

Aus dem Institut für Anatomie (Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Kühnel) der Medizinischen Universität zu Lübeck

## Die quantitative Zytoarchitektonik der Areale nach Brodmann des menschlichen Cortex cerebri<sup>1</sup>

O. Schmitt<sup>2</sup>, U. Almert, E. Mecke, R. Eggers<sup>3</sup>

### Zusammenfassung

Der menschliche Cortex cerebri ist aus unterschiedlich angeordneten Schichten von Nervenzellen, Stützzellen und einigen weiteren Zellarten aufgebaut. Diese Schichtungen oder Laminierungen weisen in verschiedenen Regionen der Hirnrinde deutliche und regelmäßig vorkommende Unterschiede auf. Aufgrund dieser unterschiedlichen Zytoarchitekturen läßt sich die menschliche Hirnrinde in Regionen gliedern, welche u. a. von Brodmann vor fast 90 Jahren in Form von Karten übersichtlich dargestellt wurden. Anhand dieser Karten können mit mikroskopischen Techniken die von ihm definierten Areale oder Regionen lokalisiert werden. Eine solche Lokalisation ist häufig notwendig, um funktionelle oder strukturelle Untersuchungen an der Hirnrinde durchzuführen. Auch die topologische Zuordnung differenzierter kortikaler Funktionen zur Hirnrinde setzt eine strukturierte Abbildung bzw. Karte der ihr zugrundeliegenden physikalischen Struktur voraus. Ferner finden sich in strukturell unterschiedlichen Bereichen der Hirnrinde häufig auch funktionelle Unterschiede. Um solche strukturellen Unterschiede systematisch über die gesamte Hirnrinde erfassen zu können, wurde eine Methodik erarbeitet, die es erlaubt, Großschnitte beider Hemisphären anzufertigen. Die Erkennung der von Brodmann kartierten Areale in diesen Großschnitten gestaltet sich jedoch komplex. Um die Diagnose von Arealen und die Festlegung von Arealgrenzen zu erleichtern, wurden in dieser Studie sämtliche Areale von zwei normalen menschlichen Gehirnen mit Hilfe einer speziell für diesen Zweck entwickelten Visualisierungs- und Quantifizierungsmethode ausgewertet.

Obwohl die kortikale Felderung nach Brodmann in den neurowissenschaftlichen Disziplinen am häufigsten

zur Lokalisation von Gehirnregionen benutzt wird, liegen nur von einzelnen Arealen vergleichbare quantitative Daten vor. Mit den hier erstmals vorgelegten Befunden möchten wir diese Lücke schließen. Sämtliche Areale, die Brodmann im menschlichen Cortex cerebri definiert hat, wurden präpariert, histologisch aufgearbeitet und mit Gallocyanin-Chromalaun gefärbt. Zur Darstellung kommt hierbei die Zytoarchitektonik. Von einem Auswerter interaktiv ausgewählte Bereiche der Schnitte wurden mit Hilfe eines Bildanalyse-systems bei 660facher Vergrößerung digitalisiert und anschließend quantitativ untersucht. Die hier benutzte Quantifizierung besteht in einer Berechnung der optischen Dichten mittels Grauwertintegration. Die berechneten optischen Dichten werden in Grauwert-Level-Index (GLI)-Bildern dargestellt. Diese bilden die Grundlage für die Erstellung von Profilkurven, in denen die orthogonal zur pialen Oberfläche abgetasteten GLI-Werte eingetragen werden. Die Profilkurven wurden nachverarbeitet und für übergeordnete Zytoarchitektoniken (allokortikal, mesokortikal, isokortikal granulär, isokortikal agranulär) zusammengefaßt, um den lamina-ren Aufbau zu verdeutlichen. Nach Filterung der Profilpeaks und Glättung zeigte sich eine hohe laminäre Konkordanz der beiden untersuchten Gehirne. Dieses Ergebnis, was selbstverständlich im Rahmen der zugrundeliegenden biologischen Variabilität betrachtet werden muß, weist auf die Möglichkeit hin, GLI-Karten als Diagnose- und Navigationshilfen bei der Auswertung wesentlich komplexerer Großschnitte einzusetzen.

### Summary

The human cortex cerebri is a layered tissue consisting of neurons, supporting cells and few other types of cells. The laminations show clearly visible structural differences in different cortical regions. 90 years ago Brodmann elaborated cortical maps that contain regions of different cytoarchitectonics. With the aid of these maps it is possible to localise the different regions by using microscopical techniques. Those localizations

<sup>1</sup> Diese Arbeit wurde in dankenswerter Weise maßgeblich durch die Possehl Stiftung unterstützt.

<sup>2</sup> schmitt@anat.mu-luebeck.de

<sup>3</sup> eggers@anat.mu-luebeck.de

are necessary in order to perform functional or structural investigations. Furthermore, a prerequisite for the assignment of different cortical functions to certain areas of the cerebral cortex is a physical mapping of the brain. Frequently structural differences are accompanied by functional differences. In order to find new structural differences and perhaps new functional entities sections of both hemispheres are produced. On such sections the cytoarchitectonics can be digitized systematically. However, the complex nature of such sections makes it difficult to localize the areas of Brodmann. In order to facilitate the recognition of these areas the present preceding study of all cortical areas of two human brains was performed. A special visualization and quantification technique was developed and the results of this method will be presented here.

Although the cortical fields of Brodmann are most frequently used in neurosciences there are only a few quantitative and comparable data available about their structural features. The results of this study are published here for the first time and should close this gap. Therefore, all Brodmann areas have been dissected, embedded and stained with galloxyanin chrome alum. This dye stains the cells which comprise the cytoarchitectonics. Those regions in the sections which should be quantified were interactively defined by a human investigator. A videomicroscope at a magnification of 660x and an image analysis system was used for digitalization and further analytical steps. After digitalization optical densities were calculated. The gray level indices (GLI) were depicted on a new GLI image. In this image the profile curves were determined. Orthogonal to the pial surface, the GLI values were scanned in between the pial surface and the white matter. Subsequently the profile curves were classified into allocortical, mesocortical, isocortical granular and isocortical agranular profile pools in order to visualize their laminar structure. Finally a peak analysis was carried out in order to filter structural relevant peaks out of the profiles. These peaks were smoothed using a FFT procedure. The resulting curves are very similar indicating a similarity between the laminar structure of different brains. Since the biological variability of the human laminar structure is large, the results of our analysis on the brains of only two persons justify further studies. However, these results indicate that GLI maps could be of great use as navigation and localization tools for the evaluation of sections of both hemispheres.

## Einleitung

Eine Einteilung der menschlichen Hirnrinde in Areale wurde von Korbinian Brodmann (1868- 1918) im Jahre 1909 in der berühmten Monographie „Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde“ publiziert, die eine Zusammenfassung seiner zahlreichen zuvor

in Fachzeitschriften erschienenen Publikationen darstellt.

Neben phylogenetisch interessanten Arten wie niederen Affen (Cercopithecinae, Hapalidae), Halbaffen (Lemur), Flughund (Pteropus), Wickelbär (Procyonidae), Kaninchen (Leporidae), Ziesel (Rodentia) und dem Igel beschrieb Brodmann unter topographisch zytoarchitektonischen Aspekten die areale Gliederung der menschlichen Hirnrinde. Die areale Numerierung folgt keinem übergeordneten topographischen oder funktionellen Prinzip, sondern der Untersuchungsabfolge, in welcher Brodmann die Areale präparierte.

Weitere zyto-, myelo-, pigment-, angioarchitektonische und funktionelle Kartierungen des Cortex cerebri stammen von Campbell (1905), Smith (1907), v. Economo und Koskinas (1925), Vogt und Vogt (1926), Pfeifer (1930), Kleist (1934), Bailey und v. Bonin (1951), Sarkissov et al. (1955), Duvernoy (1979), Braak (1980), um nur die Übersichtsarbeiten auf diesem Gebiet zu nennen.

