

Hirnforschung, Methoden der (methods of brain research)

Zu den Methoden der Hirnforschung zählen vor allem die der empirischen Disziplinen Neuroanatomie, Neurophysiologie, Neuropsychologie und ↑Psychophysik sowie die der theoretischen Disziplinen ↑Neuroinformatik, Biokybernetik und Biophysik. Die folgende Darstellung beschränkt sich auf Methoden der empirischen Hirnforschung und überdies auf solche, die typischerweise zur Untersuchung von Wirbeltieren, zum Teil auch von Menschen eingesetzt werden. Dies bedeutet aber keineswegs die Geringschätzung theoretischer Methoden, ohne die schwerlich gezielte und systematische Empirie, wie sie gerade die Komplexität von Gehirnen erfordert,

möglich ist. So ist die systemische Modellbildung – vorzugsweise unmittelbar verhaltensrelevanter Funktionen, aber auch möglicher Strukturen – als Generalmethode der theoretischen Hirnforschung wesentliche Quelle empirisch prüfbarer Hypothesen.

I Neuroanatomie

Äußere Gestalt und innerer Aufbau von Nervensystemen sind Gegenstand neuroanatomischer Forschung. Untersucht wird überwiegend postmortal auf unterschiedlichen Skalen, bevorzugt mikroskopisch und molekular, wozu Hirngewebe entnommen und teilweise aufwendigen Vorbehandlungen unterzogen wird, die sich in drei **Präparationstechniken** gliedern lassen: (i) Die chemische Fixierung und Einbettung dient dem Schutz vor Zersetzung und der mechanischen Stabilisierung, bewirkt aber auch methodenspezifische Schrumpfungen des Gewebevolumens auf bis zu 42%. (ii) Weil das Gewebe für die mikroskopische Betrachtung üblicherweise zu groß und zu kompakt ist, werden – meist in gefrorenem Zustand – Dünnschnitte hergestellt (Schnittdicken > 10 µm für Durchlicht-, ≥ 10 nm für Elektronenmikroskopie). (iii) Um Strukturen, die zu klein sind oder sich im Absorptions- oder Lichtbrechungsvermögen nur gering unterscheiden, selektiv hervorzuheben, färbt und markiert man das Gewebe.

Hirnpräparate visualisiert man u. a. mit folgenden Hilfsmitteln: (i) Gewebeschnitte werden überwiegend im Lichtmikroskop, seltener im Fluoreszenz- oder Elektronenmikroskop untersucht. (ii) Weil hochauflösende Lichtmikroskope wegen ihrer geringen Tiefenschärfe nur Teile von Nervenzellen scharf abbilden, fertigt man durch Nachfokussieren sogenannte *Camera Lucida*-Zeichnungen an. Schichtbilder aus konfokalen Scanning-Mikroskopen kann man im Digitalrechner zu etwa gleichwertigen Darstellungen kombinieren. (iii) Radioaktive Markierungen weist man autoradiographisch nach, wobei die strahlenden Gewebeschnitte direkt auf Film aufgebracht oder mit Photoemulsion überzogen und vor der Entwicklung meist mehrere Wochen zur Belichtung kühl gelagert werden.

Die klassischen Färbetechniken sind die nach C. Golgi und F. Nissl. Die **Golgi-Färbung** (s. Abb. S. 436) schwärzt offenbar zufällig bis zu 5% der ↑Neurone *vollständig*, d. h. sowohl Zellkörper als auch ↑Dendriten und unmyelinisierte ↑Axone sind ebenso deutlich und detailliert erkennbar, wie nach gezieltem „Füllen“ einzelner Neurone mit Farbstoffen durch eine Mikropipette. Die **Nissl-Färbung** (s. Abb. S. 224 oben) betrifft dagegen *alle* Neurone, wobei Nissl-Farbstoffe u. a. an die in Zellkörper und Dendriten vorhandenen Ribosomen (die zellulären „Proteinfabriken“) binden (Axone enthalten keine Ribosomen). Daneben wendet man **Silberfärbungen** an, die Teile des Cytoskeletts hervorheben. Mit all diesen Färbungen lassen sich also bevorzugt entweder Neuronenverteilungen oder die Formen einzelner Neurone studieren.

