

Aus dem Department für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Pathologie

(Leiter: Dipl. ECPHM Univ.-Prof. Dr. med. vet. Herbert Weissenböck)

Konstruktion eines dreidimensionalen Modells des Gehirns eines Hundeembryos mittels
 μ CT-Aufnahmen

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Sarah Bianca Schmitz

Wien, im Juni 2020

Betreuerin: Gabner, Simone, Dr. med. vet. PhD.

Institut für Pathologie

Gutachter: Prof. Dr. Ch. Mülling

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1. Embryonale Entwicklung des Gehirns	1
1.1.1. Telencephalon	3
1.1.2. Diencephalon	4
1.1.3. Mesencephalon	5
1.1.4. Metencephalon	5
1.1.5. Myelencephalon	6
1.2. Fragestellung	7
2. Material und Methode	8
3. Ergebnisse	10
3.1. Darstellung der Embryonen und deren Entwicklungsstadium	10
3.2. Entwicklungsstadium des Gehirns	11
3.3. Dimensionen des Gehirns	17
4. Diskussion	18
4.1. Alter der Hundeembryonen	18
4.2. Dimensionen des Gehirns	19
4.3. Verwendung des 3D-Modells für die Lehre	20
5. Zusammenfassung	21
6. Summary	22
7. Literaturverzeichnis	23

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Embryonale Entwicklung des Gehirns

Aus dem Ektoderm entwickelt sich unter Einfluss der *Chorda dorsalis* das erste Neuroepithel. Dies findet bei den Haustieren gegen Ende der dritten Woche der embryonalen Entwicklung statt. Das Epithel formt die Neuralplatte, die sich über die Neuralrinne zum Neuralrohr umbildet. Aus dessen cranialem Ende entsteht im weiteren Verlauf das Gehirn (McGeedy et al. 2017, Rüsse und Sinowatz 1991).

Am cranialen Ende um den *Neuroporus anterior* bildet sich das rundliche Archencephalon (Urhirn) und weiter caudal das längliche Deuterecephalon (Zweithirn). Der Übergangsbereich zwischen diesen beiden Bläschen proliferiert weiter und bildet das Mesencephalon (Mittelhirn) (Rüsse und Sinowatz 1991).

So entwickelt sich aus den primären zwei Gehirnbläschen das Dreibläschenstadium. Hierbei werden die ursprünglichen zwei Bläschen umbenannt. Cranial liegt nun das Prosencephalon (Vorderhirn), mittig das Mesencephalon (Mittelhirn) und caudal das Rhombencephalon (Rautenhirn) (Abb. 1A) (Hyttel et al. 2010). Durch Weiterentwicklungen dieser drei Bläschen enthält man später fünf Bläschen: das Telencephalon, das Diencephalon, das Mesencephalon, das Metencephalon und das Myelencephalon (Abb. 1C). Das Prosencephalon wird zu Telencephalon und Diencephalon, während sich das Rhombencephalon noch weiter in das anterior liegende Metencephalon und das ans Rückenmark angrenzende Myeloencephalon teilt (Hyttel et al. 2010).

Neben den Bläschen führen drei Flexuren dazu, dass das Gehirn seine spätere Gestalt erhält. Die craniale *Flexura cephalica* (Abb. 1B) erreicht beim Hund ungefähr am Tag 17 einen rechten Winkel zwischen Prosencephalon und Mesencephalon. Die *Flexura cervicalis* (Abb. 1B) markiert den Übergang des Rhombencephalons ins Rückenmark und ist beim Hund ab dem 18.Tag sichtbar. Die *Flexura pontina* (Abb. 1C) liegt im Rhombencephalon und bedingt ein Auseinanderziehen der lateralen Wände des Rhombencephalons, sodass an dessen Dach die namensgebende Raute entsteht. Diese Flexur tritt beim Hund erst am 21.Tag in Erscheinung und erreicht am 25.Tag einen rechten Winkel (Houston 1968, Hyttel et al. 2010).

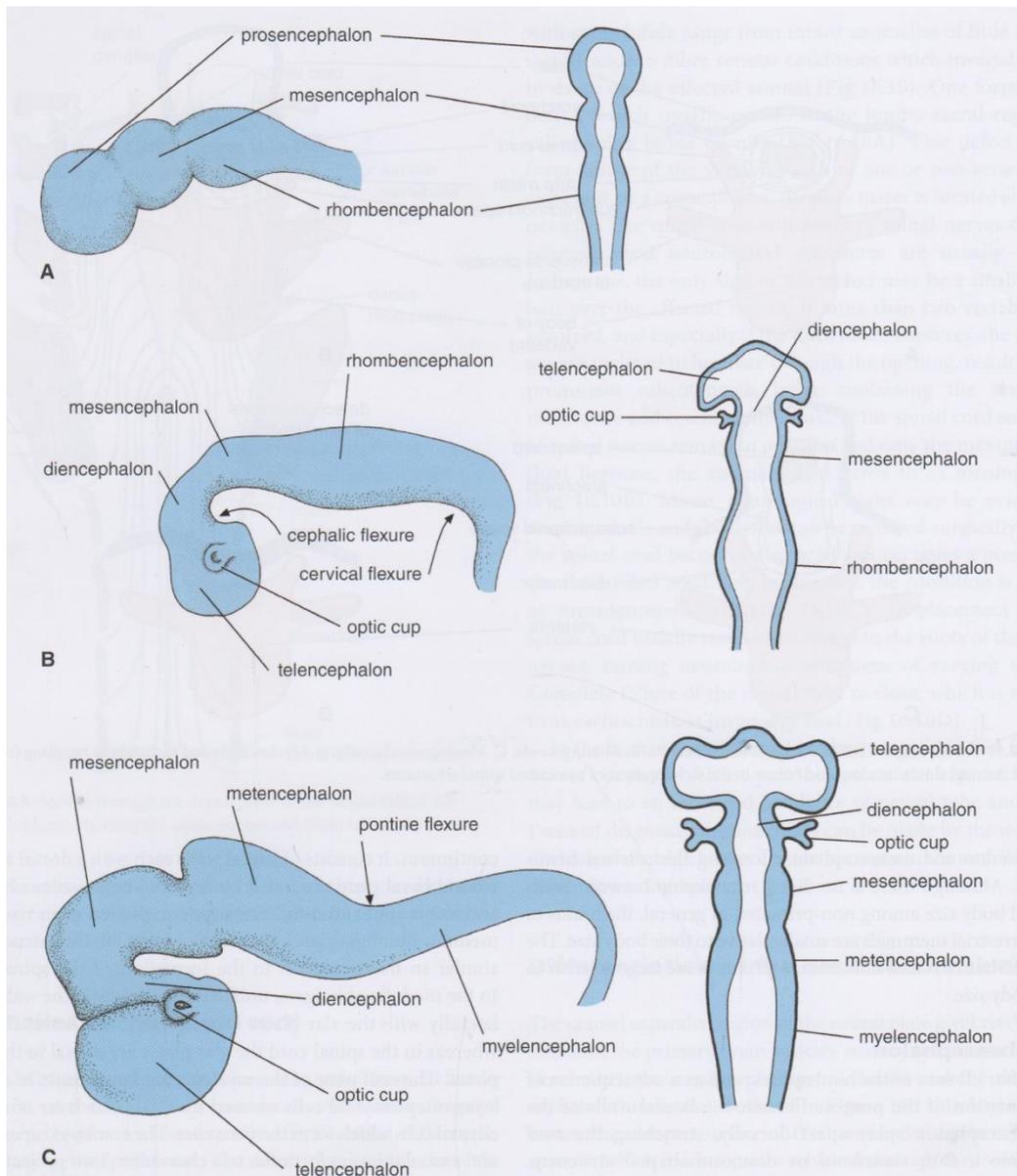


Abb. 1. Lateralansicht und dorsaler Längsschnitt durch das Gehirn während des Drei-Bläschen-Stadiums (A) mit Lokalisation der *Flexura cephalica* und *Flexura cervicalis* (B) während des Fünf-Bläschen-Stadiums mit Lokalisation der *Flexura pontina* (C).

