### А.И. Горбачевская

# СВЯЗИ НЕОПРЕДЕЛЁННОЙ ЗОНЫ ПРОМЕЖУТОЧНОГО МОЗГА СОБАКИ С ЧЁРНЫМ ВЕЩЕСТВОМ, ВЕНТРАЛЬНЫМ ПОКРЫШЕЧНЫМ ПОЛЕМ И НОЖКО-МОСТОВЫМ ЯДРОМ ПОКРЫШКИ

Лаборатория физиологии высшей нервной деятельности (зав. — д-р биол. наук В.Т. Шуваев) Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; e-mail: aig@infran.ru

В работе, выполненной техникой, основанной на ретроградном и антероградном транспорте пероксидазы хрена, исследована организация связей разных секторов неопределённой зоны (ZI) промежуточного мозга с подструктурами чёрного вещества, вентрального покрышечного поля и ножко-мостового ядра покрышки среднего мозга собаки. Установлено, что эти структуры взаимосвязаны между собой. В организации изучаемых связей выявлены элементы, указывающие на возможность сегрегированного проведения функционально различной информации по установленным путям. Наряду с этим, описанная во всех секторах ZI конвергенция проекционных волокон нейронов подструктур среднемозговых ядер, а в последних также — от нейронов всех секторов ZI, свидетельствует о возможности интеграции функционально различной информации как на уровне ZI, так и на уровне исследуемых в настоящей работе структур среднего мозга.

**Ключевые слова:** базальные ганглии, неопределённая зона, чёрное вещество, вентральное покрышечное поле, ножкомостовое ядро покрышки.

Установлено, что неопределённая зона (ZI) промежуточного мозга, как и базальные ганглии, имеет отношение к патофизиологии паркинсонизма [13]. Хирургическое разрушение или стимуляция этой структуры облегчают симптомы заболевания, связанные не только с двигательными расстройствами, но и с немоторными проявлениями, такими как депрессия, тревога, когнитивные расстройства, нарушение сна [3, 15]. В ZI выделяют несколько секторов, различающихся по структурным, нейрохимическим и функциональным характеристикам [1, 13]. Для определения оптимального сектора ZI с целью воздействия на него для уменьшения выявленных симптомов заболевания необходимо знание пространственной организации связей всех секторов этой структуры с базальными ганглиями. Особый интерес представляют малоизученные связи ZI с их выходными ядрами — ножко-мостовым ядром (PPN) покрышки среднего мозга и ядрами комплекса чёрное вещество (SN) — вентральное покрышечное поле (VTA). Эти структуры связывают базальные ганглии с нижележащими мозговыми исполнительными центрами и неоднородны по тем же характеристикам, как и ZI [8, 11, 14]. Цель настоящего исследования — изучить связи секторов ZI с отдельными подструктурами PPN и ядерного комплекса SN — VTA.

Материал и методы. Работа выполнена на 14 взрослых беспородных собаках с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Операцию, как и перфузию, осуществляли под внутривенным наркозом, используя пропофол (Б. Браун Мельзунген АГ, Германия) (2,5 мг/кг) после предварительного внутримышечного введения рометара (4 мг/кг). В качестве маркёров использовали 0,12-0,08 мкл 40% водного раствора пероксидазы хрена (HRP) (Sigma, США, тип VI) или 0,1 мкл 2,5% HRP, конъюгированной с агглютинином проростков пшеницы (WGA, Sigma, США). HRP является ретроградным, а HRP и WGA одновременно ретроградным и антероградным маркёром, введение которого позволяет выявлять не только ретроградно меченные клетки, но и антероградно меченные аксоны. В стерильных условиях по стереотаксическим координатам атласа [4] маркер вводили в разные подструктуры PPN и комплекса ядер SN — VTA. Спустя 48 ч производили перфузию головного мозга. Эту процедуру, а также последующую обработку мозга осуществляли по прописи [12], используя тетраметилбензидин для гистохимического выявления HRP в телах и аксонах нейронов ZI. Двум контрольным животным вводили в исследуемые структуры иглу шприца с маркёром, но не инъецировали последний. У этих собак меченых клеток в структурах мозга не обнаружено. Определение фронтальных уровней гистологических срезов мозга, а также идентификацию ZI и её отдельных секторов проводили в соответствии с атласом [4] и собственными данными изучения её топографии и цитоархитектоники [1].