Myelin- oder Markscheiden-Färbungen (s. Abb. S. 224 unten) kontrastieren die ↑Myelinhüllen von Axonen. Dies ermöglicht einerseits einen Überblick über die Hauptverbindungsstrukturen, andererseits eine Typisierung der Axone in Nervenfaserbündeln.

Beim *in vitro*-Tracing färben sich nach einigen Wochen die gesamten Zellmembranen der an einer Injektionsstelle mit Fluoreszenzfarbstoff kontaktierten Neurone. Demgegenüber zeigen retro- und anterogrades Axon-Tracing auch die Richtung der Signalübertragung. Früher nutzte man dazu läsionsbedingte Degenerationseffekte. – Für das moderne **retrograde Axon-Tracing**, das klärt, woher ein Hirnteil Fasern erhält, injiziert man *in vivo* z. B. das Enzym Meerrettichperoxidase, das vorwiegend von Axonendigungen aufgenommen und durch axonale ↑Transport-Mechanismen entgegen der Signalausbreitung den Zellkörpern zugeführt wird. Das Enzym enthaltende Zellkörper erscheinen dann im nach einigen Tagen entnommenen und speziell behandelten Gewebe farbig gesprenkelt. Ähnliche Tracing-Ergebnisse liefern in Latexkügelchen applizierte Fluoreszenzfarbstoffe. – Für das **anterograde Axon-Tracing**, das klärt, welche Neurone von einem Hirnbereich synaptisch angesprochen werden, injiziert man dort *in vivo* Tritium-markierte Aminosäuren, die selektiv

von Zellkörpern aufgenommen, in Proteine eingebaut und durch axonalen Transport in Signal-ausbreitungsrichtung an die Axonendigungen gelangen. Nach Präparation werden die radioaktiv markierten Aminosäuren autoradiographisch (β -Zerfall) sichtbar gemacht. Auch hierfür gibt es neuerdings Fluoreszenzfarbstoffe.

Zunehmend Anwendung finden weitgehend proteinspezifische **immunhistochemische Färbungen**. Sie beruhen auf Antikörpern gegen z. B. Endorphine – eine Gruppe von Neuropeptiden – oder Enzyme, die am Auf- oder Abbau von \uparrow Neurotransmittern beteiligt sind, aber auch Strukturproteine, die u. a. \uparrow Ionenkanäle bilden. Antikörper wenden sich gegen artfremde Proteine und werden daher in anderen Tierarten gewonnen, mit einem radioaktiven oder fluoreszierenden Marker gekoppelt und auf das zu untersuchende Gewebe gebracht, wo sie an das Protein binden.

Mit der ***in situ*-Hybridisierung** – einer genetischen Methode – lassen sich Neurone markieren, die spezifische Proteine auch tatsächlich synthetisieren, und zwar indem die von der doppelsträngigen DNA des \uparrow Zellkerns abgeleitete Synthesevorschrift – die einsträngige *messenger*-RNA (mRNA) – sichtbar gemacht wird. Hierzu stellt man aus vervielfachter DNA *in vitro* radioaktiv markierte „Gegenstücke“ zur mRNA, also komplementäre Sequenzen, her. Beide Molekülstränge verbinden sich im Präparat, so daß ein *in situ*-Hybrid entsteht – ein Doppelstrang aus mRNA und radioaktiv markiertem komplementären DNA-Strang – dessen Verteilung man autoradiographisch darstellt.

Ein wichtiges Verfahren der funktionalen Neuroanatomie ist die stoffwechselabhängige ^{14}C -**Desoxyglucose** Markierung. Diese nur schwer abbaubare radioaktive Glucose wird *in vivo* injiziert und akkumuliert in Bereichen erhöhter neuronaler Aktivität. Die Glukoseverteilung wird im später präparierten Gewebe autoradiographisch (β -Zerfall) registriert. Funktionsbezogen sind auch **Calcium-Färbungen**, weil Ca-Ionen vielfältige Transmitterfunktionen erfüllen.

II Brain Imaging

Die meisten bildgebenden Verfahren (*brain imaging*) sind wesentlich neuroanatomische Methoden, die im Gegensatz zu den vorgenannten auch am funktionsfähigen Gehirn anwendbar sind. Die Anfang der 1970er Jahre realisierte transaxiale **Röntgen-Computertomographie (CT)** beruht – wie jede gewöhnliche Röntgenaufnahme – auf der, abhängig von der röntgenoptischen Dichte des Gewebes, unterschiedlich starken Absorption oder Streuung von Röntgenstrahlen. Bei der CT werden unter vielen Richtungen eindimensionale Röntgenaufnahmen (Projektionen) einer Hirnschicht gemacht. Aus den umfangreichen Daten läßt sich nach Maßgabe raffinierter mathematischer Transformationen mit leistungsfähigen Computern ein Bild der Schicht (Tomogramm), also ein zweidimensionaler „Gehirnschnitt“, rekonstruieren. Darin lassen sich, trotz der starken Absorption durch den Schädelknochen, graue und weiße \uparrow Substanz, Blut und Cerebrospinalflüssigkeit unterscheiden. Die minimale Schichtdicke beträgt etwa 1 mm, die örtliche Auflösung der Tomogramme bis zu 0,5 mm. Bei Meßzeiten ≥ 1 s liefert die übliche CT also Bilder der Hirnstruktur. Dagegen erlauben die im folgenden beschriebenen Methoden auch Aussagen über Hirnfunktionen. Bei der **Positronen-Emissionstomographie (PET)** wird mit CT-ähnlichen Rekonstruktionsverfahren die Verteilung injizierter und selektiv vom Gewebe aufgenommener Radioisotope aufgezeichnet. Geeignete kurzlebige Isotope wie ^{15}O , ^{11}C , ^{13}N , ^{18}F , zerfallen unter Aussendung von Positronen, die mit Elektronen rasch zu zwei γ -Quanten zerstrahlen, die etwa entgegengesetzt wegfliegen und detektiert werden. Neben der Proteinsynthese und der Verteilung einiger Neurorezeptortypen lassen sich mit der PET – ähnlich der Desoxyglucose-Methode (siehe Neuroanatomie) – der Glucose-Stoffwechsel und die lokale Durchblutung, also mittelbar die Hirnaktivität, darstellen. Gewöhnlich werden zeitlich (Meßzeiten < 1 min) und örtlich aufeinanderfolgende Schichtbildsequenzen erzeugt, wobei sich Aktivitätsänderungen mit einer räumlichen Auflösung von etwa einem halben Zentimeter nach-

weisen lassen – besser als bei der nichtinvasiven Elektro- und Magnetoencephalographie (siehe Neurophysiologie). – Durch diese Eigenschaften wurde die PET auch zu einem neuropsychologischen Instrument. So versucht man Hirnregionen zu ermitteln, die während spezifischer kognitiver Leistungen wie Hören, Lesen oder Aussprechen von Worten aktiv sind. Die Darstellung der an einer Hirnleistung beteiligten Areale erfordert – nicht zuletzt wegen der Meßdauer – die Subtraktion der vermutlich unspezifischen „Hintergrundaktivität“, die zu bestimmen mit zunehmender Komplexität der Tätigkeit schwieriger wird. Zudem wird meist über Differenzbilder verschiedener Versuche sowie unterschiedlicher Personen gemittelt.

Ein weiteres rechnergestütztes bildgebendes Verfahren ist das **MRI** (*magnetic resonance imaging*), auch **NMR-Tomographie** (*nuclear magnetic resonance* oder *Kernspinresonanz*) genannt. Es beruht auf der Ausrichtung der magnetischen Momente körpereigener Atome mit Kernspin, wie Wasserstoff, Kohlenstoff und Phosphor, in einem Magnetfeld. Durch einen Radiowellenimpuls passender Frequenz werden die Spins ausgelenkt und präzessieren. Danach kehren sie unter Aussendung von Radiowellen in ihre Ausgangslage zurück (Relaxation). Frequenz und Amplitudenverlauf der Emission hängen von der Stärke des Magnetfeldes und empfindlich von der Nachbarschaft der untersuchten Atomkerne – meist Protonen – ab. Mit ortsabhängigen Magnetfeldern und Radiowellenfrequenzen kann man Meßdaten für Schnittbilder fast beliebiger (Winkel-)Lage erzeugen. – Neben den anatomischen gewinnen funktionale Aspekte an Bedeutung (**fMRI**, *functional MRI*). So läßt sich z. B. aufgrund geringfügig geänderter magnetischer Eigenschaften des Hämoglobins die erhöhte venöse Sauerstoffkonzentration in Gebieten hoher neuronaler Aktivität nachweisen. (Es erhöht sich die Durchblutung und damit die Sauerstoffzufuhr, doch schalten die Neurone auf anaeroben Stoffwechsel, so daß der venöse Sauerstoffgehalt steigt.) – Das MRI hat mehrere Vorteile gegenüber der CT oder der PET: (i) Es erlaubt – wie die PET – anatomische und funktionale Aussagen.

(ii) Es nutzt Signale aus dem darzustellenden Gewebe und erfordert weder radioaktive Substanzen noch ionisierende Strahlung. (iii) Die räumliche Auflösung ist mit typisch 0,5 mm höher als bei der PET. (iv) Mit spezieller Ausstattung läßt sich z. B. die zeitliche Änderung der Sauerstoffkonzentration verfolgen. Man ist aber noch weit davon entfernt, in den Zeitbereich von etwa 10 ms vorzudringen, in dem Hirngebiete Signale austauschen. (Änderungen der Sauerstoffkonzentration treten erst etliche 100 ms später auf.) Ergänzend braucht man daher noch die räumlich schlecht, zeitlich aber hochauflösende Elektro- oder Magnetoencephalographie.

III Neurophysiologie

Aufgabe der Neurophysiologie ist die Untersuchung der Nervensystemfunktion. Man versucht also örtlich-zeitliche Vorgänge durch Messung molekularer, elektrischer und magnetischer Signale im lebenden Substrat auf unterschiedlichen Skalen zu erfassen. Mit Ausnahme der Elektro- und Magnetoencephalographie (↑EEG, MEG) sowie der bildgebenden Verfahren (siehe Brain Imaging) geschieht dies bei Tieren invasiv *in vivo* oder an entnommenem Gewebe oder Zellkulturen *in vitro*. Folgende **Präparationstechniken** sind dabei zu unterscheiden: (i) Tiere im akuten Versuch sind narkotisiert und paralysiert oder relaxiert. Sie werden folglich künstlich beatmet und ihr Kreislauf wird stabilisiert. Gezielte Elektroden-Positionierungen sind dabei prinzipiell möglich. Die Ableitdauer hängt vom Zustand des Tieres und des Gewebes oder der Zelle ab. Intrazelluläre Ableitungen gelingen wegen Bewegungen selten und wenn, dann nur kurzzeitig. (ii) Chronisch implantierte Elektroden erlauben Messungen am sich verhaltenden Tier. (iii) Nervengewebe in Dickschnitten (*slices*) oder Zellkulturen bleiben in temperierter, osmotisch korrekter Nährlösung bei guter Sauerstoffversorgung und auf geeignetem Substrat bis zu einigen Wochen weitgehend funktionstüchtig. Sie ermöglichen daher intrazelluläre Ableitungen über längere Zeiträume. Weil der natürliche Gewebekontext fehlt und es kaum gelingt, das Ionen- und Neuromodulator-Milieu *in vitro* realistisch

nachzubilden, sind zumindest quantitative Schlüsse auf Funktionen *in situ* bedenklich. Zudem können sogar bei vollständig entwickelten Zellen Wachstum und Synapsenbildung auftreten. Embryonales Gewebe erlaubt die Beobachtung neuronaler Strukturierung, u. a. der Verbindungsbildung zwischen getrennt entnommenen Hirnteilen (Cokultur), z. B. zwischen \uparrow Retina und Tectum (\uparrow Sehsystem; \uparrow Gehirn, Aufbau des).

Nach der Präparation wendet man meist eine der folgenden Meßtechniken an.

1. Die bislang wichtigsten neurophysiologischen Methoden sind die der **Elektrophysiologie**, bei denen elektrische Signale des Hirns gemessen werden. Häufig untersucht man evozierte oder ereignisbezogene neuronale Aktivität, die bei kontrollierter Sinnesreizung und elektrischer oder biochemischer Nervenreizung auftritt.

1.1. **Ableitung neuronaler Massenaktivität.** Großflächige oder gar extracorporale (EEG-) Elektroden liefern räumlich gewichtete Summenaktivitäten von bis zu mehreren Millionen Zellen. Übliche Bandpaßauszüge solcher Meßsignale aus dem Bereich 0,5 bis 200 Hz zeigen den Zeitverlauf örtlich summierter Ströme in Zellkörpern und \uparrow Dendriten als sogenannte Feldpotentiale (FP). Die Signalamplituden der sehr hochohmigen Quellen liegen im 100 μ V-Bereich. Beispiele für FP sind das \uparrow EEG – also die Aufzeichnung spontaner, meist rhythmischer Potentialschwankungen im klassischen Frequenzbereich 0,5 bis 25 Hz sowie **ereignisbezogene** und **evozierte Potentiale** – winzige aperiodische Signale, die man durch digitale Mittelung aus dem EEG extrahiert. Bandpaßgefilterte (1 bis 10 kHz), gleichgerichtete und auf unter 200 Hz tiefpaßbegrenzte lokale Summensignale einiger hundert bis tausend Zellen zeigen im wesentlichen die geglättete Impulsaktivität (*multiunit activity*, MUA).

1.2. **Ableitung von Einzelzellaktivität.** Glaskapillar- oder Metallspitzen-Elektroden (Mikroelektroden mit freien Spitzen von 0,1 bis 10 μ m) erlauben die Aktivität weniger, mitunter auch einzelner Nervenzellen zu erfassen. (i) Bei fast

allen Ableitungen *in vivo* befindet sich die Elektrodenspitze nicht in einer Zelle, sondern extrazellulär, so daß im wesentlichen ihre \uparrow Spikeaktivität erfaßt wird. Weil diese auch von Nachbarzellen stammen kann, wird z. B. mit Amplitudenfenstern oder über Signaldifferenzen mehrläufiger Elektroden versucht Einzelzellaktivität zu extrahieren. Bei Messungen mit derzeit bis zu hundert Elektroden stellt sich das Problem der Positionierung und der Datenauswertung. (ii) Intrazelluläre Ableitungen erfordern unbewegtes Gewebe und hinreichend große Zellstrukturen. Sie liefern elektrotonische und impulsförmige Zellsignale. Mittels elektronischer Schaltungen kann man das Zellpotential oder den Membranstrom konstant halten (*voltage/current clamp*) und folglich Netto-Membranströme bzw. Zellpotentialänderungen unabhängig vom nichtlinearen Membranleitwert bestimmen. (iii) Über Glasmikroelektroden, die spezielle Ionen enthalten, läßt sich das intrazelluläre Milieu gezielt ändern (Iontophorese) und, mit ionensensitiven Medien gefüllt, bestimmt man die intra- oder extrazelluläre Konzentration einer Ionensorte.

1.3. **Untersuchung isolierter Membranprozesse.** Die *patch clamp*-Technik erlaubt die Untersuchung subzellulärer bioelektrischer Vorgänge, wie die Steuerung des Ionenflusses durch einzelne Membrankanäle. Dabei wird ein winziger Membranbereich durch eine feine Glaskapillare angesaugt und so vom Extrazellulärmedium isoliert oder gar von der Zelle abgetrennt. Die Kapillare dient außerdem als Elektrode und der Zuführung von Ionen und Pharmaka.

2. Das MEG ist die Aufzeichnung schwacher Magnetfelder im Gehirn, die durch Bewegung elektrischer Ladungen entstehen. Die Messung geschieht mit gekühlten Detektoren, sogenannten SQUIDS (*superconducting quantum interference devices*), mit denen sich extrem schwache Felder < 1 pT (weniger als der zehnmillionste Teil des Erdmagnetfeldes) nachweisen lassen. Weil die MEG bevorzugt tangential, die EEG überwiegend radial zur Schädeldecke orientierte elektrische Quellen (Dipole) erfaßt, ergänzen sich die Verfahren, wobei die MEG räumlich besser auflöst.

3. Optische Verfahren

3.1. Optische Ableitungen (*optical recording*).

Die opto-elektronische Erfassung aktivitätsabhängiger Änderungen der optischen Dichte oder Polarisation von Zellen (intrinsische Signale) oder applizierter spannungsabhängiger Farbstoffe liefert hochaufgelöste Bilder neuronaler Aktivität an der sichtbaren Oberfläche von Gehirnen oder an Gewebe *in vitro*. Spannungsabhängige Farbstoffe liefern brauchbaren Kontrast bei kurzer Ansprechzeit, sind aber toxisch; intrinsische Signale sind äußerst klein, träge und erfordern aufwendige elektronische Bildsensoren sowie digitale Bildmittelung, Hintergrundsubtraktion etc., die die Aufzeichnung experimentell nicht kontrollierbarer Aktivität erschweren.

3.2. **Infrarot-Videomikroskopie (IVM)**. Wegen der Durchdringungsfähigkeit infraroter Strahlung macht diese moderne Methode Zellen auch in vergleichsweise dicken Präparaten detailliert sichtbar. Sie erlaubt die Erregungsausbreitung im Gegensatz zu 3.1. auch in oberflächenfernen Bereichen zu studieren und Zellausläufer unter direkter visueller Kontrolle mit der *patch clamp*-Technik zu untersuchen.

4. **Substitutionsexperimente**. Nach Gabe von Pharmaka auftretende Funktionsstörungen können Aufschluß über Rezeptormoleküle und Neuronentypen geben.

5. **Läsions- oder Ausschaltungsverfahren**. Von Funktionsstörungen, die nach reversiblen (Kühlung) oder irreversiblen (\uparrow Läsion) lokalen Eingriffen auftreten, erhofft man sich Aufschluß über funktionale Beiträge der lädierten Struktur.

Psychophysische Experimente erfordern kontrollierte Reizbedingungen, also selektive sensorische Reize und möglichst konstante endogene Bedingungen (Befindlichkeit, Emotion, Kognition). Die Messung von Empfindungen geschieht dann anhand physikalischer Reizskalen, die mit der Messung physikalischer Eigenschaften an Empfindungen vergleichbar ist.

H. Glünder & A. Bibbig

Gordon, R., Herman, G. T. & Johnson, S. A. (1975) Image reconstruction from projections. *Scientific American*, 233, 56-68.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessel, T. M. (Hg.) (1995) *Neurowissenschaften*. Heidelberg: Spektrum.

Nauta, W. J. H. & Feirtag, M. (1990) *Neuroanatomie: eine Einführung*. Heidelberg: Spektrum.

Posner, M. I. & Raichle, M. E. (1996) *Bilder des Geistes. Hirnforscher auf den Spuren des Denkens*. Heidelberg: Spektrum.

Pykett, I. L. (1982) Kernspintomographie: Röntgenbilder ohne Röntgenstrahlen. *Spektrum der Wissenschaft*, no. 7, 40-55.

Stevens, S. S. (1986) *Psychophysics*. Somerset/NJ: Transaction Publishers.

Ter-Pogossian, M. M., Raichle, M. E. & Sobel, B. E. (1980) Tomographie mit radioaktiv markierten Substanzen. *Spektrum der Wissenschaft*, no. 12, 121-133.

IV Psychophysik

Mit Methoden der \uparrow Psychophysik versucht man Empfindungen zu objektivieren und zu quantifizieren. Dazu konfrontiert der Versuchsleiter eine Versuchsperson mit physikalisch wohldefinierten Sinnesreizen, wobei ein oder mehrere Reizparameter wie Intensität, Dauer, Lage, Häufigkeit oder Größe variiert werden. Er fragt jeweils nach der Wahrnehmung der Reize und registriert die Antworten der Versuchsperson. Es werden sowohl **absolute Wahrnehmungsschwellen** als auch **Unterschiedsschwellen** bestimmt.

Wörterbuch der Kognitionswissenschaft

Herausgegeben von Gerhard Strube
zusammen mit Barbara Becker, Christian Freksa,
Udo Hahn, Klaus Opwis, Günther Palm

1996

Klett-Cotta