Cephalic flexure=*Flexura cephalica*, cervical flexure=*Flexura cervicalis*, optic cup=Augenbecher, pontine flexure=*Flexura pontina* (McGeady et al. 2017).

1.1.1. Telencephalon

Das Telencephalon (Endhirn) differenziert sich genauso wie das Diencephalon aus dem Prosencephalon. Anzeichen hierfür lassen sich beim Hund gegen Ende des 18. Trächtigkeitstages bei 20 Somitenpaaren erkennen (Houston 1968). Das Telencephalon entsteht aus dem cranialsten Teil des geschlossenen Neuralrohrs, der *Lamina terminalis* und zwei lateral daran anliegenden Divertikeln. Diese Divertikel wachsen zunächst nach rostral, bevor sie weiter nach dorsal, nach caudal und zuletzt wieder nach rostral wachsen und die Hemisphären und die darin liegenden C-förmigen Seitenventrikel (Abb. 2) bilden. Zum Ende ihres Wachstums überdecken die Hemisphären dorsal und lateral einen Großteil des Gehirns und reichen bis zum vorderen Teil des Metencephalons. Am lateralen Boden der Hemisphären wird durch vermehrte Zellproliferation das *Corpus striatum* gebildet (Abb. 2). An der medialen Oberfläche der Hemisphären entsteht der in beiden Seitenventrikeln vorhandene *Plexus choroideus* durch Überlagerung mit der gut vaskularisierten *Pia mater* (Abb. 2). An der ventromedialen Wand der Hemisphärenbläschen entwickelt sich durch eine Verdickung der Hippocampus. Rostral bilden sich die *Bulbi olfactorii*, die mit den Riechepithelien über Axone in Verbindung stehen. Zunächst ist die Oberfläche der Hemisphären noch glatt, erst gegen Ende der Trächtigkeit entwickeln sich durch das unterschiedlich schnelle Wachstum von Kortex und weißer Substanz *Gyri*, *Fissurae* und *Sulci* (McGeedy et al. 2017, Hyttel et al. 2010).

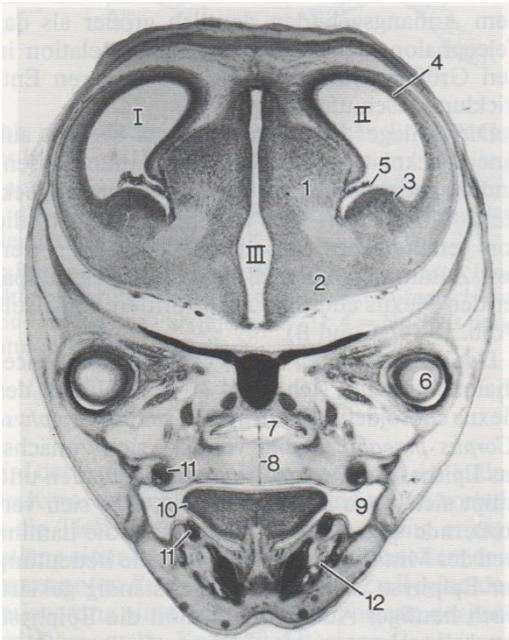


Abb. 2. Frontalschnitt durch den Kopf eines Hundeembryos. I und II=Seitenventrikel; III=3.Ventrikel, 1=Thalamus, 2=Hypothalamus, 3=*Corpus striatum*, 4=Großhirnhemisphären, 5=*Plexus choroideus*, 6=Auge, 7=Nasenhöhle, 8=Naht der lateralen Gaumenfalten, 9=Mundhöhle, 10=Zunge, 11=Zahnanlage, 12=Unterkiefer (Rüsse und Sinowatz 1991).

1.1.2 Diencephalon

Das Diencephalon (Zwischenhirn) entsteht aus dem hinteren Teil des Prosencephalon. Durch eine Verdickung der Wände kommt es zur Ausbildung von drei paarig angelegten Schwellungen. Aus den am weitesten ventral gelegenen Schwellungen entwickelt sich der Hypothalamus durch die Verschmelzung seiner beiden Anlagen. In der neu entstanden Region bilden sich viele *Nuclei*, welche für eine Vielzahl von Regulationsmechanismen des Körpers zuständig sind (Hyttel et al. 2010). Mittig ventral gelegen bilden sich paarige Vorsprünge für die *Corpora mamillaria*. Ventral lagert sich die Rathke-Tasche, eine Ausbuchtung der Buccopharyngealmembran, an den Boden des Hypothalamus (Abb. 3) und stimuliert dort das Wachstum (Kingsbury und Roemer 1940). Es bildet sich der Hypophysenstiel, *Infundibulum*, der die Vorstufe der Neurohypophyse darstellt. Nach wenigen Tagen bildet sich der *Canalis craniopharyngeus*, die Verbindung der Rathke-Tasche zur Mundhöhle, wieder zurück (Abb. 3). Die Rathke-Tasche entwickelt sich weiter zur Adenohypophyse und das *Infundibulum* zur Neurohypophyse. Zusammen bilden sie die Hypophyse (Hyttel et al. 2010, Rüsse und Sinowatz 1991).

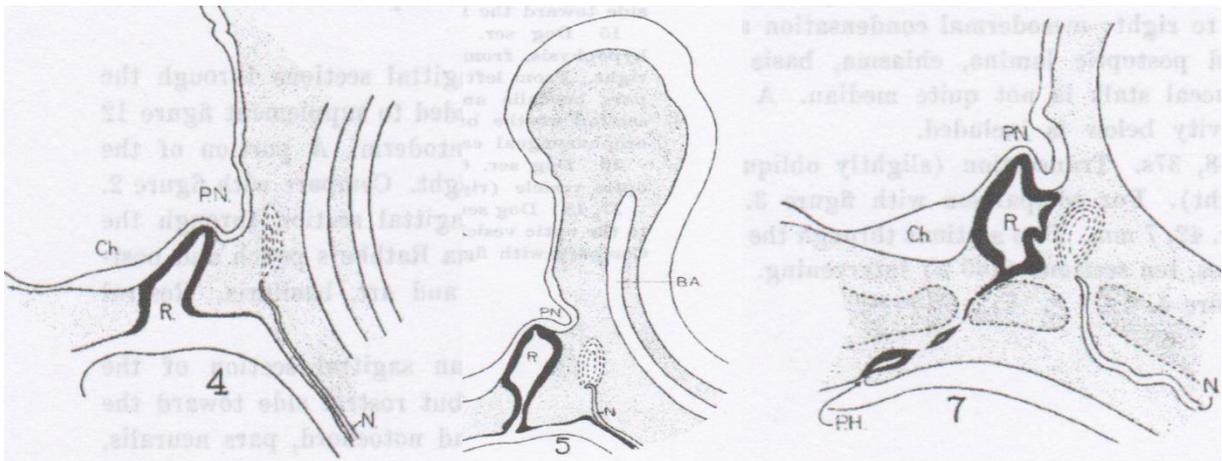


Abb. 3. Entwicklungsstadien der Hypophyse des Hundes.

