

9. Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft een onderzoek naar de indeling van de witte stof en de schors van de flocculus en de nodulus in het cerebellum van het konijn op grond van het voorkomen van het enzym acetylcholinesterase (AChE) (hoofdstuk 1), de organisatie van afferente verbindingen van de oliva inferior naar de flocculus en nodulus (hoofdstuk 2), de efferente verbindingen van de flocculus naar de vestibulaire en cerebellaire kernen (hoofdstuk 3), en de karakteristieken van oogbewegingen die door microstimulatie van de flocculus kunnen worden opgewekt (hoofdstuk 4).

De flocculus van het cerebellum speelt een belangrijke rol bij de controle van oogbewegingen. Diverse anatomische en elektrofysiologische studies hebben reeds aangetoond, dat de flocculus in anatomisch afgrensbare zones is verdeeld. Er bestaan echter grote verschillen in aantal en grootte van deze zones tussen de verschillende studies. Waarschijnlijk worden deze verschillen in de hand gewerkt door individuele variaties in het aantal folia en de grootte en vorm van de folia van de flocculus. Met behulp van een intrinsiek referentie kader zouden de anatomische en fysiologische data van verschillende experimenten kunnen worden vergeleken en zouden de problemen, die ontstaan door de individuele variatie in de morfologie van de flocculus zijn opgelost.

Hersenmateriaal, dat gekleurd wordt met een enzym histochemische methode voor acetylcholinesterase (AChE), laat een bijzonder patroon zien, waarbij dunne raphes, die uit dunne AChE-positieve vezels bestaan, de witte stof van het cerebellum verdelen in compartimenten, waarin dikkere vezels, die niet met AChE kleuren, zijn gelegen. In hoofdstuk 1 concentreerde het onderzoek zich op de vraag of de witte stof van de flocculus in het konijn met behulp van deze techniek in compartimenten verdeeld zou kunnen worden. Hiervoor werden hersenen van konijnen in transversale, horizontale en sagittale coupes gesneden en gekleurd voor AChE. Het onderzoek richtte zich tevens op de morfologie van de ventrale paraflocculus, de pedunculus van de flocculus en daaraan gerelateerde vestibulaire en cerebellaire kernen.

De sterkste aankleuring voor AChE wordt gezien in de granulaire laag, terwijl Purkinje cellen ongekleurd blijven. De moleculaire laag lijkt uit twee delen te bestaan, waarvan het binnenste eenderde deel, dat tegen de Purkinje cellaag is gelegen, relatief hard aankleurt in vergelijking met het buitenste tweederde deel, dat haast geen AChE bevat. Dit patroon wordt gevonden in de flocculus en de ventrale paraflocculus en verdwijnt abrupt op de grens van de ventrale met de dorsale paraflocculus. De witte stof van de flocculus wordt van het brachium pontis gescheiden door een sterk AChE-positieve raphe, die caudaal minder duidelijk wordt. De witte stof zelf wordt door 4 raphes verdeeld in 5 compartimenten. Deze compartimenten worden van caudolateraal naar rostromediaal benoemd als C₂, FC₁-FC₄. Caudaal versmelten de compartimenten FC₁-FC₄ en vormen zij de pedunculus van de flocculus. Deze verloopt door groep y van de vestibulaire kernen in de richting van de caudale pool van de nucleus vestibularis superior. De celgroep y bestaat uit een ventrale, compacte laag van cellen, die een kapje vormen, over het corpus restiforme, en een dorsale subnucleus met grotere, spoelvormige cellen tussen de vezels van de pedunculus flocculi. Alle neuronen van de groep y kleuren sterk voor AChE. Groep y grenst aan de dorsale zijde aan de ventromediale uitloper van de laterale cerebellaire kern, die kleine en middelgrote cellen bevat (Lpc). Mediaal versmelt groep y met de superior vestibulaire kern.

Ondanks individuele verschillen in aantal en grootte van de folia van de flocculus behouden de raphes in de witte stof van de flocculus hun positie. Deze onderverdeling in compartimenten wordt in dit proefschrift als intrinsiek referentiekader gebruikt voor de vergelijking van topografische gegevens, verkregen via anatomische tracing (zie hoofdstukken 2 en 3) en elektrofysiologisch onderzoek (zie hoofdstuk 4). Deze methode is veel nauwkeuriger dan de plaatsbepaling ten opzichte van folia en interfoliale fissuren zoals tot dusver gebruikelijk was.

De flocculus ontvangt klimvezels afkomstig van de volgende subnuclei van de onderste olijf: de dorsal cap, de ventrolateral outgrowth en de rostrale pool van de mediale bijolijf. De dorsal cap en de ventrolateral outgrowth ontvangen optokinetische informatie uit de kern

van de tractus opticus en de kernen van de accessoire tractus opticus in het mesencephalon. In hoofdstuk 2 werd anterograde tracing met WGA-HRP, gecombineerd met AChE histochemie, gebruikt om na te gaan of de klimvezelprojectie naar de flocculus en de nodulus een zonale indeling kent, die zich houdt aan het in hoofdstuk 1 beschreven intrinsieke referentie kader. Bij het maken van de injecties met WGA-HRP werden de subnuclei van de oliva inferior geïdentificeerd aan de hand van hun fysiologische karakteristieken.

De hoofdbundel van klimvezels naar de flocculus splitst zich in 5 kleinere bundels. Elk van deze bundels bezet een compartiment, dat begrensd is door AChE-positieve raphes. Het caudale deel van de dorsal cap stuurt klimvezels via compartimenten FC₂ en FC₄, terwijl afferente vezels vanaf het rostrale deel van de dorsal cap en de ventrolateral outgrowth gebruik maken van compartimenten FC₁ en FC₃. Compartiment C₂ bevat klimvezels afkomstig van de rostrale mediale bijolijf (rMAO). De vezels binnen elk compartiment eindigen in een nauwkeurig af te bakenen longitudinale strook van de moleculaire laag (flocculus zones C₂, FZ_I-FZ_{IV}). De begrenzing van deze stroken is scherp en ligt in het verlengde van de raphes. Eenzelfde patroon is aanwezig in de nodulus met 4 compartimenten in de witte stof, compartimenten XC₁-XC₄. Injecties in het caudale deel van de dorsal cap en nucleus β laten gelabelde vezels zien in compartimenten XC₁ en XC₄, welke als klimvezels eindigen in zones XZ_I en XZ_{IV} van de nodulus. Klimvezels uit het rostrale deel van de dorsal cap en de ventrolateral outgrowth eindigen via compartimenten XC₂ en XC₄ in zone XZ_{II} op het ventrale en dorsale gedeelte van lobulus X en in een centrale strip binnen zone XZ_{IV}. Injecties, die de rMAO meenemen, sturen hun vezels via compartiment XC_{III} naar zone XZ_{III} op de dorsale zijde van lobulus X en de ventrale zijde van lobulus IX. Deze bevindingen laten zien dat elk van de witte stof compartimenten (FC en XC) aan een bepaalde Purkinje cel zone (FZ en XZ) is gerelateerd.

In hoofdstuk 3 werd de efferente projectie van de zones in de flocculus naar de vestibulaire kernen bestudeerd met behulp van HRP

retrograde tracing, WGA-HRP anterograde tracing, en AChE histochemie. Evenals in hoofdstuk 2 werden de injectieplaatsen bepaald aan de hand van de fysiologische karakteristieken van de verschillende Purkinje cell zones. De zones FZ_I en FZ_{III} sturen axonen via compartiment FC₁ en FC₃ naar het dorsolaterale gedeelte van de nucleus vestibularis superior. Vezels behorende bij deze compartimenten lijken ook te eindigen in groep y. Op vergelijkbare wijze projecteren FZ_{II} en FZ_{IV} naar de mediale vestibulaire kern via FC₂ en FC₄. Geen van de injecties was gelokaliseerd binnen C₂. De resultaten werden vergeleken met die van het vorige hoofdstuk.

In hoofdstukken 1-3 wordt beschreven hoe subgroepen binnen de oliva inferior in contact komen met specifieke Purkinje cel zones, die op hun beurt projecteren naar subgroepen binnen de vestibulaire kernen. Deze zones zijn morfologisch geassocieerd met specifieke compartimenten in de witte stof. Deze zonale verbindingen zouden het neuronale substraat kunnen zijn van gedifferentieerde controle over oogspier activiteit door de flocculus. Lokale elektrische stimulatie in de flocculus veroorzaakt verschillende typen oogbewegingen. Alweer blijkt, dat een consistente interpretatie van de resultaten van dergelijke experimenten verstoord wordt door de variabele morfologie van de flocculus. Zodoende werd AChE histochemie ook in hoofdstuk 4 ingezet om de relatieve plaatsing van de stimuluslocaties, die gemerkt werden door kleine lesies, te verifiëren.

De drie-dimensionale, binoculaire oogbewegingen, die door elektrische microstimulatie van de flocculus van het cerebellum in wakkere gepigmenteerde konijnen konden worden opgewekt, werden geregistreerd met behulp van de magnetische inductie methode. Op beide ogen werden inductiespoeltjes geïmplanteerd op de sclerae. Geplaatst in een homogeen magnetisch veld zal er bij een oogbeweging een spanning worden geïnduceerd binnen de spoeltjes. Veranderingen in deze spanning zijn direct gerelateerd aan de grootte en de richting van de oogbeweging.

Voor de beschrijving van de oogbewegingen werd een orthogonaal

referentiekader bestaande uit een verticale as en twee horizontale assen gebruikt. De horizontale assen maken een hoek van 45° en 135° met de rostraal gerichte 0° as.

Oogbewegingen konden het gemakkelijkst worden opgewekt door te stimuleren (0,2 msec pulsen bij 200 Hz gedurende 1 sec, $\leq 20 \mu\text{A}$) in de diepe granulaire laag en de witte stof. De oogbewegingen waren vrij langzaam ($5\text{--}20^\circ/\text{sec}$). Beide ogen reageerden op de stimulus, waarbij het oog, dat ipsilateraal was gelokaliseerd ten opzichte van de gestimuleerde flocculus, doorgaans de grootste amplitude had. Soms waren de oogbewegingen uitsluitend ipsilateraal gelokaliseerd. De oogbewegingen werden geclassificeerd aan de hand van de grootste oogbewegings-component en de richting van de rotatie (met de klok mee, CW, of tegen de klok in, CCW). Achtenzeventig procent van de geregistreeerde oogbewegingen kon worden geplaatst in één van twee groepen. In één van de groepen bestond de grootste respons uit een abductie van het ipsilaterale oog rondom de verticale as (19%), terwijl voor de andere groep (59%) de grootste component een CCW rotatie was van het ipsilaterale (linker) oog rondom de ipsilaterale 135° as.

Deze twee voornaamste groepen van drie-dimensionale oogbewegingen zijn nauw geassocieerd met de anatomische compartimenten, die met behulp van AChE histochemie kunnen worden begrensd. Voor de drie grootste van de vijf compartimenten (FC₁, FC₂ en FC₃) zijn stimulatie gegevens beschikbaar. De middelste van deze 3 (FC₂) is gerelateerd aan de eerste groep, met rotaties rond de verticale as, de twee flankerende compartimenten (FC₁ en FC₃) zijn betrokken bij rotaties rond de 135° as uit de tweede groep. De functionele betekenis van de twee andere, kleinere compartimenten (C₂ en FC₄) kon niet worden vastgesteld.

De orientatie van de rotatie-assen voor oogbewegingen, opgewekt door stimulatie van een bepaald compartiment, komt overeen met de richting van de rotatie-assen voor bewegingen van de omgeving, die een optimale respons uitlokken in de klimvezels die eindigen op Purkinje cellen van de corresponderende zone. Dit suggereert, dat de flocculus uit

modules is opgebouwd die voor hun klimvezel input en hun output hetzelfde coördinaten systeem hanteren. De positie van deze assen komt goed overeen met de positie van de assen van de halfcirkelvormige kanalen en met die van bepaalde oogspier paren. Elke module, met zijn eigen set van aanvoerende en afvoerende verbindingen, representeert oogbewegingen rond een bepaalde as.

Het verband, dat werd aangetoond tussen bepaalde klassen oogbewegingen, klimvezel afferenten en Purkinje cel efferenten met anatomische compartimenten, maakt het waarschijnlijk dat de flocculus uit modules bestaat, die het structurele correlaat vormen van een coördinaten systeem, dat door de hersenen wordt gebruikt bij de controle van compensatoire oogbewegingen.