

## „Sposób na bregmę”

*Tomasz Blasiak*

Pracownia Neurofizjologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

### Streszczenie

Jednym z warunków powodzenia wielu typów eksperymentów elektrofizjologicznych, prowadzonych *in vivo*, jest precyzyjne umieszczenie czubka mikroelektrody w konkretnej strukturze mózgu zwierzęcia. By sprostać temu wymaganiu stosuje się technikę stereotaksji, służącą do precyzyjnego implantowania elektrod, sąd mikrodializacyjnych oraz innych mikroczuJNIków w strukturach mózgowia ssaków, podczas eksperymentów prowadzonych *in vivo*. By zapewnić odpowiednią precyzję manipulacji stereotaktycznych stosuje się wysokiej klasy sprzęt mechaniczny oraz najnowsze, sporządzone przez specjalistów atlasy stereotaktyczne. Ponadto, niezbędne jest bardzo dokładne i prawidłowe wyznaczenie położenia punktów charakterystycznych czaszki, będących odniesieniem dla manipulacji stereotaktycznych. Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie udoskonalonego i praktycznie przetestowanego w Pracowni Neurofizjologii i Chronobiologii UJ sposobu wyznaczania punktów odniesienia dla manipulacji stereotaktycznych. Nowa metoda zostanie zilustrowana na przykładzie czaszki, powszechnie wykorzystywanej w badaniach laboratoryjnych, szczura rasy Wistar.

Prowadząc eksperymenty elektrofizjologiczne *in vivo* często stajemy przed koniecznością umieszczenia miniaturowej elektrody w konkretnej strukturze mózgu zwierzęcia. Problem stanowi fakt, że mózg jest otoczony kością, której w całości nie można usunąć by odsłonić interesujący nas organ. Nawet jeśli taki zabieg można by było wykonać bez ryzyka znacznego zaburzenia fizjologii zwierzęcia, to i tak widoczne byłyby tylko powierzchniowe warstwy mózgu (np. kora mózgowa, kora mózdzku, itp.), pod którymi ukryta jest znaczna część struktur mózgowia, często tych, które są obiektem bezpośredniego zainteresowania badacza. Jeśli to właśnie jednej z takich głębokich struktur mózgu zamierzamy zaimplantować np.: elektrodę rejestracyjną/stymulującą, mikropipetę w celu domięscowego podania substancji, sondę mikrodializacyjną, itp., stajemy przed problemem jak tego dokonać. Z jednej strony cały zabieg

musi być wykonany przyżyciowo, a uszkodzenia tkanki nerwowej mają być minimalne, z drugiej strony miniaturowy element pomiarowy musi się znaleźć bezpośrednio w interesującej nas, często niedużych rozmiarów, strukturze mózgu. Bardzo skutecznym rozwiązaniem tego problemu okazała się, wprowadzona na początku XX wieku, technika stereotaktycznego wyznaczenia położenia struktur mózgu względem punktów charakterystycznych czaszki [1]. Współcześnie, metoda ta jest powszechnie stosowana w laboratoriach badawczych, jak również, przy wsparciu nowoczesnych technik obrazowania, wykorzystuje się ją z powodzeniem podczas operacji wykonywanych na ludziach. Opiera się ona na założeniu, że położenie mózgu i jego poszczególnych części względem czaszki jest zbliżone w grupie podobnych osobników. Tak więc, wykonując eksperymenty na zwierzętach laboratoryjnych tego samego gatunku i rasy, cechujących się niewielką zmiennością, będących tej samej płci, mających tą samą masę i będących w tym samym wieku, można przyjąć, że ułożenie mózgu tych zwierząt w czaszce jest bardzo podobne. Bazując na tym założeniu, stworzono wiele, ciągle aktualizowanych, trójwymiarowych atlasów stereotaktycznych mózgowia różnych gatunków zwierząt laboratoryjnych. Z takiego atlasu można odczytać, zwykle z dokładnością do 0,1mm, położenie interesującej nas struktury mózgu zwierzęcia, względem określonych punktów na czaszce. Następnie, już podczas operacji neurochirurgicznej, głowę zwierzęcia należy zamocować w ramie stereotaktycznej, będącej rusztowaniem dla mikromanipulatorów, którymi możemy wykonywać ruchy w trzech kierunkach, z dokładnością do kilku mikronów. Zamocowaną na mikromanipulatorze elektrodę przesuwamy względem punktu odniesienia na czaszce (punkt zero), zgodnie z wcześniej odczytanymi z atlasu współrzędnymi. W ten sposób, czubek elektrody powinien się znaleźć wewnątrz czaszki (niezbędne jest wykonanie niewielkiej trepanacji), w interesującej nas strukturze mózgu.