Die Brodmann-Kartierung hat sich vor allem deswegen bewährt, weil nicht zu detaillierte Aufgliederungen vorgenommen wurden und somit die zytoarchitektonische Felderung nachvollziehbar wurde. Kriterien, die eine Area oder ein kortikales Feld besitzen sollten, um als einheitlich angesehen zu werden, sowie eine Relativierung der Genauigkeit kortikaler Gliederungen hat Jones (1987) zusammengestellt. Seit den 50er Jahren wurden neue Unterteilungen der von Brodmann als einheitlich angesehenen Areale gefunden. Hierzu wurden neue quantitative Methoden (Stereologie, Bildanalyse), Tracing-Techniken, neurophysiologische Verfahren und funktionelle bildgebende Untersuchungen wie PET, fNMR sowie Methodenkombinationen, die mit Hilfe von multimodalen Matching-Techniken reintegriert und visualisiert werden konnten, genutzt. So konnte beispielsweise die Area 4 (Area gigantopyramidalis) in eine vordere (4a (anterior)) und hintere (4p (posterior)) durch Geyer et al. (1996) beim Menschen differenziert werden, oder die Area 3 in eine Area 3a und Area 3b durch Hassler und Muhs-Clement (1964) bei der Katze sowie die Area 5 in 5a, 5b, die Area 6 in 6a $\alpha$ , 6a $\beta$ , die Area 7 in 7a, 7b, und schließlich die Area 18 in 18a, 18b u.a., welche allerdings nur bei Primaten lokalisiert wurden.

Obwohl die Zytoarchitektonik-Forschung auf eine lange Tradition zurückblicken kann, wurden erst in den letzten Jahren vereinzelte quantitative Ergebnisse über die laminäre und kolumnäre Strukturierung der Zytoarchitektonik vorgelegt. Stereologische Methoden (Haug 1978, Haug 1986) und bildanalytische Techniken (Schleicher und Zilles 1990) bieten die wichtigsten analytischen Ansätze, um quantitative Daten über die Zytoarchitektonik des Cortex cerebri zu erhalten. Sie werden u. a. auch im Rahmen von neurologischen,

psychiatrischen, neuropathologischen, neuropharmakologischen und weiteren neurowissenschaftlichen Untersuchungen eingesetzt. Eine quantitative Untersuchung über sämtliche von Brodmann definierten Areale wurde bislang jedoch noch nicht publiziert.

### Methodik und Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial stammt von einem 52jährigen Mann und einer 57jährigen Frau, die keine neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen aufwiesen. Die Gehirne wurden 12 Stunden nach Todeseintritt entnommen und 3 Monate lang in 4%iger isotonischer Formalinlösung immersionsfixiert.

Vor der Präparation der Gehirne wurden die Arachnoidea mater cranialis mit Blutleitern und zum Teil die Pia mater cranialis vorsichtig entfernt. Die Areale wurden sodann nach der topographischen Karte von Brodmann präpariert. Anschließend wurden die ca. 1 cm<sup>3</sup> großen Präparate 24 Stunden gewässert, um Formalinrückstände zu entfernen. Dann folgten Entwässerung über Isopropylalkohol und Xylol und Einbettung in Paraplast bei 60°C. Mit einem Schlittenmikrotom (Jung) wurden 20 µm dicke Schnitte hergestellt, in einem 50°C warmen Wasserbad gestreckt und auf mit Chromalaungelatine beschichtete Objektträger montiert. Die Trocknungsphase erfolgte über Nacht bei 37°C.

Die Schnitte wurden mit Gallocyanin-Chromalaun (GCA) gefärbt, da sich dieser Oxazin-Farbstoff besonders gut für videomikroskopische Untersuchungen eignet (Schmitt und Eggers 1997). Die gefärbten Schnitte wurden eingedeckt und mit dem Universalforschungsmikroskop (Zeiss) mit einem 25x Objektiv und einer Zwischenvergrößerung von 1,25x ausgewertet. Die effektive Vergrößerung am Bildschirm betrug 660x. Bei einer Auflösung von 2 Pixeln pro µm (*spatial resolution* = 0,503 µm) wurden die Präparate auf einem Microscanningtisch (Märzhäuser) mäanderförmig verschoben (Abb. 1). Die Steuerung des Scanningtisches und der Fokusebene erfolgte von einem PC (Zeiss Imaging), der auch den Bildeinzug übernahm. Eine Grauwertkamera mit einer 256 Grauwerte umfassenden Bandbreite erzeugte ein analoges Signal, das von einer Framegrabber-Karte in ein digitales umgewandelt wurde. Da es sich bei der GCA-Färbung um eine monochromatische Färbung handelt, ist der Farbkameraeinsatz nicht erforderlich. Die Bildgröße betrug schließlich 512x512 Pixel. Die Teilbilder wurden gesichert und schließlich über das lokale Netzwerk auf einen zweiten PC übertragen.

Das menschliche Auge besitzt eine nur begrenzte Wahrnehmungsfähigkeit für Unterschiede in der Flächendichte bzw. Verteilung von Objekten. Da die kortikale Laminierung dem Auge sehr feine strukturelle Unterschiede bietet, wurde von Schleicher und Zilles (1990) für zytoarchitektonische Auswertungen das sog. GLI-(Gray Level Index) Verfahren entwickelt. Dieses Verfahren verstärkt selektiv die geringen strukturellen Veränderungen der Zellanordnungen. Das Prinzip dieser Auswertungsmethode geht auf Arbeiten von Adhmi (1973) und Schleicher et al. (1978) zurück und wurde in den 50er und 60er Jahren in modifizierter Weise

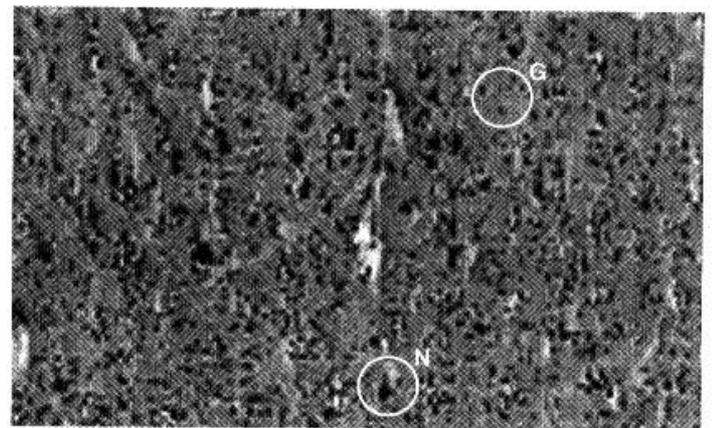
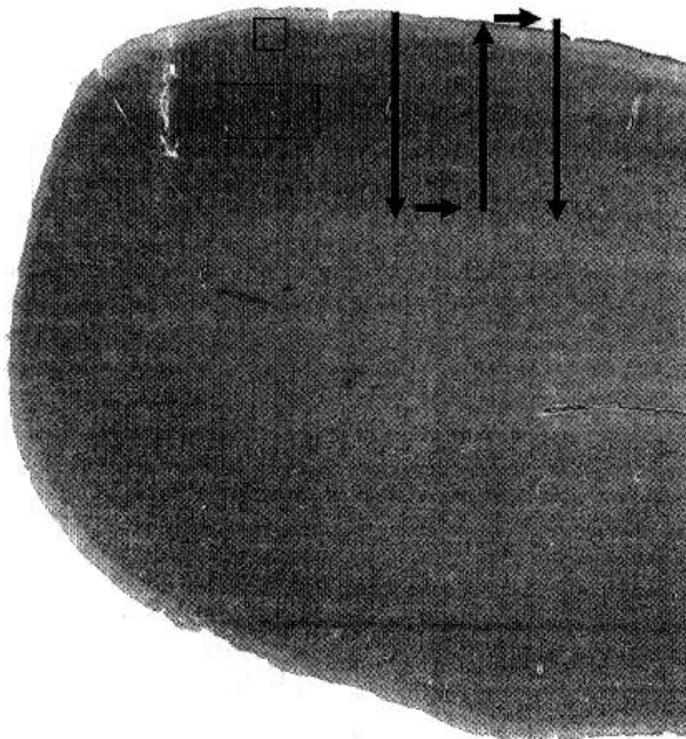


