

## РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И УСТАНОВЛЕНИЕ СВЯЗЕЙ

УДК 591

### РАЗВИТИЕ ХАБЕНУЛО-ИНТЕРПЕДУНКУЛЯРНОГО ТРАКТА У КРЫС

© 2013 г. А. А. Клепуков, И. Г. Макаренко

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН*

*119334 Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д. 26*

*E-mail: imakarenk@mail.ru*

*Поступила в редакцию 03.09.11 г.*

*Окончательный вариант получен 16.11.11 г.*

Исследование развития хабенулоинтерпедункулярного тракта (ХИТ) проводили на фиксированном мозгу плодов крыс на 21 день эмбрионального развития и неонатальных животных с 0 по 9 день постнатального развития с помощью метода диффузии липофильного флуоресцентного карбоцианинового красителя Ди-Ай (1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат) по мембранам нейронов. Маркер наносили в ядра уздечки, интерпедункулярное ядро, а также на область ядер шва. Нейроны и волокна, содержащие Ди-Ай, выявляли на вибратомных срезах с помощью флуоресцентного и конфокального микроскопов. Было обнаружено, что реципрокные связи латерального ядра уздечки с ядрами шва формируются пренатально к Э21. Нейроны, иннервирующие ядра шва располагались в дорсо- и венрокаудальных отделах латерального ядра уздечки. Проекция медиального ядра уздечки на интерпедункулярное ядро обнаруживаются лишь постнатально с П2. Нейроны – источники данных проекций формируют внутри медиального ядра уздечки характерные скопления. Таким образом, настоящая работа впервые описывает гетерогенное формирование отдельных проекционных систем, входящих в состав ХИТ у крыс в процессе перинатального онтогенеза.

*Ключевые слова:* уздечка, средний мозг, ядра шва, интерпедункулярное ядро, хабенулоинтерпедункулярный тракт, аксональные связи, карбоцианиновый краситель Ди-Ай, онтогенез, крысы.

DOI: 10.7868/S0475145013020031

Уздечка (Habenula) это парная структура промежуточного мозга, локализованная в дорсальной части таламуса. Вместе с шишковидным телом уздечка образует эпителиамус (Paxinos, 2004; Савельев, Негашева, 2005). В соответствии с терминологией Паксиноса (Paxinos, Watson, 1998) и на основе сведений о цитоархитектонике уздечки в ее составе было выделено медиальное и латеральное ядра (Andres et al., 1999). В свою очередь медиальное ядро уздечки включает в себя пять субъядер, а латеральное ядро уздечки делится на медиальную и латеральную части, включающие в себя до пяти субъядер.

Уздечка является важным звеном переключения в составе дорсальной проводящей системы мозга, связывающим посредством двух компактных трактов – медулярной полоски (МП) и хабенуло-интерпедункулярного тракта (ХИТ), лимбические структуры переднего мозга и базальные ганглии со средним мозгом. Причем, если МП является строго афферентным путем к уздечке, то в состав ХИТ входят, как афферентные, так и эфферентные волокна. С помощью

метода прижизненного транспорта пероксидазы хрена, было установлено, что большинство нейронов медиального ядра уздечки посылает аксоны в интерпедункулярное ядро (ИПЯ) среднего мозга (Herkenham, Nauta, 1979). Было показано существование определенной топографической организации хабенулоинтерпедункулярных проекций: дорсальная часть медиального ядра уздечки дает эфферентные волокна, оканчивающиеся в вентральной части ИПЯ, латеральная часть медиального ядра уздечки иннервирует дорсальный регион ИПЯ (Contestabile, Flumerfelt, 1981; Sutherland, 1982). Несмотря на то, что основные проекции на ИПЯ происходят из медиального ядра уздечки (Herkenham, Nauta, 1977), существуют данные, указывающие на то, что и латеральное ядро уздечки так же посылает аксоны в ИПЯ. Возможность связи латерального ядра уздечки с ИПЯ была показана косвенным методом разрушения латерального ядра уздечки с последующим измерением уровня ацетилхолинтрансферазы и ацетилхолинэстеразы в ИПЯ (McGeer et al., 1979). Изменения концентрации этих ферментов в ИПЯ свидетельствовали о сня-

тии влияния латерального ядра уздечки, которое было бы возможно только при наличии прямых связей между латеральным ядром уздечки и ИПЯ. В многочисленных работах было показано, что эфферентные волокна латерального ядра уздечки преимущественно идут в структуры ствола мозга в составе ХИТ, их главными целями являются ядра, содержащие моноаминэргические нейроны, такие как дофаминсодержащая вентральная тегментальная область (ВТО) и черная субстанция (Beckstead et al., 1979; Phillipson, Rusock, 1982), а также серотонинсодержащие дорсальное и медианное ядра шва (Herkenham, Nauta, 1977; Klemm, 2004).

ХИТ также содержит и афферентные волокна, идущие из дорсального и медианного ядер шва к ядрам уздечки (Pasquier et al., 1976; Kalen et al., 1989). Также было установлено, что некоторые нейроны в ВТО проецируются назад в латеральное ядро уздечки (Gruber et al., 2007).

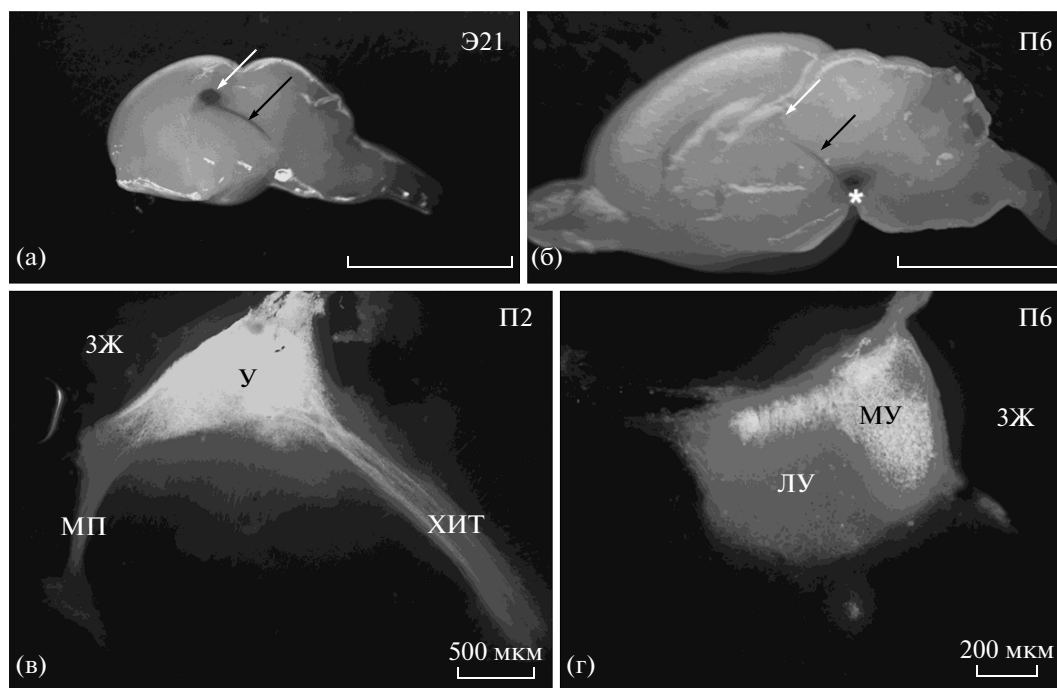
Несмотря на большое количество работ о связях уздечки с ИПЯ и структурами ствола, картина развития проводящих систем уздечки отсутствует, тогда как исследование ранних постнатальных этапов развития внутримозговых связей представляет большой интерес и может внести существенный вклад в представления о развитии нервной системы в целом.

Цель настоящей работы – подробное исследование формирования основного проводящего пути, связывающего уздечку со средним мозгом – ХИТ, в процессе раннего постнатального развития у крыс. В работе использован метод антероградной и ретроградной диффузии липофильного карбоцианинового красителя 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлората по липидному слою мембран нейронов (Vercelli et al., 2000) – один из немногих, позволяющих изучать внутримозговые связи у плодов и неонатальных животных.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на крысах Вистар полученных из Научного центра Биомедицинских технологий Российской Академии Медицинских Наук (поселок Столбовая), содержащихся в условиях вивария ИБР РАН с естественным освещением. Для получения датированной беременности самцов подсаживали на ночь в клетку к самкам. День обнаружения спермы во влагалище самки считали нулевым днем эмбрионального развития (Э0), а день рождения – нулевым днем постнатального развития (П0). Для исследования использовали животных на разных сроках развития Э21 (n4), П0 (n2), П2 (n3), П4 (n1),

П6 (n4), П9 (n1). Крысят перед перфузией наркотизировали введением внутривенно раствора нембутала в физиологическом растворе (0.9%-ный раствор хлористого натрия в дистиллированной воде) из расчета 4 мг на 100 г веса животного. Животных перфузировали через левый желудочек сердца сначала физиологическим раствором для удаления крови из кровеносных сосудов, а затем 4% раствором параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере (ПФА), декапитировали, мозг извлекали из черепа и помещали в ПФА при комнатной температуре на 12–20 часов. Далее на фиксированный мозг наносили кристаллы липофильного карбоцианинового красителя 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлората (Ди-Ай, DiI “Molecular Probes” Inc., США). Поскольку структуры мозга, на которые планировалось нанести маркер, располагаются в толще мозга близко к средней линии мозга, то в большинстве случаев мозг разрезали пополам сагиттально. Ди-Ай наносили в проколы на поверхности среза в области уздечки (разная глубина аппликации кристаллов позволяла метить избирательно медиальное ядро уздечки или оба ядра уздечки одновременно), ИПЯ и область ядер шва среднего мозга (рис. 1а, 1б). Мозг с маркером хранили в ПФА в темноте при комнатной температуре от 6 до 12 месяцев, в течение которых происходила диффузия липофильного маркера по липидному слою мембран нейронов в ретроградном и антероградном направлениях от места нанесения. Наложения маркера на уздечку и интерпедункулярное ядро приводили к четкому мечению ХИТ, который был виден даже под лупой на всех использованных сроках развития. Дальнейшее исследование проводили на сериях вибротомных коронарных или сагиттальных срезов, толщиной 80–100 мкм, натянутых кисточкой на предметные стекла и заключенных в полимеризующую среду мовиол (“Calbiochem”, Германия). Препараты анализировали в фотомикроскопе Leica DM RXA2 (Германия) с системой фильтров для выявления оранжево-красной родаминовой флуоресценции, характерной для Ди-Ай. После оценки распределения кристаллов маркера в месте введения с использованием ультрафиолетового фильтра серии срезов мозга последовательно просматривали, описывая локализацию окрашенных Ди-Ай нервных волокон и нейронов. Фотосъемку препаратов проводили с помощью цифровой фотокамеры Olympus DP70 (Япония) и специальной компьютерной программы для съемки, поставляемой вместе с ней (DP controller и DP manager). Обработку и монтаж цифровых изоб-



**Рис. 1.** Распределение Ди-Ай в области его нанесения на уздечку (а) и на интерпедункулярное ядро (б) сагиттально разрезанного фиксированного мозга, а также на сагиттальном (в) и коронарном (г) вибротомных срезах при нанесении маркера на уздечку. МП – медулярная полоска, МУ – медиальное ядро уздечки, ЛУ – латеральное ядро уздечки, У – уздечка, ХИТ (черная стрелка) – хабенулоинтерпедункулярный тракт, 3ж – полость третьего желудочка, белая стрелка – нанесение на уздечку, звездочка – нанесение на интерпедункулярное ядро. Масштаб а–б – 5 мм.

ражений для иллюстрации полученных результатов осуществляли при помощи компьютерной программы Photoshop 7.0 (“Adobe”, США). Идентификацию отделов и ядер мозга проводили с использованием атласов развивающегося мозга (Altman, Bayer, 1986; Paxinos et al., 1991) и мозга взрослой крысы (Paxinos, Watson, 1998).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

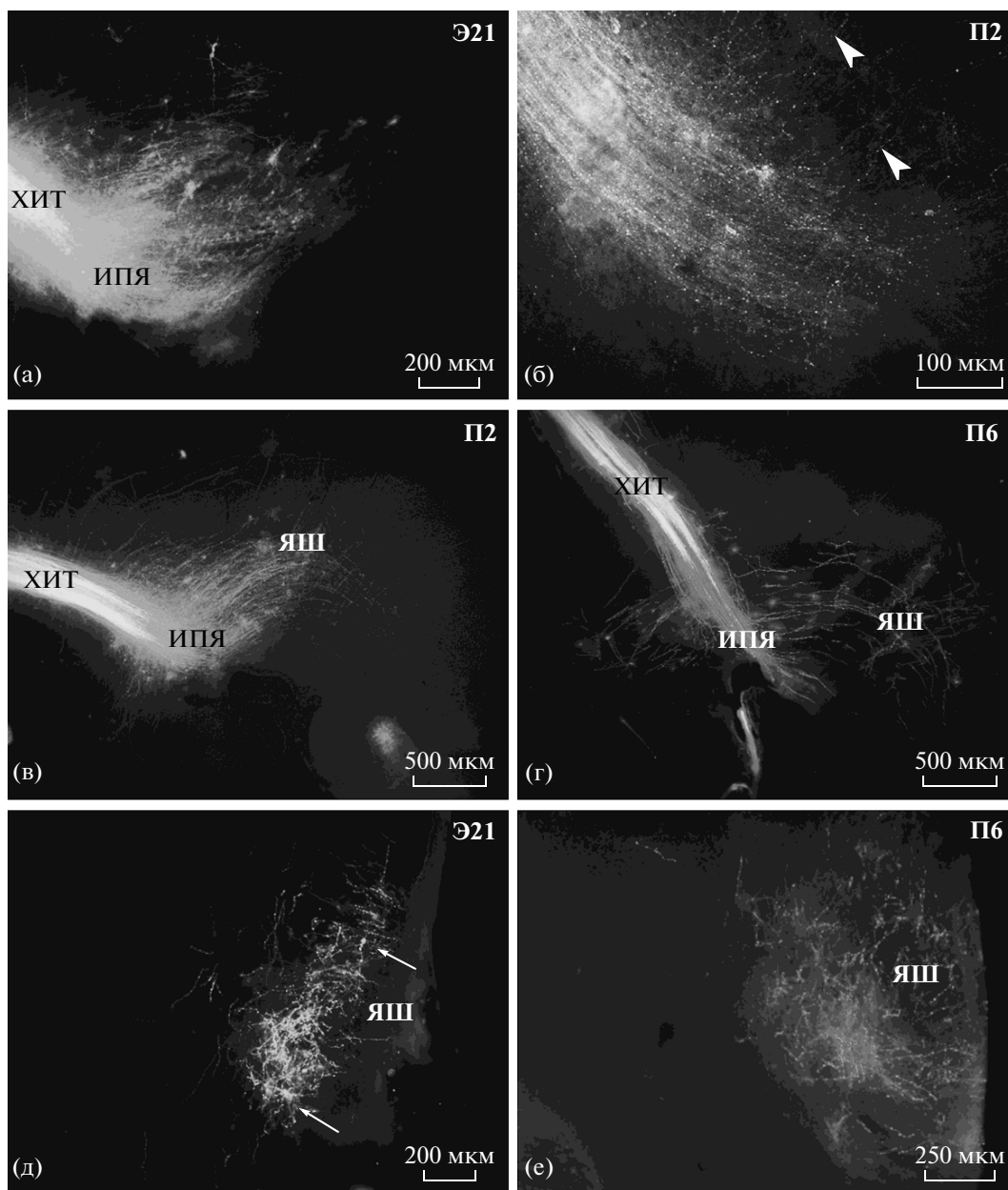
### *Распределение Ди-Ай в месте его нанесения*

Исследование каждого мозга начиналось с анализа распространения маркера в области его нанесения. Степень диффузии Ди-Ай в местах нанесения кристаллов варьировала в зависимости от области мозга и возраста животного. Так, помещение кристаллов Ди-Ай в ядра уздечки приводило к распространению маркера по всему объему уздечки, но на пренатальных и ранних постнатальных стадиях (Э21 и П2) наблюдалась незначительная диффузия красителя в прилежащие к уздечке с вентральной стороны отделы таламуса (рис. 1в). Позже на П6 и П10 точечные нанесения маркера в толщу медиального ядра уздечки такой диффузии за ее пределы не давали и Ди-Ай распространялся строго в пределах ядер уздечки (рис. 1г). Нанесение Ди-Ай на ИПЯ на

Э21 и П0 приводило к распространению маркера по всему ядру с диффузией в прилежащую дорсальнее вентральную тегментальную область. Начиная с П2, поскольку кристаллы маркера наносили на медиальный срез ИПЯ, то в случае локальных нанесений распределение Ди-Ай происходило преимущественно в медиальных отделах.

### *Распределение структур меченых Ди-Ай при нанесении маркера на уздечку*

На всех исследованных сроках нанесение Ди-Ай на уздечку приводило к мечению нервных волокон в обоих трактах уздечки (рис. 1в), причем они были видны даже под лупой на сагиттально разрезанном мозге (рис. 1а). На Э21, П0–П2 многочисленные меченые волокна ХИТ были ориентированы параллельно и прослеживались в виде компактного пучка вплоть до ИПЯ, где они веерообразно расходились, вращаясь в ядро. На Э21 и П2, когда количество волокон в ХИТ еще не очень велико, в ИПЯ выявлялись многочисленные тонкие волокна ветвящиеся в ядре (рис. 2а). Сканирование в конфокальном микроскопе показало, что часть этих волокон пересекала ИПЯ и прослеживалась в дорсокаудальном направлении (рис. 2б). Позже, начиная с П6, из-за обилия меченых структур иннервацию ИПЯ выявить было



**Рис. 2.** Меченые структуры выявленные в среднем мозге после наложения Ди-Ай на уздечку на разных сроках перинатального развития. Меченые волокна ХИТ врастающие в ИПЯ на сагиттальных срезах мозга (а–г) прослеживаются параллельно вентральному изгибу среднего мозга достигая области ядер шва (в, г). Терминальная сеть меченых волокон и единичные нейроны на коронарном срезе среднего мозга на уровне ядер шва после обширного нанесения Ди-Ай на уздечку (д). Мечение в области ядер шва после локального нанесения маркера на медиальное ядро уздечки (е). ИПЯ – интерпедункулярное ядро; ХИТ – хабенулоинтерпедункулярный тракт; ЯШ – Ядра шва; наконечник стрелки – отдельные меченые волокна прорастающие из ИПЯ в направлении ЯШ на конфокальном изображении сагиттального среза мозга (б); белые стрелки – меченые нейроны (д).

сложнее, поскольку сплетение меченых волокон заполняло весь объем ядра. Кроме того в той части среднего мозга, где ХИТ пронизывал ВТО, наблюдались волокна ориентированные перпендикулярно основному тракту и распределялись в среднем мозге параллельно его вентральному изгибу. Дру-

гая часть волокон вентрального отдела ХИТ изгибалась в дорсокаудальном направлении в области вентральных отделов ВТО и прослеживалась до области ядер шва (рис. 2в, 2г).

После нанесения Ди-Ай в ядра уздечки на Э21–П2, кроме волокон были обнаружены ме-

ченные тела нейронов без отростков в ВТО, где их выявление было затруднено большим числом меченых волокон, проходящих через эту область (рис. 2а, 2в). В области ядер шва среднего мозга нейроны и сплетение меченых нервных волокон выявлялись уже на E21, причем мечеными структурами охватывалась вся область ядер шва, включающая как дорсальное, так и медианное ядра. В ядрах шва при этом выделялось заметное сплетение меченых волокон, среди которых с трудом просматривались немногочисленные меченые тела нейронов (рис. 2д). Позже были обнаружены различия в характере распределения меченых структур в ядрах шва, в зависимости от топографии распределения маркера в ядрах уздечки. Так на П6 при мечении в области обоих ядер уздечки в медианном ядре шва обнаруживалась четкая группа клеток с развитыми дендритами, ориентированными перпендикулярно вентральной поверхности среднего мозга (рис. 2г). В тех случаях (П6), когда Ди-Ай был преимущественно локализован в медиальном ядре уздечки, в медианном ядре шва было обнаружено только сплетение терминальных волокон (рис. 2е).

*Распределение структур меченых Ди-Ай при нанесении маркера на интерпедункулярное ядро, вентральную сегментальную область и ядра шва*

Для выявления меченых тел нейронов в ядрах уздечки использовались нанесения Ди-Ай на ИПЯ на мозг, разрезанный сагиттально по средней линии. На E21–P0 ретроградно меченые нейроны выявлялись в обоих ядрах уздечки но весьма неравномерно. На коронарных срезах было заметно, что в латеральном ядре уздечки концентрация нейронов значительно выше, чем в медиальном ядре уздечки, в котором выявляются лишь единичные тела нейронов (рис. 3а, 3б). Начиная с P2 в медиальном ядре уздечки было выявлено значительное количество меченых нейронов с четким топографическим распределением внутри ядра, что на коронарных срезах имело вид дорсальной и более многочисленной вентромедиальной групп (рис. 3в). На сагиттальных срезах было выявлено, что обнаруженные группы не обособлены, а соединяются между собой в узкой медиальной зоне медиального ядра уздечки, где наблюдается максимальная концентрация тел нейронов (рис. 3г). Дорсальный слой клеток медиального ядра уздечки, посылающих аксоны в ИПЯ, расширяется в ростральном и каудальном отделах ядра (рис. 3д). Такое распределение нейронов в медиальном ядре

уздечки обнаруживалось и на всех последующих сроках развития.

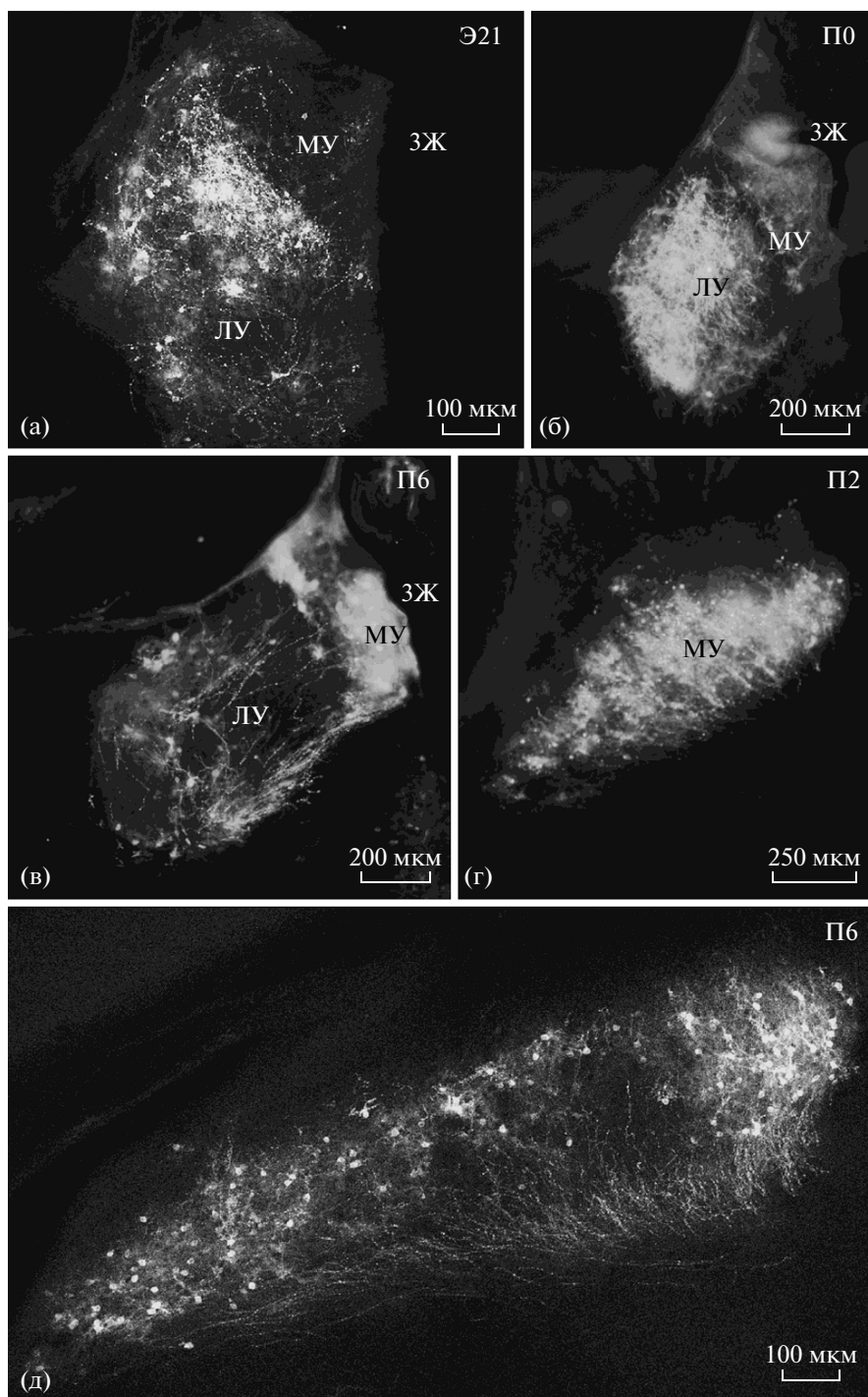
В отличие от медиального ядра уздечки в латеральном ядре уздечки уже на E21 было выявлено значительное количество нейронов (рис. 4а). Они располагались преимущественно в дорсокаудальной и в меньшей степени вентрокаудальной областях ядра, в центральной же части латерального ядра уздечки меченые структуры практически не выявлялись. В ростральной области латерального ядра уздечки меченых структур выявлено не было. В тех случаях (П4), в которых при нанесении Ди-Ай на ИПЯ наблюдалась диффузия в ВТО, в латеральном ядре уздечки дополнительно выявлялась группа нейронов, сосредоточенная в ростральной части (рис. 4б).