4. Ausstülpung der Rathke-Tasche und Beginn der Vorwölbung des *Pars neuralis* (Neurohypophyse) aus dem Diencephalon

5. Einengung des *Canalis craniopharyngeus*

7. Die Verbindung zur Mundbucht, der *Canalis craniopharyngeus*, ist nicht mehr durchgängig

Ch=Anlage des *Chiasma opticus*, N=Chorda dorsalis, PN=Pars neuralis der Hypophyse, R=Rathke-Tasche (Kingsbury und Roemer 1968)

Von der Anlage des Hypothalamus durch den *Sulcus hypothalamicus* getrennt, liegt die Anlage des Thalamus (Hyttel et al. 2010). Bevor dieser als getrennte Anlage zu erkennen ist, haben sich beim Hund schon um den 17. Trächtigkeitstag die Augenbläschen an den lateralen Wänden des Diencephalons gebildet. Diese bilden die Vorstufe der Augen (Houston 1968). Die beiden thalamischen Ausbuchtungen proliferieren sehr schnell und wachsen aneinander. Der Hohlraum in ihrer Mitte ist der dritte Ventrikel (Abb. 2) und steht über die *Foramina interventricularia* mit den Seitenventrikeln in Verbindung (Hyttel et al. 2010).

In der dorsalen Schwellung, dem Epithalamus, formt sich ein kleines Divertikel, das sich zur Epiphyse, Zirbeldrüse, entwickelt, die später für den Melatoninstoffwechsel zuständig ist (Hyttel et al. 2010).

1.1.3. Mesencephalon

Das Mesencephalon verändert sich nicht so stark, wie die anderen Gehirnteile (McGeady et al. 2017). Beim Hund zeigt es zwischen dem 19. und 25. Tag vorrangig ein Längenwachstum, wobei es seine rundliche Form beibehält (Houston 1968). Durch das Wachstum verengt sich der Neuralkanal zum *Aquaeductus mesencephali*, der die Verbindung zwischen drittem und viertem Ventrikel darstellt. Im Querschnitt befinden sich im dorsalen Teil die Flügelplatten, aus denen die Vierhügelplatte mit ihren vier *Colliculi* hervorgeht. Weiter ventral liegen die Grundplatten, sie entwickeln sich zum einen in das *Tegmentum* und in die zwei lateral gelegenen *Crura cerebri*. Im *Tegmentum* befinden sich die Kerne des *Nervus oculomotorius*, des *Nervus trigeminus* und des *Nervus trochlearis*. Die *Crura cerebri* enthalten Nervenfasern, die den cerebralen Cortex mit dem *Pons* und dem Rückenmark verbinden (McGeady et al. 2017, Rüsse und Sinowatz 1991).

1.1.4. Metencephalon

Cranial der *Flexura pontina* entfaltet sich das Metencephalon (Hinterhirn). Es enthält in seinen Wänden lateral die Flügelplatten und medial die Grundplatten. Aus dem ventralen Anteil des Metencephalons bildet sich die Brücke, *Pons*. Sie enthält somatomotorische Kerne des *Nervus abducens* und viszeromotorische Kerne des *Nervus facialis* und *Nervus trigeminus*. Die dorsalen Anteile der Flügelplatten bilden das Kleinhirn, *Cerebellum*. Durch die Biegung der *Flexura pontina* bilden die dorsolateralen Anteile der Flügelplatten die sogenannten Rautenlippen. Aus deren cranialer Portion geht die Kleinhirnplatte durch eine weitere Vertiefung der *Flexura pontina* hervor. Zu Beginn der fetalen Periode dehnt sich die

Kleinhirnplatte nach dorsal hantelförmig aus. Der zentral gelegene Teil wird zum *Vermis*, Kleinhirnwurm, von dessen caudalem Teil sich zu einem späteren Zeitpunkt durch eine Furche noch der *Lobus flocculonodularis* differenziert. Die lateralen Anteile entwickeln sich zu den Kleinhirnhemisphären. Sie proliferieren sehr stark und ihre Oberfläche legt sich dabei in enge, parallele, transversale Falten, die *Folia cerebelli*. Die Entwicklung des Kleinhirns ist davon abhängig wie schnell sich die Tiere *postnatal* selbstständig fortbewegen. So differenziert sich der zerebrale Kortex bei Hundewelpen erst *postnatal* (Hyttel et al. 2010, Rüsse und Sinowatz 1991).

1.1.5. Myelencephalon

Caudal der *Flexura pontina* entwickelt sich aus dem Rhombencephalon der am weitesten posterior gelegene Anteil des Gehirns, das Myelencephalon (Markhirn). Seine Deckplatte wird während der Entwicklung weit auseinandergezogen, bis nur noch eine einlagige Zellschicht mit einigen Ausbuchtungen bestehen bleibt, die als Dach über dem vierten Ventrikel liegt und den *Plexus choroideus* bildet. Wie im Metencephalon kommen die zunächst dorsal gelegenen Flügelplatten lateral der Grundplatten zu liegen. Somit liegen die sensiblen afferenten Nervenbahnen der Flügelplatten lateral der efferenten Nervenbahnen der Grundplatten (Abb. 4) (Hyttel et al. 2010). Zu den sensiblen Nervenbahnen der Flügelplatten zählen unter anderem die des *Nucleus dorsalis nervi vagi*, die des *Nucleus tractus solitarii* und des *Nervus vestibulocochlearis*. Der Kernbereich des *Nervus hypoglossus* und der *Nucleus ambiguus* befinden sich in den Grundplatten. Ventral der Grundplatten bildet sich der Olivenkernkomplex aus ausgewanderten Neuronen der Flügelplatten (Abb. 4) (Rüsse und Sinowatz 1991).

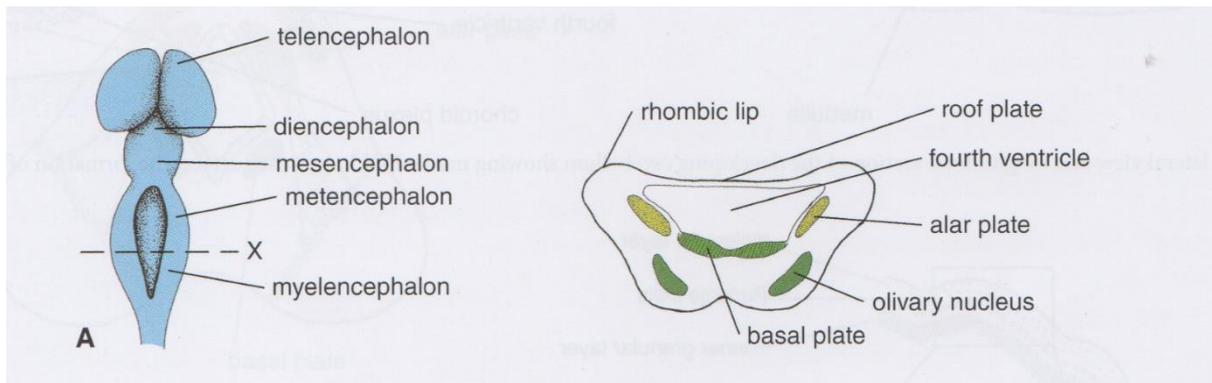


Abb. 4. Dorsalansicht des Gehirns (A) mit Querschnitt auf der Höhe des Myelencephalons. rhombic lip=Rautenlippe, roof plate=Dach, fourth ventricle=vierter Ventrikel, alar plate=Flügelplatte, olivary nucleus=Olivarenkernkomplex, basal plate=Grundplatte (McGeady et al. 2017).