Dokładność "trafienia" czubkiem takiej elektrody w konkretną strukturę zależy od kilku czynników. Aby zwiększyć prawdopodobieństwo powodzenia implantacji, poza precyzyjnym wykonywaniem wszystkich zabiegów operacyjnych, należy między innymi:

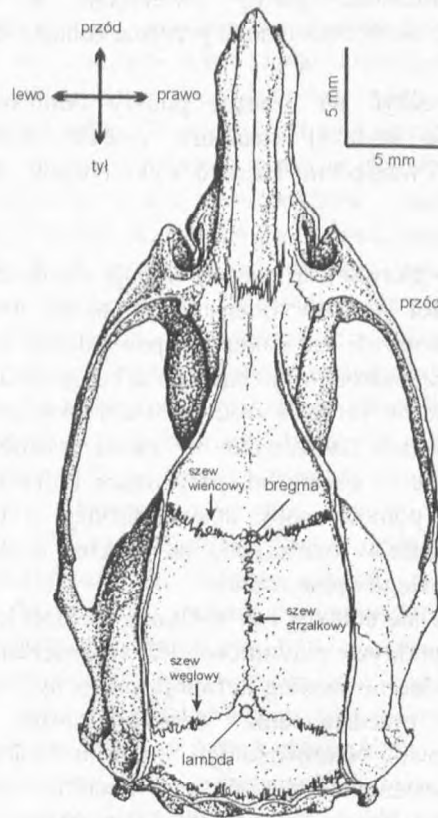
- dołożyć starań aby zwierzę poddawane operacji spełniało wytyczne (gatunek, rasa, płeć, masa/wiek, sposób hodowli) autora atlasu stereotaktycznego,
- zastosować aparat stereotaktyczny i mikromanipulatory dobrej klasy, których konstrukcja i stan techniczny powinny zapewniać wysoką precyzję i stabilność,

- prawidłowo zamocować głowę zwierzęcia w ramie aparatu stereotaktycznego, skonstruowanego/przeznaczonego dla danego typu zwierząt,
- precyzyjnie wyznaczyć na czaszce punkty odniesienia, względem których położenie badanej struktury zostało podane w atlasie stereotaktycznym i względem, którego wykonywane będą manipulacje stereotaktyczne.

Wypełnienie dwóch pierwszych zaleceń wydaje się dość proste i zależy przede wszystkim od ilości środków finansowych jakimi dysponujemy oraz możliwości prowadzenia hodowli lub zakupu odpowiednich zwierząt. Kolejne dwa punkty odnoszą się bezpośrednio do samego zabiegu neurochirurgicznego i dotyczą tych jego elementów, które są źródłem wielu problemów i błędów. O ile prawidłowe zamocowanie zwierzęcia w ramie stereotaktycznej oraz manipulacje stereotaktyczne to czynności, przy nauce których niezbędna jest praktyczna prezentacja i pomoc osoby doświadczonej, o tyle prawidłowe wyznaczenie położenia punktów odniesienia na czaszce może być obiektem teoretycznego, instruktarzowego opracowania.

Chociaż każdy atlas stereotaktyczny definiuje położenie zastosowanych punktów odniesienia, w praktyce prawidłowe ich wyznaczenie bywa trudne, a punkty, wyznaczone dokładnie według definicji, mogą być błędne. Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie udoskonalonego i praktycznie przetestowanego w Pracowni Neurofizjologii i Chronobiologii UJ sposobu wyznaczania punktu odniesienia na czaszce, powszechnie wykorzystywanego w badaniach laboratoryjnych, szczura rasy Wistar (dorosły samiec).