Результаты исследования. Полученные данные представлены в таблице. Животным I группы вводили маркер в разные части PPN. При инъекции маркера в латеральную или медиальную область диффузной части PPN (собаки № 1–3) отмечено сходное распределение ретроградно меченных клеток (рис. 1, а). Антероградно меченные аксоны (см. рис. 1, б) были обнаруже-

Группы животных	Номера животных	Локализация зон инъекций марке- ра (HRP или HRP–WGA) в разных частях PPN и SN–VTA	Фронтальные уровни по атласу [4]	Меченые нейроны и аксоны в ZI			
				ZIr	ZId	ZIv	ZIc
Ι	1	IPPNd (HRP-WGA)	4.5-3.0	+/AHT	+/AHT	+/AHT	+/AHT
	2	lPPNd (HRP)	6.5-4.5	+	+	+	++
	3	mPPNd (HRP-WGA)	5.5-3.5	+	++	++/ AHT	+/ AHT
	4	PPNc (HRP-WGA)	4.5-3.5	0/AHT	0/AHT	+/AHT	+/AHT
	5	PPNc (HRP)	4.0-2.5	0	0	+	+
II	6	VTA (HRP-WGA)	9.0-8.5	++/AHT	+/AHT	+	+
	7	VTA (HRP)	12.0-9.0	++	++	+	+
	8	SND (HRP-WGA)	9.0-8.5	0	0	+/AHT	+/AHT
	9	SND (HRP)	8.5-7.0	0	0	+	+
	10	SNL (HRP- WGA)	9.0-8.5	+/AHT	+/AHT	0	0
	11	SNL (HRP)	9.5-9.0	+	+	0	0
	12	SNC (HRP-WGA)	9.5-8.5	+/AHT	+/AHT	+/AHT	+/AHT
	13	SNC (HRP-WGA)	9.0-8.5	+/AHT	+/AHT	+/AHT	+/AHT
	14	SNR (HRP-WGA)	8.5-8.0	+/AHT	+/AHT	+/AHT	+/AHT

Распределение меченых нейронов и аксонов в неопределённой зоне (ZI) промежуточного мозга при инъекциях маркера в разные части ножко-мостового ядра покрышки среднего мозга (PPN) и комплекса ядер чёрное вещество (SN) вентральное покрышечное поле (VTA) мозга собаки

Примечание. Число нейронов (H), меченных маркером на одном фронтальном срезе мозга: 0 — меченые нейроны отсутствовали; + — (1–3 H); ++ — (4–10 H); АНТ — антероградное мечение аксонов. Подструктуры PPN: PPNc — компактная часть; IPPNd — латеральная и mPPNd — медиальная области диффузной части (PPNd). Части SN: SNC — компактная; SND — дорсальная; SNL — латеральная; SNR ретикулярная. Сектора ZI: ZIr — ростральный; ZId — дорсальный; ZIv — вентральный; ZIc — каудальный. Маркеры: HRP — пероксидаза хрена; HRP–WGA — пероксидаза хрена, конъюгированная с агглютинином проростков пшеницы.

ны во всех секторах ZI у животных с введением маркера в латеральную область диффузной части PPN, и только в вентральном и каудальном секторах — у животных с введением маркера в медиальную область этого ядра. У животных, которым инъекция маркера была сделана в компактную часть PPN (собаки № 4-5), маркированные аксоны были выявлены во всех секторах ZI, а маркированные нейроны — только в её вентральном и каудальном секторах. ІІ группу составили собаки, которым маркер инъецировали в структуры комплекса ядер SN — VTA. При введении маркера в VTA (собаки № 6–7) в ростральном и дорсальном секторах ZI выявлены маркированные нейроны (см. рис. 1, в) и аксоны. В вентральном и каудальном секторах ZI у этих животных были зафиксированы только меченые нейроны. Собакам № 8-9 маркер инъецировали в дорсальную часть SN. У них ретроградное и антероградное мечение (см. рис. 1, г) наблюдали в вентральном и каудальном секторах. При введении маркера в латеральную часть SN (собаки № 10–11) лишь в ростральном и дорсальном секторах ZI выявлены меченые нейроны и аксоны. В других секторах у этих животных маркированных нейронов и аксонов не выявлено. Когда маркер вводили в компактную часть SN (собаки № 12–13), а также в ретикулярную часть SN, меченые нейроны и аксоны были обнаружены во всех секторах ZI.

