

# Computergestützte, dreidimensionale Darstellung NO-Synthase I-positiver Interneurone im Bulbus olfactorius von *Phodopus sungorus*

Monika Weindel, Holger Jastrow, Rainer Spessert, Stefan Reuss und Lutz Vollrath

Anatomisches Institut der Johannes Gutenberg-Universität, Becherweg 13, D-55128 Mainz

## Zusammenfassung

Der Botenstoff NO scheint, zumindest bei Nagetieren, an der Ausbildung des Geruchsgedächtnisses beteiligt zu sein. Für die Bildung des NOS wird die neuronale NO-Synthase (NOS I) in Subpopulationen der verschiedenen Interneurone des Bulbus olfactorius (BO) verantwortlich gemacht. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Verteilung NOS I-positiver Interneurone im BO zu veranschaulichen. Als Tiermodell wurde der Dsungarische Zwerghamster gewählt, dessen NOS I-positiv Interneurone sich spezifisch mit Hilfe der NADPH-Diaphorase darstellen lassen. Für die 3D-Rekonstruktion wurden 20 µm dicke, NADPH-Diaphorase gefärbte Serienschnitte eines kompletten Bulbus fotografiert. Die interaktive Überlagerung der gescannten Bilder ermöglichte die Erstellung eines dreidimensionalen Daten-Arrays, der mit Hilfe der neurochirurgischen Operations-Planungs- und Simulations-Software weiterbearbeitet wurde. Die relevanten Zellen, die Glomeruli, der Bulbus olfactorius accessorius und das Stratum granulosum des Bulbus wurden als segmentierte Voxel-Strukturen visualisiert. Verschiedene Blickwinkel auf die ausgewählten Strukturen und die Möglichkeit, die einzelnen Kompartimente selektiv zu betrachten, gewährleisteten einen räumlichen Eindruck.

Unsere Aufnahmen demonstrieren anschaulich die dreidimensionale Verteilung der NOS-positiven Neurone in ihrer Beziehung zu den oben genannten Strukturen im Bulbus olfactorius des Hamsters. Auf der Grundlage unserer Befunde könnten Veränderungen in der Verteilung NOS I-positiver Neurone visualisiert werden, die bisher nicht zu erfassen waren. In diesem Zusammenhang und im Hinblick auf die mögliche funktionelle Bedeutung NOS I-positiver Interneurone wäre es von großem Interesse zu untersuchen, inwieweit eine Unterbrechung des sensorischen Inputs die Verteilung NOS I-positiver Interneurone beeinflusst.

## Einführung

Veränderungen in der Proteinexpression spielen bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine große Rolle. In vielen Fällen betreffen sie auch das Verteilungsmuster eines Proteins im histologischen Schnitt. Aufgrund komplexer räumlicher Verhältnisse, wie sie beispielsweise im ZNS vorliegen, sind solche Veränderungen im Expressionsmuster im zweidimensionalen Bild nur bedingt zu erfassen. Insofern ist hier eine dreidimensionale Darstellung wünschenswert.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Studie das Expressionsmuster des Enzyms neuronale NO-Synthase (NOS I), das den retrograden Botenstoff NO produziert, räumlich visualisiert. Als experimentelles Gewebe diente der Bulbus olfactorius (BO) des Dsungarischen Zwerghamsters (*Phodopus sungorus*), dessen NOS I-positiv Interneurone sich mit Hilfe der NADPH-Diaphorase-Färbung spezifisch darstellen lassen.

## Material und Methoden

In tiefer Narkose wurde ein Dsungarischer Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) mit einer Peridot-Lysin-Paraformaldehyd-Lösung transkardial perfundiert. Die Entnahme des linken BO erfolgte einschließlich des caudal angrenzenden Hirnareales. Nach 3 h Nachfixierung und anschließender Kryoprotektion wurden 20 µm dicke Sagittalschnitte des kompletten BO erstellt. Die NADPH-Diaphorase-Färbung erfolgte auf den Objektträgern bei 37° C für 90 min mit 1 mM β-NADPH, 0,8 mM NBT und 10 % Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl, pH 8.