1.2. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein dreidimensionales (3D) Modell des Gehirns inklusive der Hypophyse und des Ventrikelsystems eines Hundeembryos mittels micro-CT (μ CT) Analyse zu erstellen. Die Ausdehnung der einzelnen Hirnabschnitte wurde vermessen. Zusätzlich sollte das aus der Vorgeschichte unbekanntes Alter der Hundeembryonen basierend auf der allgemeinen Embryonalentwicklung sowie der Entwicklungsvorgänge im Gehirn bestimmt werden.

Die erstellten 3D-Modelle sollen den Studierenden der Veterinärmedizinischen Universität Wien auf der E-Learning-Plattform Vetucation® zur Verfügung zu stellen. Die Komplexität der embryologischen Entwicklung ist für Studierende allein durch histologische Schnitte und zweidimensionale Abbildungen schwer zu begreifen. Mit Hilfe des 3D-Modells des embryonalen Gehirns sollen sich die Studierenden Entwicklungen, wie die Entstehung der Hypophyse aus einer Ausstülpung des Rachendaches, besser vorstellen können. Die Gegenüberstellung ausgewählter histologischer Quer- und Längsschnitte des Gehirns mit den μ CT-Bildern soll die Lehre der Embryologie für die Studierenden ergänzen.

2. Material und Methode

Es wurden drei Formalin-fixierte (4 % Formaldehyd, nach Lillie, (Mulisch und Welsch 2015)) Embryonen aus dem Archiv des Departments für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien zur Verfügung gestellt. Die drei Embryonen stammen von der Ovariohysterektomie einer zwei jährigen Spaniel-Mischlingshündin. Weitere Informationen über die Embryonen liegen nicht vor.

Ein Embryo wurde für die μ CT-Untersuchungen über einen Zeitraum von 72 Stunden mit Phosphormolybdänsäure (1 % in 70 % Ethanol, VWR International, Radnor, PA) kontrastiert. Danach wurde er in einer 1,5%igen Agaroselösung mit niedrigem Schmelzpunkt in einem 50 ml Plastikbehälter eingebettet. Anschließend wurden die computertomographischen Aufnahmen angefertigt. Zunächst wurden 16 Probedbilder ohne den Embryo aufgenommen, um das auftretende Hintergrundrauschen im Nachhinein korrigieren zu können. Das μ CT (Xradia MicroXCT-400, Carl Zeiss X-ray Microscopy, Pleasanton, CA) arbeitete mit einem Programm bei einer Spannung von 80 kV, einer Leistung von 8 W und einer Stromstärke von 100 μ A. Dabei wurde ein LE-4 Glasfilter verwendet, um niederenergetische Röntgenstrahlung herauszufiltern. Die Belichtungszeit der tomographischen Bilder, die mit einer vierfachen Vergrößerung aufgenommen wurden, betrug 15 Sekunden. Die Voxelgröße wurde auf 6,86 μ m festgelegt.

Mithilfe der Amira Software 6.5.0. (FEI Visualization Sciences Group, Mérignac Cédex, France) wurde das Gehirn auf den tomographischen Bildern segmentiert. In jedem fünften Bild wurden die Konturen manuell nachgefahren und dazwischen interpoliert. Bei kleineren Strukturen wie der Hypophyse wurde jedes zweite Bild segmentiert. Nach dem Segmentieren wurden die Oberflächen geglättet und die Anteile des Gehirns manuell mit unterschiedlichen Farben markiert. Durch die unterschiedlichen Graustufen des Gehirns und der Ventrikel innerhalb der Bilder konnte das 3D-Modell der Ventrikel von der Software automatisiert erstellt werden. Die Länge (cranio-caudale Ausdehnung), Breite (latero-laterale Ausdehnung) und Höhe (ventro-dorsale Ausdehnung) der jeweiligen Gehirnabschnitte wurden am jeweiligen Punkt der maximalen Ausdehnung durch die Zählung der Pixel gemessen. Zusätzlich wurde die Scheitel-Steiß-Länge (SSL) des Embryos gemessen und die Anzahl der Somitenpaare gezählt.

Abschließend wurden die 3D-Modelle mit histologischen Schnitten, die im Vorfeld von Mitarbeitern der AG Histologie für Unterrichtszwecke hergestellt worden waren, verglichen. Dazu wurden die anderen beiden Embryonen in Paraffin eingebettet. Danach wurden 3 μ m dicke Serienschnitte hergestellt, auf Objektträger aufgezogen und anschließend mittels

Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Ein Embryo wurde längs und der zweite quer geschnitten. Insgesamt gab es 1053 Längsschnitte und 1133 Querschnitte. Diese histologischen Schnitte wurden mit Hilfe eines Lichtbildmikroskops (DMD108, Leica, Wetzlar, Deutschland) begutachtet und relevante Schnitte wurden zum Vergleich mit den μ CT-Aufnahmen ausgewählt und fotografiert.

3. Ergebnisse

3.1. Darstellung der Embryonen und deren Entwicklungsstadium

Die Färbung mit Phosphormolybdänsäure sorgte für einen guten Kontrast der einzelnen Strukturen in den μ CT-Aufnahmen, während die Hämatoxylin-Eosin-Färbung die Unterscheidung der verschiedenen Strukturen in den histologischen Schnitten möglich machte. So konnte man erkennen, dass alle drei Embryonen etwa gleich weit entwickelt waren. Bei allen waren die inneren Organe, wie Herz, Lunge, Leber, die Primordia der Nieren und das Gehirn schon differenziert. Auch der Magen-Darm-Trakt und die noch undifferenzierte Gonadenanlage waren gut zu erkennen. Allerdings zeigten alle drei Embryonen leicht unterschiedliche Neigungen hinsichtlich deren Einbettung, sodass kein 90° Winkel zwischen den Quer- und Längsschnitten der histologischen Präparate vorhanden war.

Der computertomographisch untersuchte Embryo (Abb. 5) zeigte eine SSL von 12,46 mm und 36 Somitenpaare.

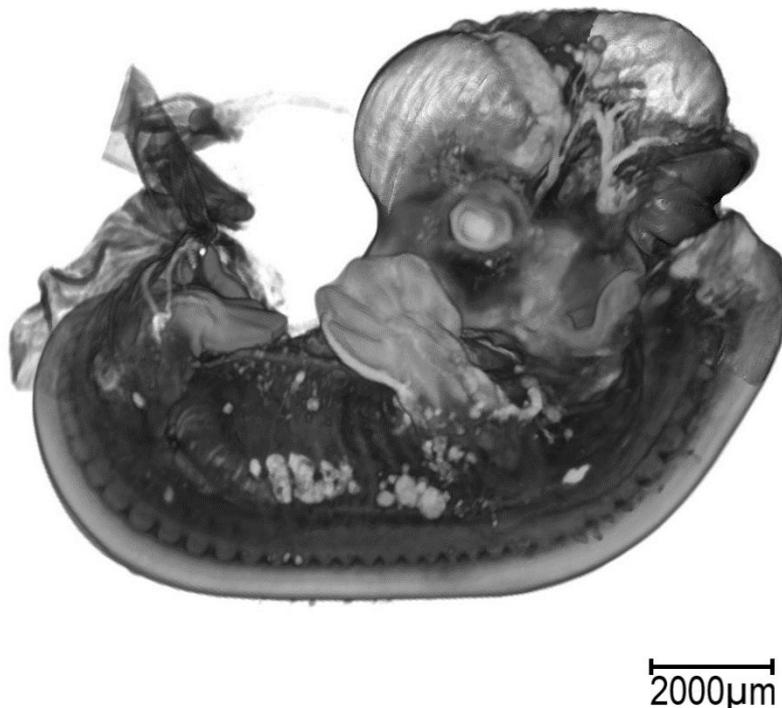
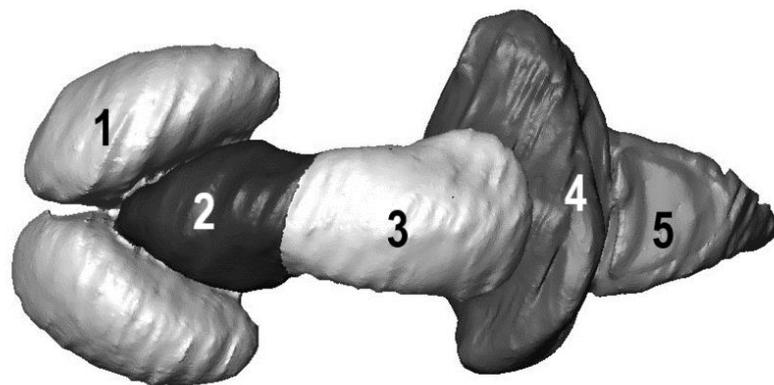


Abb. 5. Computertomographische 3D-Konstruktion des Hundeembryos, Lateralansicht.