Aktualnie dostępnych jest kilka, współcześnie wydawanych atlasów stereotaktycznych mózgu dorosłego szczura [2, 3, 4]. Wszystkie te atlasy podają położenie struktur mózgu szczura względem punktów charakterystycznych na powierzchni grzbietowej mózgowo-czaszki. W niniejszej pracy, jako klasyczny, zostanie przedstawiony sposób wyznaczania tych punktów, który został wykorzystany między innymi w najpowszechniej stosowanym i ciszącym się najlepszą opinią atlasie stereotaktycznym autorstwa Georga Paxinosa i Charlesa Watsona [2; tzw. atlas Paxinosa]. Jako klasyczny punkt odniesienia (punkt zero) w atlasie Paxinosa wykorzystuje się punkt zwany bregmą ( $\beta$ ), który wyznacza się w miejscu przecięcia szwu wieńcowego (*sutura coronalis*) ze szwem strzałkowym (*sutura sagittalis*) na grzbietowej powierzchni mózgowo-czaszki (Ryc. 1.).

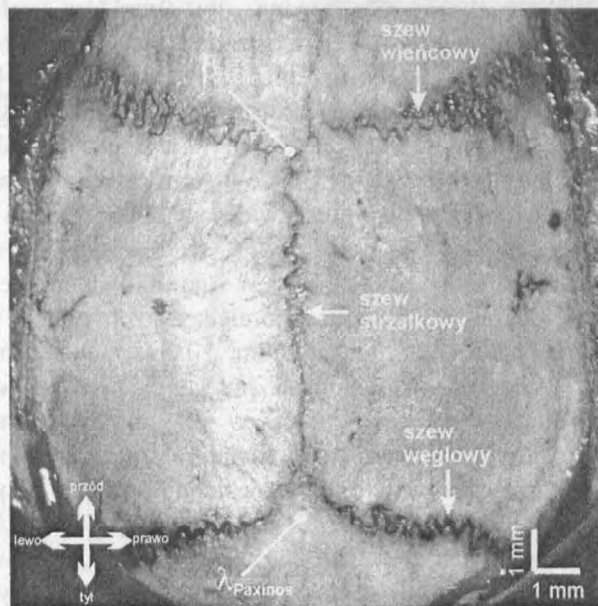


**Ryc. 1.** Szkic widzianej z góry czaszki dorosłego samca szczura rasy Wistar. Zaznaczone zostało położenie punktów bregma i lambda, zgodnie z definicją stosowaną w większości atlasów stereotaktycznych. Strzałki wskazują szwy pomiędzy kośćmi sklepienia mózgowczaszki. Schemat czaszki zapożyczony z Paxinos i Watson, 1998.

Jako pomocniczy definiuje się punkt lambda ( $\lambda$ ), którego położenie określa się na przecięciu bocznych fragmentów szwu węglowego (*sutura lambdaeidea*) z przedłużeniem szwu strzałkowego (Ryc. 1.). Odległość pomiędzy bregmą i lambda powinna wynosić  $8,8 \pm 0,6$  mm zgodnie z pomiarami podanymi w atlasie Paxinosa, a oba punkty powinny leżeć w płaszczyźnie symetrii czaszki i mózgu (przyjmując, że czaszka i mózg są symetryczne i posiadają jedną, wspólną płaszczyznę symetrii).

W praktyce jednak, przebieg szwów czaszkowych często odbiega od "typowego idealnego" układu według, którego można by wiarygodnie wyznaczyć położenie punktów bregma i lambda. Na rycinie 2 przedstawiony jest

taki właśnie przypadek, w którym, pomimo, że zwierzę spełniało wytyczne atlasu stereotaktycznego, przebieg szwów czaszkowych był nietypowy. Należy zaznaczyć, że w tym przypadku odstępstwa przebiegu szwów czaszkowych od "typowego" przebiegu są nieznaczne. W praktyce laboratoryjnej często jednak spotykamy się z dużo bardziej zaburzonym układem szwów czaszkowych.



**Ryc. 2.** Zdjęcie przedstawiające grzbietową powierzchnię mózgowcaszki szczura rasy Wistar. Zaznaczone zostało położenie punktów bregma ( $\beta_{\text{Paxinos}}$ ) i lambda ( $\lambda_{\text{Paxinos}}$ ), wyznaczonych zgodnie z definicją stosowaną w atlasie stereotaktycznym Paxinosa (Paxinos i Watson, 1998). Białe strzałki wskazują szwy pomiędzy kośćmi sklepienia mózgowcaszki.