Aufnahmen von bei 5facher Vergrößerung fotografierten Serienschnitten wurden gescannt und als Grauwert-Grafikdateien gespeichert. Ein in der interaktiven Datensprache IDL™ selbstgeschriebenes Programm ermöglichte die Überlagerung der Bilder und Speicherung eines dreidimensionalen Daten-Arrays. Mit Hilfe der neurochirurgischen Operations-Planungs- und Simulations-Software NeuroOPS (Jendrysiak, 1997) wurden die relevanten Zellen und Schichten segmentiert. Hierbei ließen sich die unterschiedlichen Grauwerte der Strukturen nutzen. Vom Computer erkannte Objekte und biologische Strukturen wurden anhand der Fotos einander zugeordnet, bevor die räumliche Darstellung mit der 3D-rendering-Routine von NeuroOPS erfolgte. Die Abbildungen 2-7 zeigen die Rekonstruktion eines linken BO aus den angegebenen Perspektiven. Um auch weiter zentral im BO lokalisierte NOS I-positiven Zellen zu visualisieren, wurden von oben nach unten hin immer weniger periphere Schichten dargestellt.

Die dargestellten Schichten (Abb. 1a) und NOS I-positiven Neuronentypen (Abb. 1b-d) wurden wie nebenstehend gezeigt farblich kodiert.

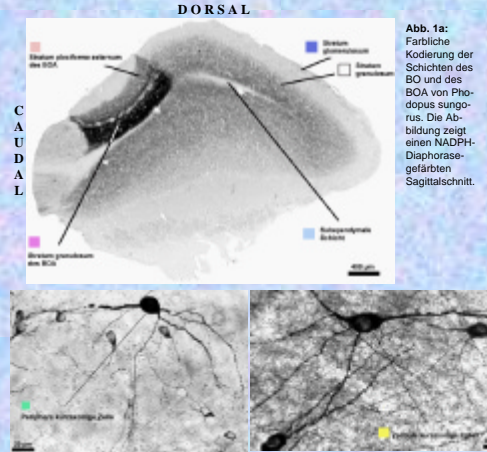


Abb. 1a: Farbliche Kodierung der Schichten des BO und des BOA von *Phodopus sungorus*. Die Abbildung zeigt einen NADPH-Diaphorase-gefärbten Sagittalschnitt.

Abb. 1b,c: Farbliche Kodierung der NOS I-positiven kurzxonigen Zellen des Bulbus olfactorius und des Bulbus olfactorius accessorius von *Phodopus sungorus*.

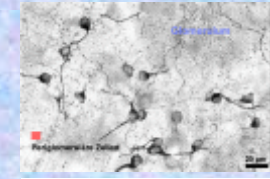


Abb. 1d: Glomerulum und farbliche Kodierung der NOS I-positiven periglomerulären Zellen des Bulbus olfactorius und des Bulbus olfactorius accessorius von *Phodopus sungorus*.

**Ergebnisse**  
Die räumliche Verteilung der jeweiligen NOS I-positiven Interneuronpopulationen wird in der computergestützten Rekonstruktion des BO erkennbar. Es zeigt sich, daß die NOS I-positiven Interneuronpopulationen nicht nur Schichten-spezifisch angeordnet sind, sondern auch innerhalb der Schichten ein differenziertes Verteilungsmuster erkennen lassen. So kommen die NOS I-positiven periglomerulären Zellen (rot) des Stratum glomerulosum im dorsolateralen Bereich des caudalen BO in besonders hoher Dichte vor (Abb. 2, Mitte). Darüberhinaus fällt auf, daß ihr Vorkommen Glomeruli (blau) -assoziiert ist (Abb. 5, oben und Mitte). Die NOS I-positiven kurzxonigen Zellen lassen ebenfalls eine asymmetrische Verteilung erkennen. So kommen die peripheren kurzxonigen Zellen (grün) des Stratum glomerulosum fast ausschließlich im ventromedialen Bereich des BO vor (Abb. 4,7, jeweils unten), während sich die NOS I-positiven zentralen kurzxonigen Zellen (gelb) des Stratum granulosum ventrolateral des BOA konzentrieren (Abb. 7, unten).