Как можно видеть на схеме (рис. 2), где суммированы полученные результаты о связях ZI с PPN и комплексом ядер SN — VTA, на латеральную и медиальную области диффузной части PPN проецируются все сектора ZI, а на компактную часть PPN — вентральный и каудальный сектора. При этом все сектора получают проекционные волокна от нейронов латеральной области диффузной части PPN и компактной части PPN, а от медиальной области диффузной части PPN проекционные волокна направлены лишь на вентральный и каудальный сектора ZI.

Изучение организации связей ZI с комплексом SN — VTA позволяет заключить, что все сектора ZI проецируются на VTA, ретикулярную и компактную части SN. На латеральную часть SN из всех секторов ZI проецируются только её дорсальный и ростральный сектора, а на дорсальную часть SN — её вентральный и каудальный сектора. Характерно, что на те же сектора ZI, которые проецируются на структуры комплекса SN — VTA, направлены обратные проекции от структур этого комплекса. Исключением является только VTA, которое получает проекционные волокна от нейронов всех секторов ZI, но иннервирует только ростральный и дорсальный её сектора.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что в большинстве секторов ZI можно наблюдать конвергенцию проекционных волокон,



Рис. 1. Меченые нейроны и аксоны в неопределённой зоне (ZI) при введении маркера в ножко-мостовое ядро покрышки (a, б), в вентральное покрышечное поле (в) и в чёрное вещество (г) мозга собаки. Окраска по М.М. Mesulam [12].



Рис. 2. Организация проекций неопределённой зоны (ZI) промежуточного мозга с ножко-мостовым ядром покрышки (PPN) и комплексом ядер чёрного вещества (SN) — вентральное покрышечное поле (VTA). Стрелки указывают наличие проекций: сплошные — от ZI; пунктирные — на ZI. Обозначения те же, что и в таблице.

26

исходящих от нейронов всех подструктур исследуемых ядер (PPN, SN — VTA) и, наоборот, в отдельных подструктурах ядер среднего мозга от большинства секторов ZI.

Обсуждение полученных данных. В проведенных опытах впервые была изучена организация проекций отдельных секторов ZI и разных подструктур PPN и ядерного комплекса SN- VTA, которая до сих пор не была исследована у собаки. Ранее на других животных было определено, что ZI взаимосвязана с этими подкорковыми ядрами [9, 16, 17]. Однако указанные авторы не детализировали организацию связей разных сегментов ZI с отдельными подструктурами этих ядер. Она описана только у крысы [7, 9], у которой изучали связи ZI с базальными ганглиями. Были установлены проекции этой структуры на компактную и ретикулярную части SN и обе части PPN. К сожалению, в этих исследованиях не рассматривались связи со всеми частями, составляющими исследуемые ядра среднего мозга. У собаки было показано, что ZI реципрокно связана со всеми подструктурами PPN, как и у крысы, а

также со всеми частями ядерного комплекса SN — VTA, а не только с компактной и ретикулярной, как показано у этого животного [7]. Кроме того, у крысы, вне зависимости от локализации зоны инъекции маркера в ZI, в структурах среднего мозга наблюдали сходное мечение нейронов, чего у собаки обнаружено не было.