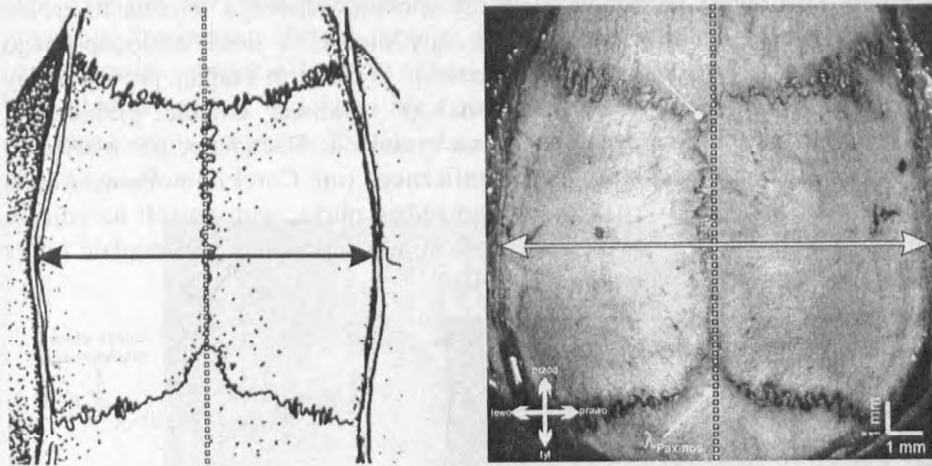
W przykładzie przedstawionym na rycinie 2 wydaje się, że szew strzałkowy biegnie nieco skośnie, a jego położenie, szczególnie przedniego fragmentu, może odbiegać od płaszczyzny symetrii czaszki. Dodatkowo, szew wieńcowy przecina się ze strzałkowym w dwóch punktach, przesuniętych względem siebie zarówno w osi przód-tył, jak i lewo-prawo. W tym i podobnych przypadkach, bardzo pomocne okazuje się wyznaczenie płaszczyzny symetrii względem grzebieni kostnych, do których przymocowane są do mózgowcaszki mięśnie żuchwy (Ryc. 3.). Na tym etapie operacji głowa zwierzęcia jest już zamocowana (prawidłowo!) w aparacie stereotaktycznym i możemy przy pomocy manipulatorów stereotaktycznych precyzyjnie poruszać się względem czaszki. Na uchwyt manipulatora zakładamy cienką igłę strzykawkową i pod kontrolą wzrokową (najlepiej pod powiększeniem, wykorzystując mikroskop

operacyjny o długiej ogniskowej), ostrożnie operując mikromanipulatorem, należy dotknąć czubkiem igły grzbietu jednego z wcześniej odsłoniętych grzebieni. Po odczytaniu współrzędnych tego punktu należy przemieścić igłę tak by jej czubek dotknął grzbietu przeciwległe położonego grzebienia (nie zmieniając położenia igły w osi przód-tył!) i ponownie odczytać z manipulatora współrzędne. Wykorzystując współrzędne obu punktów należy policzyć odległość w osi lewo-prawo pomiędzy grzebieniami. Jednocześnie, można sprawdzić czy położenie grzbietów grzebieni w osi grzbietowo-brzuszej jest podobne. Jeśli podczas preparatyki zachowaliśmy ostrożność i grzebienie nie zostały zbyt "zeskrobane", różnica w ich położeniu na osi grzbietowo-brzuszej nie powinna przekraczać 0,2 mm. Większa różnica oznacza, że głowa zwierzęcia jest prawdopodobnie nieprawidłowo zamocowana w aparacie stereotaktycznym.

Następnie, przesuwamy czubek igły w kierunku dośrodkowym czaszki o połowę obliczonej wcześniej odległości pomiędzy grzebieniami, tak by znalazł się dokładnie pośrodku, pomiędzy nimi. Teraz, jeśli przy pomocy mikromanipulatora będziemy dokonywać przesunięć wzdłuż osi przód-tył, czubek igły powinien przemieszczać się w płaszczyźnie symetrii czaszki i mózgu, po tzw. linii środkowej. Przykład tak wyznaczonej linii środkowej czaszki jest zaznaczony przerywaną linią naniesioną na zdjęcie po prawej stronie ryciny 3. Jak widać na tym przykładzie, punkty bregma i lambda wyznaczone dokładnie wedle przepisu Paxinosa ( $\beta_{\text{Paxinos}}$  i  $\lambda_{\text{Paxinos}}$ ), leżą u tego zwierzęcia poza linią środkową wyznaczoną naszą metodą. Dokładność tej metody wielokrotnie potwierdzono w naszej Pracowni podczas histologicznej weryfikacji położenia elektrod rejestracyjnych, lub też obserwując wzajemne położenie wyznaczonej linii środkowej i górnej, żyłnej zatoki strzałkowej biegnącej grzbietowo na powierzchni mózgu, dokładnie pomiędzy półkulami. Z naszych obserwacji wynika, że metoda wyznaczania osi środkowej czaszki względem grzebieni jest znacznie dokładniejsza od klasycznej metody podawanej przez Paxinosa, zwłaszcza gdy przebieg szwów czaszkowych jest nietypowy, jak na podanym przykładzie.