3.2. Entwicklungsstadium des Gehirns

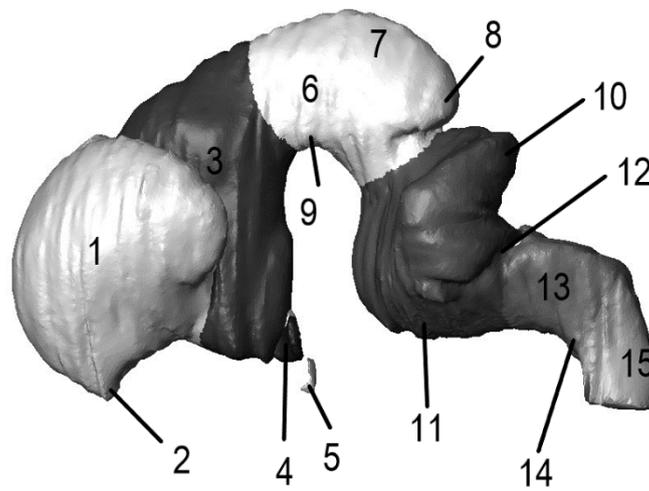
Die Embryonen zeigten ein Gehirn im Fünfbläschenstadium, das im 3D-Modell am besten nachzuvollziehen war (Abb. 6, 7). Die Telencephalon-Hemisphären überragten mit ihrer lateralen Ausdehnung circa die Hälfte des Diencephalons, dorsal überdeckten sie allerdings noch keinen Gehirnabschnitt (Abb. 6). Rostro-ventral an den Hemisphären waren die Anlagen der *Bulbi olfactorii* erkennbar (Abb. 7). Die *Flexura cephalica* war deutlich ausgeprägt (Abb. 7). Im Mesencephalon war die Anlage der Vierhügelplatte in Form der *Colliculi caudales* am caudalem Ende der Vierhügelplatte bereits vorhanden (Abb. 7).

Das Rhombencephalon hat sich in Metencephalon und Myelencephalon geteilt. Die von dorsal kommende *Flexura pontina* befand sich zwischen eben jenen Anteilen und hatte in etwa eine 90° Winkelung erreicht (Abb. 7). Im Metencephalon war ein frühes Entwicklungsstadium des *Cerebellums* von der *Pons* abgrenzbar (Abb. 7). Die Oberfläche des *Cerebellums* zeigte noch keine *Folia*. Die Hantelform des *Cerebellums* war noch nicht vollständig erreicht, aber eine laterale Ausdehnung schon deutlich erkennbar (Abb. 6). Das Myelencephalon war bereits durch die *Flexura cervicalis* vom Rückenmark abgrenzbar (Abb.7).



2000µm

Abb. 6. Dorsalansicht des 3D-Modells des Gehirns. 1=rechte Telencephalon-Hemisphäre, 2=Diencephalon, 3=Mesencephalon, 4=Metencephalon, 5=Myelencephalon.



2000µm

Abb. 7. Lateralansicht des 3D-Modells des Gehirns. 1=linke Telencephalon-Hemisphäre, 2=Anlage des *Bulbus olfactorius*, 3=Diencephalon, 4=Hypophyse, 5=*Canalis craniopharyngeus*, 6=Mesencephalon, 7=Anlage der Vierhügelplatte, 8=Anlage der *Colliculi caudales*, 9=*Flexura cephalica*, 10=Anlage des *Cerebellums*, 11=*Pons*, 12=*Flexura pontina*, 13=Myelencephalon, 14=*Flexura cervicalis*, 15=Rückenmark.

Ventral am Diencephalon war die Heranbildung der Hypophyse bereits deutlich zu erkennen (Abb. 7, 8). Der *Canalis craniopharyngeus* befand sich in den μ CT-Aufnahmen schon in Rückbildung während er in den histologischen Längsschnitten noch fast vollständig war (Abb. 8A, B).

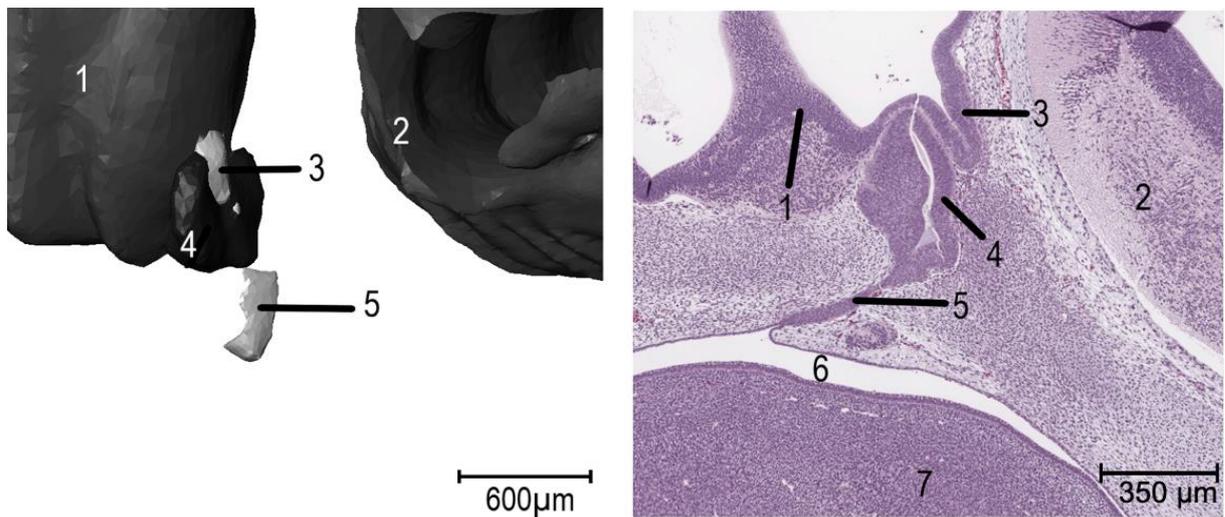
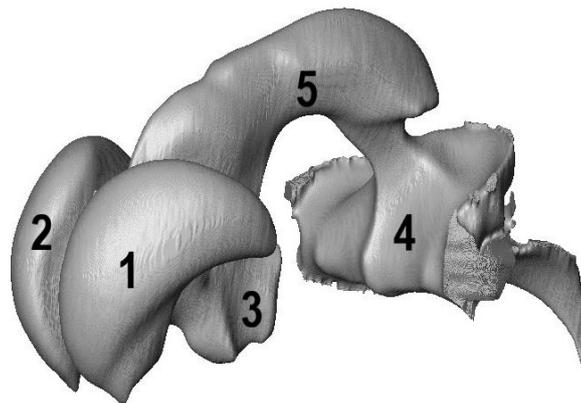


Abb. 8. 3D-Modell der Hypophyse (A) und histologischer Längsschnitt der Hypophyse (B). 1=Diencephalon, 2=Metencephalon, 3=Anlage der Neurohypophyse, 4=Anlage der Adenohypophyse, 5=*Canalis craniopharyngeus*, 6=Mundhöhle, 7=Zungenanlage.