**Schlußfolgerung**  
Mit der vorgestellten Methode läßt sich die räumliche Verteilung NOS I-positiver Neurone im BO anschaulich darstellen. Insofern bietet sich die Möglichkeit, Veränderungen im Expressionsmuster der NOS I im gesamten Bulbus zu visualisieren, die zweidimensional nicht zu erfassen sind. Nachteilig ist, daß die Durchführung der vorgestellten Methode einen erheblichen Zeitaufwand erfordert.

Literatur  
Jendrysiak, U. (1997): Segmentierung von Schnittbildern. Spektrum der Wissenschaft (6/97): 107 - 112.  
Dankagung  
Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Studie (Sp-403/1-4).  
IDL ist ein registriertes Warenzeichen von Research Systems, Inc. 2995 Wildemess Place, Suite 203, Boulder CO 80301.  
Die neurochirurgische Operations-Planungs- und Simulations-Software NeuroOPS wurde vom Institut für medizinische Statistik und Dokumentation, J. Gutenberg-Universität, Mainz, entwickelt.

## Drehung um eine ventrodorsale gedachte Achse:

## Drehung um eine rostrocaudale gedachte Achse:

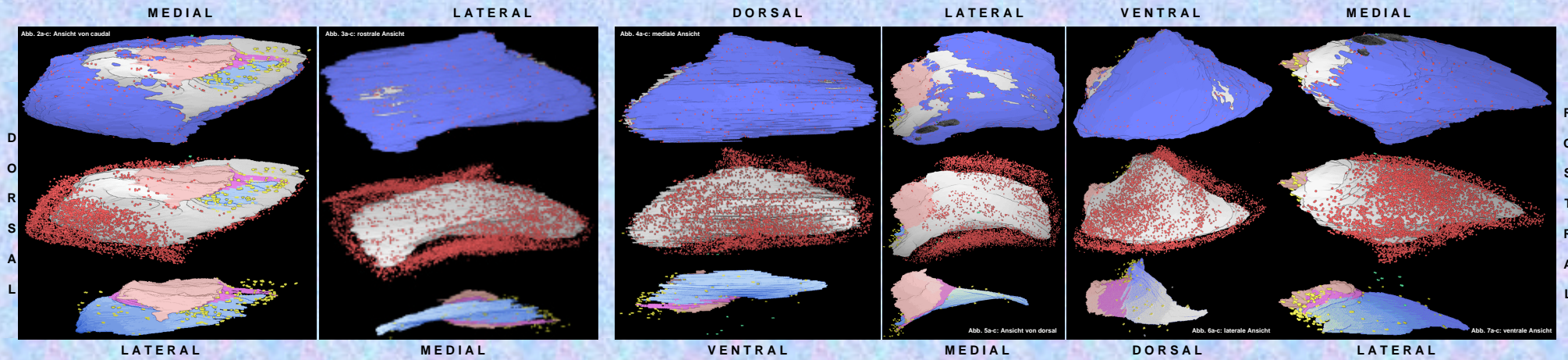


Abb. 2 - 7: Computergestützte dreidimensionale Darstellung des linken BO von *Phodopus sungorus* in der Ansicht von caudal (Abb. 2), rostral (Abb. 3), medial (Abb. 4), dorsal (Abb. 5), lateral (Abb. 6) und ventral (Abb. 7). Von oben nach unten erfolgt jeweils eine zunehmende Abtragung der peripheren Schichten. Die farbliche Kodierung der dargestellten Strukturen ist den Abb. 1a-d zu entnehmen.