Mając tak wyznaczoną linię środkową czaszki pozostaje jeszcze ustalić gdzie na tej osi znajdują się punkty bregma i lambda. Najprostszą metodą jest przyjęcie za punkt  $\beta$  przecięcia linii środkowej ze szwem wieńcowym kości sklepienia mózgowoczaszki. Sposób ten można zastosować pod warunkiem, że przebieg szwu wieńcowego jest bardzo regularny. Gdy jednak przebieg szwu jest zaburzony, prawidłowość wyznaczenia punktu bregma tą drogą może budzić duże wątpliwości. W takiej sytuacji można zweryfikować położenie punktu bregma opierając się na stałym położeniu tego punktu (8,8 mm do przodu) względem punktu lambda. Chociaż z naszych obserwacji wynika, że szew

węglowy, częściej niż szew wieńcowy, ma typowy przebieg, może się jednak zdarzyć, że w konkretnym przypadku tak nie jest. Ponadto, sama metoda określania położenia punktu lambda jest szacunkowa - opiera się na ekstrapolowanym przedłużeniu bocznych fragmentów szwu węglowego, a to może być przyczyną dużych niedokładności.

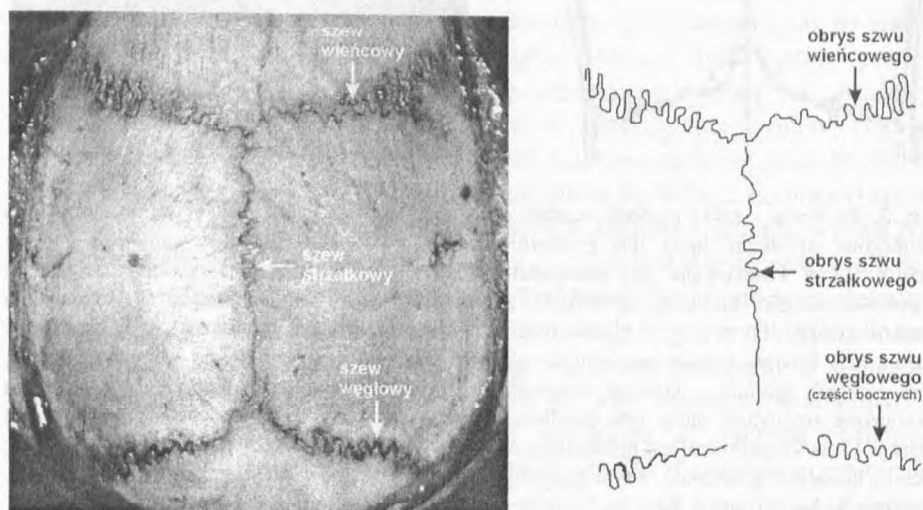


**Ryc. 3.** Po lewej - szkic grzbietu czaszki dorosłego samca szczura rasy Wistar. Czarna linia zakończona strzałkami łączy oba grzebienie kostne, do których przymocowany jest mięsień zuchwy. Linia kropkowana jest prostopadła do czarnej linii ciągłej i przebiega dokładnie w połowie odcinka łączącego grzebienie, a tym samym powinna przebiegać w płaszczyźnie symetrii czaszki. Po prawej - zdjęcie przedstawiające grzbietową powierzchnię mózgow czaszki szczura rasy Wistar. Zaznaczone zostało położenie punktów bregma ( $\beta_{\text{Paxinos}}$ ) i lambda ( $\lambda_{\text{Paxinos}}$ ), wyznaczonych zgodnie z definicją stosowaną w atlasie stereotaktycznym Paxinosa. Biała linia zakończona strzałkami łączy oba grzebienie kostne, do których przymocowany jest mięsień zuchwy. Linia kropkowana jest prostopadła do białej linii ciągłej i przebiega dokładnie w połowie odcinka łączącego grzebienie, a tym samym powinna przebiegać w płaszczyźnie symetrii czaszki. Wyraźnie widać, że punkty  $\beta_{\text{Paxinos}}$  i  $\lambda_{\text{Paxinos}}$  leżą poza linią środkową czaszki.