Abb. 1: a) Grauwertmosaik der Area 1. Dieses Bild besteht aus 22 x 24 Teilbildern, die jeweils eine Größe von 512<sup>2</sup> Pixeln Kantenlänge und 8 Bit Grauwertumfang haben. Das eingetragene Quadrat gibt die Größe eines 512<sup>2</sup> Bildes wieder. Die Pfeile zeigen den mäanderförmigen Verlauf der GLI-Berechnung. Nach dem gleichen Verfahrenprinzip wurden alle Teilbilder des Mosaiks erfasst. Das Rechteck ist in b) vergrößert abgebildet. b) Der 3x vergrößerte Ausschnitt des Bildes zeigt, daß sogar noch einzelne Zellen differenziert werden können (G: Gliazellen, N: Pyramidenzellen).

in Form der Photometrie zur Auswertung von enzymhistochemischen Reaktionen in histologischen Schnitten benutzt (Wied 1966, Wied und Bahr 1970, Pope et al. 1952, Pope 1968).

Um Laminierungen und kolumnäre Zellverteilungen mit dem GLI-Verfahren sichtbar zu machen, müssen größere Gewebearale ausgewertet werden. Hierzu wurden Bereiche in den Präparaten von einem Auswerter interaktiv in Form eines viereckigen Auswertungsfeldes definiert und anschließend mit Hilfe des zuvor beschriebenen Systems mäanderförmig digitalisiert (Abb. 1 a). Auf die derart digitalisierten Einzelbilder (Abb. 1b) der Bildmosaike (Abb. 1a) wird schließlich das GLI-Verfahren angewendet.

Der GLI ist definiert als der Flächenanteil oder auch die relative Häufigkeit von gefärbten Zellprofilen eines Bildes. Um diesen Flächenanteil zu bestimmen, wurden bildanalytische Verfahren eingesetzt (Pratt 1978, Rosenfeld und Kak 1982, Gonzalez und Woods 1993, Jähne 1993, Sonka et al. 1994, Phillips 1994, Lehmann et al. 1997 u. a.). Zellprofile bzw. optische Projektionen von Zellen, die das Vordergrundsignal darstellen, müssen in der digitalisierten videomikroskopischen Abbildung vom Hintergrund (Neuropil) unterschieden werden. Ein solcher Unterscheidungsvorgang wird auch als Segmentierung bezeichnet und stellt in vielen Auswertungssystemen von histologischen Bildern ein Problem dar. Um dieses Problem zu lösen, wurde ein Algorithmus entworfen, in welchem ein adaptives Schwellwertverfahren benutzt wird. Dieses besteht darin, ein Tiefpaß-gefiltertes Bild mit empirisch ermittelter Filtergröße (9 Pixel) vom Originalbild zu subtrahieren. Das Verfahren bietet eine ausreichende Segmentierung in digitalisierten 20 µm dicken GCA-gefärbten Schnitten und führt zu Ergebnissen, die mit denen einer interaktiven Schwellwertbestimmung übereinstimmen.

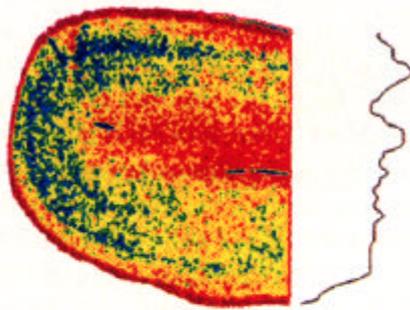
Aufgrund des Sampling-Theorems von Prewitt (1965) können nur solche Details eines histologischen Schnittes aufgelöst werden, die doppelt so groß sind, wie das zugrundeliegende Meßfeld. In der Medizin besagt der Begriff der Sehschärfe (Visus, Auflösungsvermögen) im Prinzip das gleiche, nämlich die Fähigkeit der Netzhaut, zwei Punkte getrennt zu erkennen. Daher wurde eine 16 x 16 Pixel große Maske über die Mosaikteilbilder verschoben und über jeder Maske der GLI berechnet. Die resultierenden  $32^2$  Werte wurden in einem sog. GLI-Bild als einzelne Pixel eingetragen. Aus einem großen Bildmosaik von  $i \times j \times 512^2$  Bildelementen wurde ein vielfach kleineres  $i \times j \times 32^2$  GLI-Bild berechnet. Die GLI-Werte wurden schließlich noch in acht Klassen eingeteilt, welcher jeweils ein Farbwert zugewiesen wurde. Dieses Look-Up-Table ist in Abb. 3 wiedergegeben.

Der nächste Auswertungsschritt bestand darin, charakteristische Profile der geschichteten bzw. laminären Zellanordnung (Zytoarchitektur) zu berechnen. Hierzu wurden interaktiv Polygone über der pialen Oberfläche und der Rinden-Mark-Grenze (RMG) eines jeden GLI-Bildes definiert. Ein Algorithmus erzeugte sodann eine Schar von Meßstrecken. Von jedem Punkt des pialen Polygons wurde der dichtest gelegene RMG-Punkt bestimmt und zwischen diesen beiden Punkten eine Meßstrecke gelegt. Auf dieser Meßstrecke wurden sodann die GLI-Werte abgetastet. Das entstandene Profil mußte normiert werden, da die Länge der Meßstrecken einer Schar variiert. Die normierten Profile wurden summiert und schließlich über die Anzahl der Meßstrecken gemittelt. Diese gemittelten Profile der unterschiedlichen Brodmann Areale mußten dann nochmals in Hinsicht auf ihre Amplitudenhöhe normiert werden, um eine Vergleichbarkeit der Profile untereinander zu gewährleisten. Solche normierten Profilkurven sind in den Abb. 2a-c neben den entsprechenden GLI-Darstellungen aufgetragen. Außerdem wurde eine Glättung mit einer gleitenden Mittelung über ein Fenster von 5 Werten durchgeführt. Die Amplitudenhöhe der Profilkurven wurde schließlich farbkodiert (Abb. 3) und einer Sortierung nach morphologischen Kriterien unterzogen. Zunächst wurden die Brodmann-Areale nach agranulären und granulären Gruppen sortiert. Um den Vergleich der Profile der beiden Gehirne zu erleichtern, wurden sie in einem Profilmuster zusammengefaßt. Eine Übersicht über die 4 Kortextypen ist der Abb. 3a-d zu entnehmen.

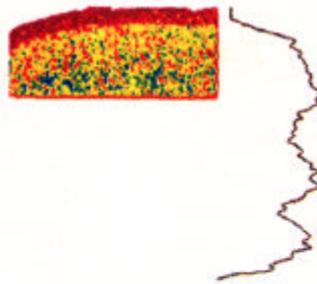
Mit einer Peakanalyse wurden die Maxima der Profile bestimmt. Wird die Anzahl der Peaks mit einem Filter, der Subpeaks entfernt, auf vier bis sechs reduziert, so ergaben sich Verteilungen, die besser untereinander vergleichbar waren, als die ursprünglichen Profile. Die Reduktion der Peaks wurde so durchgeführt, das zwischen ihnen möglichst große Abstände gesucht wurden, um dazwischenliegende Peaks herauszufiltern. Die resultierenden Peakverteilungen wurden für die granulären und agranulären Areale für beide Gehirne separat zusammengefaßt und mit Hilfe einer schnellen Fouriertransformation (FFT) geglättet. Bei diesem Glättungsverfahren werden die Fourier-Komponenten mit Frequenzen, die größer als  $(n\Delta t)^{-1}$  sind, herausgefiltert, wobei  $n$  die

---

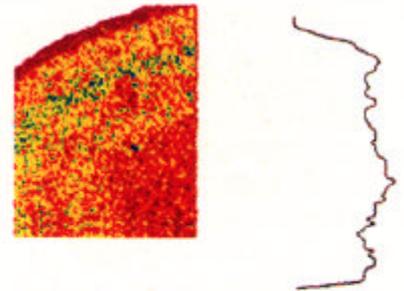
Abb. 2 (auf den Seiten 148, 149 und 152): a) Die GLI-Bilder und Profile der Areale 1 bis 20. b) Areale 21 bis 35. c) Areale 36 bis 52. Das Look-Up-Table zu diesen Abbildungen ist in Abb. 3 wiedergegeben. Die Profilkurven sind alle normiert und können direkt miteinander verglichen werden. Dafür gestaltet sich ein direkter Vergleich mit den GLI-Bildern entsprechend schwieriger.



