

University of Groningen

## The role of the nucleus retroambiguus in the neural control of respiration, vocalization and mating behavior

Boers, José

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2005

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Boers, J. (2005). *The role of the nucleus retroambiguus in the neural control of respiration, vocalization and mating behavior*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

**Samenvatting**

Veel gedragingen in het dagelijks leven zijn willekeurig. Enkele voorbeelden hiervan zijn spreken, schrijven, lopen, en het pakken van een kopje koffie. Een aantal gedragingen zijn het gevolg van emoties, bijvoorbeeld huilen, schreeuwen, lachen en de ineengezakte lichaamshouding van iemand die depressief is. Deze laatstgenoemde gedragingen worden geregeld door het emotioneel motorisch systeem (EMS). Dit systeem speelt een belangrijke rol in overlevingsgedrag, zowel in overleving van de soort als van het individu. Het EMS bestaat uit twee delen, een lateraal en een mediaal deel. Het laterale deel is betrokken bij specifieke emotionele gedragingen, zoals sexueel gedrag, mictie (plassen) en vocalisatie (maken van geluid). Deze gedragingen komen tot stand door activatie van kerngebieden behorende tot het limbische systeem, zoals het periaqueductale grijs (PAG), de hypothalamus, de amygdala, de bed nucleus van de stria terminalis, het mediale preoptische gebied en de limbische cortex. Deze gebieden hebben specifieke verbindingen met interneuronen in het ruggenmerg en in de hersenstam. Deze interneuronen, op hun beurt, projecteren naar motoneuronen van spieren, die betrokken zijn bij bepaald gedrag. Het mediale deel van het EMS heeft geen specifieke verbindingen, maar projecteert diffuus naar interneuronen en motoneuronen in de hersenstam en in alle segmenten van het ruggenmerg. Het mediale deel wordt beschouwd als een level-setting systeem, dat de mate van exciteerbaarheid van inter-, sensorische- en motoneuronen bepaalt.

Het PAG is het meest caudale deel van het limbische systeem en speelt een belangrijke rol binnen het EMS. Elektrische stimulatie van het PAG in katten leidt tot defensief en agressief gedrag, en tot het verhogen van de pijndrempel, mictie en vocalisatie. Wanneer het PAG gestimuleerd wordt in krolse dieren vertonen zij paringsgedrag. Het PAG kan deze gedragingen uitvoeren door zijn projecties naar specifieke interneuron groepen in pons en medulla oblongata, die op hun beurt verbindingen hebben met motoneuronen in hersenstam en ruggenmerg.

Een van de interneurongroepen die projecties ontvangt van het PAG is de nucleus retroambiguus (NRA) in het ventrolaterale deel van de caudale medulla oblongata. De NRA speelt een belangrijke rol in de controle van abdominale druk, in de context van ademhaling, vocalisatie en braken, maar speelt ook een belangrijke rol bij paringsgedrag. De NRA projecteert voornamelijk contralateraal naar motoneuronen in hersenstam en ruggenmerg. In de hersenstam heeft de NRA verbindingen met motoneuronen van de pharynx en zachte gehemelte. In het cervicale, thoracale en hoog lumbale ruggenmerg projecteert de NRA naar motoneuronen van het diafragma en van de intercostaal- en buikspieren. In hamster, kat en aap is aangetoond dat de NRA specifieke verbindingen heeft met groepen motoneuronen in het lumbosacrale ruggenmerg. Van deze projecties wordt verondersteld dat ze betrokken zijn bij paringsgedrag. In kat en aap is tevens aangetoond dat deze NRA-lumbosacrale projecties onder invloed staan van het vrouwelijk geslachtshormoon oestrogeen. In krolse katten is het aantal eindigingen van NRA vezels op achterpoot motoneuronen bijna negen keer groter

dan in niet-krolse katten. Deze toename wordt veroorzaakt door uitgroei van de NRA-eindigingen.

Dit proefschrift geeft nieuwe inzichten in de NRA projecties betrokken bij de controle van abdominale druk en paringsgedrag. Ten eerste wordt een compleet overzicht van NRA projecties naar alle segmenten van het ruggenmerg gepresenteerd (hoofdstuk 2). Daarnaast beschrijft het de aard van de NRA projecties naar motoneuronen van buikspieren en larynxspieren (hoofdstukken 3 en 4) en geeft het aan welke kerngebieden, met uitzondering van de NRA, de motoneuronen van de pharynx en zachte gehemelte controleren (hoofdstuk 5). Tevens worden de cellen met de oestrogeen receptor-alpha in kaart gebracht (hoofdstukken 6 en 7) en wordt de invloed van het hormoon oestrogeen op de PAG-NRA projectie beschreven (hoofdstuk 7). Tenslotte wordt ingegaan op de vraag of de cellen in de NRA die betrokken zijn bij de controle van de abdominale druk dezelfde of andere zijn als de NRA neuronen die een rol spelen in paringsgedrag (hoofdstuk 8).

Een aantal van de NRA-motoneuronale verbindingen in de hersenstam en ruggenmerg zijn al bekend, maar een compleet overzicht van NRA-ruggenmerg projecties ontbreekt nog. Deze projecties zijn in kaart gebracht door middel van een anterograde tracing studie (hoofdstuk 2). In het hoog cervicale ruggenmerg eindigen NRA vezels in het gebied van de motoneuronen van de cleidomastoideus en dorsale nek spieren, zoals de splenius, biventer cervicis en complexus. In laag cervicale segmenten zijn NRA vezels gevonden in de motoneurongroepen van het diafragma, pectoralis minor en cutaneus trunci. In thoracale en hoog lumbale segmenten is een bilaterale projectie gevonden naar de motoneurongroepen van de intercostaal- en buikspieren, en mogelijk ook naar die van axiale spieren en interneuronen. De projectie naar het lumbosacrale ruggenmerg is vergelijkbaar met een eerdere studie (VanderHorst and Holstege, 1995). Verder zijn er door het hele ruggenmerg NRA vezels gevonden in interneurongroepen in laminae V-VIII en X. Deze resultaten tonen aan dat er in het cervicale en thoracale ruggenmerg geen specifieke NRA projecties gevonden zijn naar motoneuronen van spieren die een rol kunnen spelen bij paringsgedrag, maar wel naar interneuronen en naar motoneuronen van (hulp)ademhalingspielen.

Met betrekking tot de controle van abdominale druk, met name in de context van ademhaling en vocalisatie geven de hoofdstukken 3 en 4 van dit proefschrift informatie over de aard van de NRA projecties naar motoneuronen van de obliquus externus abdominis, cutaneus trunci en cricothyroideus. De obliquus externus is een schuine buikspier die, in samenwerking met andere buik- en bekkenbodemspieren, bij contractie de druk in de buikholte kan verhogen. De cutaneus trunci is een heel dunne spier die net onder de huid gelegen is. Deze spier komt niet voor bij de mens. Het is niet zeker welke functie deze spier heeft, maar mogelijk speelt deze een rol bij rillen en het bewegen van de huid om insecten te verwijderen. In de hamster speelt hij een rol bij het omhoog brengen van de staart tijdens de paringshouding. Aangezien de spier erg dun is, is het

onwaarschijnlijk dat hij een grote rol speelt bij de controle van de abdominale druk. Eerder lichtmicroscopisch onderzoek heeft al laten zien dat de NRA sterke verbindingen heeft met de motoneurongroepen van obliquus externus abdominis en cutaneus trunci, maar de vraag is of deze projecties inhiberend of exciterend zijn. Door middel van een gecombineerde anterograde en retrograde tracing studie op elektronen microscopisch niveau is de aard van deze verbindingen nagegaan (hoofdstuk 3). Uit de resultaten blijkt dat de grote meerderheid van de NRA vezels monosynaptische verbindingen maakt met de motoneuronen van de obliquus externus abdominis en van de cutaneus trunci. De NRA eindigingen blijken asymmetrische synapsen met de dendrieten van de motoneuronen te maken en ronde blaasjes te bezitten, kenmerkend voor exciterende verbindingen. Deze resultaten tonen dus aan dat de NRA projecties naar de motoneuronen van de obliquus externus abdominis en cutaneus trunci excitatoir van aard zijn.

Vocalisatie is het maken van geluid en kan opgewekt worden door stimulatie van het PAG. Het komt tot stand door een luchtstroom door de luchtpijp en het strottenhoofd, waaraan de stembanden, die in trilling gebracht worden, bevestigd zijn. De luchtstroom is het gevolg van een verhoogde intra-abdominale en thoracale druk, die tot stand gebracht wordt door contractie van buik-, bekkenbodemen en intercostaalspiere. De cricothyroideus is een van de larynxspieren die de stembanden aanspant tijdens vocalisatie. Lichtmicroscopische studies kunnen niet aantonen of de NRA monosynaptische verbindingen heeft met de motoneuronen van de cricothyroideus, omdat deze verspreid liggen in het laterale tegmentaal veld van de medulla oblongata. Om deze reden is een elektronen microscopisch onderzoek gedaan om aan te tonen dat er monosynaptische NRA verbindingen zijn met de cricothyroideus motoneuronen (hoofdstuk 4). Inderdaad is er een groot aantal NRA eindigingen gevonden die synaptisch contact maken met de dendrieten van deze motoneuronen. Net als de NRA projecties naar de motoneuronen van de obliquus externus abdominis en cutaneus trunci zijn ook deze verbindingen excitatoir van aard, aangezien de meeste NRA eindigingen asymmetrische synapsen met de cricothyroideus dendrieten vormen en ronde en pleiomorfe blaasjes bevatten.

Spieren van de pharynx en zachte gehemelte spelen, net als de larynxspieren, niet alleen een belangrijke rol bij vocalisatie en ademhaling, maar ook bij slikken en braken. De motoneuronen van de pharynx en zachte gehemelte liggen in de dorsale groep van de nucleus ambiguus (dgNA). De dgNA is een duidelijk te onderscheiden kern in het lateraal tegmentaal veld van de medulla oblongata. Dit maakt het mogelijk om de projecties naar deze groep te bestuderen op lichtmicroscopisch niveau. Het is al bekend dat de NRA vele verbindingen heeft met de motoneuronen van de pharynx en zachte gehemelte, maar niet of er andere kernen in het centrale zenuwstelsel zijn die naar deze motoneuronen projecteren. Licht- en elektronen microscopisch onderzoek in hoofdstuk 5 van dit proefschrift toont aan dat er maar een klein aantal andere celgroepen, gelocaliseerd in pons, medulla oblongata en eerste cervicale segment, naar de motoneuronen

van de pharynx en zachte gehemelte projecteren. Celgroepen in de pons zijn gelocaliseerd in de parabrachiale kernen en in het tegmentum dorsomediaal van de oliva superior. Celgroepen in de medulla oblongata zijn gelocaliseerd in het mediale tegmentaal veld, caudale raphe kernen, laterale tegmentaal veld en in de nucleus solitarius.

In het kader van het onderzoek naar paringsgedrag zijn de hoofdstukken 6 en 7 van dit proefschrift gewijd aan de localisatie van cellen die oestrogeen receptoren bevatten en wordt nagegaan of de PAG-NRA projectie ook beïnvloed wordt door het hormoon oestrogeen. De paringshouding van de vrouwtjes hamster bestaat uit elevatie van de staart en lordosis van de rug. Tijdens deze houding is zij gedurende een aantal minuten volledig immobiel, wat het mannetje in staat stelt te paren. In de niet-oestrus periode is het vrouwtje aggressief tegen het mannetje, waardoor geen paringsgedrag plaatsvindt. Het paringsgedrag van de vrouwtjes kat is ingewikkelder dan dat van de hamster. Het bestaat uit het opzij bewegen van de staart, lordosis van de rug en het trappelen met de achterpoten. In beide diersoorten vindt paringsgedrag uitsluitend plaats wanneer zij in oestrus (krols) zijn. Een prikkel, zoals bijvoorbeeld het aaien over de lage rug en perineum leidt in de periode van oestrus tot het vertonen van de paringshouding, maar nooit tijdens de non-oestrus periode. Aangezien paringsgedrag sterk afhankelijk is van de bloedspiegels van oestrogeen is het van belang te weten waar in het centrale zenuwstelsel de cellen gelocaliseerd zijn die gevoelig zijn voor dit hormoon, d.w.z. waar liggen de cellen met oestrogeen receptoren. Door gebruik te maken van immunohistochemische methoden zijn de cellen met de oestrogeen receptor-alpha (ER- $\alpha$ -IR) in de hamster (hoofdstuk 6) en de kat (hoofdstuk 7) in kaart gebracht.

Het verdelingspatroon van ER- $\alpha$ -IR cellen in het mesencephalon van katten en hamsters vertoont grote overeenkomsten. In beide diersoorten bevinden de meeste cellen zich in het laterale en ventrolaterale deel van het PAG en het aangrenzende tegmentum. In de kat, maar niet in de hamster, zijn ze ook in het dorsomediale deel van het PAG aangetroffen. In pons en medulla in de hamster zijn ER- $\alpha$ -IR gevonden in de parabrachiale kernen, de nucleus van de tractus solitarius en in de NRA. In de kat zijn ze niet aanwezig in de NRA, maar daarentegen wel in de oppervlakkige lagen van de nucleus van het caudale spinale trigeminus complex. In katten is naast het verdelingspatroon van ER- $\alpha$ -IR cellen in het mesencephalon, pons en medulla ook naar de localisatie hiervan in het tel- en diencephalon en in het gehele ruggenmerg bestudeerd. In het telen- en diencephalon blijken er ER- $\alpha$ -IR cellen in de amygdala, bed nucleus van de stria terminalis, lateral septum kernen, hypothalamus en in het preoptische gebied te liggen. Door de hele lengte van het ruggenmerg zijn ER- $\alpha$ -IR cellen gevonden in Rexed's laminae I en II van de dorsale hoorn. Alleen in het onderste deel van het lumbale en in het sacrale ruggenmerg zijn ze bovendien aangetroffen in lamina V en in de sacrale parasymphatische kern.

Uit eerder onderzoek is al gebleken dat cellen in het dorsomediale, laterale en

ventrolaterale deel van het PAG sterke verbindingen hebben met de cellen in de NRA. De localisatie van de NRA-projectie cellen in het PAG komt sterk overeen met het verdelingspatroon van de ER- $\alpha$ -IR neuronen in het PAG. Aangezien de PAG-NRA projectie een rol speelt bij paringsgedrag, wordt verwacht dat deze projectie beïnvloed wordt door het hormoon oestrogeen. Om deze reden is onderzocht of de NRA-projectie cellen in het PAG de oestrogeen receptor-alpha bevatten (hoofdstuk 7). Uit de resultaten blijkt dat, ondanks de grote overlap tussen het verdelingspatroon van beide groepen cellen, dat maar voor een relatief klein aantal van de cellen in het PAG opgaat. Een groot deel van de neuronen in het PAG zijn interneuronen die verbindingen hebben naar andere cellen binnen het PAG. Waarschijnlijk maken de meeste ER- $\alpha$ -IR neuronen deel uit van deze interneuronen. Mogelijk projecteren deze ER- $\alpha$ -IR interneuronen naar de PAG cellen die in direct contact staan met de NRA cellen. Op deze manier zou oestrogeen dus zowel direct als indirect, via interneuronen, invloed kunnen uitoefenen op de PAG-NRA projectie voor paringsgedrag.

Zoals reeds opgemerkt bestaat de NRA uit interneuronen die directe verbindingen hebben met motoneuronen van spieren die een rol spelen in de controle van abdominale druk en paringsgedrag. Het is niet bekend of de NRA cellen die naar de motoneuronen van achterpoot-, rug- en staartspieren projecteren, andere zijn dan de NRA cellen die naar de motoneuronen van de intercostaal- en buikspieren en van de larynx, pharynx en zachte gehemelte projecteren. Immers, indien er binnen de NRA groepen cellen bestaan die verschillende functies hebben, zullen deze ook verschillende projecties naar motoneuronen vertonen. NRA cellen die betrokken zijn bij de controle van abdominale druk hebben verbindingen met motoneuronen van intercostaal-, buik- en bekkenbodemspieren en cellen in de NRA, die een rol spelen in paringsgedrag, hebben verbindingen met motoneuronen van achterpoot-, rug- en staartspieren. Hoofdstuk 8 beschrijft een fysiologische studie, verricht met dr. P.A. Kirkwood van het Institute of Neurology in London, UK, waarin dit is onderzocht. De resultaten hiervan tonen aan dat een groep NRA cellen met projecties naar het lumbosacrale ruggenmerg niet actief is tijdens normale ademhaling. Waarschijnlijk is het zo dat deze groep cellen alleen een rol speelt in het paringsgedrag en mogelijk projecties ontvangt van neuronen in het PAG die de oestrogeen receptor-alpha bevatten.

In dit proefschrift is een concept gepresenteerd met betrekking tot de rol die de NRA speelt in de controle van paringsgedrag en van abdominale druk, in de context van ademhaling en vocalisatie. De motorische component van deze gedragingen wordt gevormd door specifieke afdalende projecties van het PAG naar de NRA. De NRA projecteert naar motoneuronen in de hersenstam en het ruggenmerg. De autonome componenten, zoals bloeddruk en exciteerbaarheid van neuronen, komen tot stand door PAG projecties naar andere relay kernen in de hersenstam. Al deze componenten worden geïntegreerd door het PAG. Het PAG speelt dus een cruciale rol in de organisatie van emotionele gedragingen, ten eerste omdat

## ***Samenvatting***

---

het PAG projecties ontvangt van limbische structuren en het ruggenmerg, en ten tweede omdat het projecteert naar relay kernen in de hersenstam. De NRA is één van deze relay kernen van het PAG voor zijn controle van overlevingsgedrag.