Der erste und zweite Ventrikel, auch Seitenventrikel genannt, waren noch sehr groß, wiesen aber schon eine leichte C-Form auf (Abb. 9). Der *Plexus choroideus* der Seitenventrikel war beidseits entwickelt (Abb. 10,11). Das *Foramen interventriculare* war sehr weit (Abb. 11). Auch der dritte Ventrikel im Diencephalon war vorhanden. Im Mesencephalon war der Neuralkanal noch sehr weit und würde sich erst später zum *Aquaeductus mesencephali* verengen (Abb. 9). Nur an seinem caudalen Ende war schon eine Einziehung bemerkbar (Abb. 9). Ebenso war der vierte Ventrikel, der in Kontakt mit dem Zentralkanal des Rückenmarkes stand, noch weit ausgedehnt (Abb. 9).



2000µm

Abb. 9. Craniolaterale Aufsicht auf das 3D-Modell des Ventrikelsystems. 1=linker Seitenventrikel, 2=rechter Seitenventrikel, 3=dritter Ventrikel, 4=vierter Ventrikel, 5=Anlage des *Aquaeductus mesencephali*.

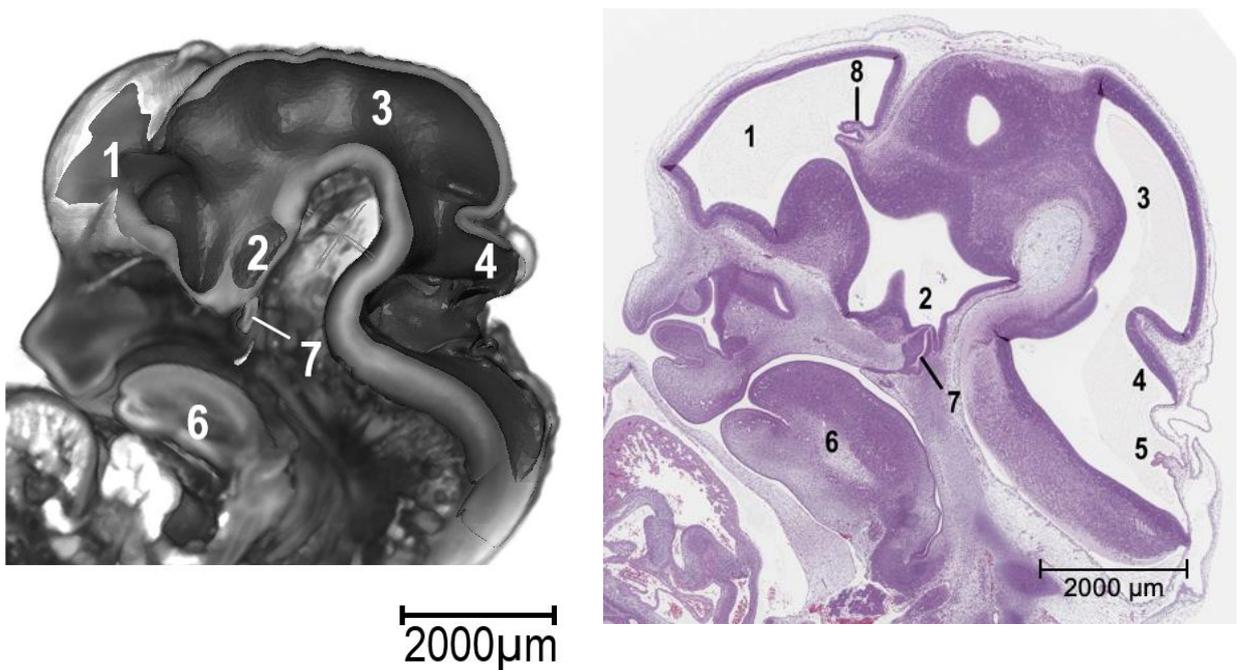


Abb. 10. Längsschnitt durch die μ CT-Aufnahme (A) und histologischer Längsschnitt (B) auf etwa gleicher Höhe. 1=Telencephalon, 2=Diencephalon, 3=Mesencephalon, 4=Metencephalon, 5=Myelencephalon, 6=Zungenanlage, 7=Hypophyse mit darunterliegendem *Canalis craniopharyngeus*, 8=*Plexus choroideus* des linken Seitenventrikels. Durch die schon erwähnte leicht unterschiedliche Position der Embryonen, ist der sichtbare Ausschnitt nicht ganz gleich. Im histologischen Längsschnitt sieht man in die linke Telencephalon-Hemisphäre mit dem *Plexus choroideus*, während man im μ CT-Schnitt eine kleine Einsicht in die rechte Telencephalon-Hemisphäre erlangt. Auch das Myelencephalon ist im μ CT-Ausschnitt nicht sichtbar.

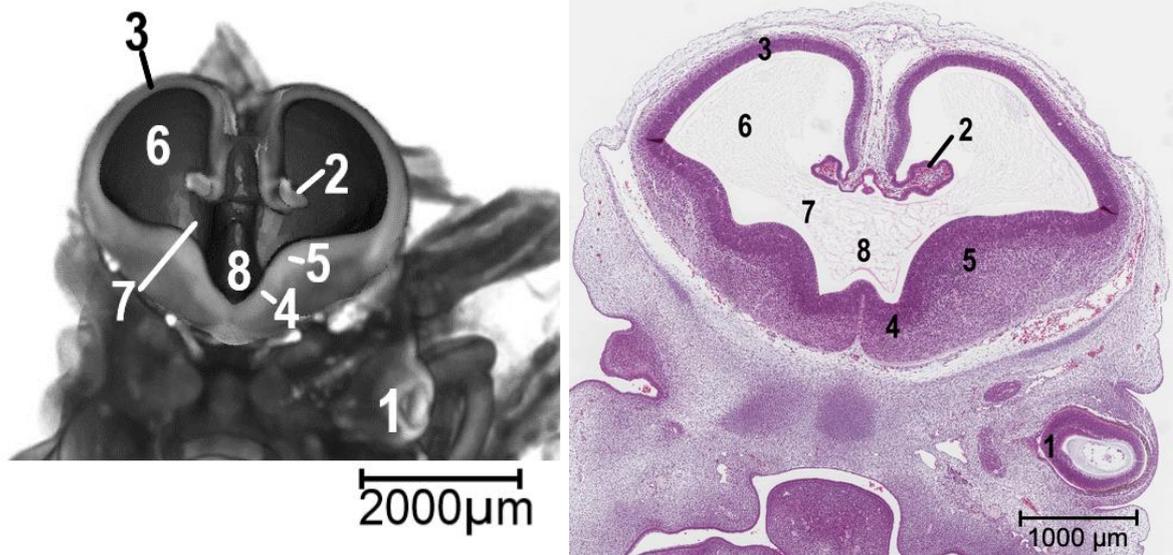


Abb. 11. Querschnitt durch die μ CT-Aufnahmen (A) und histologischer Querschnitt (B) auf Höhe des *Foramen interventriculare*. 1=Augenbläschen, 2=*Plexus choroideus*, 3=Telencephaloncortex, 4=Hypothalamus, 5=*Corpus striatum*, 6=rechter Seitenventrikel, 7=*Foramen interventriculare*, 8=dritter Ventrikel.

3.3. Dimensionen des Gehirns

Bei den Embryonen wies das Gehirn eine vorrangig sagittale Ausbreitung auf. Die Gesamtlänge des Gehirns in den μ CT-Aufnahmen betrug 8,08 mm. Die größten Ausdehnungen zeigten die Hemisphären des Telencephalons, das Diencephalon und das Metencephalon (Tab. 1). Das Myelencephalon stellte den kleinsten Abschnitt des Gehirns dar. Am schmalsten war das Mesencephalon. Die Länge des noch vorhandenen Anteils des *Ductus craniopharyngeus* betrug 0,42 mm.

Gehirnabschnitt	Länge (mm)	Breite (mm)	Höhe (mm)
Telencephalon-Hemisphäre	2,74	1,62	3,27
Diencephalon	2,83	1,63	3,93
Mesencephalon	2,67	1,51	1,83
Metencephalon	2,17	3,86	2,61
Myelencephalon	1,36	1,73	1,16
Hypophyse	0,3	0,7	0,61

Tab. 1. Dimensionen der einzelnen Gehirnabschnitte.

4. Diskussion

4.1. Alter der Hundeembryonen

Zur Bestimmung des Alters der Embryonen wurden folgende aus den μ CT-Analysen erhobenen Daten in Betracht gezogen: die Anzahl der Somitenpaare, die SSL der Embryonen und der Entwicklungszustand des Gehirns.

Häufig wird in der Literatur das Alter mit der korrelierenden Anzahl der Somitenpaare angegeben. Der untersuchte Embryo hatte 36 Somitenpaare. Houston (1968) beschrieb, dass ein Hundeembryo mit 21 Tagen 32 Somitenpaare und mit 25 Tagen 39 bis 49 Somitenpaare aufweist. McGeady et al. (2017) gaben jedoch an, dass ein Hundeembryo am Tag 22 schon 40 und am Tag 24 48 Somitenpaare besitzt. Laut Evans et al. (2012) zeigt ein Hundeembryo im Alter von 23 Tagen 32 Somitenpaare. Dementsprechend hätte der untersuchte Embryo nach Evans et al. (2012) ein Alter von über 23 Tagen, nach McGeady et al. (2017) von unter 22 Tagen und nach Houston (1968) ein Alter zwischen 21 und 25 Tagen.

Die SSL wird ebenfalls zur Altersbestimmung von Embryonen und Feten herangezogen. Da jedoch bei keinem der drei Embryonen die SSL vor der Fixierung gemessen wurde und Fixierung und Kontrastierung zu beachtlichen Gewebsschrumpfungen führen können (siehe 4.2), wurde von dieser Methode der Altersbestimmung Abstand genommen.

Die μ CT-Bilder der vorliegenden Arbeit zeigen einen Embryo im Fünfbläschenstadium mit einer Differenzierung des Metencephalons in *Cerebellum* und *Pons*, einer *Flexura pontina* im 90° Winkel und einem schon vollständig verschlossenen *Canalis craniopharyngeus*. Die histologischen Präparate zeigen bis auf einen noch durchgängigen *Canalis craniopharyngeus* genau die gleichen Entwicklungen.

Sasaki und Nishioka (1998) beschrieben, dass sich beim Hundeembryo die Rathke-Tasche als Primordium der Hypophyse mit 25 Tagen bildet, sich deren proximales Ende am Tag 27 zum *Canalis craniopharyngeus* verengt und dieser am Tag 30 vollständig verschlossen ist. Laut Kingsbury (1940) tritt die Rathke-Tasche beim Hund das erste Mal bei einer SSL von 10 mm auf, verengt sich langsam bei einer SSL von 13 bis 14 mm und bei einer SSL von 17,5 mm ist ihre Verbindung zur Mundbucht getrennt. Houston (1968) erwähnte in welchem Alter die Flexuren im Gehirn bei Hundeembryonen auftreten. Laut ihm tritt die *Flexura pontina* zuerst in einem Alter von 21 Tagen auf und erreicht am Tag 25 einen Winkel von ca. 90°. Außerdem beschrieb Houston (1968), dass sich am Tag 25 das Rhombencephalon beim Hund

in die drei Primordia des *Pons*, des *Cerebellums* und des Myelencephalons gegliedert hat. Pieri et al. (2015) erwähnten, dass sie beim Hund am Tag 35 ein starkes Größenwachstum des Gehirns und die Differenzierung des Metencephalons und Myelencephalons feststellen konnten. In Ihren Abbildungen sieht man die Differenzierung allerdings schon an Tag 29 bis 32.

Demnach müsste das Alter des computertomographisch untersuchten Embryos laut Sasaki und Nishioka (1998) bei 30 Tagen und bei den histologisch präparierten Embryonen bei 27 bis 30 Tagen liegen. Nach Houston (1968) müsste das Alter aller Embryonen bei mindestens 25 Tagen und laut Pieri et al. (2015) bei mindestens 29 bzw. 35 Tagen liegen. Ein unterschiedliches Alter der Embryonen ist jedoch auszuschließen, da alle aus derselben Gravidität entstammen und zum selben Zeitpunkt entnommen worden. Es ist zu vermuten, dass es sich um geringe individuelle Unterschiede von einigen Stunden in der Entwicklung handelt.

Wenn sowohl die Anzahl der Somitenpaare als auch die Gehirnentwicklung berücksichtigt wird, kommt man für das Alter der Embryonen auf einen Zeitraum zwischen 21 bis 35 Tagen. Die zum Teil sehr unterschiedlichen Angaben in der Literatur könnten zum einen durch eine unterschiedliche Definition des Gestationsbeginns herrühren (Pieri et al. 2015) und zum anderen durch unterschiedliche Gestationsdauern bedingt sein. Houston (1968) definierte den Tag eins der Gestation als den Tag der Ovulation, bestimmt durch eine Vaginalzytologie. Im Gegensatz dazu setzen Sasaki und Nishioka (1998) den Tag eins als Tag des Deckaktes fest. Sasaki und Nishioka (1998) gaben bei Beaglen eine durchschnittliche Gestationsdauer von 60 Tagen an, während Okkens et al. (1993) in einer Studie mit verschiedenen Rassen eine mittlere Gestationsdauer von 62,1 Tagen berechneten.

4.2. Dimensionen des Gehirns

Alle Längenmessungen am untersuchten Embryo wurden erst nach Fixierung und Kontrastierung vorgenommen, es stehen also keine Vergleichswerte des nativen Embryos zur Verfügung. Rastogi et al. (2013) gaben eine Schrumpfung von 33 % für Gewebe, das Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet wurde, an. Für die Kontrastierung mittels Phosphormolybdänsäure gibt es noch keine Daten, die etwas über die Größenveränderung der einzelnen Organsysteme aussagen. Buytaert et al. (2014) fanden heraus, dass eine Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure für μ CT-Untersuchungen zu einer Schrumpfung des Gehirnvolumens um 27,3 % führte, wobei die Standardabweichung bei 1,7 % lag. Es kann

angenommen werden, dass eine Kontrastierung mit Phosphormolybdänsäure zu ähnlichen Schrumpfungen im Gehirn führt.