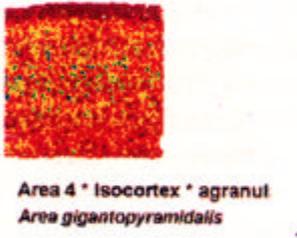
Area 1 \* Isocortex \* granulär  
*Area postcentralis intermedia*



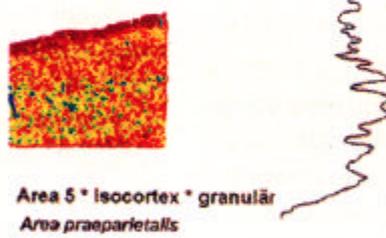
Area 2 \* Isocortex \* granulär  
*Area postcentralis caudalis*



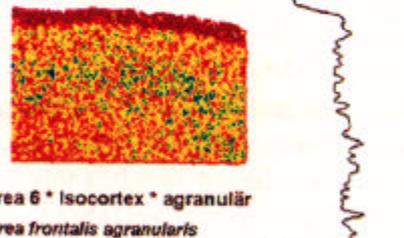
Area 3 \* Isocortex \* granulär  
*Area postcentralis oralis*



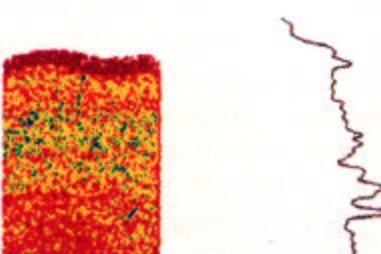
Area 4 \* Isocortex \* agranulär  
*Area gigantopyramidalis*



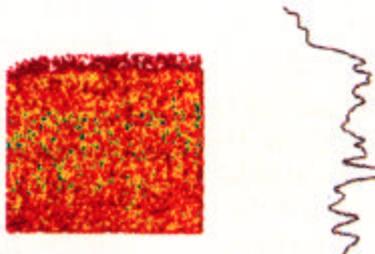
Area 5 \* Isocortex \* granulär  
*Area praeparietalis*



Area 6 \* Isocortex \* agranulär  
*Area frontalis agranularis*



Area 7 \* Isocortex \* granulär  
*Area parietalis superior*



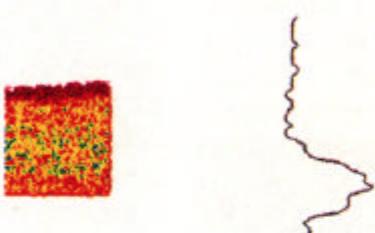
Area 8 \* Isocortex \* agranulär  
*Area frontalis intermedia*



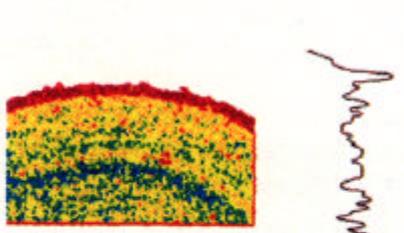
Area 9 \* Isocortex \* granulär  
*Area frontalis granularis*



Area 10 \* Isocortex \* granulär  
*Area frontopolaris*



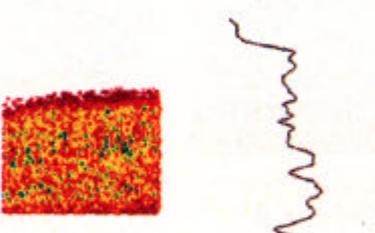
Area 11 \* Isocortex \* granulär  
*Area praefrontalis*



Area 17 \* Isocortex \* granulär  
*Area striata*



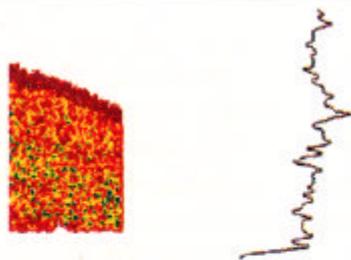
Area 18 \* Isocortex \* granulär  
*Area occipitalis*



Area 19 \* Isocortex \* granulär  
*Area praecoccipitalis*



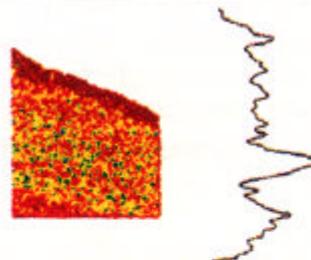
Area 20 \* Isocortex \* granulär  
*Area temporalis inferior*



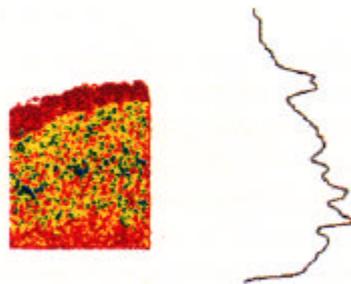
Area 21 \* Isocortex \* granulär  
Area temporalls media



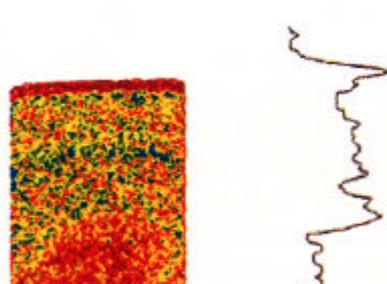
Area 22 \* Isocortex \* granulär  
Area temporalls superior



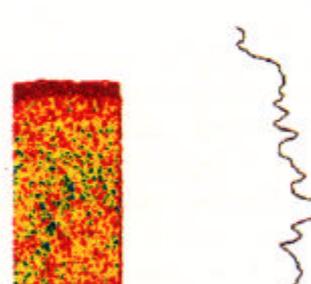
Area 23 \* Allocortex  
Area cingularis posterior ventralis



Area 24 \* Mesocortex \* agranulär  
Area cingularis anterior ventralis



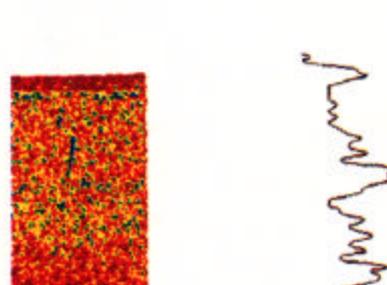
Area 25 \* Mesocortex \* granulär  
Area subgenualis



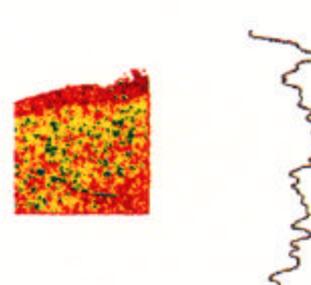
Area 26 \* Allocortex  
Area ectosplenialis



Area 27 \* Allocortex  
Area praesubicularis



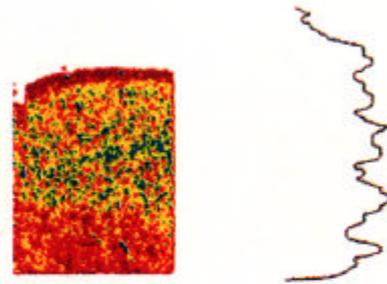
Area 28 \* Allocortex  
Area entorhinalis