Стоит напомнить, что, на основании связей разных секторов ZI с функционально специфическими мозговыми центрами, была определена их модальная специфичность [13]. В результате были выделены лимбические (ростральный и дорсальный) и сенсомоторные (вентральный и каудальный) сектора. Можно предположить, что описанное функциональное разнообразие секторов ZI обусловлено и различием в организации описываемых связей её секторов с подструктурами PPN и комплекса SN — VTA, также различающимися функционально. Так, в настоящем исследовании было установлено, что на лимбические ростральный и дорсальный сектора ZI проецируются принадлежащие к мезолимбической системе и вовлечённые в функционирование лимбической системы VTA и латеральная часть SN [6, 8, 10]. Кроме того, показано, что сенсомоторные вентральный и каудальный сектора ZI получают проекционные волокна от нейронов медиального сегмента диффузной части PPN, который рассматривают как локомоторную область [5]. На основании полученных данных о связях функционально различных секторов ZI с функционально аналогичными подструктурами SN — VTA и PPN, можно полагать, что ZI является релейной структурой для сегрегированного проведения информации в моторных и немоторных петлях кругов в теоретических моделях, созданных для понимания информационной обработки в базальных ганглиях [2, 3]. Исходя из сказанного, наблюдаемые у больных паркинсонизмом двигательные или иные расстройства, вероятно, являются следствием дисфункции соответственно в моторных или немоторных петлях кругов базальных ганглиев [3, 19, 20]. В связи с этим, при выборе мишени для стимуляции мозга или хирургического удаления полезно учитывать сведения о проекциях отдельных секторов ZI и функционально гетерогенных структур базальных ганглиев, которые помогут определить более точно функциональную принадлежность секторов ZI, что будет способствовать оказанию более точных селективных воздействий при лечении неврологических заболеваний.

Ряд авторов рассматривают ZI как лимбикомоторный интегративный центр [20]. У собаки во всех секторах ZI описана конвергенция проекционных волокон нейронов подструктур среднемозговых ядер, а также в последних — от нейронов всех секторов ZI. Эти факты свидетельствуют о том, что функционально различная информация может быть интегрирована не только на уровне ZI [9, 20], но и, как показано в исследованиях на других животных, в ядрах комплекса SN — VTA [6] и PPN [18], которые являются выходными структурами системы базальных ганглиев. В дополнение к сказанному следует напомнить, что проекции на ZI структур среднего мозга являются возвратными, и полагают, что именно через такие петли [6] происходит взаимодействие между функционально различными кругами, необходимое для осуществления поведенческих актов.

Полученные в настоящей работе результаты о наличии взаимосвязи между ZI, SN- VTA и PPN, наряду с данными, указывающими на модулирующую функцию ZI по отношению к выходным структурам морфофункциональной системы базальных ганглиев [13], позволяют заключить, что она может являться частью указанной системы. В организации связей между исследуемыми структурами данной системы выявлены как элементы, указывающие на возможность сегрегированного проведения функционально различной информации между исследованными структурами, так и конвергентного проведения информации. Последнее может свидетельствовать о возможности интеграции функционально различной информации на уровне всех исследованных структур. В связи с этим полученные данные могут быть полезны для дальнейшего развития существующих представлений о путях проведения и механизмах обработки функционально различной информации в системе базальных ганглиев. Представленные приоритетные данные об особенностях организации проекций ZI у собаки не только вносят вклад в эволюционную морфологию, но могут также представлять интерес для разработки и оптимизации существующих клинических методов стимуляции подкорковых структур, применяемых для облегчения патологических симптомов у людей с неврологическими заболеваниями, в патогенез которых вовлечены рассматриваемые структуры.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 06-04-48346.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Горбачевская А.И. и Чивилёва О.Г. Структурная организация неопределённой зоны промежуточного мозга собаки. Морфология, 2007, т. 128, вып. 3, с. 11–15.
- Alexander G.E., DeLong M.R. and Strick P.L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. Ann. Rev. Neurosci., 1986, v. 9, p. 357–381.