Da davon ausgegangen werden kann, dass durch die sehr ähnliche Gewebzusammensetzung der einzelnen Gehirnabschnitte der Einfluss der Phosphormolybdänsäure auf deren Größe in etwa derselbe ist, können die Längenmessungen für den Vergleich der Größenverhältnisse untereinander zur Hand genommen werden. Die Länge des Gehirns betrug 8,08 mm und an der breitesten Stelle, im Metencephalon 3,86 mm. Bis zum Zeitpunkt der Geburt, sollte das Verhältnis zwischen Breite und Länge, so wie von Fox et al. (1963) beschrieben, gleich sein. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beim untersuchten Embryo bis jetzt hauptsächlich ein Längenwachstum im Gehirn stattgefunden hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden die maximalen Ausdehnungen der fünf Gehirnabschnitte beim Hundeembryo vermessen. In der Literatur liegen zum jetzigen Zeitpunkt keine Angaben zu den Dimensionen der einzelnen Gehirnabschnitte beim Hund als Vergleichswerte vor. Jedoch gibt es vereinzelt Studien, welche sich mit einer 3D-Volumenmessungen bei der Gehirnentwicklung anderer Tierarten befasst haben. Wong et al. (2012) errechneten Volumina von einzelnen Gehirnregionen bei weiterentwickelten (Tag 15,5 *post coitum*) Mäuseembryonen. Zhou et al. (2015) gaben die Volumina des Telencephalons, des *Cerebellums* und des Hirnstamms von Hühnerembryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien an. Die Werte dieser beiden Studien können demnach nicht mit den Werten des Hundeembryos verglichen werden. Um bessere Vergleichsmöglichkeiten mit der vorhandenen Literatur zu ermöglichen, sollten in weiterführenden Studien Volumenmessungen, von kleineren Hirnregionen durchgeführt werden.

4.3. Verwendung des 3D-Modells für die Lehre

Das 3D-Modell des Gehirns stellt eine gute Erweiterung der Lehrmedien dar. In Kombination mit histologischen Schnittbildern erleichtert es die Vorstellung der Entwicklungsprozesse. Durch die Möglichkeiten, das Modell in jede beliebige Richtung zu drehen und Schnitte durch das 3D-Modell an beliebigen Stellen anzeigen zu lassen, können Studierende ein plastischeres Bild des Gehirns während der Embryogenese erlangen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erstellung des dreidimensionalen (3D) Modelles des Gehirns eines Hundeembryos mittels micro-CT (μ CT) mit anschließender Analyse der Dimensionen der einzelnen Hirnabschnitte.

Dazu wurde ein Formalin-fixierter Hundeembryo mit Phosphormolybdansäure (1 % in 70 % Ethanol) kontrastiert und mit einem μ CT analysiert. Anschließend wurde mit Hilfe der Software Amira 6.5.0 ein 3D-Modell des Gehirns und ein 3D-Modell des Ventrikelsystems erstellt. Zusätzlich wurden die Modelle noch mit histologischen Schnitten von zwei anderen Embryonen derselben Trächtigkeit verglichen.

Alle drei Embryonen wiesen eine Gehirnentwicklung im Fünfbläschenstadium mit deutlich erkennbarem Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon und Myelencephalon auf. Am Metencephalon war bereits die Unterteilung in *Cerebellum* und *Pons* erkennbar. Die drei Flexuren waren alle schon ausgeprägt und verliehen dem Gehirn seine typische Gestalt. Am ventralen Boden des Diencephalons hat sich das Primordium der Hypophyse gebildet und deren Verbindung zur Mundhöhle war bereits unterbrochen.

Insgesamt hatte das Gehirn eine Länge von 8,08 mm. Die breiteste Stelle lag im Mesencephalon und war 3,86 mm breit. Der kleinste Gehirnabschnitt war das Myelencephalon, der größte Gehirnabschnitt das Diencephalon.

Aufgrund der Anzahl der Somitenpaare und der Gehirnentwicklung ließ sich das Alter der Embryonen zwischen 21 und 35 Tagen festlegen.

Die Embryonen zeigten zwar alle eine unterschiedliche Lagerung, ließen sich aber dennoch gut miteinander vergleichen und ermöglichten einen guten Einblick in die Entwicklung des Gehirns.

6. Summary

The aim of this study was to create a micro-CT (μ CT) based three-dimensional (3D) model of the brain of a dog embryo. Furthermore, the different segments of the brain were analyzed regarding their dimensions.

Therefore, a formalin-fixated dog embryo was stained with phosphormolybdic acid (1 % in 70 % ethanol) and analyzed using a μ CT. With the use of the Amira 6.5.0 software, a 3D-model of the brain and a 3D-model of the ventricle system was created. Additionally, these models were compared to histological sections from two embryos of the same pregnancy.

All three embryos showed five brain vesicles: telencephalon, diencephalon, mesencephalon, metencephalon and myelencephalon. In the metencephalon the division into cerebellum and pons was present. All three brain flexures were built and gave the brain its typical conformation. The primordia of the hypophysis could be recognized on the ventral floor of the diencephalon and its connection to the oral cavity was already disconnected.

The brain had a total length of 8.08 mm. The widest point was situated at the mesencephalon and was 3.86 mm. The smallest vesicle was the myelencephalon, while the diencephalon was the biggest vesicle.

Based on the brain development and the amount of somite pairs, the age of the embryos was estimated to be between 21 and 35 days of gestation.

Although all three embryos were fixated in different positions, they could be easily compared with each other and together gave a good insight into the development of the brain.

7. Literaturverzeichnis

Buytaert J, Goyens J, De Greef D, Aerts P, Dirckx J. 2014. Volume Shrinkage of Bone, Brain and Muscle Tissue in Sample Preparation for Micro-CT and Light Sheet Fluorescence Microscopy (LSFM). *Microscopy and Microanalysis*, 20(4): 1208-1217.

Evans HE, Lahunta AD, Miller ME. 2012. *Miller's Anatomy of the Dog*. Vierte Aufl. St Louis: Elsevier Saunders, 20.

Fox MW. 1963. Gross Structure and Development of the Canine Brain. *American Journal of Veterinary Research*, 24: 1240-1247.

Houston ML. 1968. The Early Brain Development of the Dog. *The Journal of Comparative Neurology*, 134(3): 371-383.

Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M. 2010. *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Erste Aufl. Edinburgh: Saunders Elsevier.

Kingsbury BF, Roemer FJ. 1940. The Development of the Hypophysis of the Dog. *Developmental Dynamics*, 66(3): 449-481.

McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT, Kilroy D, Lonergan P. 2017. *Veterinary Embryology*. Zweite Aufl. Chichester: Wiley.

Okkens AC, Hekerman TWM, de Vogel JWA, van Haften B. 1993. Influence of litter size and breed on variation in length of gestation in the dog. *Veterinary Quarterly*, 15(4): 160-161

Pieri N, Souza AF, Casals JB, Roballo K, Ambrósio CE, Martins DS. 2015. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(4): 625-631.

Rastogi V, Puri N, Arora S, Kaur G, Yadav L, Sharma R. 2013. Artefacts: A diagnostic dilemma – A review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(10): 2408-2413.

Mulisch M., Welsch U. 2015. Romeis Mikroskopische Technik. Neunzehnte Aufl. Heidelberg: Springer.

Rüsse I, Sinowatz F. 1991. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Berlin, Hamburg: Parey.

Sasaki F, Nishioka S. 1998. Fetal Development of the Pituitary Gland in the Beagle. *The Anatomical Record*, 251(2): 143-151.

Wong MD, Dorr AE, Walls JR, Lerch JP, Henkelman RM. 2012. A novel 3D mouse embryo atlas based on micro-CT. *Development*, 139(17): 3248–3256.

Zhou Z, Chen Z, Shan J, Ma W, Li L, Zu J, Xu J. 2015. Monitoring brain development of chick embryos in vivo using 3.0 T MRI: subdivision volume change and preliminary structural quantification using DTI. *BMC Developmental Biology*, 15(29).