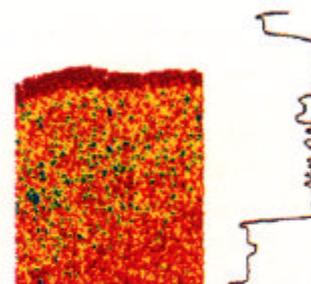
Area 29 \* Allocortex  
Area retrolimbica granularis



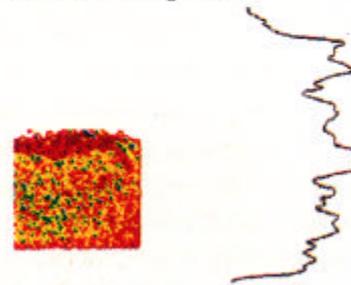
Area 30 \* Allocortex  
Area retrolimbica granularis



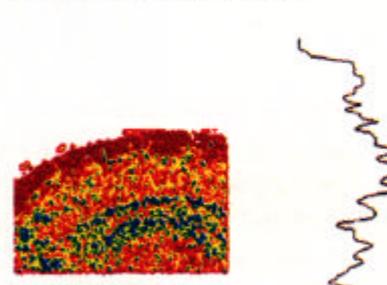
Area 31 \* Isocortex \* granulär  
Area cingularis posterior dorsalis



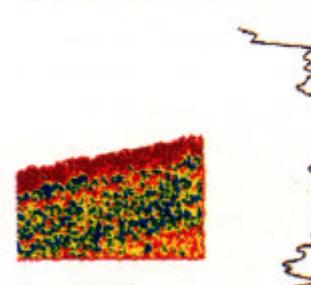
Area 32 \* Isocortex \* agranulär  
Area cingularis anterior dorsalis



Area 33 \* Mesocortex \* granulär  
Area praegenualis



Area 34 \* Allocortex  
Area entorhinalis dorsalis



Area 36 \* Allocortex  
Area perirhinalis

Größe des Glättungsfensters und  $\Delta t$  der Abstand zwischen zwei Datenpunkten ist. Schließlich wurden die Profile noch einer Ähnlichkeitsanalyse unterzogen. Diese besteht darin, die Ähnlichkeit bzw. den Abstand der Profilkurven untereinander zu erfassen.

### Ergebnisse

In den Abb. 2a-c sind die GLI-Bilder mit Profilen aller Areale des weiblichen Gehirns 1253 wiedergegeben. Die 4 wichtigsten Kortextypen sind in Abb. 3a-d in vergrößerter Ansicht abgebildet. Die Zusammenfassung aller Profile in Form eines *kortikalen Fingerprints* ist in Abb. 3e dargestellt. Die Amplitudenhöhen der GLI-Profile sind hier farbkodiert abgebildet. Die gemittelten Profile jedes Gehirns können in den Abbildungen 4a und 4b besser verglichen werden und werden im folgenden besprochen. Die Lamina 1 (Lamina

molecularis) weist eine geringe Zelldichte und damit einen geringen GLI in allen Arealen des Iso-, Meso- und Allocortex auf. Auf die Lamina 1 folgt meist ein GLI-Peak im Profil, welches typisch ist für die Lamina granularis externa, der äußeren Körnerschicht. Dies gilt auch für agranuläre Areale, wie z. B. die Area 44 (Area opercularis). Das anschließende Tal ist wiederum typisch für die Lamina pyramidalis externa, die bei den agranulären Arealen eher in Form eines Peaks ausgeprägt ist und bei den granulären Arealen talförmig. Diese Schicht wird in die Unterschichten 3a, 3b und 3c unterteilt, die in den Profilen zu erkennen sind. Die Lamina granularis interna ist in den granulären Arealen ungefähr doppelt so breit wie in den agranulären. Diese vierte Schicht wird in den granulären Arealen in die Unterschichten 4a, 4b, 4c $\gamma$ , 4c $\beta$  und 4d unterteilt. Auch diese Unterschichten lassen sich in den integrier-

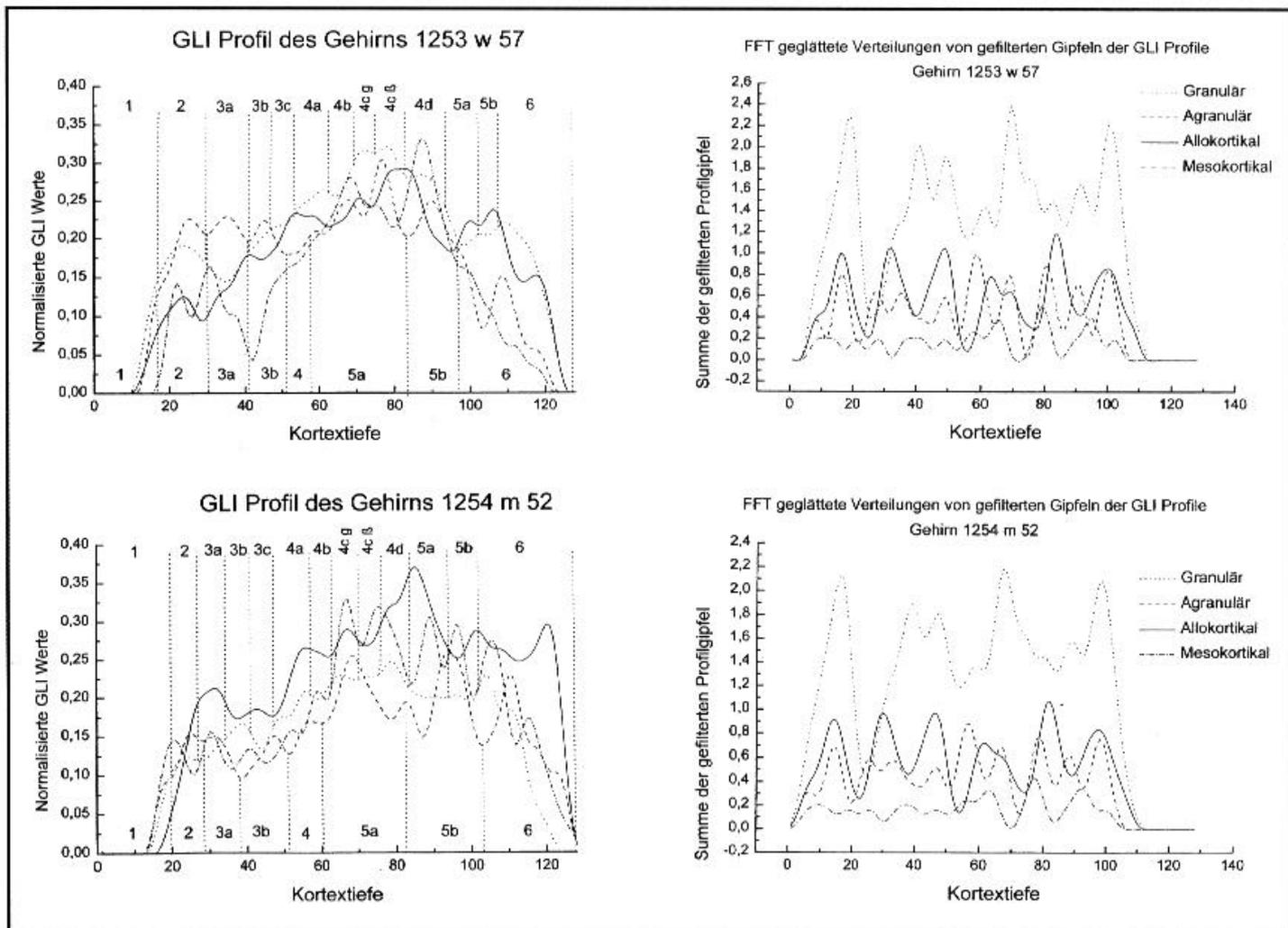


Abb. 4: Auf der **linken** Seite sind die geglätteten Profilkurven beider Gehirne wiedergegeben. Die 4 Kortextypen sind in Form von 4 Kurven in einem Diagramm dargestellt. Diesen 4 Kurven sind jeweils unterschiedliche Liniestile zugeordnet (Diagramme auf der rechten Seite). Auf der linken Seite sind die mittleren normierten GLI-Werte gegen die Kortextiefe aufgetragen, so daß die zytoarchitektonische Schichtung deutlich wird. Die obere Zahlenreihe im Diagramm gibt die Lage der granulären Laminae an und die untere die der agranulären. – Auf der **rechten** Seite sind die Verteilungen der gefilterten GLI-Kurven-Maxima gegen die Kortextiefe aufgetragen. Die Liniestile sind die gleichen wie auf der linken Seite. Beim Vergleich gleicher Kortextypen bzw. Liniestile fällt die große Ähnlichkeit der Kurven beider Gehirne auf.