- DeLong M.R. and Wichmann T. Circuits and Circuit Disorders of Basal Ganglia. Neurological Rev., 2007, v. 64, № 1, p. 20–24.
- Dua-Sharma S., Sharma K.N. and Jacobs H.L. The canine brain in stereotaxic coordinates. Cambridge, Massachusetts, London, MIT Press, 1970.
- 5. Garcia-Rill E. The basal ganglia and the locomotor regions. Brain Res. Rev., 1986, v. 11 № 1, p. 47–63.
- Haber S.N. Functional anatomy and physiology of the basal ganglia: non-motor functions. In: Current clinical Neurology: deep brain stimulation in neurological and psychiatric disorders. Totowa, N.J. Humana Press, 2008 p. 33–62.
- Heise C.E. and Mitrofanis J. Evidence for a glutamatergic projection from the zona incerta to the basal ganglia of rats. J. Comp. Neurol., 2004, v. 468, № 3, p. 482–495.
- Jimenez-Castellanos J. and Graybiel A.M. Subdivisions of the dopamine-containing A8-A9-A10 complex identified by their differential mesostriatal innervation of striosomes and extrastriosomal matrix. Neuroscience, 1987, v. 23, № 1, p. 223–242.
- Kolmac C.I., Power B.D. and Mitrofanis J. Patterns of connections between zona incerta and brainstem in rats. J. Comp. Neurol., 1998, v. 396, № 3, p. 544–555.
- Kritzer M.F. Selective colokalization of immunoreactivity for intracellular gonadal hormone receptors and tyrosine hydroxylase in the ventral tegmental area, substantia nigra, and retrorubral fields in the rat. J. Comp. Neurol., 1997, v. 379, № 1, p. 247–260.
- McRitchie D.A., Hardman C.D. and Halliday G.M. Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. J. Comp. Neurol., 1996, v. 364, № 1, p. 121–150.
- Mesulam M.M. Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. J. Histochem. Cytochem., 1978, v. 26, № 2, p. 106–117.
- Mitrofanis J. Some certainty for the "zone of uncertainty"? Exploring the function of the zona incerta. Neuroscience, 2005, v. 130, № 1, p. 1–15.
- 14. Pahapill A.P. and Lozano A.M. The pedunculopontine nucleus and Parkinson disease. Brain, 2000, v. 123, № 9, p. 1767–1783.
- Plaha P., Ben-Shiomo Y., Patel N.K. and Gill S.S. Stimulation of the caudal zona incerta is superior to stimulation of the subthalamic nucleus in improving contralateral parkinsonism. Brain, 2006, v. 126, № 7, p. 1732–1747.

- Roger M. and Cadusseau J. Afferent connections to the zona incerta in the rat: a combined retrograde and anterograde study. J. Comp. Neurol., 1985, v. 241, № 2, p. 480–492.
- 17. Shammah-Lagnado S.J., Negrao N. and Ricardo J.A. Afferent connections of the zona incerta: a horseradish peroxidase study in the rat. Neuroscience, 1985, v. 15, № 1, p. 109–134.
- Smith Y. and Shink E. The pedunculopontine nucleus (PPN): A potential target for the convergence of information arising from different functional territories of the internal pallidum (GPi) in primates. Soc. Neurosci. Abstr., 1995, v. 21. p. 677.
- Stathis P., Panourias I.G., Yhemistocleous M.S. and Sakas D.E. Connections of the basal ganglia with the limbic system: implications for neuromodulation therapies of anxiety and affective disorders. Acta Neurochir., 2007, Suppl., v. 97, № 2, p. 575–586.
- Stefurak T., Mikulis D., Mayberg H. et al. Deep brain stimulation for Parkinson's disease dissociates mood and motor circuits: a functional MRI case study. Mov. Disord., 2003, v. 18, № 12, p. 1508–1516.

Поступила в редакцию 07.02.09

## THE CONNECTIONS OF THE ZONA INCERTA OF THE DOG DIENCEPHALON WITH THE SUBSTANTIA NIGRA, THE VENTRAL TEGMENTAL AREA AND THE PEDUNCULO-PONTINE TEGMENTAL NUCLEUS

#### A.I. Gorbachevskaya

This study used the technique based on horse-radish peroxidase retrograde and anterograde transport to examine the organization of the connections of different sectors of the zona incerta (ZI) of the diencephalon with the substructures of the substantia nigra, the ventral tegmental area and the pedunculopontine tegmental nucleus of dog mesencephalon. It was found that these structures were interconnected with each other. In the organization of the projections studied, the elements were detected that suggested the possibility of the segregated conduction of the functionally various information via the established pathways. Alongside with this, the convergence of the projection fibres of the neurons of the mesencephalic nuclei substructures to ZI, described in all its sectors, together with the projections of all the ZI sectors to these neurons, indicates the possibility of the integration of functionally various information both at ZI level and at the level of mesencephalic structures studied in this work.

**Key words**: *basal ganglia, zona incerta, substantia nigra, ventral tegmental area, pedunculopontine tegmental nucleus.* 

Laboratory of Physiology of Higher Nervous Activity, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg.