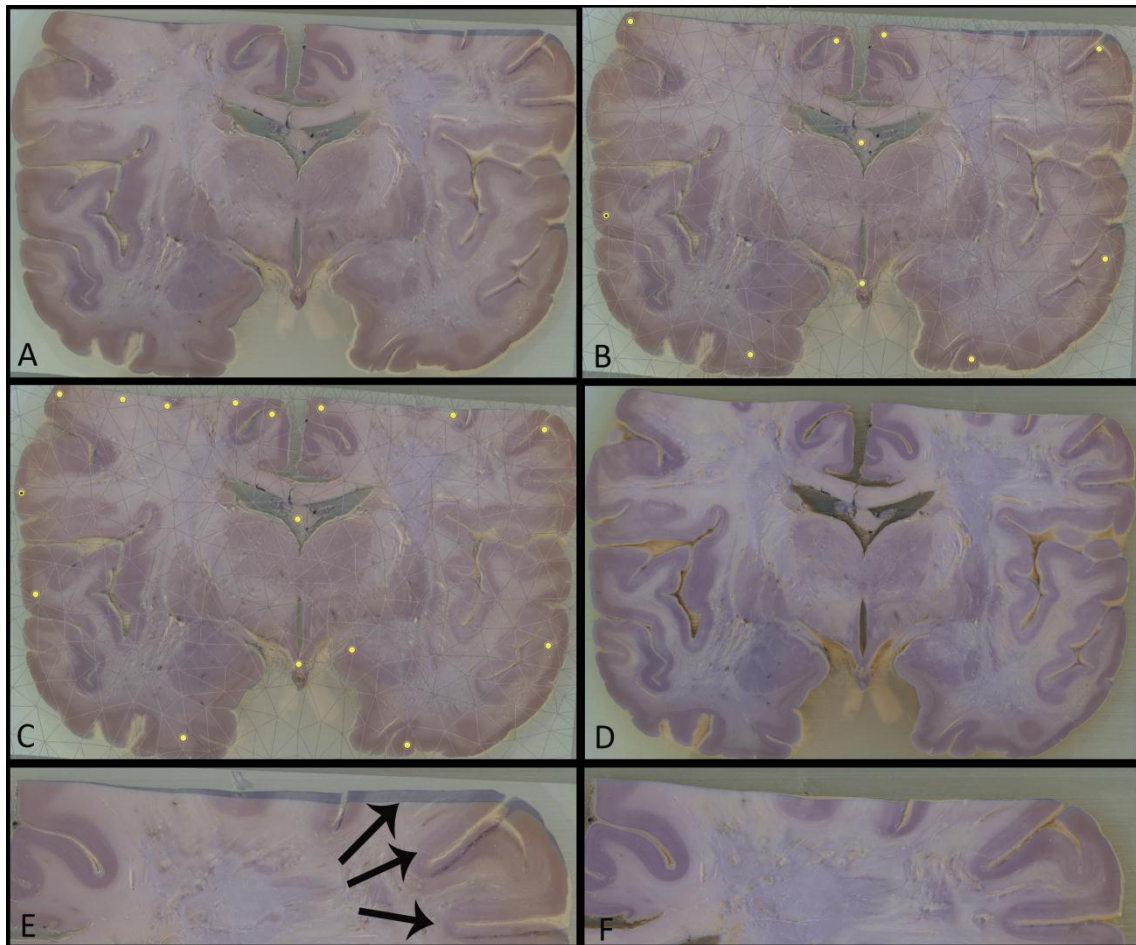


Abb.1: Warpingtechnik: (A) Grobausrichtung der Gallozyanin-gefärbten Schnitte zum ungefärbten Block. (B) Verformbares Gitter und Ankerpunkte auf die primäre Bildebene projiziert. (C) Nicht-lineare Korrektur der Verformungen. (D) Endgültige Ausrichtung. (E) Ausschnitt des durch die Gewebesverarbeitung lokal stark verformten gefärbten Schnitts vor Korrektur und (F) nach der nichtlinearen Korrektur.

An das zweidimensionale Warping aller primären Bilder, schließt sich das 3D Warping der histologischen Schnitte an. Ziel ist ein Ausgleich der Schrumpfungen, die bei histologischen Prozeduren durch Dehydrierung während der Einbettung und Schneidewie Färbeprozeduren unvermeidbar sind (Bauchot, 1967; Kretschmann et al., 1982; Simmons und Swanson, 2009; Small und Peterson, 1982).

In diesem Falle dienen Gestalt und Volumen der kernspintomographischen Aufnahmen und ihrer Rekonstruktionen als Zielbilder, da *in cranio* gescannte Gehirne in erster

Annäherung die ursprüngliche Form und das ursprüngliche Volumen des Gehirns am ehesten wiedergeben. Zu diesem Zweck wurden gewarppte .JPG-Bilder der histologischen Schnitte und die DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) MR-Dateien der *post mortem* Gehirne (Fall 1) in eine Software-Plattform zur Visualisierung und Bearbeitung von biomedizinischen Daten (Amira ® 5.4 .1, Visage Imaging GmbH, Berlin, Deutschland) importiert. Das histologische Volumen wurde manuell auf das gleiche Koordinatensystem wie das aus den kernspintomographischen Daten eingestellt (Abb.2). Der midcommissurale Punkt (Mittelpunkt der interkommissuralen Linie) wurde nach dem Vorschlag von Schaltenbrand und Wahren (1977) als Ursprung des Koordinatensystems (Abb. 4) definiert. Zu den Software-Werkzeugen für das 3D-Warping in Amira ®5.4.1, gehören rigide und elastische Transformationen. Die Registrierung kann automatisch (euklidische, Normalized Mutual Information, Mutual Information oder Korrelationsalgorithmen) oder manuell (rigide) durchgeführt werden. Die automatischen Registrierungsalgorithmen von Amira ® konnten keine perfekte Kongruenz durch den Vergleich beider Volumina erzielen. Manuelle Einstellungen wurden daher durch visuelle Kontrolle der Landmarken (AC, PC, Thalamushöhe, kortikale Windungen, Hirnstammoberfläche) in beiden Sätzen von Bildern gemacht. Dieser dritte Schritt war für das Gehirn von Fall 2 nicht möglich, da keine *in cranio post mortem* MRT-Bilder zur Verfügung standen. Das Gehirn von Fall 3 war nicht 3D rekonstruiert.

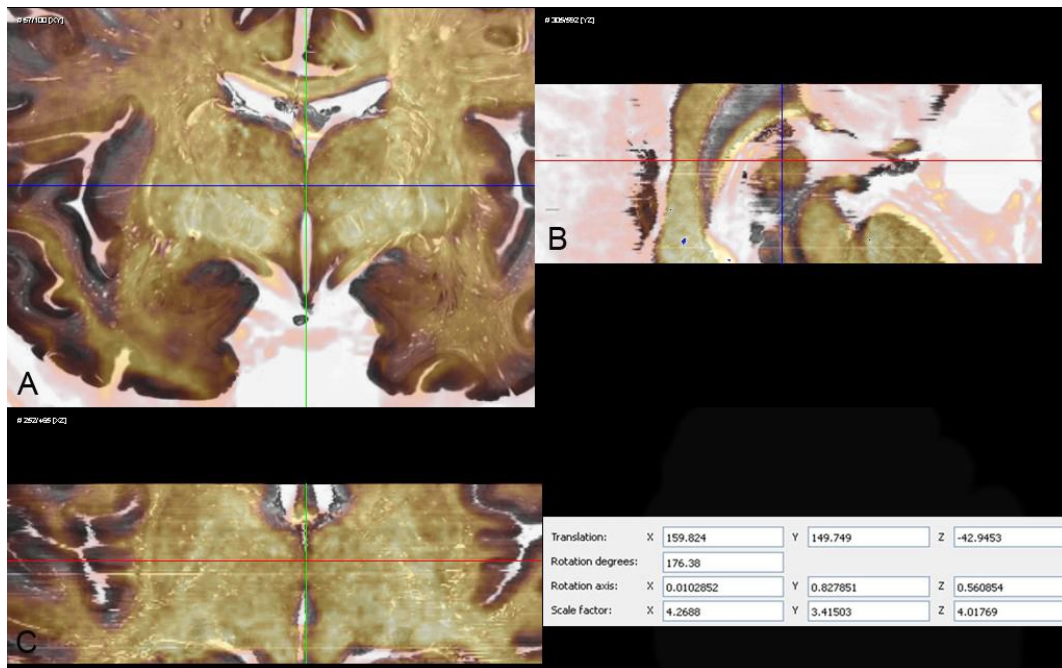


Abb.2: 3D Warping der kernspintomographischen Bilder mit dem histologischen Block (A) Anpassen der histologischen Schnitte in der frontalen Schnittebene an die frontalen kernspintomographischen Bilder. (B) Sagittales Matching. (C) Horizontales Matching. Der graue Kasten in der rechten unteren Ecke ermöglicht die manuelle Steuerung der linearen geometrischen Transformation.

Unabdingbare Voraussetzung für die 3D Rekonstruktion von subkortikalen Strukturen wie Thalamus etc. ist die Grenzziehung zwischen Kerngebiet und umgebenden markhaltigen Massen und des Ventrikels. Gleiches gilt für die Einteilung des Thalamus in seine Unterkerne. Um dieses zu erreichen, wurden digitale Fotos der Gallozyanin-gefärbten Schnitte in Adobe Photoshop CS5 ® importiert (3C). Die Umrisse bzw. Grenzen der Thalamuskern und ihrer Unterkerne wurden auf jedem Serienschnitt unter Verwendung des Stereomikroskops und durch Vergleich des mikroskopischen Feinbaus manuell nach Hasslers Kriterien und seiner Nomenklatur (1982) umfahren (Fachausdruck segmentiert). Die digitalisierten Bilder mit den segmentierten Grenzen der Thalamuskern wurden dann in .JPG Bilder umgewandelt und die Thalamuskern und ihre Unterkerne wurden entsprechend dem HSV-System (Farbton, Sättigung und Wert) kodiert. Das HSV-System basiert auf einer zylindrischen Koordinatendarstellung

von Punkten in einem RGB (Rot, Grün und Blau)-Farbmodell. Sechs Grundfarben wurden den sechs großen thalamischen Kernmassen zugeordnet. Unterkerne innerhalb der großen Thalamuskernmassen wurden durch Variationen der Grundfarbe des HSV-Systems wiedergegeben.

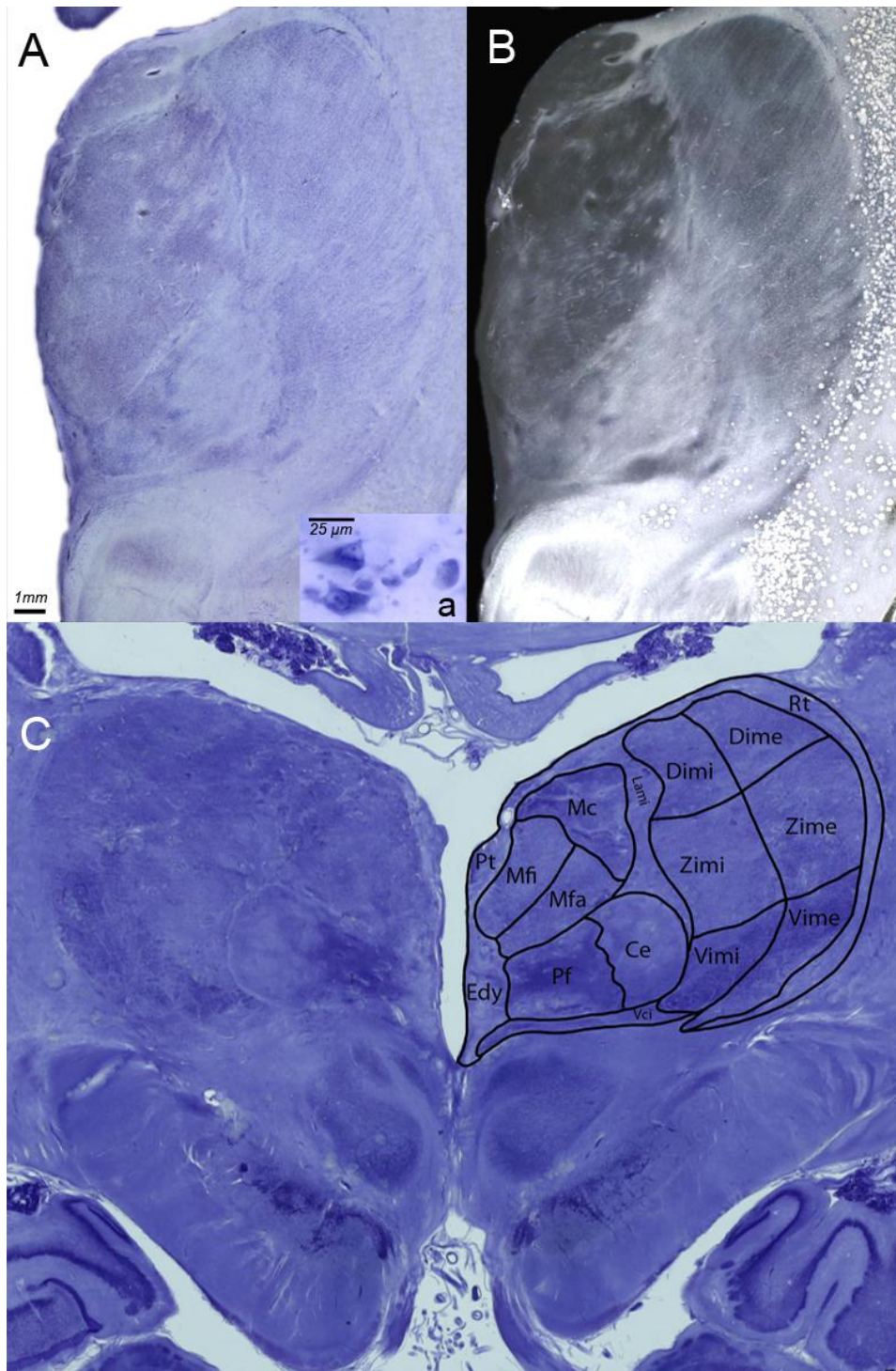


Abb.3: Zytoarchitektur des Thalamus : Die frontalen Schnitte der Abbildungen (A) und (B) entsprechen der Tafel 28 (Abschnitt LXVIII Fp 9,0) des *Schaltenbrand & Wahren Atlas*‘ (1977). Diese Frontalebene ist weiter kaudal als die in (C). (A) Hellfeldbeleuchtung eines Gallozyanin-gefärbten 400 μm dicken Schnitts durch den rechten Thalamus von Fall 3. (a) Ausschnittsvergrößerung mit großen und kleinen Zellen des Ncl. medialis fasciculosus entsprechend der Beschreibung von Hassler (1982). (B) im selben Abschnitt Dunkelfeldbeleuchtung. Mehrere runde Körper sind innerhalb der Capsula interna zu unterscheiden. Sie sind am ehesten Galaktolipide, die nach unvollständiger Formalinfixierung als Niederschlag nach Kontakt mit Alkohol auftreten. (C) Konturen der Thalamuskern nach mikroskopischer zytoarchitektonischer Analyse erhalten. Balken in Abb. (A) entspricht 1 mm. Balken in Abb. (a) entspricht 25 μm .

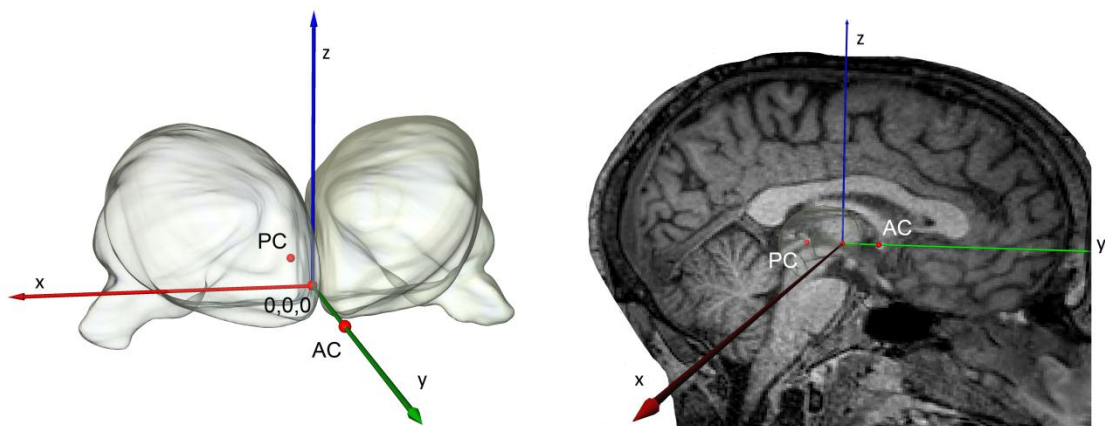


Abb.4: Stereotaktisches Referenzsystem: Der Nullpunkt (0,0,0) ist der äquidistante Punkt zwischen AC und PC auf der Mittellinie. Die x-Achse (rot) repräsentiert die latero-laterale oder Sagittalebene, y (grün) die antero-posteriore oder Frontalebene und z (blau) die supero-inferiore oder horizontale Ebene.

2.2 Zentroide

Zentroide, oder geometrischen Zentren dienen als Mittelpunkte für Koordinaten, mit deren Hilfe Thalamuskern unabhängig von ihrer teilweise bizarren Form lokalisiert

werden können. Die geometrischen Zentren wurden mit Hilfe von Amira® und die Eingabe der arithmetischen Mittelwerte jeder Achse (x, y und z) durch einen Punkt im 3D-Raum berechnet. Auf diese Weise wird die mittlere Position der Kerne im 3D-Raum beschrieben (Deoni et al., 2007; Lemaire et al., 2010; Morel et al., 1997; Sparing et al., 2008).

2.3 Bedeutung der stereotaktischen Koordinaten

Die stereotaktischen Koordinaten wurden für jeden der Schwerpunkte der Thalamuskern und Unterkerne berechnet. Nullpunkt für dieses Koordinatensystem war der interkommissurale Punkt. Die Ebene 0 wird durch die Linie zwischen AC und PC gegeben (Abb. 4). Die stereotaktischen Koordinaten von Fall 1 sind in Tabelle 2 angezeigt und die 3D-Verteilung der Schwerpunkte für den Fall 1 wird in den Abbildungen 5 und 6 und im Video 2 dargestellt.

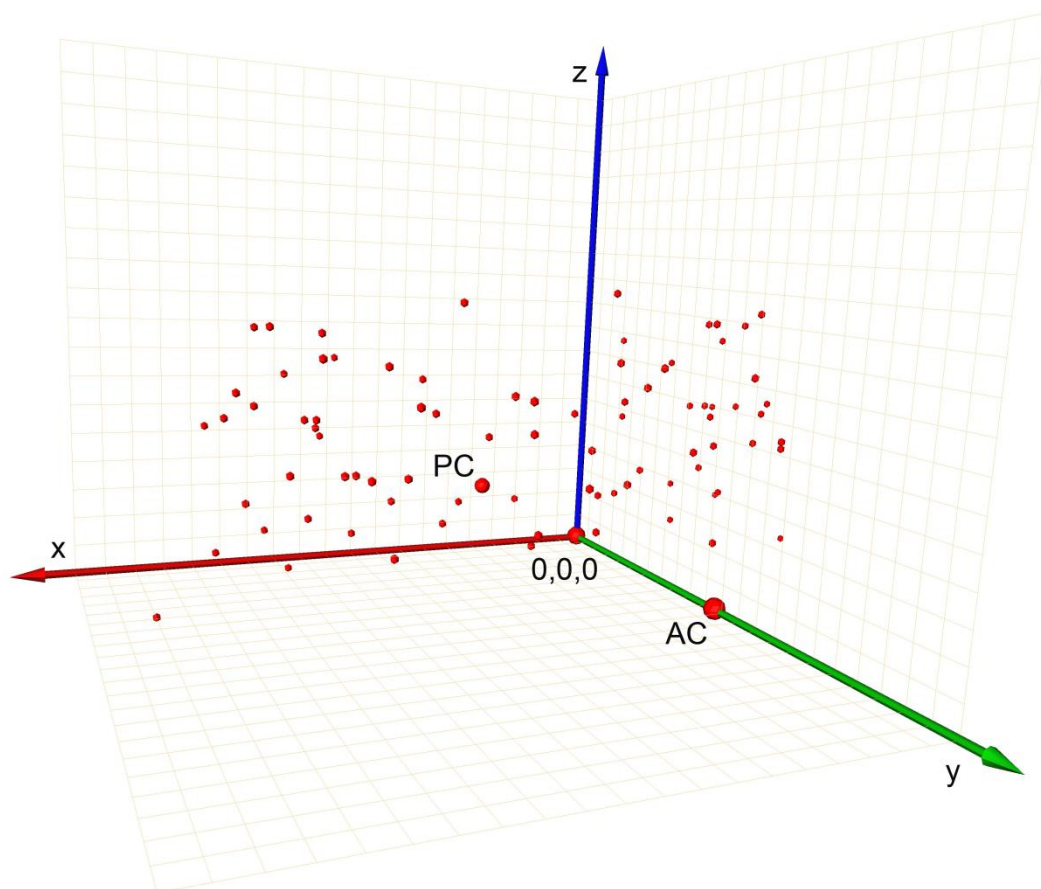


Abb.5 :Verteilung der Zentroide aus einer rechten fronto-lateralen Perspektive gesehen.

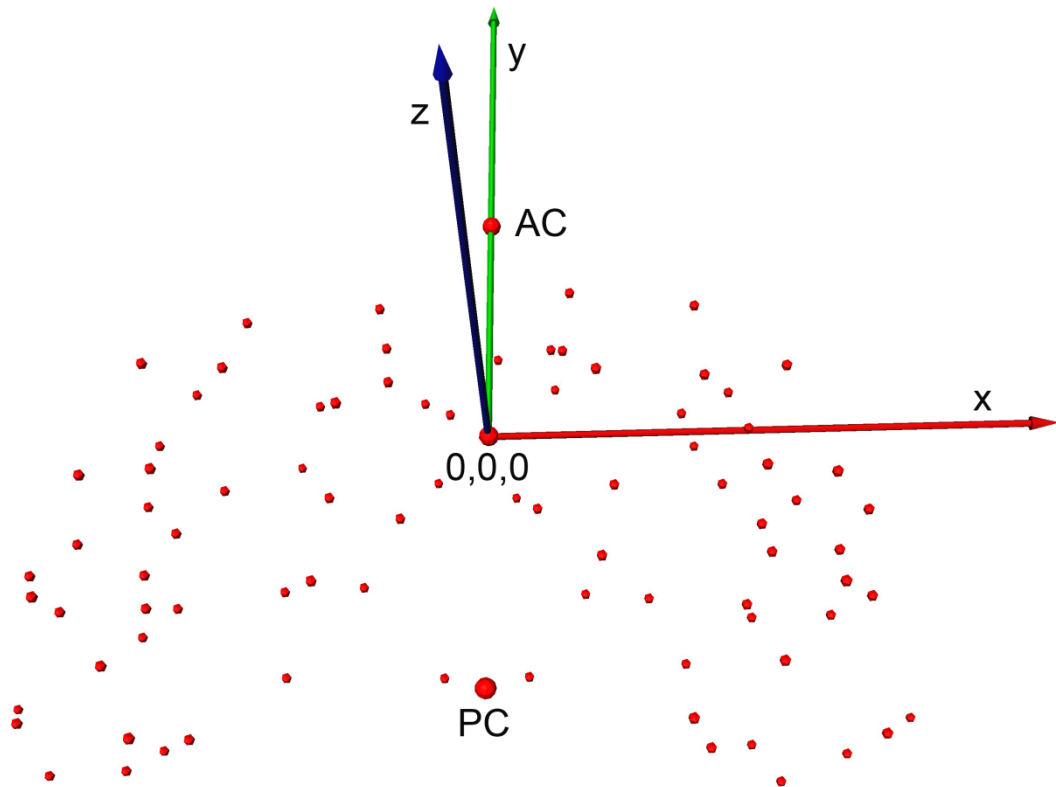


Abb.6: Verteilung der Zentroide aus einer superioren Perspektive.

2.4 Symmetriemessungen

Zur Quantifizierung räumlicher Asymmetrie von Fall 1 im Vergleich zu Fall 2 wurden mehrere vergleichende Messungen gemacht.

Symmetrische Koordinaten wurden wie folgt ausgedrückt:

$$|X_r| = |X_l|$$

$$|Y_r| = |Y_l|$$

$$|Z_r| = |Z_l|$$

r steht für rechtsseitige Kerne und l für die linksseitige Thalamuskern. Symmetrische Kerne hätten per definitionem die gleichen x-, y- und z-Koordinaten. Aus diesem Grunde können die drei obigen Gleichungen zu einem umfassenden Koordinatensystem mit der Koordinate "C" vereinfacht werden:

$$|C_r| = |C_l|$$

Die Gleichung $|C_r| - |C_l| = 0$ würde Symmetrie bedeuten, wobei es keinen Unterschied zwischen den absoluten Koordinaten eines bestimmten Kerns auf der rechten und linken Seite gäbe. Die Gleichungen $|C_r| - |C_l| > 0$ und $|C_r| - |C_l| < 0$ bedeuten jeweils rechtsseitige oder linksseitige Asymmetrie.

Wollen wir die absoluten Werte der Koordinaten in Millimeterangeben, um auszudrücken, wie weit eine Koordinate von ihrem kontralateralen Partner entfernt ist, kann die Gleichung folgendermaßen formuliert werden:

$$||C_r| - |C_l|| = AICD$$

In der obigen Gleichung bezeichnet AICD den absoluten Interkoordinatenabstand (Absolute Inter Coordinate Distance) in mm ausgedrückt. Ein hoher AICD bedeutet hohe Asymmetrie.

3. Ergebnisse

3.1 Abgrenzung, Warpingtechniken, Segmentierung, und computergestützte 3D-Rekonstruktion und ihre Bedeutung für eine 3D-Rekonstruktion des Thalamuskomplexes mit seinen Unterkernen

Agonale Faktoren, Fixierungsartefakte, Schrumpfung, Quellung und Artefakte beim Schneiden, Färben und Aufziehen von Schnitten verändern mehr oder minder stark die Form und die Größe von Schnitten und üben deshalb einen erheblichen und *a priori* nicht vorhersehbaren Einfluss auf die Rekonstruktion eines Gehirns. Durch die in der Überschrift aufgeführten Techniken können diese unerwünschten Auswirkungen abgeschätzt und zum größten Teil kompensiert oder rückgängig gemacht werden. Bei Fall 1 konnten alle in der Überschrift aufgezählten Techniken eingesetzt werden. Bei Fall 2 wurde keine *in cranio post mortem* Kernspintomographie durchgeführt und im Fall 3 wurde an den Schnittserien lediglich die Zyto- und die Myeloarchitektonik nach Hassler (1982) im mikroskopischen Hell- und Dunkelfeld studiert, ohne dass die Gestalt des Thalamus computergestützt rekonstruiert wurde. Die Erkenntnisse dieser kombinierten Hell- und Dunkelfelduntersuchung am Thalamus des Falles 3 erleichterte erheblich die Segmentierung der Thalamuskern der Fälle 1 und 2.

3.1.1 Identifikation der thalamischen Haupt- und Unterkerne

Trotz der hohen Schnittdicke von 400 und mehr Mikrometern blieben die Gallozyanin-gefärbten Schnitte bei Durchlichtbetrachtung transparent. Schon bei der Untersuchung der Thalamusanschnitte mit dem bloßen Auge oder einer schwach vergrößernden Lupe ließen sich am Thalamuskomplex die Hauptkomponenten und eine Reihe von Unterkernen deutlich abgrenzen. Bei konventioneller Schnitttechnik von 20 Mikrometern werden nach Nissl-Färbung feine architektonische Unterschiede nur nach sehr genauer Durchmusterung erkennbar. Offensichtlich verstärken die Überlagerungseffekte dicker Gallozyanin-gefärbter Schnitte selbst Nuancen an

unterschiedlicher Zelldichte, Zellgröße, Färbbarkeit, Orientierung und Lagerung von Neuronen innerhalb der thalamischen Kernkomponenten, so dass auch wenig geübte Betrachter nach einer relativ kurzen Einarbeitungszeit eine nachvollziehbare Abgrenzung und Unterteilung des Thalamuskomplexes ausführen (siehe Abb. 3C). Wenn dann auch noch nach kurzen *post mortem*- oder Autolysezeiten und bei guter Durchfixierung des Hirngewebes die markhaltigen Fasern weitgehend erhalten bleiben und sich bei Dunkelfeldbeleuchtung als hell leuchtende Stränge und feinste Fasergeflechte darstellen, so können die auf einer Nissl-Färbung basierenden zytoarchitektonischen Abgrenzungen durch myeloarchitektonische Befunde ohne großen Aufwand und Verlust an Gewebe durch eine zusätzliche „Spezialfärbung“ ergänzt werden (Abb. 3B). Ferner erhält der Betrachter bei der Verwendung einer Stereolupe bei der Untersuchung der einzelnen 400 oder mehr Mikrometer dicken Schnitte bereits einen dreidimensionalen Eindruck von der Lagerung der Nervenzellen bzw. der räumlichen Anordnung markhaltiger Axone. Anhand dieser zytoarchitektonischen, myeloarchitektonischen Kriterien und der abschnittsweise erkennbaren räumlichen Anordnung der neuronalen Perikarya und ihrer sichtbaren Neuriten wurde die Einteilung des Thalamuskomplexes nach Hasslers Terminologie in trunco- und palliothalamische Kerne durchgeführt. Diese wurden weiter in Territorium anterius, Territorium mediale, Substantia grisea centralis thalamica, Involucrum mediale, Territorium laterale, Pulvinar, Zona reticulata thalami, Corpus geniculatum mediale und Corpus geniculatum laterale aufgeteilt.

Die Bilder 3A und 3B wurden aus einer Schnitthöhe einer Frontalschnittserie entnommen, die in etwa der Schnittebene der Tafel 28 (Abschnitt LXVIII Fp 9,0) des Atlas von Schaltenbrand und Wahren (1977) entspricht. Aus einem Vergleich der Abbildungen 3A und 3B mit der Tafel 28 wird deutlich, dass die Grenzen der thalamischen Unterkerne sich nicht an mathematisch-geometrischen Kriterien orientieren und einfachen geometrischen Linien folgen, sondern außerordentlich komplexe Gebilde formen. Wolkenähnliche neuronale Aggregationen bauchten sich auf oder häuften sich in der medialen nuklearen Region an, während der ventrocaudale parvocelluläre (V.c.pc.) Subkern als chromophiler (kräftig dunkel-gefärbt in Gallozyaninpräparat) Satellit den Ventrocaudalis anterior (V.c.a.) zu begleiten schien. Im Gegensatz zu den medialen Kernen waren die Kerne der lateralen Kernregion durch

eine Streifung charakterisiert, die den kortikalen vertikalen Radii ähnelt. Das Kaliber dieser thalamischen Radii variierte von fein über intermediär, bis grob. Bei Dunkelfeldbeleuchtung (Abb. 3B) bildeten Bündel aus dünneren oder dickeren markhaltigen Fasern die Achsen dieser Radii. Feinkalibrige Fasern durchsetzten das Pulvinar, Fasern eines intermediären Kalibers die Vi und großkalibrige Fasern den Vc.

Kenntnisse und Anwendung zyto-und myeloarchitektonischer Kriterien -wie für den Fall 3 definiert - sind die unabdingbare Voraussetzung einer Abgrenzung oder Segmentierung der einzelnen thalamischen Kerngebiete und ihrer computergestützten 3D-Rekonstruktion mit Amira®. Amira® rekonstruierte aus den Umrissen der Kerne auf den Serienschnitten der Fälle 1 und 2 die Gestalt derselben. Im Fall 1 wurde die dreidimensionale Gestalt der einzelnen thalamischen Kerngebiete zuerst aus den Umrissen der histologischen Serienschnitte rekonstruiert und dann mit den Methoden des linearen und nichtlinearen Warpings mit den 3D Strukturen der kernspintomographischen Serie registriert (Abb. 8).

Die Berechnung der Schwerpunkte oder Zentroide einzelner Thalamuskerngebiete bietet gewissermaßen ein mathematisches Hilfsmittel, die entsprechenden Kerne unabhängig von ihrer teilweise stark unregelmäßigen Gestalt in Form von Koordinaten exakt zu lokalisieren. Je nach Blickwinkel kann eine sehr komplexe Anordnung von Schwerpunkten wahrgenommen werden (Abb. 5 und 6 und Video 1).

Wir berechneten die AICD in jeder Achse für 34 Paare von Thalamuskernen in Fall 1 und 2 und verglichen die Werte von x1 mit x2, y1 mit y2, und z1 mit z2 unter Verwendung gepaarter t-Tests. Die Analysen zeigen für die AICD-Werte der x-Achse keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Fall 1 und 2 ($p > 0,05$). Hingegen waren aber die AICD-Werte der y- und z-Koordinaten des Falles 2 viel asymmetrischer als die des Falles 1 ($p < 0,001$) (Tabelle 4). Dieses Ergebnis gibt den subjektiven Eindruck, dass die Thalami des Falles 1 recht gleichförmig – symmetrisch - gebaut waren, während sie im Fall 2 entlang der y- und z-Achse verformt schienen. Die Tabelle 5 fasst die erzielten Ergebnisse zusammen und die Abbildung 9 zeigt die 3D-Anordnung der Thalamuskerngebiete der Fälle 1 und 2.

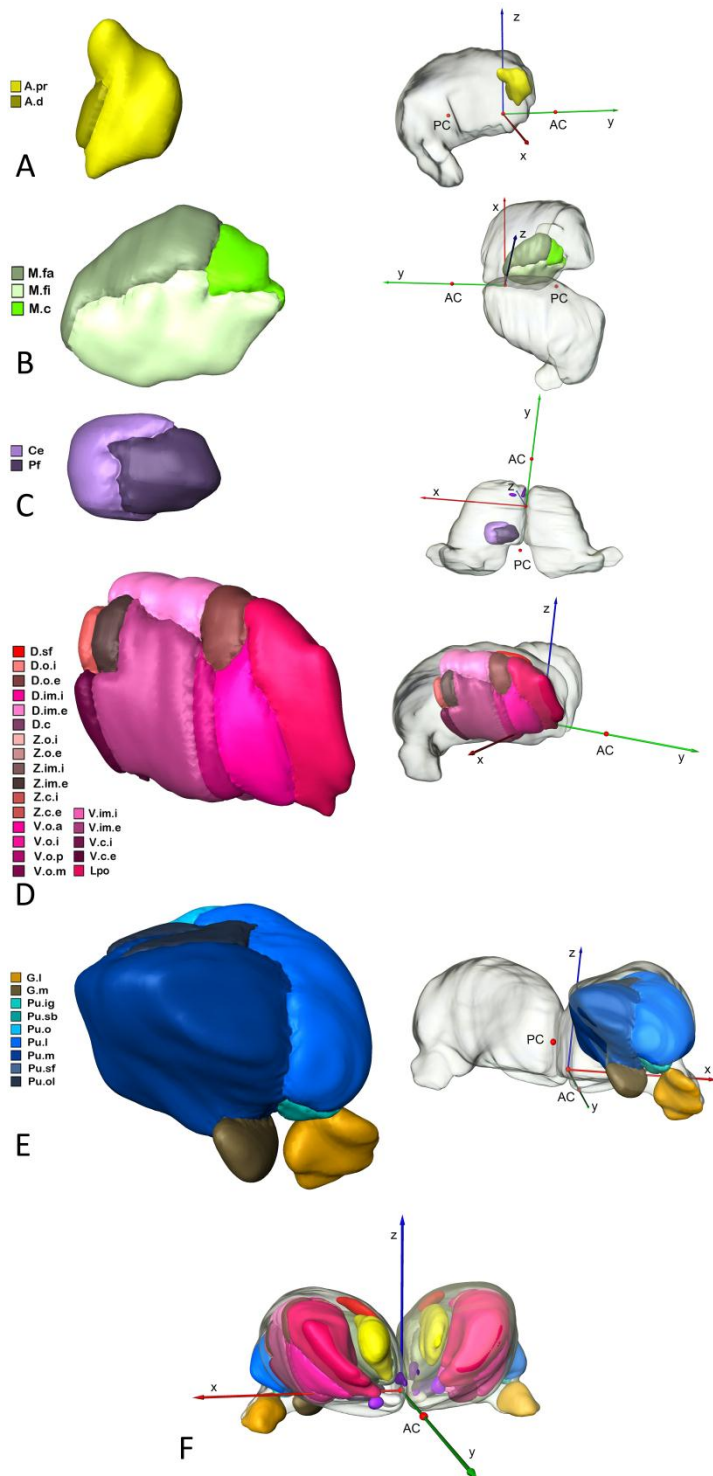


Abb.7: 3D Rekonstruktion des Thalamus und seiner Unterkerne des Falles 1. Zur besseren Orientierung sind auf der rechten Bildhälfte die jeweiligen Achsen dargestellt: (A) Anteriore Gruppe, (B) Mediale Gruppe, (C) Ncl. centromedianus und Ncl.

parafascicularis, (D) Laterale Gruppe, (E) Pulvinar. (F) Thalami im Referenzsystem eingefügt.

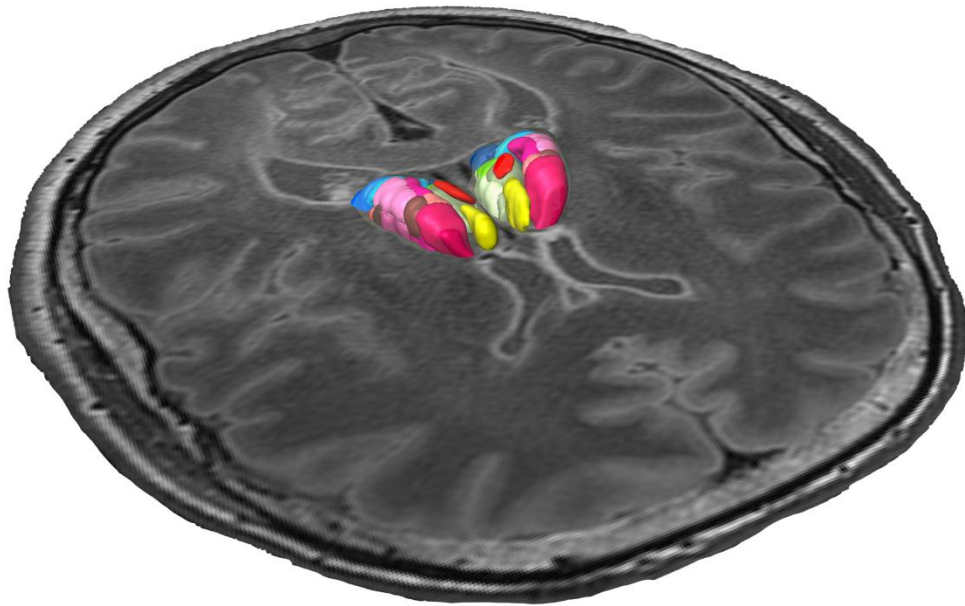


Abb.8: Registrierung der histologisch segmentierten Thalamuskern mit dem bei 3,0 Tesla aufgenommenen kernspintomographischen Bild des gleichen Gehirns.

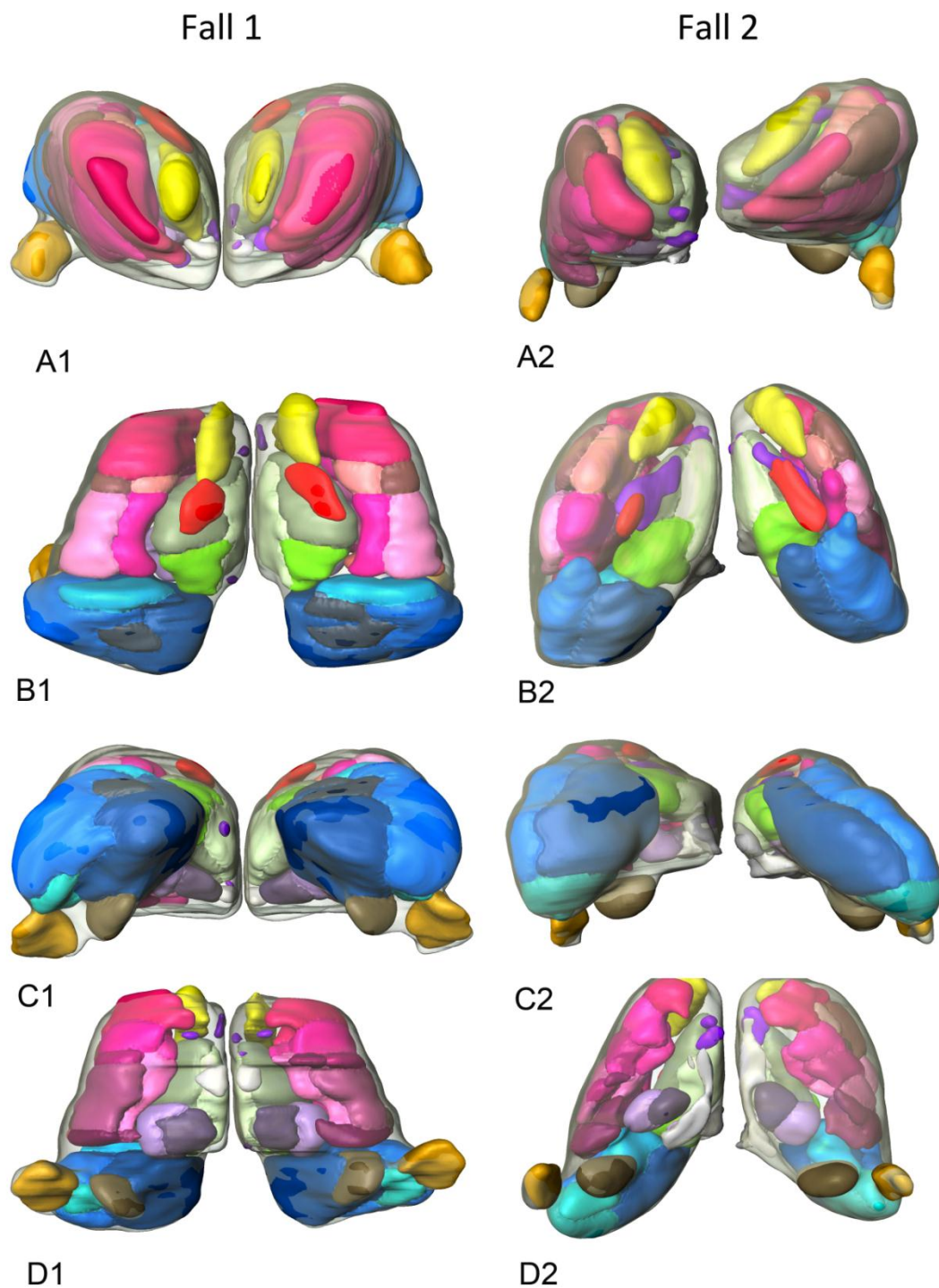


Abb.9: Synopsis des 3D rekonstruierten Thalamuskomplexes und seiner Unterkerne nach den zytoarchitektonischen Kriterien von Hassler (1982). *Fall 1 ist auf der linken Seite (A1, B1, C1 und D1) und Fall 2 auf der rechten Seite (A2, B2, C2 und D2) dargestellt. (A1) und (A2): Vorderansicht; (B1) und (B2): superiore Ansicht; (C1) und (C2): posteriore Ansicht; (D1) und (D2): inferiore Ansicht.*

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Literatur und bisherige Lösungen für die atlasbasierte Hirnlokalisierung

Seit ihrer Einführung vor 65 Jahren wurden stereotaktische Geräte kontinuierlich weiter entwickelt, verbessert und verfeinert. Aber selbst in Kombination mit den neuesten bildgebenden Methoden und ihren hohen Auflösungen bleibt bei neurochirurgischen Eingriffen die diagnostische und therapeutische Navigation in den intrazerebralen Kerngebieten ungewiss.

Diese Ungewissheit versuchten eine Reihe von Autoren (Deoni et al., 2007; Elias et al., 2011; Lemaire et al., 2010; Traynor et al., 2011) durch MRT-basierte thalamische Segmentierung als Ergänzung und, wenn möglich, als Substitution klassischer Atlanten zu klären. Dennoch mussten zuletzt Traynor et al. 2011 einräumen, dass die Ergebnisse ihrer Thalamusunterteilung in T1- und T2-gewichteten kernspintomographischen Aufnahmen nicht einmal mit denen einer Segmentierung basierend auf den Faserverbindungen der thalamischen Kerngebiete übereinstimmten. Nach wie vor ist die Auflösung histologischer Atlanten weitaus besser als die von Kernspintomographen bei einer Feldstärke von 3.0 T und selbst von experimentellen Geräten mit höchster Feldstärke. Neben Traynor et al. (2011) schlagen deshalb auch andere Autoren (Amunts et al., 2007; Mazziota et al., 2001; Toga et al., 2006) vor, die Ergebnisse unterschiedlicher Untersuchungsmethoden zu kombinieren. Hirnatlanten mit ihrer Detailtreue sind also nach wie vor der Standard für intrazerebrale Navigation, an denen sich andere Methoden orientieren sollten.

Mit dem Aufkommen bildgebender Verfahren und zunehmend leistungsfähiger Computer und Software wurde deshalb versucht, beide Methoden, Bildgebung und die Abbildungen von Atlanten in einer Benutzeroberfläche zu vereinen. Die Umsetzung dieser Aufgabe ist alles andere als banal.

Bei der histologischen Aufarbeitung des menschlichen ZNS sind eine Reihe von Artefakten nicht zu vermeiden. Unmittelbar nach dem Eintritt des Todes, vermutlich

aber auch schon während einer längeren Agonie, verändert sich die normale chemische Zusammensetzung des ZNS. Das ausgeglichene und nur durch erheblichen Energieaufwand gewährleistete intra- und extrazelluläre Konzentrationsverhältnis von Ionen und elektrisch geladenen Molekülen bricht zusammen und in der Folge kommt es zu Verschiebungen von Flüssigkeiten und Formveränderungen, meist Quellungen. Nach der Entnahme des Gehirns und beginnender Formalinfixierung sistieren diese Phänomene nicht, sondern werden durch das erfahrungsgemäß langsame Eindringen von Formalin in das Hirngewebe noch erheblich verstärkt, um sich nach längerer Formalinfixierung wieder umzukehren. Mark und Rinde quellen und schrumpfen unterschiedlich (Bauchot, 1967; Quester and Schröder, 1997; Simmons and Swanson, 2009; Small and Peterson, 1982). Nach Ende einer Formalinfixierung wird das Hirngewebe gewöhnlich entweder in Paraffin oder in Zelloidin eingebettet, um es besser schneiden zu können. Zu diesem Zweck muss vorher über steigende Alkoholkonzentrationen Wasser aus dem Hirngewebe entzogen werden, damit für die bessere Schneidbarkeit das wasserunlösliche Paraffin oder Zelloidin in das Gehirn eindringen können. In der Folge schrumpft das Gehirn teilweise erheblich, individuell aber nie vorhersagbar entweder stärker oder weniger stark, das Marklager manchmal stärker als die Rinde, dann aber auch umgekehrt, die Rinde manchmal stärker als das Marklager (Kretschmann et al., 1982).

Das in Paraffin oder Zelloidin eingebettete Gehirn wird auf einen Mikrotom geschnitten. Je nach Untersucher und Fragestellung variiert die Schnittdicke zwischen 4 und 800 Mikrometern. Dabei werden vor allem dünne Paraffin- und Zelloidinschnitte beim Schneiden häufig verformt (Kraus, 1962), die Schnitte wellen sich, sie reißen ein.

Anschließend werden dünne Schnitte entweder auf Objektträger aufgeklebt und dicke Schnitte in Formalin oder Alkohol gesammelt und aufbewahrt. Nach dem Aufkleben können die Schnitte gefärbt werden. Das ist eine Prozedur, bei der zunächst das Paraffin mit Xylol gelöst wird, dann die Schnitte in absteigenden Alkoholreihen rehydriert und danach in Färbelösungen gefärbt werden. Anschließend werden sie erneut mit Alkohol dehydriert und zuletzt in einem flüssigen Kunststoff mit einem Deckglas versehen, um dauerhaft aufbewahrt zu werden. Diese geschilderten Manipulationen verändern ebenfalls den Quellungszustand des Gewebes und nicht selten lösen sich dünne Schnitte

von Objektträgern und sind unwiederbringlich verloren. Bei dicken Schnitten kommt so etwas selten vor. Dennoch können auch sie sich beim De- und Rehydrieren verformen, einzelne Schnitte teilweise stark. So wird also die histologische Detailtreue, die bis zur Auflösung von 0.2 μm der besten Ölimmersionsobjektive reicht, durch unvermeidbare Artefakte erkaufte.

Umgekehrt liefert hochauflösende *post mortem* Bildgebung wichtige Informationen über das Volumen und die Form des Gehirns *in cranio* (Pfefferbaum et al., 2004). So liegt es auf der Hand, beide Methoden zu kombinieren und die Schwäche der einen mit der Stärke und den Vorteilen der anderen Methode auszugleichen. Aber aus den für die histologische Bearbeitung geschilderten Schritten und Artefakten sind eine Reihe von Schwierigkeiten zu überwinden.

Etliche Protokolle und Strategien wurden für die Registrierung histologischer und kernspintomographischer Bilder tierischer (Dauguet et al., 2007) und menschlicher Gehirne (Orselin et al., 2001; Osechinskiy und Kruggel, 2011) entworfen, ohne dass man sich auf ein allgemein gültiges Protokoll einigen konnte.

Alternativ versuchte zunächst Yoshida (1987) die 3D Rekonstruktion der histologischen Schnitte des Schaltenbrand und Bailey Atlas (1959). Ihnen folgten einige Autoren, die Ähnliches an den häufig gebrauchten Druckausgaben anderer Atlanten weiterer Autoren umzusetzen versuchten (Carballo-Barreda et al., 2007; Ganser et al., 2004; Nowinski und Below, 2003; Nowinski et al., 1997; St-Jean et al., 1998). Dabei kamen einige Unstimmigkeiten in den Vorlagen zu Tage. Beispielsweise sind die orthogonalen Platten des Atlas von Talairach und Tournoux nicht konsistent. In der Folge hat ein gegebener Punkt im dreidimensionalen stereotaktischen Raum bis zu drei unterschiedliche anatomische Bezeichnungen. Ein anderes Beispiel ist die verzerrte Wiedergabe der Abbildungen mit teilweise unrealistischen Formen (Nowinski et al., 1997) aus dem Atlas von Schaltenbrand und Wahren (1977) nach einer 3D Rekonstruktion. Komplexe Näherungsformeln wurden von St. Jean et al (1998) für den Schaltenbrand und Wahren Atlas (1977) und von Ganser et al. (2004) für den Talairach und Tournoux Atlas entwickelt. Aber selbst mit diesen umfassenden mathematischen Behandlungen und Berechnungen konnten nicht alle Unstimmigkeiten ausgeräumt werden.

Daher wurde versucht, in neuen Schnittserien alte und neue Techniken zu vereinen. Chakravarty et al. (2006) verwendet einen zuvor präsentierten nichtlinearen Transformationsalgorithmus (ANIMAL-Automated Nonlinear Image Matching and Anatomical Labeling) für die Ausrichtung histologischer Schnitte und die Kontruktion eines 3D Volumens. Yelnik et al. (2007) verwendeten kernspintomographische Bilder vom gleichen Patienten für die Ausrichtung der histologischen auf die kernspintomographischen Schnitte und die Erstellung eines kohärenten Volumens. Die Registrierung wurde mit Software-Werkzeugen und einem intensitätsbasierten Block-Matching-Ansatz bewerkstelligt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kernspintomographische Aufnahmen allgemein als eine verlässliche Matrize akzeptiert werden, auf die die artefaktbeladenen histologischen oder immunhistochemischen Schnitte korrigiert werden sollten. Allerdings sind Wege und Methoden zu diesem Ziel kompliziert, aufwändig was Personal, Soft- und Hardware betrifft und von den Ergebnissen her immer noch verbesserungswürdig.

4.2 Diskussion unserer Lösungen und Methoden

4.2.1 Hohe Schnittdicken vermindern die Artefaktrate

Schrumpfung und Verformung der Schnitte sind die wichtigsten und begrenzende Schritte bei der Registrierung von histologischen Schnitten mit entweder *post mortem in situ* kranialen MRT oder *post mortem* MRT formalinfixierten Gehirnen. Wir haben versucht, diese technischen Herausforderungen mit einer modifizierten Zelloidineinbettung, ungewöhnlich hohen Schnittdicken (350 bis 450 µm) und einer modifizierten Nissl-Färbung (Heinsen und Heinsen, 1991; Heinsen et al.; 2000) zu minimieren. Schneiden und Färben gut fixierter menschlicher Hemisphären oder sogenannter zentraler Blöcke von Gehirnen (Teile beider Hemisphären mit Kortex, den Basalganglien, Thalamus, Hirnstamm und Kleinhirn) war schnell und zuverlässig. Dennoch können einzelne Schnitte einer Serie homogen verformt oder in der y- und x-Achse geschrumpft sein. Letzteres lässt sich nur beim Alignieren vorheriger und nachfolgender Schnitte mit dem geschrumpften Schnitt sicher erkennen, da die Form des geschrumpften Schnittes mit den Vergleichsschnitten deutlich aus der Rolle fällt.

Die Gallozyaninfärbung dicker Schnitte erleichtert erheblich die Abgrenzung kortikaler Areale und subkortikaler Kerne und ermöglicht den Ausschluss neuropathologischer Veränderungen (Casanova et al., 2008; Ewers et al., 2011; Grinberg et al., 2009; Heckers et al., 1991; Heinsen et al. 1994a, 1994b, Heinsen et al. 1996).

4.2.2 Hohe Schnittdicken erleichtern architektonische Abgrenzungen

In der Tat ist die Abgrenzung von thalamischen Unterkernen alles andere als unkompliziert. Das gilt vor allem für Abgrenzung entsprechend der Nomenklatur nach Hassler die von vielen Klinikern bevorzugt wird. Dies wird nach Lektüre der Veröffentlichung von Dewulf (1971) deutlich. Das war der Grund, dass zytoarchitektonische Studien wegen der Subjektivität ihrer Betrachtungsweise kritisiert wurden. Die Gruppe von Zilles führte deshalb eine beobachter-unabhängige quantitative Methode zur Abgrenzung kortikaler Felder und Zytoarchitektonik subkortikaler Kerne ein (Amunts et al. 2005; Schleicher et al., 1986; Schleicher et al., 2000). Dieses Verfahren beruht auf konventioneller zeitaufwändiger Paraffineinbettung, dem Schneiden von Tausenden von 20 µm dicken Serienschnitten und dem Einsatz spezieller nicht frei verfügbarer Hard-und Software. Nach unserer Erfahrung ist die Abgrenzung der dicken Gallozyanin-gefärbten Schnitte fast eine intuitive, da sich minimale zytologische Details in sehr dicken Schnitten überlagern und gegenseitig verstärken (Abb. 3). An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass in den gängigen älteren Atlanten bevorzugt myeloarchitektonische Abbildungen bei der Abgrenzung der Kerngebiete gezeigt werden. Nissl-gefärbte zytoarchitektonische Übersichtsvergrößerungen sind wegen des geringen Kontrasts nur schwer photographisch zu reproduzieren. In einigen Gallozyanin-gefärbten Schnittserien konnten wir auch myelinisierte Fasern in der Dunkelfeldbeleuchtung erkennen (Abb. 3B). Wir haben derzeit keine Erklärung warum bei Dunkelfeldbeleuchtung Fasern und Faserbündel in solchen Fällen wie dem Fall 3 sichtbar werden. Dennoch ergänzt eine Dunkelfeldbeleuchtung mit Faserdarstellung in diesen unerklärlich bevorzugten Fällen die rein zytoarchitektonische Betrachtung. Bei stärkerer und starker stereomikroskopischer Vergrößerung konnten weitere Unterteilungen der wichtigsten Thalamuskern in Subkerne erkannt werden. So fielen beispielsweise die intralaminaren Kerne durch die strangförmige Anordnung und Chromophilie ihrer Nervenzellen auf. Im

Bereich des M.pl. drangen die Neuronen tief in den dorsolateralen Quadranten der medialen Kernregion ein. Die Neuronen des M.c. bildeten große Komplexe, die atemberaubenden Konfigurationen von Cumulonimbi bei dreidimensionaler Stereomikroskopie ähnelten, während der M.fi.p. homogener im Durchlicht erschien. Bei Dunkelfeldbetrachtung fielen die M.fi- und M.fa- Unterkerne durch ihren Markreichtum und durch unterschiedliche Verlaufsrichtung und Anordnung der Fasern auf, während den M.c nur wenige Faserbündel in schräger Verlaufsrichtung von dorsolateral nach ventromedial durchzogen. Die lateralen Kerne waren von Fasern durchsetzt, die kortikalen Radiärbündeln ähnelten. Bei der Betrachtung der gleichen Regionen im Hellfeld waren die Nervenzellreihen deutlich zu erkennen, die parallel zu den Radiärbündeln angeordnet waren. Wahrscheinlich spiegelt die Anordnung von Neuronen in Form von Streifen, einfachen isolierten oder unregelmäßigen Inseln und hochkomplexen wolkenähnlichen Gebilden funktionelle Eigenarten wider, deren Bedeutung weitgehend unbekannt ist.

Zyto- und Myeloarchitektonik sind im Lateralkern deutlich komplementär. Sehr dicke Gallozyanin-gefärbte Schnitte erleichtern eine zytoarchitektonische Gliederung der großen Thalamuskern ganz erheblich. Dennoch war es nicht möglich, alle von Hassler beschriebenen Unterkerne sicher abzugrenzen. Die Grenzen einiger Unterkerne wurden deshalb nach mehr oder minder topographisch-anatomischen Kriterien von den Hasslerschen Abbildungen auf die gegenwärtig untersuchten Schnitte übertragen. In vergleichbaren 60 µm dicken Serienschnitten durch das Gehirn von Mäusen und 100 µm dicken Serienschnitten durch das Gehirn von Ratten erschien die Zytoarchitektonik des Thalamus-Komplexes bei Nagetieren weit weniger unregelmäßig und wies deutlich weniger interindividuelle Variabilität auf als beim Menschen. Nur umfassende interdisziplinäre zytoarchitektonische, elektrophysiologische und bildgebende Studien am Menschen werden vielleicht künftig einige der Geheimnisse von Struktur und Funktion des Thalamus enthüllen.

4.2.3 Hohe Schnittdicken erleichtern die verschiedenen Formen des Warpens

Die Abgrenzung des Thalamus und seiner Unterkerne ist an 350- 400 µm dicken Gallozyanin-gefärbten Schnitten sehr viel einfacher als an solchen von 20-40 µm Dicke. Sie ist aber für die 3D Rekonstruktion der Form and Größe der genannten Strukturen unerlässlich. Ebenso wichtig wie die Abgrenzung oder Segmentierung ist die Korrektur der Fixierungs-, Lagerungs-, Schneide- und Färbeartefakte. Einige Lösungsansätze für die Registrierung von gefärbten histologischen Schnitten auf die ungefärbten wurden weiter oben schon beschrieben. Für die geometrisch streng angeordneten Schnitte des Blocks sowie die anschließende Projektion der alignierten Schnittserie zum Ausgleich der Schrumpfungsfaktoren in den kernspintomographischen Raum sind lineare und nicht-lineare Transformationen erforderlich (Arad and Reisfeld, 1994; Arad et al., 1994; Arad, 1995; Bajcsy and Kovacic, 1989; Brookstein, 1989; Bro-Nielsen and Gramkow, 1996; Buhmann, 2000; Fischer and Modersitzki, 2008; Moshfeghi, 1991; Zitova and Flusser, 2003). Beim Schneiden wurde jeder einzelne Zelloidinschnitt auf dem Block photographiert. Diese linear angeordneten und vor dem Schneiden und später durch das Färben nicht verformten Schnitte dienten als Vorlage oder Matrize für dieselben Gallozyanin-gefärbten Schnitte. Anstatt komplexe Computerprogramme zu entwickeln oder anzuwenden, wurden der ungefärbte und der gefärbte Schnitt in Photoshop CS5® importiert. Mit Photoshop® lassen sich beide Bilder optisch übereinanderlegen, der obere Schnitt – in diesem Falle der gefärbte Schnitt – lässt sich durch Änderung der Transparenz nach Belieben durchsichtig machen und auf den darunter gelegenen Schnitt – den ungefärbten als Matrize – in Ausrichtung Form und Größe beliebig verändern. Auf diese Weise können manuell alle erdenklichen Schneide- und Färbeartefakte ausgeglichen werden. Diese Prozedur wurde für jeden Gallozyanin- gefärbten Schnitt durchexerziert bis zuletzt alle Artefakte optisch ausgeglichen waren. Die Methode ist zwar zeitaufwändig aber im Gegensatz zu hochkomplexen Computerprogrammen ist tatsächlich garantiert jeder Schnitt und jedes Artefakt ausgeglichen.

Ähnlich wie mit Photoshop® lassen sich mit Amira® globale Volumenveränderungen und fixierungs-, einbettungs- und färbebedingte Schrumpfungen ausgleichen. Sowohl aus den gefärbten und segmentierten Thalami als auch aus den Konturen des Thalamus

in den kernspintomographischen Serien können die jeweiligen Thalami 3D rekonstruiert werden. Beide Volumina werden in Amira® übereinandergelegt, die 3D Form und Größe des aus der MRT-Serie rekonstruierten Thalamus dient als Matrize für den aus der gefärbten Schnittserie rekonstruierten Thalamus. Auch in diesem Falle lassen sich Inkongruenzen unter optischer Kontrolle manuell und ohne Verwendung automatischer komplexer Computersoftware ausführen.

4.3 Funktionelle Bedeutung der Zentroide für die Hirnlokalisierung

Die Berechnung von Zentroiden oder geometrischen Zentren von Thalamuskernen und ihre Zuordnung zu stereotaktischen Koordinaten hat eine gewisse funktionelle Bedeutung. Die Platzierung von tiefen Hirnelektroden oder Spulen für die transkranielle magnetische Stimulation (TMS) soll über einer Zielstruktur - und nur über dieser – so genau wie möglich eingestellt werden. So lange die Zielstruktur geometrisch einfach gebaut ist, kugelförmig oder in Form eines Rotationsellipsoids, bleibt eine exakte Einstellung unproblematisch. Bei komplexen Rinden- oder subkortikalen Strukturen lässt sich ein Zielpunkt nicht so einfach festlegen. Zentroide für motorisch evozierte Potentiale wurden von Sparing et al. (2008) berechnet, um effektiver den motorischen Kortex mit TMS zu stimulieren. Die Nomenklaturen „Schwerpunkte“ (Massenmittelpunkte) und „Gravizentrum“ werden ebenfalls verwendet, um Zentroide zu beschreiben. Wir bevorzugen die Bezeichnung Zentroide oder geometrischen Zentren. Der Begriff "Schwerpunkt" impliziert, dass jeder der Thalamuskern eine gleichförmige Dichte hat, was nicht auf alle Fälle zutrifft. Die Bezeichnung „Gravizentrum“ impliziert, dass die Thalami in ein homogenes Gravitationsfeld eingebettet sind.

Bei tiefen Strukturen wie dem Thalamus und seiner vielgestaltigen Kerngebiete sollte deshalb die Festlegung von Zentroiden die Effektivität von Stimulationen erhöhen.

Durch Vergleiche zwischen den Zentroidkoordinaten unterschiedlicher Individuen unter Verwendung einer gemeinsamen Vorlage lassen sich interindividuelle Variabilitäten untersuchen, probabilistische Informationen auf einer 3D-Karte erheben und interindividuelle Asymmetrien einzelner Thalamuskern beschreiben (Deoni et al., 2007; Lemaire et al., 2010; Morel et al., 1997; Sparing et al., 2008). Wir fanden eine

beträchtliche intraindividuelle linksseitige Asymmetrie der entsprechenden Thalamuskern im Fall 2. Der Durchschnittswert AICD für die x-Achse von Fall 2 war ähnlich wie bei Fall 1 (beide ca. 1,5 mm), aber auf der y- und z-Achse waren die durchschnittlichen AICDs von Fall 2 signifikant unterschiedlich zu Fall 1 ($p < 0,001$). Diese Asymmetrie im Fall 2 könnte auf anatomische Variationen oder lediglich ein *post mortem* Artefakt zurückzuführen sein. Da kein MRT für den Fall 2 zur Verfügung stand, konnten die Ursachen der Asymmetrie weder genau bestimmt noch korrigiert werden. Ungeeignete Lagerung des frischen unfixierten Gehirns oder Verformung beim Transport des Formalin-fixierten Organs könnten Ursache für eine artifizielle asymmetrische Verformung sein.

5. Ausblick

5.1 Technische Neuerungen

In der vorliegenden Studie wurde eine neuartige, einfache, zuverlässige und preisgünstige histologische Technik vorgestellt, die in Verbindung mit 3D Rekonstruktionen und kernspintomographischen Untersuchungstechniken die Erstellung eines sehr detailreichen Atlas‘ von Hirnstrukturen erlaubt und eine genaue intrazerebrale Navigation erleichtert. Auf Grund der gemachten Erfahrungen ist es durchaus realistisch, in einem überschaubaren Zeitraum eine sehr große Zahl von zusätzlichen menschlichen Gehirnen zu untersuchen und durch Optimierungen in der Entnahme, der Einbettung und der Schneideprozedur eine atlasbasierte Navigation im menschlichen ZNS auf eine breite und umfassende Grundlage zu stellen. Zu diesem Zweck soll in naher Zukunft von der Medizinischen Fakultät Sao Paulo ein 3D Drucker beschafft und in den Räumlichkeiten des Pathologischen Instituts aufgestellt werden. Mit Hilfe der *post mortem in cranio* kernspintomographischen Aufnahmen lassen sich Teile des knöchernen Schädels und der Schädelbasis 3D rekonstruieren, im .stl-Format exportieren und als Kunststoffmodell vom Drucker ausdrucken. Dieses Kunststoffmodell kann das zu fixierende Gehirn ohne Gefahr von artifiziellen Verformungen während der Formalifixierung aufnehmen.

Weiter konnten wir über dünnere Zelloidinlösungen und speziell angefertigte Exsikatoren in Übergröße auch ganze Gehirne mit Kleinhirn und Hirnstamm einbetten und schneiden. Die bisherige Beschränkung auf einzelne Hemisphären oder zentrale Blöcke entfällt somit.

Die durch das Magnetfeld hervorgerufenen Verzerrungen von kernspintomographischen Bildern lassen sich durch die Registrierung mit CT-Bildern korrigieren. Ein Computertomograph ist bereits in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Räumen des Pathologischen Instituts aufgebaut und steht für kommende Fälle bereit.

5.2 Klinische Aspekte

Wir konnten die erhobenen Daten und Koordinaten unseres histologischen Atlas durch Registrierung mit prä- oder postoperativen kernspintomographischen Aufnahmen von Patienten der Neurochirurgischen Klinik der Medizinischen Fakultät Sao Paulo auf Computerbildschirmen darstellen und stereotaktische Eingriffe simulieren. Die Ergebnisse von bilateralen Hirnstimulationen des Nucleus subthalamicus von 4 Patienten mit Dystonie und vorangegangenen Pallidotomien sind bereits veröffentlicht (Fonoff et al., 2012 – Abb.10).

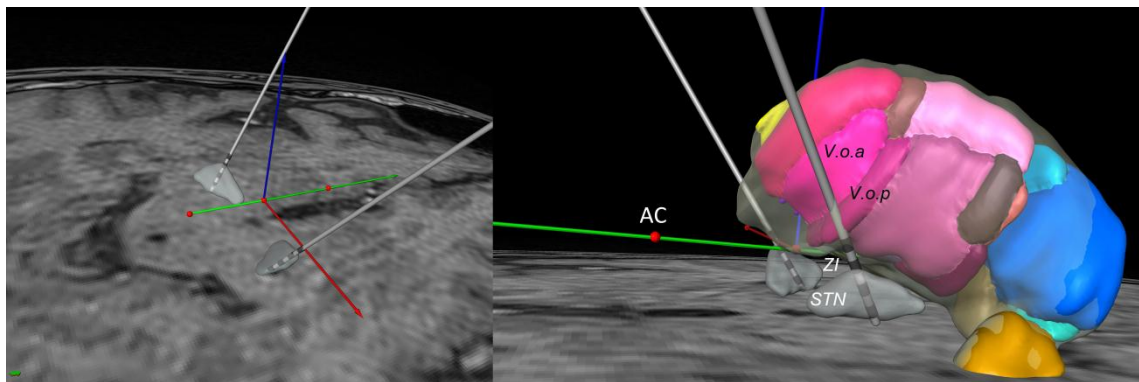


Abb.10: Bilaterale Hirnstimulation des Ncl. subthalamicus nach bilateraler Pallidotomie bei Dystonie (Fonoff et al., 2012).

Die Ergebnisse einer Mikrodialyse nach Mikrostimulation des Globus pallidus internus konnten durch Projektion unserer Atlasdaten auf die entsprechenden postoperativen kernspintomographischen Patientenaufnahmen verifiziert werden (Abbildung 11 und Video 3). Die Daten wurden bereits von Martinez et al., 2012 vorgestellt.

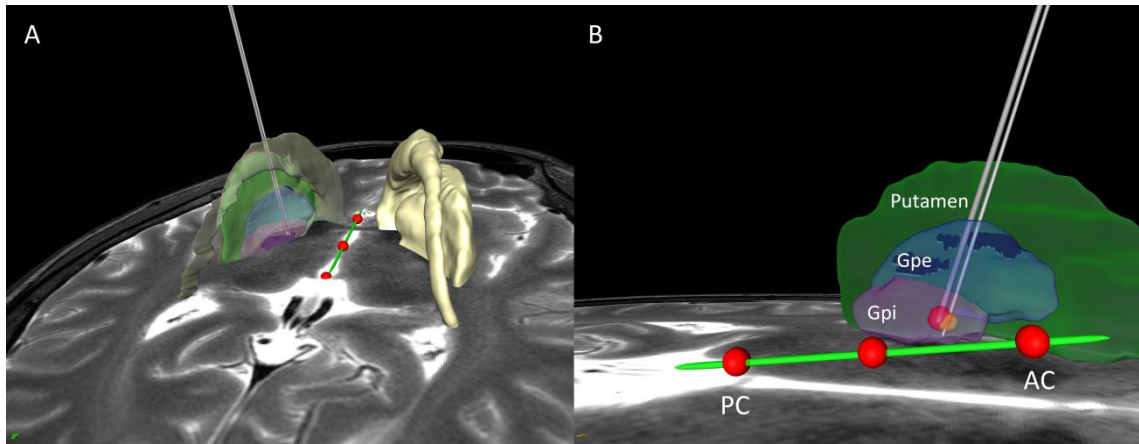


Abb.11: Mikro dialyse nach Mikrostimulation des Globus pallidus internus. Auf (A) ist ein Überblick der Basalganglien und der anatomischen Lage der Mikrostimulationselektrode und Mikro dialysesonde dargestellt. Die rechte Abbildung (B) gibt eine detaillierte Ansicht wieder. Die rote Kugel an der Spitze der Mikrostimulationselektrode und die gelbe Kugel an der Spitze der Mikro dialysesonde verdeutlichen die räumliche Entfernung der Sonden zueinander und somit den Abstand zwischen Stimulation und Effekt.

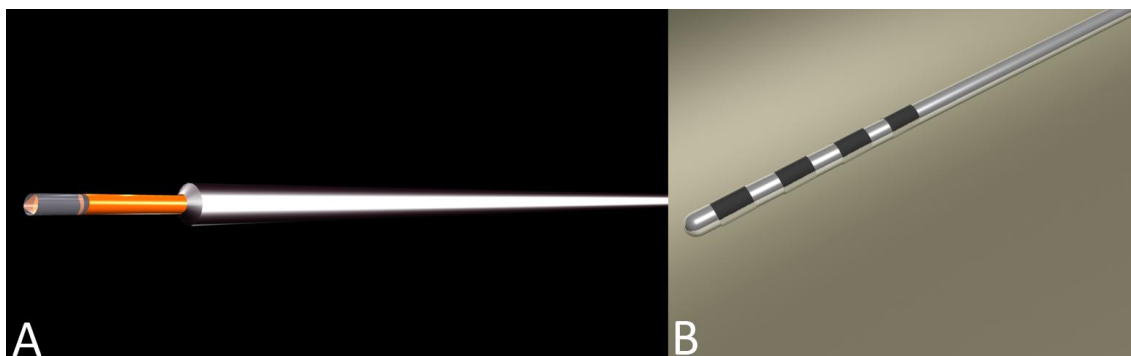


Abb. 12: Rekonstruktion und Wiedergabe der verwendeten Tiefenhirnstimulationselektroden und der Mikro dialysesonde in natürlicher Größe. (A) Mikro dialysesonde; (B) Tiefenhirnstimulationselektrode (quadripolar DBS elektrode model 3387; Medtronic, Inc., Minneapolis, MN).

Die Planung optimierter Zugänge zur stereotaktischen Läsion der amygdalären Ncll. lateralis, anteromedialis und centralis von aggressiven Patienten ist abgeschlossen (Abb. 13).

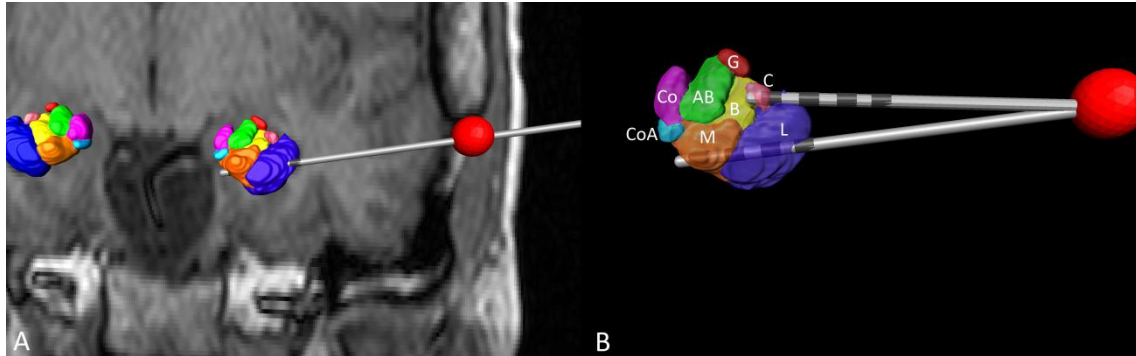


Abb.13: 3D Rekonstruktion des menschlichen Mandelkernkomplexes und Beispiele für optimale chirurgische Zugänge für die Zielkerne. (L) *Subnucleus lateralis*; (M) *Subnucleus medialis*; (C) *Subnucleus centralis*; (B) *Subnucleus basalis*; (AB) *Subnucleus basalis accessorius*; (Co) *Subnucleus corticalis*; (CoA) *Subnucleus corticalis accessorius*; (G) *Subnucleus granularis*. Die rote Kugel soll den Ort der Trepanation anzeigen.

Eine vollständige Darstellung einer tiefen Hirnstimulation des Ncl. subthalamicus bei einer Patientin mit Morbus Parkinson der Medizinischen Fakultät Sao Paulo kann in der elektronischen Version dieses Manuskripts betrachtet werden (siehe Video 4).

Die hohe Konzentration von Eisen in der subthalamischen Region ermöglicht eine mehr oder minder genaue Visualisierung des stark eisenhaltigen Ncl. subthalamicus in kernspintomographischen T2 Serien (Drayer et al., 1986). Es ist aber auch bekannt, dass Eisen in der subthalamischen Region nicht gleichmäßig verteilt ist. Eine sichere präoperative Planung für Eingriffe in der Region kann sich daher nicht ausschließlich auf kernspintomographische Bilder verlassen, sondern beruht auch und vor allem auf einer elektrophysiologischen Kontrolle während des chirurgischen Eingriffs (Reese et al., 2012).

Wir konnten diese Diskrepanz zwischen den hypodensen T2-Signalen und den zytoarchitektonischen Grenzen des Ncl. subthalamicus mit unserer Methode eindeutig demonstrieren (Abb.14).

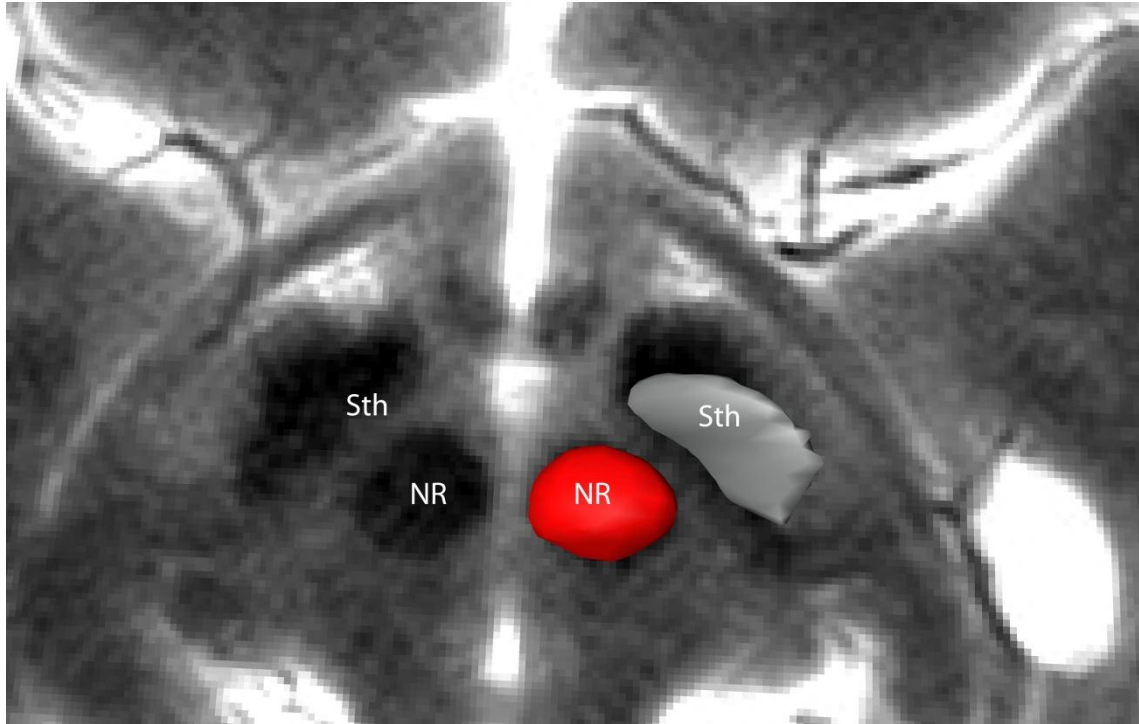


Abb.14: Diskrepanz zwischen dem hypodensen T2-Signal (schwarze Bezirke) und den zytoarchitektonischen Grenzen des Ncl. subthalamicus (graue Oberfläche).
(NR) *Ncl. ruber*; (Sth) *Ncl. subthalamicus*.

Veränderungen im basalen Kernkomplex des Vorderhirns spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit (Teipel et al., 2005). Die einzelnen Komponenten des Komplexes sind sehr klein und sie lassen sich selbst mit den am besten auflösenden Kernspintomographien nicht eindeutig darstellen. In einer Kooperation mit Professor Stefan Teipel von der Universität Rostock konnten wir die Kerne des basalen Vorderhirnkomplexes mit unserer Methode segmentieren (Abb. 15) und in den kernspintomographischen Raum projizieren. Auf diese Weise ist die Erstellung einer auf der Histologie basierenden kernspintomographischen Maske möglich, die voxelbasierte quantitative Auswertungen dieser Regionen erlaubt und für

eine Frühdiagnose der Alzheimerschen Krankheit und eventuelle therapeutische Stimulationen im Frühstadien eingesetzt werden kann.

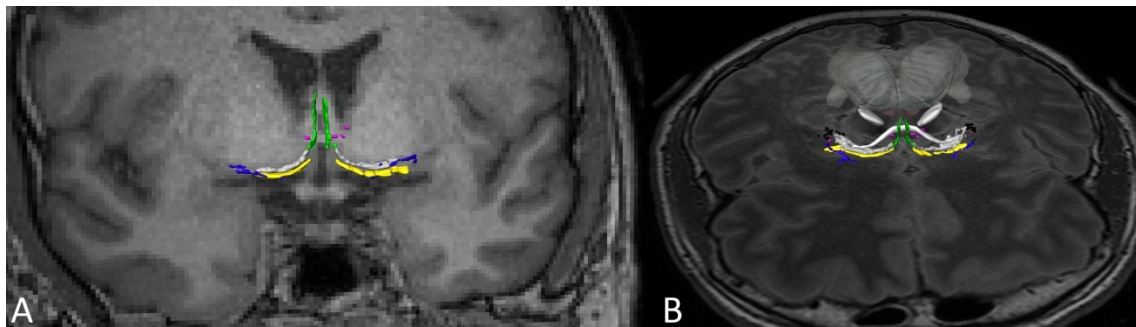


Abb. 15: Der basale Vorderhirnkomplex in 3D Darstellung. (A) *Frontale kernspintomographische Ansicht* (B) *horizontale kernspintomographische Ansicht.*

Neben konventionellen kernspintomographischen Methoden werden vermehrt diffusionsgewichtete Magnetresonanztomografien (DTI, diffusiontensorimaging) und intrakranielle Ultraschalluntersuchungen zur Darstellung zerebraler Strukturen eingesetzt. Die vorliegende Methode eignet sich auch, zytoarchitektonisch definierte Kerngebiete mit DTI- und Ultraschallbildern zu fusionieren (vgl. Abbildungen 16, 17 und 18).

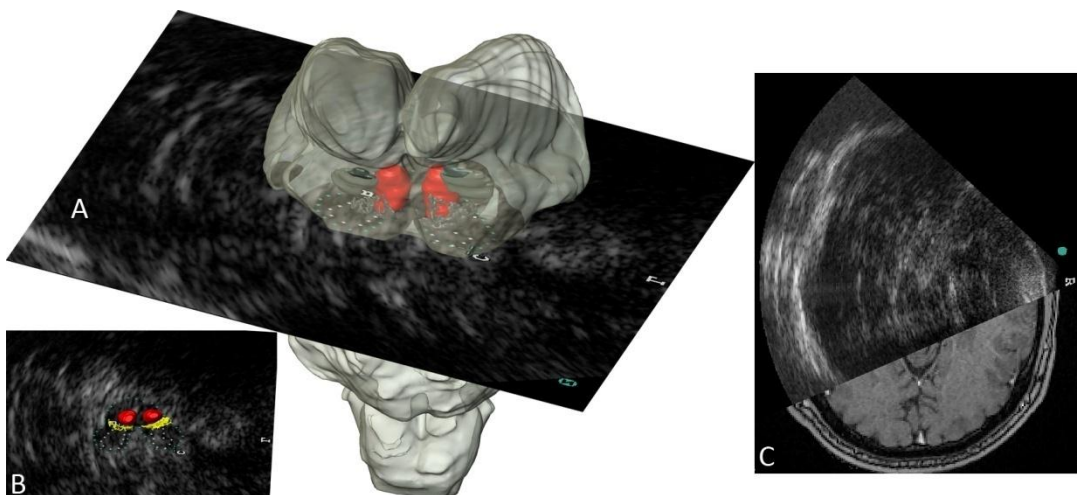


Abb. 16: Intrakranielle Ultraschalluntersuchung im Vergleich zu Kernspintomographie und Histologie. (A) und (B) *3D Repräsentation des Hirnstammes und der Ultraschallwellen.* (C) *Fusion der US- und MRT-Bilder.*

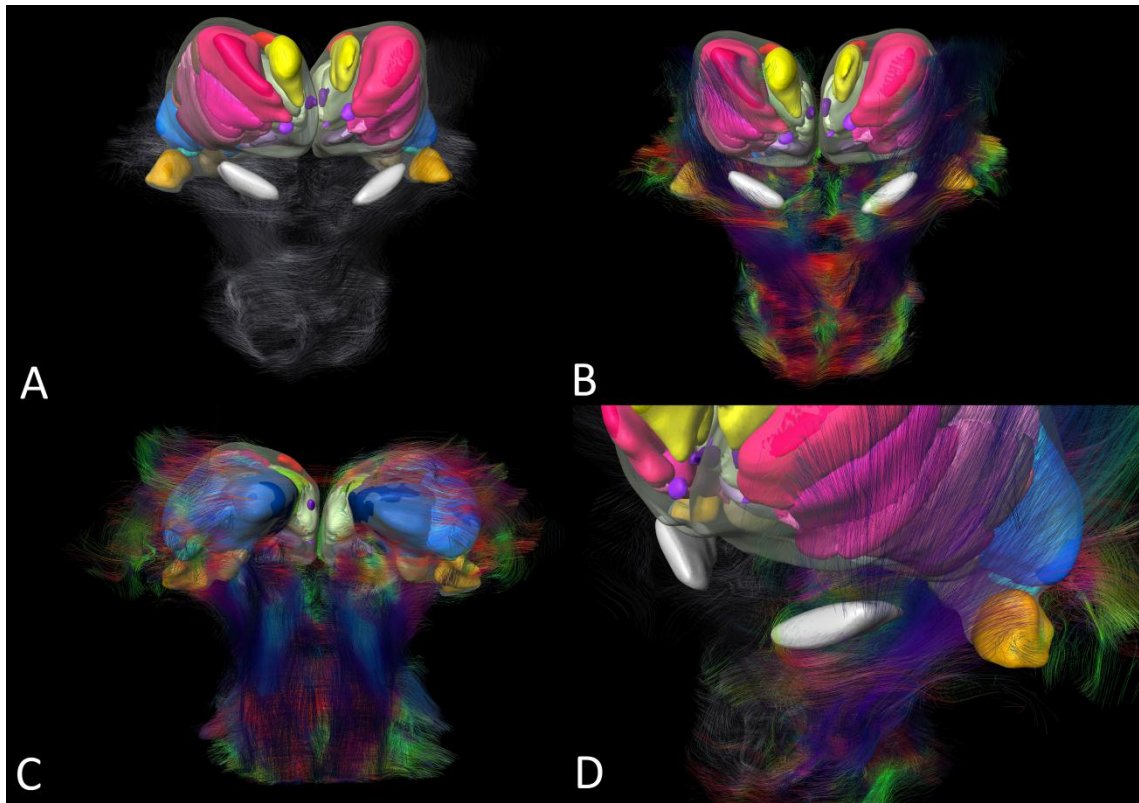


Abb. 17: Fusion einer 3D Darstellung der zytoarchitektonischen Thalamusfelder und Traktographie. (A) und (B) anteriore Ansicht; (C) posteriore Ansicht; (D) detaillierte Ansicht der Faserbahnen in der Region des Ncl. subthalamicus.

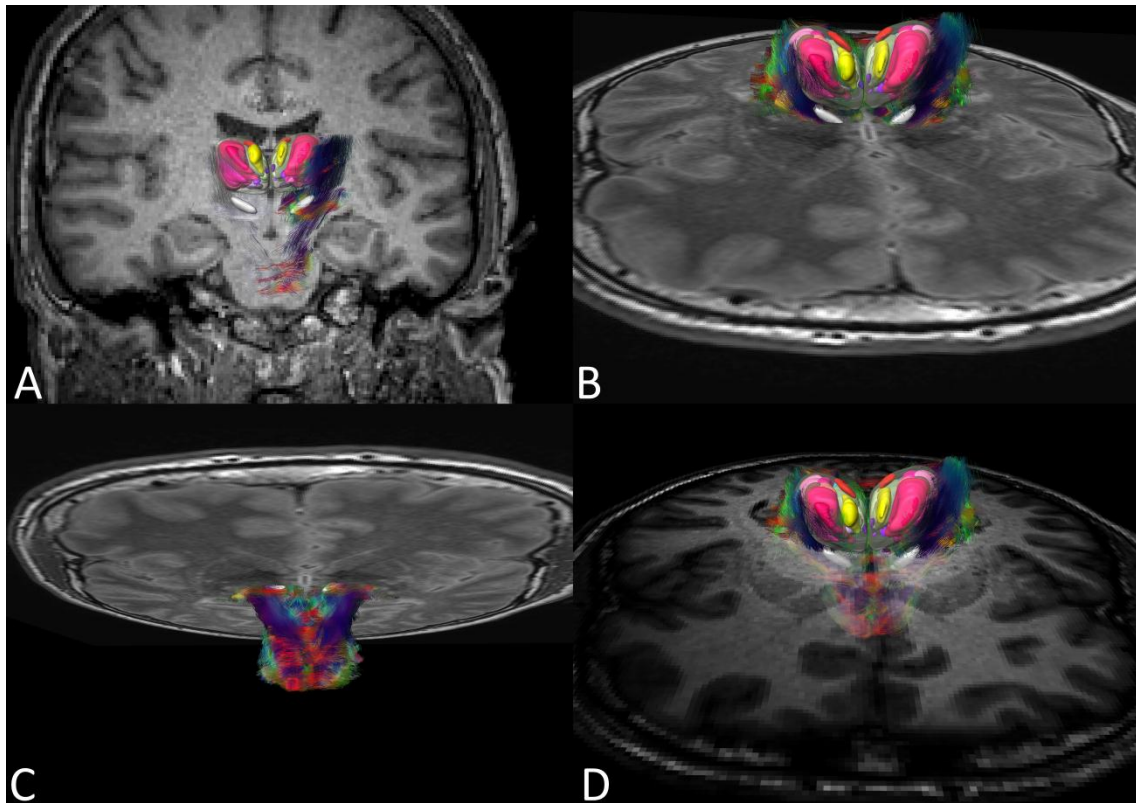


Abb. 18: Fusion der 3D Darstellung der zytoarchitektonischen thalamischen Felder, Traktographie und kernspintomographischen Aufnahmen. (A) Frontalansicht; (B) Horizontalansicht von superior; (C) Horizontalansicht von inferior; (D) Horizontalansicht von superior mit transparentem MRT-Bild.

DTI ermöglicht die Darstellung von Faserbahnen in der weißen Substanz des menschlichen Gehirns. Trotz weit verbreiteter Anwendung in Diagnostik, Therapie und Forschung steckt die Korrelation der Ergebnisse von DTI Untersuchungen am menschlichen Gehirn und ihrer Äquivalente mit myeloarchitektonischen Befunden noch in den Kinderschuhen (Hagmann et al., 2010). Lösungsansätze für das Gehirn von Ratten wurden von Budde und Frank (2012) kürzlich vorgeschlagen. Bei einigen unserer Fälle konnten wir im Dunkelfeld den Verlauf von Fasern beobachten (siehe Abb. 3B). Diese Beobachtungen könnten einen neuen methodischen Ansatz für Korrelationsstudien zur Frage der Validität von DTI-Befunden und ihrem Äquivalent in myeloarchitektonischen Betrachtungen bieten.

6. Zusammenfassung

Intrazerebrale stereotaktische Eingriffe werden zu einem großen Teil ohne direkte Sichtkontrolle durchgeführt. Ein Operateur muss sich deshalb bei der räumlichen Festlegung von Strukturen und beim Anfahren dieser Strukturen auf Hilfsmittel wie stereotaktische Geräte und auf Atlanten, über welche die stereotaktischen Geräte gesteuert werden, verlassen. Trotz großer Fortschritte bei den bildgebenden Verfahren während der letzten dreißig Jahre, ist es gegenwärtig noch nicht möglich, zuverlässig alle subkortikalen Strukturen mit computertomographischen (CT) oder magnetresonanztomographischen (MRT) zu identifizieren oder begrenzen. Eine ganze Reihe zytoarchitektonischer beziehungsweise immunhistochemischer Atlanten wurde veröffentlicht. Dennoch ist es nicht gelungen, die Ergebnisse und Abbildungen dieser Atlanten mit bildgebenden Verfahren bis in die gewünschten Details zu kombinieren, um auf diese Weise das immer noch geringe Auflösungsvermögen radiologischer Methoden zu erhöhen. Deformationen bei der Gewebsentnahme des Gehirns, bei der anschließenden Einbettung, bei der alkoholischen Dehydrierung des Gewebes, Verformungen beim Schneiden und Färben der Schnitte überfordern selbst hoch komplexe mathematische Verfahren und Algorithmen beim Versuch, zytoarchitektonische und immunhistochemische Schnitte mit der gewünschten Präzision den radiologischen Ergebnissen und Bildern und damit indirekt auch den Verhältnissen *in vivo* anzupassen. Als Alternative verwendeten wir ungewöhnlich dicke (350 – 440 µm) Gallozyanin- (Nissl) gefärbte Serienschritte durch die Gehirne (ZNS) von drei Personen im Alter von 56, 68 und 36 Jahren. Bei einem Fall wurde das ZNS *post mortem* mit einem Kernspintomographen vor der Entnahme gescannt. Die Serienschritte durch dieses Gehirn und das eines zweiten und dritten nicht-gescannten Falles wurden mit Gallozyanin gefärbt, die zytoarchitektonischen Grenzen des Thalamuskomplexes und seiner Unterkerne wurden nach Hassler (1982) identifiziert, jede ihrer Grenzen mit dem Cursor eines Graphiktablets umfahren und die Gestalt des Thalamuskomplexes und seiner Unterkerne mit Hilfe von Photoshop CS5® und eines computergestützten 3D-Rekonstruktionsprogramms (Amira®) dargestellt. Im Fall 3 ließen sich nach Dunkelfeldbeleuchten die Verteilung markhaltiger Fasern studieren

und die zytoarchitektonischen mit myeloarchitektonischen Befunden erweitern und ergänzen.

Zusätzlich konnten im Fall 1 die histologischen Serienschnitte und ihre 3D Rekonstruktion mit dem *post mortem in cranio* MRT registriert werden. Insgesamt kann dieser methodische Ansatz als eine robuste und relativ einfache wenn auch mit umfangreicherer manueller Tätigkeit verbundene Technik zur sehr detailreichen unverformten Korrelation zytoarchitektonischer und kernspinotomographischer Darstellung des Thalamuskomplexus und seiner Unterkerne angesehen werden. Sie könnte als Grundlage für die Herausgabe eines multimedialen 3D stereotaktischen Atlas des menschlichen Gehirns dienen.

7. Literaturverzeichnis

- Afshar, F., Watkins, E. S., Yap, J. C., 1978. *Stereotaxic atlas of the human brainstem and cerebellar nuclei*. Raven Press New York.
- Alho, E. J. L., Grinberg, L. T., Heinsen, H., Fonoff, E. T., 2011. *Review of Printed and Electronic Stereotactic Atlases of the Human Brain.*, in Neuroimaging for Clinicians-Combining Research and Practice, Ed.1st, Peres J.Intech
- Amunts, K., Kedo, O., Kindler, M., Pieperhoff, P., Mohlberg, H., Shah, N. J., Habel, U., Schneider, F., Zilles, K., 2005. *Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps*. Anat Embryol. 210,343-352.
- Amunts, K., Schleicher, A., Zilles, K., 2007. *Cytoarchitecture of the cerebral cortex—More than localization*. NeuroImage 37,1061-1065.
- Andrade-Souza, Y. M., Schwalb, J. M., Hamani, C., Hoque, T., Saint-Cyr, J., Lozano, A. M., 2005. *Comparison of 2-dimensional magnetic resonance imaging and 3-planar reconstruction methods for targeting the subthalamic nucleus in Parkinson disease*. Surg Neurol. 63,363-
- Andrew, J. and Watkins, E. S., 1969. *A stereotaxic atlas of the human thalamus and adjacent structures*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Arad, N. and Reisfeld, D., 1994. *Image Warping Using few Anchor Points and Radial Functions*.The Eurographics Association.
- Arad, N., Dyn, N., Reisfeld, D.,Yeshurun, Y., 1994. *Image Warping by Radial Basis Functions: Application to Facial Expressions*. Graphical Models and Image Processing 56,161-172.
- Arad, N., 1995. *Image Warp Design Based on Variational Principles*. Tel-Aviv University.
- Bajcsy, R. ,Kovacic, S., 1989. *Multiresolution elastic matching*, Computer Vision. Graphics and Image Processing 46,1-21.

Ballester, M. A. G., Zisserman, A. P., Brady, M., 2002. *Estimation of the partial volume effect in MRI*. Medical Image Analysis 6,389-405.

Bauchot, R., 2011. *Les modifications du poencephalique au cours de la fixation*. J.Hirnforsch. 253-283.

Bookstein, F. L., 1989. *Principal warps: Thin-plate splines and the decomposition of deformations*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 11,569-585.

Bourgeois, G., Magnin, M., Morel, A., Sartoretti, S., Huisman, T., Tuncdogan, E., Meier, D., Jeanmonod, D., 1999. *Accuracy of MRI-guided stereotactic thalamic functional neurosurgery*. Neuroradiology 41,636-645.

Bro-Nielsen, M. and Gramkow, C., 1996. *Fast fluid registration of medical images*. Hamburg, Germany, Springer Lecture Notes in Computer Science. In Proceedings Visualization in Biomedical Computing (VBC'96) 1131, 267-276.

Budde, M. D., Frank, J.A., 2012. *Examining brain microstructure using structure tensor analysis of histological sections*. NeuroImage 63:1-10.

Buhmann, M. D., 2000. *Radial Basis functions*. Acta Numerica.1-38.

Carballo-Barreda, M., Rodríguez-Rojas, R., Torres-Montoya, A., and López-Flores, G., 2007. *Atlas computarizado para la planificación de neurocirugías estereotáticas funcionales guiadas por imágenes*. Neurocirugía 18, 478-484.

Casanova, M. F., Kreczmanski, P. , Trippe, J., Switala, A., Heinsen, H., Steinbusch, HW., Schmitz, C., 2008. *Neuronal distribution in the neocortex of schizophrenic patients*. Psychiatry Res. 158,267-277.

Chakravarty, M. M., Bertrand, G. , Hodge, C. P., Sadikot, A. F. ,Collins, D. L., 2006. *The creation of a brain atlas for image guided neurosurgery using serial histological data*. NeuroImage 30,359-376.

Coffey, R. J., 2009. *Printed Stereotactic Atlases, Review*.in Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery Lozano, A.M., Gildenberg, P.L. and Tasker, R.R. Springer Berlin/Heidelberg.

Dandy, W. E., 1918. *Ventriculography following the injection of air into the cerebral ventricles*. Ann Surg. 1,5-11.

Dauguet, J., Delzescaux, T., Condé, F., Mangina, J. F., Ayache, N., Hantraye, P.,Frouin, V., 2007.*Three-dimensional reconstruction of stained histological slices and 3D non-linear registration with in-vivo MRI for whole baboon brain*. Journal of Neuroscience Methods 164,191-204.

Deoni, S. C. L., Rutt, B. K., Parrent, A. G.,Peters, T. M., 2007. *Segmentation of thalamic nuclei using a modified k-means clustering algorithm and high-resolution quantitative magnetic resonance imaging at 1.5T*. NeuroImage 34,117-126.

Dewulf, A., 1971. *Anatomy of the normal human thalamus. Topometry and standardized nomenclature*.Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

Drayer, B., Burger, P., Darwin, R., Riederer, S., Herfkens, R., Johnson, G.A., 1986. *MRI of brain iron*. AJR Am J Roentgenol 147,103-10.

El-Tahawy, H., Lozano, A. M., Dostrovsky, J., 2004. *Electrophysiological findings in Vim and Vc*.in Microelectrode Recordings in Movement Disorder Surgery, Ed:Israel, Z. and Burchiel, K. J. Thieme New York.

Elias, W. J., Zheng, Z. A., Domer, P., Quigg, M.,Pouratian, N., 2011.*Validation of connectivity-based thalamic segmentation with direct electrophysiologic recordings from human sensory thalamus*. NeuroImage im Druck.

Emmers, R. and Tasker, R. R., 1975.*The human somesthetic thalamus, with maps for physiological target localization during stereotactic neurosurgery*. Raven Press, New York.

Ewers, M., Frisoni, G. B., Teipel, S. J., Grinberg, L. T., Amaro, E. Jr., Heinsen, H., Thompson, P. M.,Hampel, H., 2011. *Staging Alzheimer's disease progression with multimodality neuroimaging*. ProgNeurobiol. 95, 535-546.

Fatterpekar, G. M., Naidich, T. P., Delman, B. N., Aguinaldo, J. G., Gultekin, S. H., Sherwood, C., Hof, P. R., Drayer, B. P., 2002. *Cytoarchitecture of the Human Cerebral Cortex: MR Microscopy of Excised Specimens at 9.4 Tesla*. Am J Neuroradiol. 23,1313-1321 .

Fischer, B. , Modersitzki, J., 2008. *Ill-posed medicine—an introduction to image registration*. Inverse Problems 24,1-16.

Fonoff, E. T., Campos, W. K., Mandel, M., Alho, E. J. L. and Teixeira, M. J., 2012. Bilateral subthalamic nucleus stimulation for generalized dystonia after bilateral pallidotomy. Mov. Disord., 27: 1559–1563.

Ganser, K. A., Dickhaus, H., Metzner, R., Wirtz, C. R., 2004. *A deformable digital brain atlas system according to Talairach and Tournoux*. Med Image Anal. 8,3-22.

Grinberg, L. T., Ferretti, R. E. L., Farfel, J. M., Leite, R., Pasqualucci, C. A., Rosemberg, S., Saldiva, P. H. N., Nitrini, R., Jacob Filho, W., 2006. *Brain bank of the Brazilian aging brain study group—a milestone reached and more than 1,600 collected brains*. Cell Tissue Banking.

Grinberg, L. T. ,Heinsen, H., 2007. *Computer-assisted 3D reconstruction of the human basal forebrain complex*. Dementia & Neuropsychology 2,140-146.

Grinberg, L. T., Amaro Jr., E., Teipel, S., dos Santos, D. D., Pasqualucci, C. A., Leite, R. E. P., Camargo, C. R., Goncalves, J. A., Sanches, A. G., Santana, M., Ferretti, R. E. L., Jacob-Filho, W., Nitrini, R., Heinsen, H., 2008. *Assessment of factors that confound MRI and neuropathological correlation of human postmortem brain tissue*. Cell Tissue Banking 9,195-203.

Grinberg, L. T., Amaro Jr., E., Santos, D. D., Pacheco, S., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., Pasqualucci, C. A., Teipel, S., Flatz, W., Heinsen, H., 2009. *Improved detection of incipient vascular changes by a biotechnical platform combining post-mortem MRI in situ with neuropathology*. JNeurol Sci. 283,2-8.

Hagmann, P., Cammoun, L., Gigandet, X., Gerhard, S., Grant, P.E., Wedeen, V., Meuli, R., Thiran, J.P., Honey, C.J., Sporns, O., 2010. *MR connectomics: principles and challenges*. J. Neurosci. Methods 194, 34–45.

Hassler, R., 1982. *Architectonic Organization of the Thalamic Nuclei*. In Stereotaxy of the Human Brain : Anatomical, Physiological and Clinical Applications, Ed.2nd, Schaltenbrand G and Walker E. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Heckers, S., Heinsen, H., Heinsen, Y., Beckmann, H., 1991. *Cortex, white matter, and basal ganglia in schizophrenia: a volumetric postmortem study*. Biol Psychiatry 29,556.

Heimburger, R. F., Kalsbeck, J. E., Campbell, R. L., Mealey, J. Jr., 1966. *Positive contrast cerebral ventriculography using water-soluble media*. J Neurol. Neurosurg. Psychiat. 29,281-290.

Heinsen, H., Heinsen, Y. L., 1991. *Serial Thick, Frozen, Gallocyanin Stained Sections of Human Central Nervous System*. The Journal of Histotechnology. 14,167-173.

Heinsen, H., Henn, R., Eisenmenger, W., Götz, M., Bohl, J., Bethke, B., Lockemann, U., Püschel, K., 1994. *Quantitative investigations on the human entorhinal area: left - right asymmetry and age-related changes*. Anat Embryol. 190,181-194.

Heinsen, H., Strik, M., Bauer, M., Luther, K., Ulmar, G., Gangnus, D., Jungkunz, G., Eisenmenger, W., Götz, M., 1994. *Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease*. Acta Neuropathol. 88,320-333.

Heinsen, H., Rüb, U., Gangnus, D., Jungkunz, G., Bauer, M., Ulmar, G., Bethke, B., Schüler, M., Böcker, F., Eisenmenger, W., Götz, M., Strik, M., 1996. *Nerve cell loss in the thalamic centromedian-parafascicular complex in patients with Huntington's disease*. Acta Neuropathol. 91,161-168.

Heinsen, H., Arzberger, T., Schmitz, C., 2000. *Celloidin mounting (embedding without infiltration) - a new, simple and reliable method for producing serial sections of high thickness through complete human brains and its application to stereological and immunohistochemical investigations*. Journal of Chemical Neuroanatomy 20, 49-59.

Heinsen, H., Hampel, H., Teipel, S., 2006. *Response to Boban et al: computer-assisted 3D reconstruction of the nucleus basalis complex, including the nucleus subputaminalis (Ayala's nucleus)*. Brain 129, E43-.

Horsley, V., Clarke, R. H., 1908. *The structure and function of the cerebellum examined by a new method*. Brain 31, 54-124.

Kraus, C., 1962. *Veränderungen der Paraffinschnitte durch das Mikrotomieren und das nachfolgende Aufziehen*. J Hirnforsch. 5, 23-28.

Krauth, A., Blanc, R., Poveda, A., Jeanmonod, D., Morel, A., Székely, G., 2010. *A mean three-dimensional atlas of the human thalamus: Generation from multiple histological data*. NeuroImage 49, 2053-2062.

Kretschmann, H. J., Tafesse, U., Herrmann, A., 1982. *Different volume changes of cerebral cortex and white matter during histological preparation*. Microscopica acta. 86, 13-24.

Lemaire, J. J., Sakka, L., Ouchchane, L., Caire, F., Gabrillargues, J., Bonny, J. M., 2010. *Anatomy of the human thalamus based on spontaneous contrast and microscopic voxels in high field magnetic resonance imaging*. Neurosurgery 66, 161-172.

Mai, J. K., Assheuer, J., Paxinos, G., 1997. *Atlas of the human brain*. Academic Press, San Diego.

Martinez, R.R.C., Carvalho, M.C., Brandao, M.L., Teixeira, M.J., Navarro, J., Fonoff, E.T.; 2012. *Human microdialysis during acute high frequency stimulation of internus globus pallidus increases dopamine release and improves parkinsonian symptoms* [abstract]. Mov. Disord. 27 Suppl 1 :130

Mazziotta, J. C., Toga, A. W., Evans, A. C., Fox, P., Lancaster, J., 1995. *A Probabilistic Atlas of the Human Brain: Theory and Rationale for its Development*. NeuroImage 2, 89-101.

Mazziotta, J. C., Toga, A. W., Evans, A. C., Fox, P., Lancaster, J., Zilles, K., Woods, R., Paus, T., Simpson, G., Pike, B., Holmes, C., Collins, D. L., Thompson, P. M., MacDonald, D., Iacobini, M., Schomann, T., Amunts, K., Pallomero-Gallagher, N.,

Geyger, S., Parsons, L., Narr, K., Kabani, N., Le Goualher, G., Boomsma, D., Cannon, T., Kawashima, R., Mazoyer, B., 2001. *A probabilistic atlas and reference system for the human brain: International Consortium for Brain Mapping (ICBM)*. Philos Trans R Soc Lond Ser B-Biol Sci. 356,1322-.

Morel, A., Magnin, M., Jeanmonod, D., 1997. *Multiarchitectonic and stereotactic atlas of the human thalamus*. J Comp Neuro. 387,588-630.

Morel, A., 2007. *Stereotactic atlas of the human thalamus and basal ganglia*. Informa Health care New York.

Moshfeghi, M., 1991. *Elastic Matching of Multimodality Medical Images*. Graphical Models and Image Processing. 53,271-282.

Niemann, K., Naujokat, C., Pohl, G., Wollner, C., Keyserlingk, D. v., 1994. *Verification of the Schaltenbrand and Wahren Stereotactic Atlas*. Acta Neurochir. 129,72- 81.

Nowinski, W. L., Fang, A., Nguyen, B. T., 1997. *Multiple brain atlas database and atlas-based neuroimaging system*. Comput Aided Surg. 12,42-66.

Nowinski, W. L., Belov, D., 2003. *The Cerefy Neuroradiology Atlas: a Talairach–Tournoux atlas-based tool for analysis of neuroimages available over the Internet*. NeuroImage 20,50-57.

Nowinski, W. L., Belov, D., Thirunavuukarasuu, A., Benabid, A. L., 2006. *A probabilistic functional atlas of the VIM nucleus constructed from pre-, intra- and post-operative electrophysiological and neuroimaging data acquired during the surgical treatment of Parkinson's disease patients*. Stereotact Funct Neurosurg. 83,190-196.

Nowinski, W. L., 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.

Ono, M., Abernathey, C. D, Kubik, S., 1990. *Atlas of the cerebral sulci*. Georg Thieme Verlag/Thieme Medical Publishers Stuttgart.

Osechinskiy, S. ,Kruggel, F., 2011. *Slice-to-Volume Nonrigid Registration of Histological Sections to MR Images of the Human Brain*. Anatomy Research International.1-17.

Ourselin, S., Bardinet, E., Dormont, D., Malandain, G., Roche, A., Ayache, N., Tandé, D., Parain, K., Yelnik, J.,2001. *Fusion of Histological Sections and MR Images:Towards the Construction of an Atlas of the Human Basal Ganglia*. W. Niessenand M.Viergever. Heidelberg , Springer-Verlag Berlin. MICCAI. LNCS 2208, 743-751.

Pfefferbaum, A., Sullivan, E. V. , Adalsteinsson, E., Garrick, T.,Harper, C., 2004. *Postmortem MR imaging of formalin-fixed human brain*.NeuroImage 21,1585-1595.

Quester, R. ,Schröder, R.,1997.*The shrinkage of the human brain stem during formalin fixation and embedding in paraffin*. J Neurosci Methods.75,81-89.

Radovici, A. , Meller, O.,1932. *Essai de liquidographiecéphalo-rachidienne. Encéphalo-myélographie par Le thorotrast sous-arachnoidien*. Bull Acad Méd.107,314-317.

Reese, R., Pinsker, M. O., Herzog, J., Wodarg, F., Steigerwald, F., Pötter-Nerger, M., Falk, D., Deuschl, G., Mehdorn, H. M., Volkmann, J. 2012. *The atypical subthalamic nucleus—an anatomical variant relevant for stereotactic targeting*. Mov. Disord., 27: 544–548.

Schaltenbrand, G. and Bailey, P. ,1959. *Introduction to Stereotaxis with an atlas of the human brain*.Thieme Stuttgart.

Schaltenbrand, G. and Wahren, W. ,1977. *Atlas for Stereotaxy of the Human Brain with an accompanying guide*. Thieme Stuttgart.

Schleicher, A., Zilles, K.,Wree, A.,1986. *A quantitative approach to cytoarchitectonics: software and hardware aspects of a system for the evaluation and analysis of structural inhomogeneities in nervous tissue*. J Neurosci Methods. 18,221-235.

Schleicher, A., Amunts, K., Geyger, S., Kowalski, T., Schormann, T., Pallomero-Gallagher, N., Zilles, K., 2000. *A stereological approach to human cortical*

architecture: identification and delineation of cortical areas. J Chem Neuroanat. 20,31-47.

Schulz, G., Crooijmans, H. J. A., Germann, M., Scheffler, K., Müller-Gerbl, M., Müller, B., 2011. *Three-dimensional strain fields in human brain resulting from formalin fixation.* J Neurosci Methods. 202,17-27.

Simmons, D. M., Swanson, L. W., 2009. *Comparing histological data from different brains: Sources of error and strategies for minimizing them.* Brain Research Reviews 60,349-367.

Small, C. S., Peterson, D. I., 1982. *The reliability of dimensions of formalin-fixed brains.* Neurology 32,413-415.

Sparing, R., Buelte, D., Meister, I. G., Paus, T., Fink, G. R., 2008. *Transcranial Magnetic Stimulation and the Challenge of Coil Placement: A Comparison of Conventional and Stereotaxic Neuronavigational Strategies.* Human Brain Mapping 29,86.

Spiegel, E. A., Wycis, H. T., Marks, M., Lee, A. J., 1947. *Stereotaxic apparatus for operations on the human brain.* Science 106,349-350.

Spiegel, E. A. and Wycis, H. T., 1952. *Stereoencephalotomy (thalamotomy and related procedures).* Grune and Stratton New York.

St-Jean, P., Sadikot, A. F., Collins, D. L., Clonda, D., Kasrai, R., Evans, A. C., Peters, T. M., 1998. *Automated atlas integration and interactive three-dimensional visualization tools for planning and guidance in functional neurosurgery.* IEEE Trans Med Imaging. 17,672-680.

Stancanella, J., Muacevic, A., Sebastiano, F., Modugno, N., Cerveri, P., Ferrigno, G., Uggeri, F., Romanelli, P., 2008. *3T MRI evaluation of the accuracy of atlas-based subthalamic nucleus identification.* Medical Physics 35,3069-3077.

Talairach, J., David, M., Tournoux, P., Kvasina, T., 1957. *Atlas D'Anatomie Stereotaxique : Réperage Radiologique Indirect des Noyaux Gris Centraux des Règions Mesencephalo-sous-optique et Hypothalamique de L'Homme.* Paris.

Talairach, J. and Tournoux, P., 1988. *Co-planar stereotaxic atlas of the human brain: Three-dimensional proportional system : An approach to cerebral imaging*. Thieme New York.

Teipel, S., Meindl, T., Grinberg, L. T., Grothe, M., Cantero, J. L., Reiser, M. F., Möller, H. J., Heinsen, H., Hampel, H., 2011. *The cholinergic system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an in vivo MRI and DTI study*. Hum Brain Mapp. 32, 1349-1362.

Teipel, S. J., Flatz, W. H., Heinsen, H., Bokde, A. L. W., Schoenberg, S. O., Stoeckel, S., Dietrich, O., Reiser, M. F., Moeller, H. J., Hampel, H., 2005. *Measurement of basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease using MRI*. Brain 128, 2626-2644.

Toga, A. W., Thompson, P. M., Mori, S., Amunts, K., Zilles, K., 2006. *Towards multimodal atlases of the human brain*. Nat Rev Neurosci. 7, 952-966.

Traynor, C. R., Barker, G. J., Crum, W. R., Williams, S. C. R., Richardson, M. P., 2011. *Segmentation of the thalamus in MRI based on T1 and T2*. NeuroImage 56, 939-950.

Uylings, H. B., Sanz Arigita E., de Vos, K., Smeets, W. J., Pool, C. W., Amunts, K., Rajkowska, G., Zilles, K., 2000. *The importance of a human 3D database and atlas for studies of prefrontal and thalamic functions*. Prog Brain Res. 126, 357-368.

Van Buren, J. M. and Borke, R. C., 1972. *Variations and connections of the human thalamus*. Springer Berlin.

Wolberg, G., 1992. *Digital Image Warping*. George Wolberg. IEEE Washington/Brussels/Tokyo.

Yelnik, J., 2002. *Functional Anatomy of the Basal Ganglia*. Mov Disord. 17, S15-S21.

Yelnik, J., Bardinet, E., Dormont, D., Malandain, G., Ourselin, S., Tandé, D., Karachi, C., Ayache, N., Cornu, P., Agida, Y., 2007. *A three-dimensional, histological and deformable atlas of the human basal ganglia. I. Atlas construction based on immunohistochemical and MRI data*. NeuroImage 34, 618-638.

Yelnik, J., Bardin, E., Dormont, D., 2009. *Electronic Stereotactic Atlases*. In: Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery. Ed: Lozano, A.M., Gildenberg, P.L., Tasker, R.R. Springer Berlin/Heidelberg.

Yoshida, M., 1987. *Creation of a three-dimensional atlas by interpolation from Schaltenbrand-Bailey's atlas*. Appl Neurophysiol. 50, 45-48.

Zaborszky, L., Hoemke, L., Mohlberg, H., Schleicher, A., Amunts, K., Zilles, K., 2008. *Stereotaxic probabilistic maps of the magnocellular cell groups in human basal forebrain*. NeuroImage 42, 1127-1141.

Zilles, K., Schleicher, A., Pallomero-Gallagher, N., Amunts, K., 2002. *Quantitative analysis of cyto- and receptor architecture of the human brain*. In: Brain Mapping: The Methods. Ed: Mazziotta, J. C. and Toga, A. W. Elsevier Amsterdam.

Zitová, B., Flusser, J., 2003. *Image Registration methods: a survey*. Image and Vision Computing. 21, 977-1000.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Warping Technik: (A) Grobausrichtung der Gallozyanin-gefärbten Schnitte zum ungefärbten Block. (B) Verformbares Gitter und Ankerpunkte auf die primäre Bildebene projiziert. (C) Nicht-lineare Korrektur der Verformungen. (D) Endgültige Ausrichtung. (E) Ausschnitt des durch die Gewebesverarbeitung lokal stark verformten gefärbten Schnitts vor Korrektur und (F) nach der nichtlinearen Korrektur.

Abb.2: 3D Warping der kernspintomographischen Bilder mit dem histologischen Block: (A) Anpassen der histologischen Schnitte in der frontalen Schnittebene an die frontalen kernspintomographischen Bilder. (B) Sagittales Matching. (C) Horizontales Matching. Der graue Kasten in der rechten unteren Ecke ermöglicht die manuelle Steuerung der linearen geometrischen Transformation.

Abb.3: Zytoarchitektur des Thalamus: Die frontalen Schnitte der Abbildungen (A) und (B) entsprechen der Tafel 28 (Abschnitt LXVIII Fp 9,0) des 'Schaltenbrand & Wahren Atlas' (1977). Diese Frontalebene ist weiter kaudal als die in (C). (A) Hellfeldbeleuchtung eines Gallozyanin-gefärbten 400 µm dicken Schnitts durch den rechten Thalamus von Fall 3. (a) Ausschnittsvergrößerung mit großen und kleinen Zellen des Ncl. medialis fasciculosus entsprechend der Beschreibung von Hassler (1982). (B) Im selben Abschnitt Dunkelfeldbeleuchtung. Mehrere runde Körper sind innerhalb der Capsula interna zu unterscheiden. Sie sind am ehesten Galaktolipide, die nach unvollständiger Formalinfixierung als Niederschlag nach Kontakt mit Alkohol auftreten. (C) Konturen der Thalamuskern nach mikroskopischer zytoarchitektonischer Analyse erhalten. Balken in Abb. (A) entspricht 1 mm. Balken in Abb. (a) entspricht 25 µm.

Abb.4: Stereotaktisches Referenzsystem: Der Nullpunkt (0,0,0) ist der äquidistante Punkt zwischen AC und PC auf der Mittellinie. Die x-Achse (rot) repräsentiert die latero-laterale oder Sagittalebene, y (grün) die antero-posteriore oder Frontalebene und z (blau) die supero-inferiore oder horizontale Ebene.

Abb.5 :Verteilung der Zentroide aus einer rechten fronto-lateralen Perspektive gesehen.

Abb.6: Verteilung der Zentroide aus einer superioren Perspektive.

Abb.7: 3D Rekonstruktion des Thalamus und seiner Unterkerne des Falles 1. Zur besseren Orientierung sind auf der rechten Bildhälfte die jeweiligen Achsen dargestellt: (A) Anteriore Gruppe, (B) Mediale Gruppe, (C) Ncl. centromedianus und Ncl. parafascicularis, (D) Laterale Gruppe, (E) Pulvinar; (F) Thalami im Referenzsystem eingefügt.

Abb.8: Registrierung der histologisch segmentierten Thalamuskern mit dem bei 3,0 Tesla aufgenommenen kernspintomographischen Bild des gleichen Gehirns.

Abb.9: Synopsis des 3D rekonstruierten Thalamuskomplexes und seiner Unterkerne nach den zytoarchitektonischen Kriterien von Hassler (1982). Fall 1 ist auf der linken Seite (A1, B1, C1 und D1) und Fall 2 auf der rechten Seite (A2, B2, C2 und D2) dargestellt. (A1) und (A2): Vorderansicht; (B1) und (B2): superioren Ansicht; (C1) und (C2): posteriore Ansicht; (D1) und (D2): inferiore Ansicht.

Abb.10: Bilaterale Hirnstimulation des Ncl. subthalamicus nach bilateraler Pallidotomie bei Dystonie (Fonoff et al., 2012).

Abb.11: Mikrodialyse nach Mikrostimulation des Globus pallidus internus. Auf (A) ist ein Überblick der Basalganglien und der anatomischen Lage der Mikrostimulationselektrode und Mikrodialysesonde dargestellt. Die rechte Abbildung (B) gibt eine detaillierte Ansicht wieder. Die rote Kugel an der Spitze der Mikrostimulationselektrode und die gelbe Kugel an der Spitze der Mikrodialysesonde verdeutlichen die räumliche Entfernung der Sonden zueinander und somit den Abstand zwischen Stimulation und Effekt.

Abb. 12: Rekonstruktion und Wiedergabe der verwendeten Tiefenhirnstimulationselektroden und der Mikrodialysesonde in natürlicher Größe. (A) Mikrodialysesonde; (B) Tiefenhirnstimulationselektrode (quadripolar DBS elektrode model 3387; Medtronic, Inc., Minneapolis, MN).

Abb.13: 3D Rekonstruktion des menschlichen Mandelkernkomplexes und Beispiele für optimale chirurgische Zugänge für die Zielkerne. (L) Subnucleus lateralis; (M) Subnucleus medialis; (C) Subnucleus centralis; (B) Subnucleus basalis;

(AB) Subnucleus basalis accessorius; (Co) Subnucleus corticalis; (CoA) Subnucleus corticalis accessorius; (G) Subnucleus granularis. Die rote Kugel soll den Ort der Trepanation anzeigen.

Abb.14: Diskrepanz zwischen dem hypodensen T2-Signal (schwarze Bezirke) und den zytoarchitektonischen Grenzen des Ncl. subthalamicus (graue Oberfläche). (Nr) Ncl. ruber; (Sth) Ncl. subthalamicus.

Abb. 15: Der basale Vorderhirnkomplex in 3D Darstellung. (A) Frontale kernspintomographische Ansicht (B) horizontale kernspintomographische Ansicht.

Abb. 16: Intrakranielle Ultraschalluntersuchung im Vergleich zu Kernspintomographie und Histologie. (A) und (B) 3D Repräsentation des Hirnstammes und der Ultraschallwellen. (C) Fusion der US- und MRT-Bilder.

Abb. 17: Fusion einer 3D Darstellung der zytoarchitektonischen Thalamusfelder und Traktographie. (A) und (B) anteriore Ansicht; (C) posteriore Ansicht; (D) detaillierte Ansicht der Faserbahnen in der Region des Ncl. subthalamicus.

Abb. 18: Fusion der 3D Darstellung der zytoarchitektonischen thalamischen Felder, Traktographie und kernspintomographischen Aufnahmen. (A) Frontalansicht; (B) Horizontalansicht von superior; (C) Horizontalansicht von inferior; (D) Horizontalansicht von superior mit transparentem den MRT-Bild.

9. Tabellen

N (Anzahl d. untersuchten Thalami)	Alter (Jahre)	Geschlecht	Todesursache	Vorherige neurologischen Erkrankungen	3.0T MRT	PMI*	Fixierung	Schnitt-ebene	Anzahl der Schnitte	Schnitt-dicke (µm)
Fall1 (n=2)	56	Mann	Herzinfarkt	keine	Ja, <i>in cranio</i> und <i>ex cranio</i> **	15h 30 min	Formalin 1:9, Immersion, 4 Monate	frontal	77	400
Fall 2 (n=2)	68	Mann	Herzinfarkt	keine	Nein	13h 27 min	Formalin 1:9, Immersion, 4 Monate	horizontal	70	400
Fall 3 (n=2)	36	Frau	stumpfes Trauma ***	keine	Nein	48h	Formalin 1:9, Immersion, 4 Monate	frontal	86	450

*PMI=*Post mortem* Intervall (Zeit zwischen Tod und Autopsie)

***Ex cranio* Gewebe wurde nach 120 Tagen Formalinfixierung gescannt

*** ohne Schädelhirntrauma oder andere Hirnverletzungen

Tabelle 1: Fälle und Vorgeschichte

Struktur	Rechts (Koordinaten in mm)			Links (Koordinaten in mm)		
	x	y	z	x	y	z
AC	0	13,25	0	0	13,25	0
PC	0	-13,25	0	0	-13,25	0
A.pr	4,13	2,70	7,68	-4,23	1,02	9,11
A.d	3,22	0,97	5,73	-4,02	-0,25	7,90
M.fa	5,88	-6,27	5,79	-6,42	-6,84	6,19
M.fi	2,51	-6,56	4,38	-3,41	-7,51	5,42
M.c	5,24	-10,41	7,19	-6,41	-12,04	8,66
Edy	1,30	-2,85	-1,23	-2,47	-2,31	-0,56
SHb	1,92	-12,42	-0,78	-1,92	-12,42	-0,78
Cu	3,76	-0,36	7,51	-3,70	-2,78	8,97
Ce	7,43	-9,11	0,26	-9,08	-9,01	1,46
Pf	4,56	-8,72	-1,03	-5,69	-8,22	0,14
Li	9,11	-11,37	-2,09	-9,16	-12,29	-0,75
Fa	3,29	2,11	0,74	-2,86	0,19	2,68
Pt	0,62	2,35	3,07	-1,48	-1,51	4,31
D.sf	5,15	-4,46	12,01	-5,15	-6,23	12,68
D.o.i	9,81	-2,69	8,79	-10,30	-3,35	11,20
D.o.e	13,25	-2,59	9,18	-13,50	-3,47	11,82
D.im.i	11,91	-7,93	10,02	-12,83	-7,96	10,86
D.im.e	14,59	-8,48	10,28	-15,73	-8,14	10,81
D.c	14,48	-13,10	9,88	-17,33	-12,87	9,42
Z.o.i	12,13	-8,07	5,27	-17,62	-8,23	5,04
Z.o.e	16,40	-8,31	6,78	-13,31	-7,78	5,00
Z.im.i	12,48	-9,33	5,09	-14,32	-10,00	5,39
Z.im.e	15,18	-9,69	5,86	-19,31	-9,94	5,45
Z.c.i	11,33	-11,39	4,28	-14,11	-11,47	5,18
Z.c.e	16,47	-11,42	4,95	-17,87	-11,50	5,06
V.o.a	11,41	-0,09	3,44	-13,31	-0,25	4,65
V.o.i	9,20	-1,08	3,27	-7,59	-0,76	4,14
V.o.p	12,22	-2,01	3,34	-15,02	-2,49	3,80
V.o.m	10,04	-0,46	-0,69	-9,40	-0,82	-1,29
V.im.i	10,87	-4,64	2,80	-11,76	-4,90	3,66
V.im.e	14,15	-5,54	2,74	-15,21	-5,62	3,60
V.c.i	12,12	-9,75	-0,66	-13,97	-9,67	1,31
V.c.e	15,54	-10,14	0,32	-16,04	-10,21	-0,59
L.po	9,73	2,03	7,37	-10,23	0,89	8,54
G.l	20,06	-12,36	-6,59	-23,08	-12,03	-4,73
G.m	12,15	-14,37	-4,90	-15,24	-14,69	-3,50
Pu.ig	16,31	-15,22	-3,78	-20,00	-16,25	-2,25
Pu.sb	13,10	-16,76	-2,96	-16,15	-16,42	-1,25
Pu.o	12,31	-15,12	6,98	-14,77	-15,14	7,67
Pu.l	16,63	-16,98	3,65	-19,16	-16,22	4,36
Pu.m	9,57	-17,18	2,81	-12,02	-16,81	3,70
Pu.sf	8,54	-17,72	7,69	-12,81	-18,63	8,89

Tabelle 2. **Stereotaktische Koordinaten der Zentroide thalamischer Subkerne.** x entspricht der latero-lateralen oder sagittalen Ebene; y entspricht der antero-posterioren oder Frontalebene und z entspricht der supero-inferioren oder horizontalen Ebene.

Territorium anteriorius	Territorium mediale	Subst. grisea centralis	Involucrum mediale	Territorium laterale	Pulvinar	Zona reticulata	Corpus geniculatum mediale	Corpus geniculatum laterale
A.pr (ncl. antero- principalis)	M.fi (Ncl. medialis fibrosus)	Edy (Ncl. endymalis)	Fa (Ncl. fasciculosus)	Dorsal nuclei (D.o.e, D.o.i, D.im.e, D.im.i, D.c, Dsf *)	Pu.sf (Pulvinar superficiale)	Rt.c (Ncl. reticulatus caudalis)	G.m	G.l
A.d (ncl. antero- dorsalis)	M.fa (Ncl. medialis fasciculosus)	SHb (Ncl. subhabenu laris)	La.im (lamina medullaris interna)	Intermediary nuclei (Z.o.e, Z.o.i, Z.im.e, Z.im.i. Z.c.e, Z.c.i *)	Pu.o.l (Pulvinar orolaterale)	Rt. po (Ncl. reticulatus polaris)		
	M.c (Ncl. .medialis caudalis)		Ce (Ncl. centralis thalami or nucleus centrum medianum- Monakow)	Ventral nuclei (V.o.a, V.o.i, V.o.p, V.o.i, V.o.m, V.im.i, V.im.e, V.c.i, V.c.e*)	Pu.m (Pulvinar mediale)	Rt.im (Ncl. reticulatus intermedius)		
			Pf (Ncl. parafascicularis)	Lateropolar nuclei (Lpo)	Pu.l (Pulvinar laterale)	Rt.pu (Ncl. reticulatus pulvinaris)		
			Cu (Ncl. cucullaris)		Pu.ig (Pulvinar intergeniculatu m)			
			Pt (Ncl. parataenialis)		Pu.sb (Pulvinar supra- brachiale)			
			Li (Ncl. Limitans)		Pu.o (pulvinar orale)			

*D=dorsalis, o=oralis, i=internus, e=externus, im=intermedius, Z=zentralis, V=ventralis, a=anterior, p=posterior,
sf=superficialis

Tabelle 3. Thalamische Kerngruppen: Einteilung, Untergliederung und Abkürzungen nach Hassler (1982).

<i>AICD</i>	Durchschnitt (mm)	Median (mm)	SD	p-Wert ($\alpha = 0.05$)
x1	1.80	1.50	1.27	$p > \alpha$ (0.80)
x2	1.72	1.46	1.14	
y1	0.72	0.34	1.11	$p < \alpha$ (0.0000006)
y2	3.00	2.75	1.56	
z1	1.04	0.88	0.66	$p < \alpha$ (0.0000000000000006)
z2	4.94	4.77	1.52	

Tabelle 4. Vergleichswerte für den *AICD* (Absoluter Inter-Koordinaten-Abstand) in den 3-Achsen von Fall 1 (x1, y1, z1) und Fall 2 (x2, y2, z2). Durchschnitte, Mediane, Standardabweichungen und p-Werte sind angezeigt.

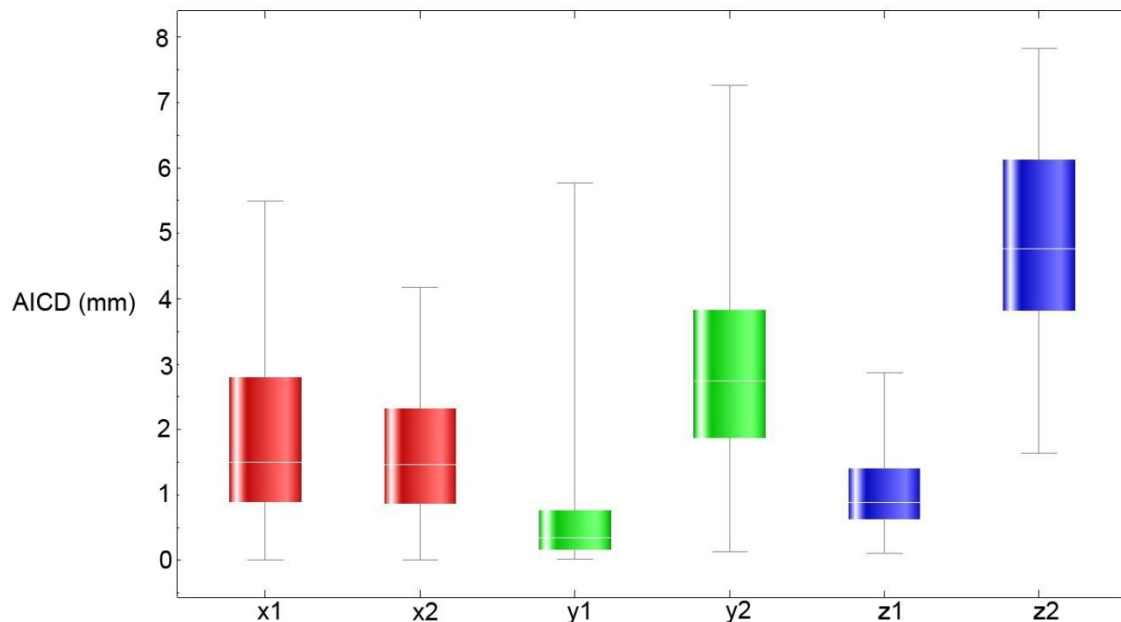


Tabelle 5. Graphische Darstellung der Symmetriemessungen : Der *AICD* (Absoluter inter-Koordinaten Abstand) von 34 gepaarten Thalamuskernen wurde unter Verwendung der Formel $\|C_r\| - \|C_l\| = AICD$ berechnet. Dieser Abstand wird in Millimeter angegeben. Die x-Koordinaten des Falles 1 (x1) und des Falles 2 (x2) sind in rot, während die y-Koordinaten von Fall 1 (y1) und Fall 2 (y2) in grün und die z-Koordinaten von Fall 1 (z1) und Fall 2 (z2) in blau dargestellt sind. Die Balkenenden markieren die minimalen und maximalen Werte der AICDs für jede Achse und die

weißen Linien in den Balken die Mediane. P-Wert für x_1/x_2 war > 0.05 , p-Wert für $y_1/y_2 < 0.001$ und für $z_1/z_2 < 0.001$.

10. Videos

Vier Videos können in der elektronischen Version dieses Manuskripts betrachtet werden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich besonders meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Helmut Heinsen, für die Überlassung des Themas, die jederzeit gute Betreuung, die stets freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit danken. Besonders danke ich Ihm auch für die Geduld während des langen Prozesses der Niederschrift meiner Ergebnisse.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch beim gesamten Team der Medizinischen Fakultät der Universität von Sao Paulo und der *Brain Bank of the Brazilian Aging Brain Research Group* (BBBABSG).

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Erich T. Fonoff für die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung und sein Vertrauen. Ich möchte mich auch bedanken bei Herrn Prof. Dr. Manoel J. Teixeira, Frau Dr. Lea T. Grinberg und Herrn Prof. Dr. Edson Amaro Jr. für die stets engagierte Unterstützung und Zusammenarbeit.

Dem gesamten Team der *Brains at Night* danke ich herzlich für die Hilfe bei den Aufnahmen der MRT-Datensätze und der Entnahme der Gewebe, insbesondere Herrn Rafael Emídio da Silva für die Tipps und Zusammenarbeit mit den DTI Daten.

Frau Dr. Ana Tereza d. L. Alho, meiner Schwester und wissenschaftlichen Partnerin, danke ich Dir nicht nur für die technische-, sondern auch für die persönliche Hilfe.

Des Weiteren möchte ich Frau E. Broschk und Frau A. Bahrke vom Labor für Morphologische Hirnforschung der Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychoanalyse der Universität Würzburg für die immer vorsichtige und präzise Verarbeitung der Gehirne danken. Dank auch an Frau Katharina Schüch für die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit.

Die Ausführung dieser Doktorarbeits war nur möglich durch ein Stipendium von CAPES-Brasilien. Auch dieser Institution gilt mein besondere Dank.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern, Schwestern, Nichten und meinen Freunden danken, die mir in dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Durch ihre liebevolle Unterstützung war es auch in schwierigen Zeiten möglich, den Blick nach vorn zu richten und sich neuen Herausforderungen zu stellen.

Lebenslauf

Name: Eduardo Joaquim Lopes Alho

Geburtsdatum: 01.09.1978

Geburtsort: São Paulo, Brasilien

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: Brasilianer/Portugiese

Email: eduardoalho@hotmail.com

Schulausbildung

1984-1995: Grund-, Mittel- und Oberschule an der Escola Americana e Colégio Mackenzie, Sao Paulo, Brasilien

Studium

1997-2002: Studium der Humanmedizin an der Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, Brasilien

2000-2002: Zweijährig praktische Ausbildungsabschnitt in Chirurgie, Innere Medizin, Gynäkologie /Geburtshilfe und Pädiatrie

Berufsweg

2003 : Hausarzt an der Programa de Saúde da Família (Gesundheitsprogramm der Familie) der Universidade Federal de Sao Paulo, in Mauá, Brasilien

2004-2009: Facharztausbildung in Neurochirurgie am Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Brasilien. Stipendium von FUNDAP

2007-2009: Assistenzarzt in der Notfallaufnahme der Pronto Socorro Central de São Bernardo do Campo, São Bernardo, Brasilien

2008-2009: Assistenzarzt am Instituto Neurológico de São Paulo, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Raul Marino Jr.

2010-2013: Stipendium von DAAD/CAPES für Forschung und Doktorarbeit im Labor für Morphologische Hirnforschung der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, leiter Prof. Dr. med. Helmut Heinsen

Publicações

1. Fonoff, E. T., Campos, W. K., Mandel, M., **Alho, E. J. L.** and Teixeira, M. J., 2012. *Bilateral subthalamic nucleus stimulation for generalized dystonia after bilateral pallidotomy*. *Mov. Disord.*, 27: 1559–1563.
2. **Alho, E.J.L.**, Grinberg, L.T., Heinsen, H., Fonoff. E.T., 2011. *Review of Printed and Electronic Stereotactic Atlases of the Human Brain*. In: *Neuroimaging for Clinicians - Combining Research and Practice*, Julio F. P. Peres (Ed.), ISBN: 978-953-307-450-4, InTech,
3. Fonoff, E.T., de Oliveira, Y.S.A., Lopez, W.O.C., **Alho, E.J.L.**, Lara, N.A., Teixeira, M.J., 2010. *Endoscopic-guided percutaneous radiofrequency cordotomy*. *J Neurosurg.* 113 (3): 524-527.
4. Pinto, N.C., Pinto, F.C.G., **Alho, E.J.L.**, Yoshimura, E.M., Krebs, V.L.J., Teixeira, M.J., Chavantes, M.C., 2010. *Pilot study in neonates using low-level laser therapy in the immediate postoperative period of myelomeningocele*. *Einstein*; 8:5-9.
5. Pinto, F.C.G., Chavantes, M.C., Pinto, N.C., **Alho, E.J.L.**, Yoshimura, E.M., Krebs, V.L.J., Teixeira, M.J., 2010. *Novel Treatment Immediately after Myelomeningocele Repair Applying Low-Level Laser Therapy in Newborns: A Pilot Study*. *Pediatr Neurosurg*; 46: 249-254.
6. Pinto, F.C.G., Matushita, H., Furlan, A.L.B., **Alho, E.J.L.**, Goldenberg, D.C., Bunduki, V., Krebs, V.L.J., Teixeira, M.J., 2009. *Surgical Treatment of Myelomeningocele Carried Out at 'Time Zero' Immediately after Birth*. *Pediatr Neurosurg.* 45:114–118.
7. **Alho, E.J.L.**, Paiva, W.S., Amorim, R.L.O., Figueiredo, E.G., Andrade, A.F., Teixeira, M.J., 2008. *Traumatic subarachnoid hemorrhage: clinical and radiological aspects and complications*. *J Bras Neurocirurg.* 19 (3):31-36.
8. Paiva, W.S., **Alho, E.J.L.**, Chavantes, M.C., Pinto, N.C., Amorim, R.L.O., Pinto, F.C.G., Teixeira, M.J., 2008. *Neuroendoscopic resection with ND: YAG laser treating colloid cyst in the third ventricle*. *Jornal Brasileiro de Laser* 1:24-27.
9. Paiva, W.S., Amorim, R.L.O., **Alho, E.J.L.**, Cardeal, D.D., Andrade, A.F., 2007. *Chronic subdural hematoma with sudden clinical uncal herniation and coma- Case Report*. *Rev Chil Neurocirurg.* 29:60-62
10. Paiva, W.S., Amorim, R.L.O., Tavares, W.M., **Alho, E.J.L.**, Jeng, B.P., Figueiredo, E.G., 2007. *Horner's syndrome after blunt cervical and chest trauma*. *Arq Neuropsiquiatr.* 65(4-A):1037-1039