ten Profilen wiederfinden. Die schwach ausgeprägte Lamina 4 der agranulären Areale ist als schwacher Peak auf einem Profilplateau zu erkennen. Dafür ist die ausgesprochen große Output-Schicht, die Lamina pyramidalis interna, mit zwei deutlichen Peaks in den Schichten 5a und 5b vertreten. In den granulären Arealen ist die Lamina 5 entsprechend schmaler und zeigt nur einen schwachen Peak über der Schicht 5b im Übergang zur Lamina multiformis. Letztere ist wiederum bei beiden Kortextypen mit einem deutlich exprimierten Peak sichtbar.

Die Übergangsarchitekturen zwischen agranulären und granulären Arealen sind in den Kurven von Abb. 4 (links) wiedergegeben. Die mesokortikalen Areale (Area 24, 25, 33) zeigen zwei initiale Peaks über den Laminae 2 und 3. Anschließend steigen die Profile steil auf und besitzen auf Höhe der Lamina 4 mehrere steile Peaks und Täler. Die allokortikalen Areale zeigen drei hervortretende Peaks und zwar 1. über den Laminae 2 und 3, 2. über den Laminae 4 bis 5 und 3. über der Lamina 6. Dazwischen liegen einige weitere Peaks, die schwächer ausgeprägt sind.

Eine Peakberechnung mit anschließender Reduktion auf 4-6 Peaks pro Profil ergab sehr ähnliche Verteilungen (Abb. 4 (rechts)) im Vergleich der beiden Gehirne. Das obere Diagramm von Abb. 4 (rechts) kann direkt mit dem unteren verglichen werden. Die Lage der Peaks für die unterschiedlichen Hirnrindentypen stimmen erstaunlicherweise, bis auf kleine Abweichungen, nahezu überein.

### Diskussion

Bislang wurde noch keine vollständige Kartierung des Cortex cerebri des Menschen mit stereologischen oder bildanalytischen, also quantitativen Methoden durchgeführt. Die hier dargestellten GLI-Maps und GLI-Profilen charakterisieren die laminäre Struktur und zeigen topologische Inhomogenitäten zwischen funktionell unterschiedlichen Arealen, wie z. B. bei den granulären und agranulären Feldern auf. Weitere Anwendungsbereiche der GLI-Technik und der Profilkurvenanalyse liegen zum einen in der Altersforschung, der neuropathologischen Analyse von kortikalen Erkrankungen, insbesondere Krankheitsbildern aus dem degenerativen Formenkreis und in psychiatrischen Erkrankungen, die zu strukturellen Veränderungen führen.

Ferner dient der vorliegende GLI-Katalog als Orientierungshilfe in den komplexen dreidimensionalen Zytoarchitekturen von Großschnittserien. Über die dreidimensionale Zytoarchitektur der Gehirnrinde liegen nur Ergebnisse aus der Hippocampusformation und der Area striata vor. Dreidimensionale GLI-Profilen bzw. Kartierungen müssen weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

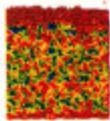
Die GLI-Technik läßt sich auch auf myelo- und pigmentarchitektonische sowie auf immunhistochemische Färbungen anwenden. Präparate, in denen die Myelo- und Pigmentarchitektur dargestellt wurden, werden derzeit noch ausgewertet. Bislang sind derartige morphologische Entitäten noch nicht quantitativ erfaßt worden.

Die vom Untersucher unabhängige Abgrenzung zweier benachbarter Areale ist mit Hilfe von multivariater Statistik möglich und hat den Vorteil, daß die Grenzen der unterschiedlichen Areale objektiv berechnet werden. Hierfür wird die Diskriminanzanalyse mit kanonischen Variablen (Schleicher et al. 1987, Oxnard 1969) eingesetzt. Auch eine Berechnung der Mahalanobis-Distanzen von Merkmalsvektoren der Profilkurven und Hypothesenverifikation mittels Hotelling's statistic (Geyer et al. 1996) kann scheinbar einheitliche Areale objektiv diskriminieren. Diese morphologisch disjunkten Areale können schließlich auf ihre funktionellen Eigenschaften gezielter untersucht werden.

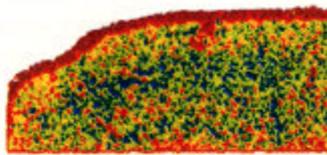
In einem weiteren Teilprojekt wird die GLI-Technik für amplifizierte immunhistochemische Visualisierungen purinerner (ATP), monoaminerg catecholaminer-

---

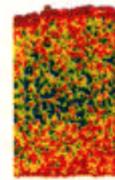
*Abb. 3 (auf Seite 153): a) Vergrößertes GLI-Bild eines typischen agranulären Rindenbereiches, b) eines granulär bis agranulären mesokortikalen Abschnitts, c) eines neokortikalen granulären Bereiches (Sehrinde) und d) der agranulären allokortikalen Hippocampusformation (Reglo subcommissuralis). Über dem GLI-Bild d) wurde eine Profilkurve aus dem CA3-Bereich abgebildet. Dieser befindet sich im GLI-Bild direkt unter der Profilkurve. Das Original-Mosaikbild hat eine Kantenlänge in x von 15360 und in y von 9216 Pixeln und wurde ebenfalls bei einer Vergrößerung von 660x aufgenommen. Die Farbtabelle (GLI Look-Up-Table) im mittleren Abbildungsteil zeigt die Kodierung der GLI-Werte. Bereiche hoher Zelldichte sind blau und solche geringer Zelldichte sind rot gekennzeichnet. – Daneben ist das farbkodierte Profilmuster (kortikaler Fingerprint) des weiblichen und männlichen Gehirns abgebildet. Die Brodmann Areale beider Gehirne sind in y-Achsenrichtung (rechter Bildrand) wiedergegeben und stehen immer paarweise nebeneinander. Dem unteren Diagrammabschnitt sind die agranulären (roter Balkenbereich) und dem oberen die granulären Areale (grüner Balkenbereich) zugeordnet. Auf der Unterseite des Diagramms ist in x-Achsenrichtung die normierte Kortextiefe (0 bis 127) aufgetragen. Das Look-Up-Table steht links neben dem Diagramm. Die Farbwerte sind hier im Vergleich zu den GLI-Abbildungen a) bis d) invertiert worden (blau: Bereiche niedriger Zelldichte, rot: Bereiche hoher Zelldichte).*



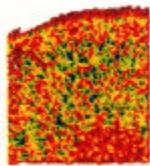
Area 36 \* Allocortex  
*Area ectorrhinalis*



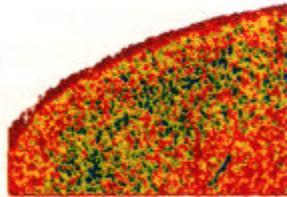
Area 37 \* Isocortex \* granulär  
*Area occipito-temporalis*



Area 38 \* Isocortex \* agranulär  
*Area temporopolaris*



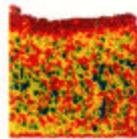
Area 39 \* Isocortex \* granulär  
*Area angularis*



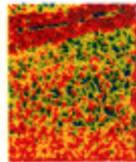
Area 40 \* Isocortex \* granulär  
*Area supramarginalis*



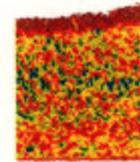
Area 41 \* Isocortex \* granulär  
*Area temporalis transversa interna*



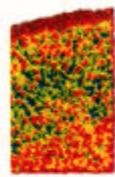
Area 42 \* Isocortex \* granulär  
*Area temporalis transversa externa*



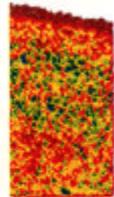
Area 43 \* Isocortex \* agranulär  
*Area subcentralis*



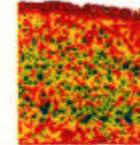
Area 44 \* Isocortex \* agranulär  
*Area opercularis*



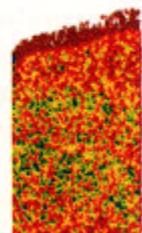
Area 45 \* Isocortex \* granulär  
*Area triangularis*



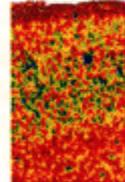
Area 46 \* Isocortex \* granulär  
*Area frontalis media*



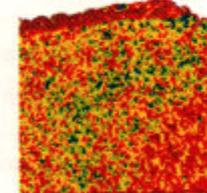
Area 47 \* Isocortex \* granulär  
*Area orbitalis*



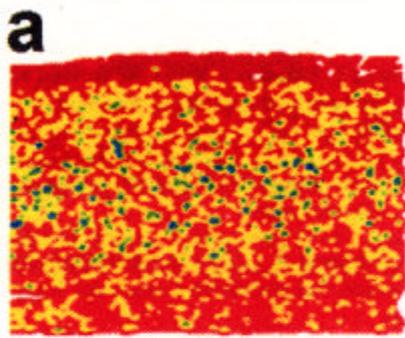
Area insularis anterior agranularis



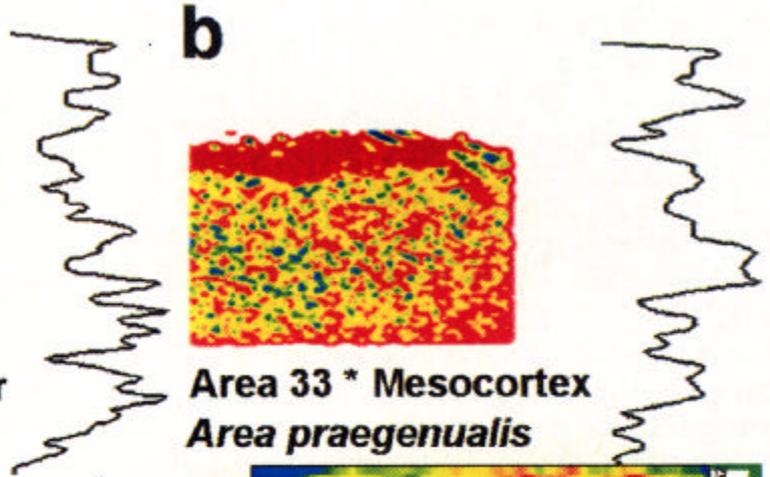
Area insularis posterior granularis



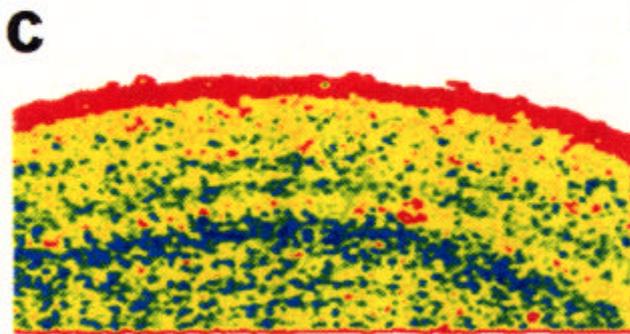
Area 52 \* Isocortex \* granulär  
*Area parainsularis*



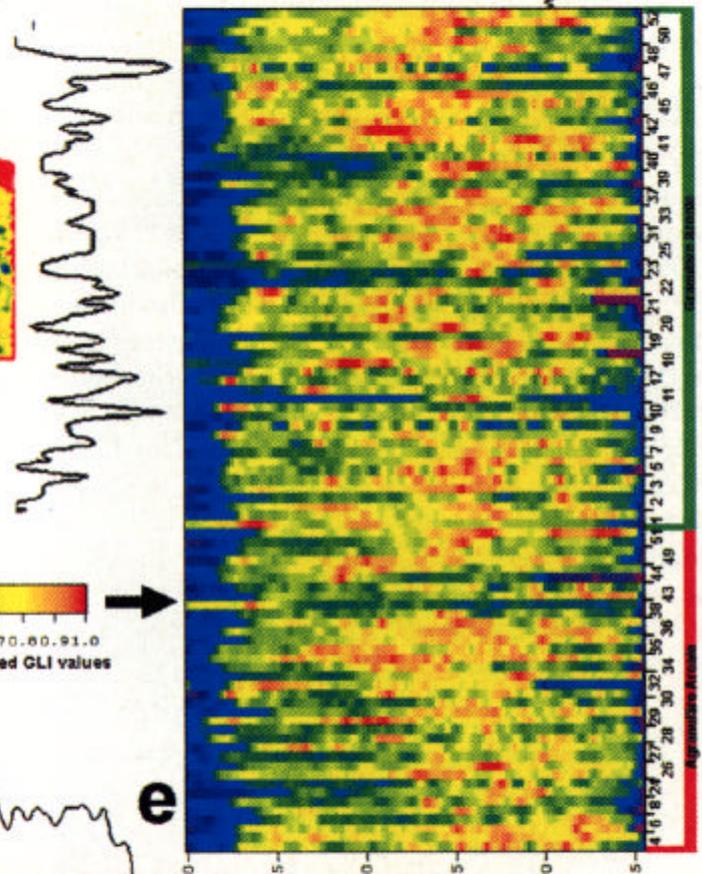
**a**  
Area 4 \* Isocortex \* agranulär  
Area gigantopyramidalis



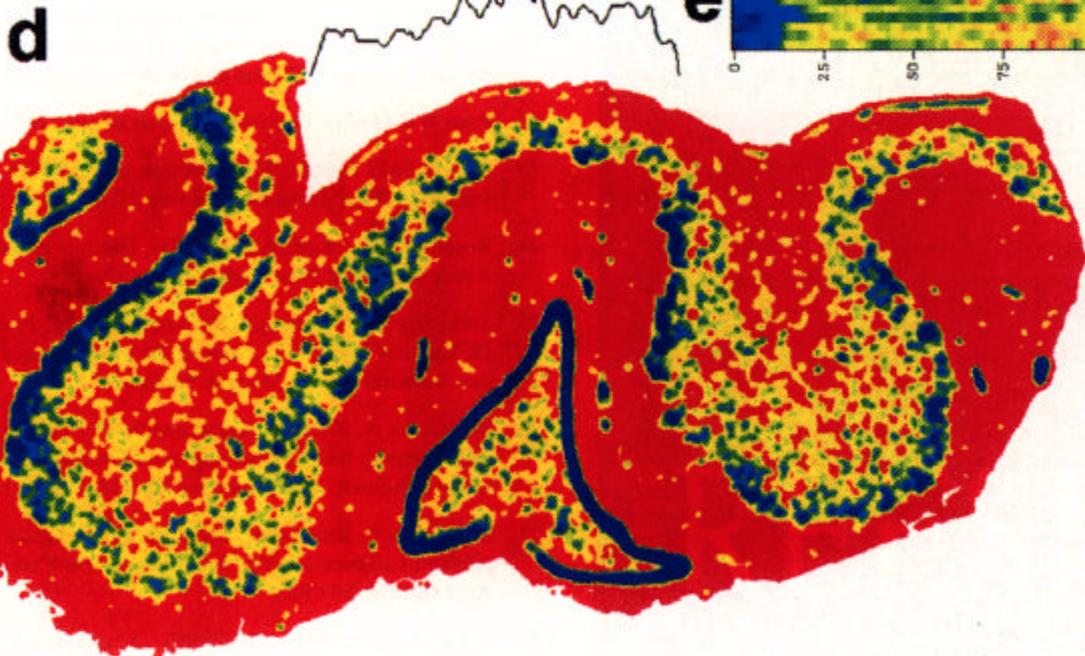
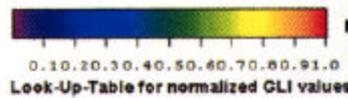
**b**  
Area 33 \* Mesocortex  
Area praegenualis



**c**  
Area 17 \* Isocortex \* granulär  
Area striata



**GLI Look-Up-Table**



**d**

**e**

ger (Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin), monoaminerg non catecholaminerg (Histamin, Serotonin), aminerg (Glutamat, Glycin), cholinerg (Azetylcholinesterase, Cholinazetyltransferase) und nitroger (brain-nitric oxide synthetase) Transmittersysteme in den Arealen 1 und 4 des Cortex cerebri erarbeitet. In Zukunft sollen auch in situ Hybridisierungen der mRNAs von neuromodulatorischen Rezeptoren, Ionenkanälen und synaptischen Proteinen mit der GLI-Methodik dargestellt werden.

Dreidimensionale GLI-Analysen liegen bislang noch nicht vor und könnten weitere neuronale Anordnungen sichtbar machen. Allerdings führt das Schneiden von eingebettetem Gewebe zu erheblichen Problemen bei der dreidimensionalen Rekonstruktion. Mit geeigneten, wenn auch kostspieligen, Bildregistrierungsverfahren können diese Schwierigkeiten jedoch angegangen werden.

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen wurde ein vollständiger GLI-Katalog vorgelegt, der als Basis für die areale Identifikation und Navigation in Großschnitten dient. Anderen Arbeitsgruppen, die beispielsweise im Human Brain Project an neuen Kartierungstechniken von Gehirnatlanten arbeiten, wird mit der vorliegenden Übersicht eine Orientierungsmöglichkeit bei der nicht immer einfachen Identifikation unterschiedlicher Areale geboten. Sämtliche GLI-Darstellungen wurden gleichartig mit Hilfe von Profilkurven quantitativ ausgewertet und verglichen. Insofern stellen die Profilkurven ebenfalls Standards für die areale Identifikation dar. Die hohe strukturelle Übereinstimmung der zusammengefaßten Peakkurven weist auf eine relativ große laminäre Ähnlichkeit zwischen menschlichen Großhirnrinden hin.

## Literatur

- Adhami H (1973). Die Photometrische Bestimmung des Cortexzell- und Grauehalts auf der Grundlage des Nissl-Bildes. *Acta Anat Suppl* 60: 1-52.
- Bailey P, Bonin G von (1951). *The isocortex of man*. University of Illinois Press: Urbana.
- Braak H (1980). *Architectonics of the human telencephalic cortex*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York.
- Brodman K (1909). *Verleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde*. Barth: Leipzig.
- Campbell AW (1905). *Histological studies on the localization of cerebral function*. University Press: Cambridge
- Duvernoy H (1979). An angioarchitectonic study of the brain. *Anat Clin* 1: 207-222.
- Economo C von, Koskinas GN (1925). *Die Cytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen*. Springer: Berlin.
- Geyer S, Ledberg A, Schleicher A, Kinomura S, Schormann T, Bürgel U, Klingberg T, Larsson J, Zilles K, Roland PE (1996). Two different areas within the primary motor cortex of man. *Nature* 382: 805-807.
- Gonzalez RC, Woods RE (1993). *Digital image processing*. Addison Wesley: Massachusetts.
- Hassler R, Muhs-Clement K (1964). Architektonischer Aufbau des sensomotorischen und parietalen Cortex der Katze. *J Hirnforsch* 6: 377-420.
- Haug H (1978). Clustering and layering of neurons in the central nervous system. *Lect Notes Biomath* 23: 193-201.
- Haug H (1986). History of neuromorphometry. *J Neurosci Meth* 18: 1-17.
- Jähne B (1993). *Digitale Bildverarbeitung*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York.
- Jones EG (1987). Brodmann's Areas. In: Adelman G (ed). *Encyclopedia of Neuroscience*. Birkhäuser: Boston, Basel, Stuttgart, Vol. 1: 180-181.
- Kleist K (1934). *Gehirmpathologie*. Barth: Leipzig.
- Lehmann T, Oberschelp W, Pelikan E, Repges R (1997). *Bildverarbeitung für die Medizin*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York.
- Oxnard CE (1969). The combined use of multivariate and clustering analysis in functional morphology. *J Biomech* 2: 73-80.
- Pfeifer RA (1930). *Grundlegende Untersuchungen für die Angioarchitektonik des menschlichen Gehirns*. Springer: Berlin.
- Phillips D (1994). *Image Processing in C*. Prentice Hall: Lawrence.
- Pope A, Canveness WF, Livingston KE (1952). The architectonic distribution of acetylcholinesterase in the frontal isocortex of psychotic and nonpsychotic patients. *AMA Arch Neurol Psychiat* 68: 425-443.
- Pope A (1968). Structural and enzymatic microchemistry of human cerebral cortex. In: Bailey OT, Smith DE (eds). *The central nervous system*. Williams and Wilkins: Baltimore
- Pratt WK (1978). *Digital image processing*. Wiley: New York.
- Prewitt JMS (1965). The selection of sampling rate for digital scanning. *IEEE Trans Biomed Eng* 12: 14-21.
- Rosenfeld A, Kak AC (1982). *Digital picture processing*. Academic Press: New York, London, Paris.
- Sarkissov SA, Filimonoff IN, Kononowa EP, Preobraschenskaja IS, Kukuev LA (1955). *Atlas of the cytoarchitectonics of the human cerebral cortex*. Medgiz: Mokau.
- Schleicher A, Zilles K, Kretschmann H-J (1978). Automatische Registrierung und Auswertung eines Grauwertindex in histologischen Schnitten. *Verh Anat Ges* 72: 413-415.
- Schleicher A, Ritzdorf H, Zilles K (1987). Erster Ansatz zur objektiven Lokalisation von Arealgrenzen im Cortex cerebri. *Verh Anat Ges* 81: 867-868.
- Schleicher A, Zilles K (1990). A quantitative approach to cytoarchitectonics: analysis of structural inhomogeneities in nervous tissue using an image analyser. *J Microsc* 157: 367-381.

29. Schmitt O, Eggers R (1997). Systematic investigations of the contrast results of histochemical stainings of neurons and glial cells in the human brain by means of image analysis. *Micron* 28: 197-215.
30. Smith GE (1907). A new topographical survey of the human cerebral cortex, being an account of the distribution of the anatomically distinct cortical areas and their relationship of the cerebral sulci. *J Anat* 41: 237-254.
31. Sonka M, Hlavac V, Boyle R (1994). Image processing, analysis and machine vision. Chapman & Hall: London, Glasgow, Weinheim.
32. Vogt C, Vogt O (1926). Die vergleichend-architektonische und vergleichen drei zphysiologische Felderung der Großhirnrinde unter besonderer Berücksichtigung der menschlichen. *Naturwissenschaften* 14: 1190-1194.
33. Wied GL (1966). Introduction to quantitative cytochemistry. Academic Press: New York, London.
34. Wied GL, Bahr GF (1970). Introduction to quantitative cytochemistry-II. Academic Press: New York, London.