Wydaje się więc, że pomimo dość dokładnego wyznaczenia linii środkowej czaszki, prawidłowe wyznaczenie położenia na niej punktów bregma i lambda jest zadaniem bardzo trudnym, a szacunkowe ("na oko") jego rozwiązania są potencjalnym źródłem błędów. W ostatniej części tego artykułu zostanie pokrótce przedstawione, aktualnie testowane w Pracowni Neurofizjologii i Chronobiologii Instytutu Zoologii UJ, rozwiązanie tego problemu. Opiera się ono na połączeniu wcześniej opisanej metody wyznaczania linii środkowej czaszki z cyfrowymi metodami obróbki i analizy matematycznej obrazu. W metodzie tej punkty bregma i lambda są wyznaczane w miejscu przecięcia się linii środkowej czaszki (wyznaczonej względem grzebieni)

z krzywymi, matematycznie dopasowanymi do szwów czaszkowych: wieńcowego i węglowego. Poniższy opis w skrócie przedstawia procedurę wyznaczania punktów bregma i lambda tą metodą.

Pierwszy krok wygląda podobnie jak we wcześniej opisanej metodzie wyznaczania linii środkowej czaszki, z tą różnicą, że punkty pomiarowe na grzebieniach czaszki należy w widoczny sposób zaznaczyć. Można to zrobić w prosty sposób, nanosząc na czubek igły niewielką ilość wodoodpornego barwnika (np. z wodoodpornego flamastra). W drugim etapie, przy pomocy cyfrowego aparatu fotograficznego, należy wykonać zdjęcie grzbietowej powierzchni mózgowczaszki, takie jak na rycinie 4. Następnie, po wczytaniu zdjęcia do komputerowego programu graficznego (np. Corel PhotoPaint, Adobe PhotoShop, Paint Shop Pro) należy sporządzić obrys, widocznych na zdjęciu szwów czaszkowych. W przypadku szwu węglowego należy sporządzić obrys tylko jego bocznych fragmentów (Ryc. 4.).

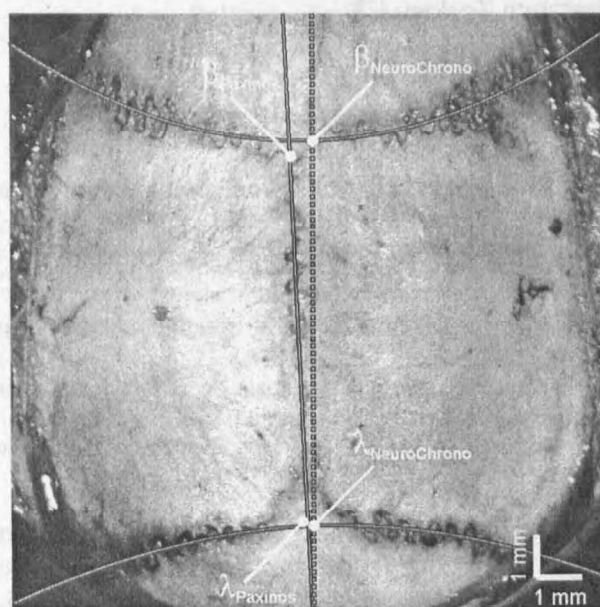


**Ryc. 4.** Po lewej – Zdjęcie przedstawiające grzbietową powierzchnię mózgowczaszki szczura rasy Wistar, wykonane prostym aparatem cyfrowym. Białe strzałki wskazują szwy pomiędzy kośćmi sklepienia mózgowczaszki. Po prawej – obrys szwów czaszkowych, widocznych na zdjęciu po lewej. W przypadku szwu węglowego sporządzono obrys tylko jego bocznych fragmentów. Obrys wykonano przy pomocy komputerowego programu do obróbki grafiki (Corel PhotoPaint).

Obrysy poszczególnych szwów stanowią trzy zbiory punktów, do których dopasowujemy krzywe. Równania poszczególnych krzywych to odpowiednio: wielomian stopnia drugiego (parabola) dla szwu wieńcowego i węglowego oraz wielomian stopnia pierwszego (prosta) dla szwu strzałkowego. W połowie odcinka łączącego oba, zaznaczone na grzebieniach i widoczne na zdjęciu



punkty, należy przeprowadzić prostą prostopadłą do tego odcinka, która wyznaczy nam linię środkową czaszki. Dopasowane krzywe, oraz linię środkową czaszki wygodnie jest wykreślić na wcześniej wykonanym zdjęciu, co znacznie ułatwia poprawne zlokalizowanie punktów bregma i lambda. W naszej Pracowni, wykorzystując uniwersalne środowisko programowe MATLAB, stworzyliśmy specjalny program, który po wczytaniu do niego zdjęcia czaszki oraz wykonanego obrysu szwów, dokonuje obliczeń matematycznych, a następnie wszystkie krzywe nanosi na zdjęcie. Na rycinie 5 znajduje się przykładowy wynik takiej analizy z zaznaczonymi punktami bregma i lambda wyznaczonymi klasyczną ( $\beta_{\text{Paxinos}}$  i  $\lambda_{\text{Paxinos}}$ ) oraz naszą, nową metodą ( $\beta_{\text{NeuroChrono}}$  i  $\lambda_{\text{NeuroChrono}}$ ).



**Ryc. 5.** Zdjęcie przedstawiające grzbietową powierzchnię mózgowca szczura rasy Wistar. Ciągłe linie stanowią naniesione na zdjęcie krzywe dopasowane matematycznie do poszczególnych szwów czaszkowych. Linia przerywana wyznacza linię środkową czaszki, wyznaczoną względem grzebieni kostnych. Zaznaczone zostało położenie punktów bregma i lambda wyznaczone metodą klasyczną ( $\beta_{\text{Paxinos}}$  i  $\lambda_{\text{Paxinos}}$ ) oraz nową metodą testowaną w Pracowni Neurofizjologii i Chronobiologii UJ ( $\beta_{\text{NeuroChrono}}$  i  $\lambda_{\text{NeuroChrono}}$ ).

Jak widać, w tym przypadku punkty, zwłaszcza  $\beta_{\text{Paxinos}}$  i  $\beta_{\text{NeuroChrono}}$ , są od siebie znacznie oddalone (ok. 0,7mm). W praktyce oznacza to, że przyjmując  $\beta_{\text{Paxinos}}$  za odniesienie dla manipulacji stereotaktycznych, prawdopodobnie

trafimy czubkiem elektrody do innej struktury niż gdybyśmy za punkt zero przyjęli  $\beta_{\text{NeuroChrono}}$ .

Otwartym pozostaje pytanie, który z tych dwóch punkt uznać za właściwą bregmę. Nasze dotychczasowe doświadczenia pozwalają nam zaufać położeniu punktu  $\beta_{\text{NeuroChrono}}$  na osi lewo-prawo ponieważ jest ono ustalone względem grzebieni czaszki, czyli metodą od dawna z powodzeniem stosowaną w Pracowni Neurofizjologii i Chronobiologii UJ. Czy również położenie  $\beta_{\text{NeuroChrono}}$  na osi przód-tył, wyznaczone matematycznie, okaże się w praktyce lepsze od klasycznego przecięcia ze szwem wieńcowym? Odpowiedź na to pytanie przyniosą, specjalnie w tym celu zaplanowane, eksperymenty jakie zostaną w najbliższym czasie przeprowadzone w Pracowni Neurofizjologii i Chronobiologii Instytutu Zoologii UJ.

### Piśmiennictwo

1. V. Horsley i R.H. Clarke. The structure and functions of the cerebellum examined by a new method. *Brain*, 31:45-124, 1908.
2. G. Paxinos i C. Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth Edition. Academic Press 1998.
3. L.W. Swanson. Brain Maps: Structure of the Rat Brain. Second Edition. Elsevier 1998.
4. L. Kruger, S. Saporta i L.W. Swanson. Photographic Atlas of the Rat Brain: The Cell and Fiber Architecture Illustrated in Three Planes with Stereotaxic Coordinates. Cambridge University Press 1995.

Adres do korespondencji:

**Tomasz Błasiak**

Pracownia Neurofizjologii, Instytut Zoologii UJ

ul. R. Ingardena 6

30-060 Kraków

tel.: (48 12) 663 26 12

e-mail: [blask@zuk.zi.uj.edu.pl](mailto:blask@zuk.zi.uj.edu.pl)

[tblasiak@wp.pl](mailto:tblasiak@wp.pl)