Исходя из того, что в составе ХИТ афферентные волокна к уздечке идут не только из ИПЯ, но и из ядер шва были проанализированы дополнительные нанесения Ди-Ай на эти структуры на П6 и П9. В результате были выявлены многочисленные меченые нейроны в вентральной и дорсокаудальной частях латерального ядра уздечки, распределение которых в значительной степени совпадало с таковым при нанесении на ИПЯ (рис. 4в).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В последние несколько десятилетий основным подходом к исследованию внутримозговых связей у взрослых животных являются методы прижизненного транспорта различных маркеров, таких как пероксидаза из хрена, флюороголд, холерный цитотоксин Б и др., вводимых в мозг стереотаксически (Klemm, 2004). Однако данные маркеры неприменимы для исследования внутримозговых связей на пренатальных и ранних постнатальных сроках. Как было показано нами ранее, использование липофильного карбоцианинового красителя Ди-Ай, дает хорошие результаты для решения подобных задач, что описано в литературе (Villani, 1996) и подтверждено нами на примере исследования развития ряда проводящих систем гипоталамуса (Makarenko et al., 2000, 2001; Makarenko, 2008).

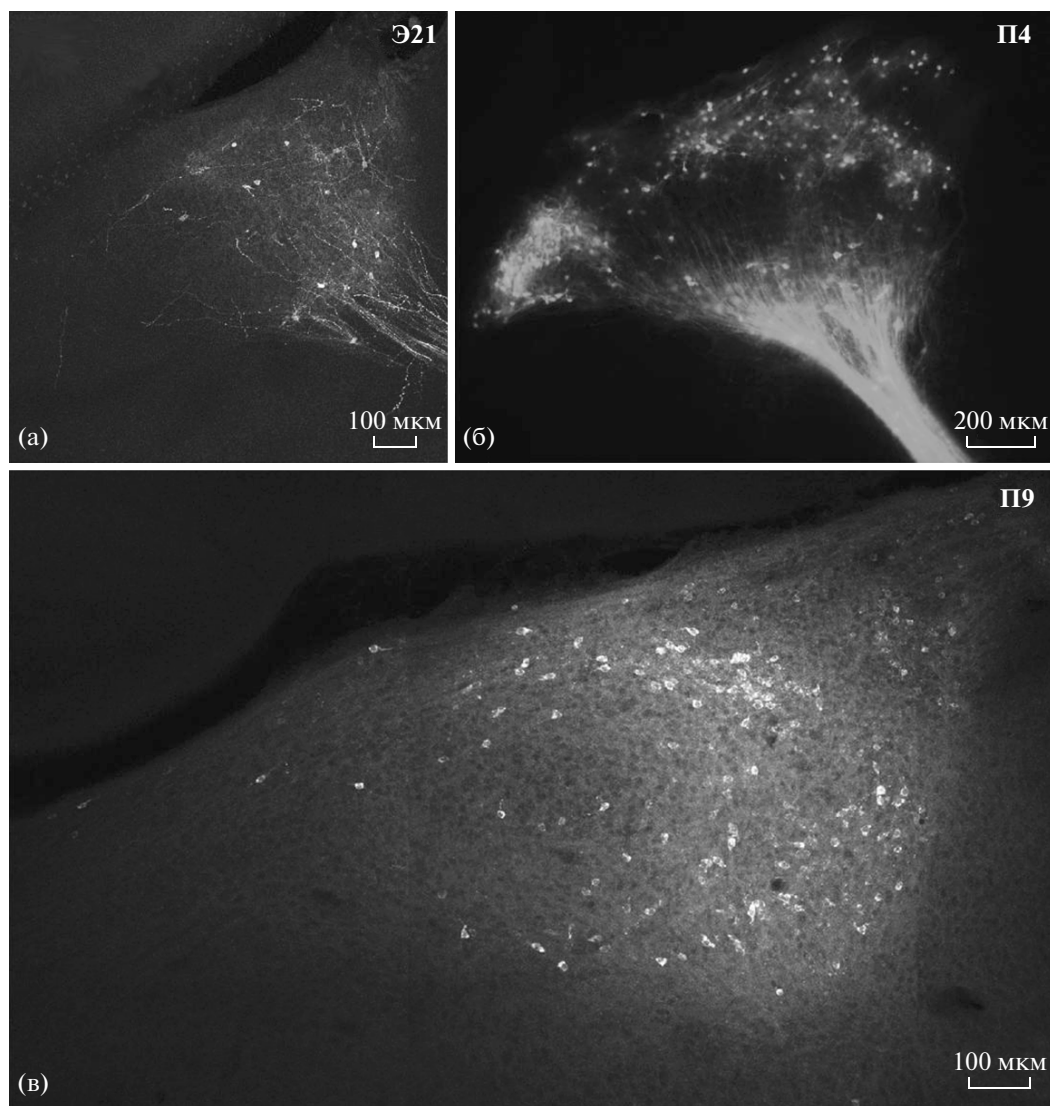
В настоящей работе нанесение Ди-Ай осуществлялось на поверхность или в проколы уздечки на мозге, разрезанном пополам сагиттально. Это обеспечивало мечение либо медиального ядра уздечки, либо обоих ядер. Наличие диффузии маркера за пределы ядер уздечки на пренатальных и ранних постнатальных сроках развития крыс объясняется формированием волокнистой капсулы, окружающей данную структуру (Andres et al., 1999), которая на более поздних



**Рис. 3.** Распределение меченых тел нейронов и волокон в медиальном и латеральном ядрах уздечки при нанесении Ди-Ай на ИПЯ на разных сроках развития: а – конфокальное изображение коронарного среза уздечки на Э21; б–в – коронарные срезы уздечки на П0, П6; г – сагиттальный срез медиального ядра уздечки на П2; д – конфокальное изображение медиального ядра уздечки на П6. МУ – медиальное ядро уздечки, ЛУ – латеральное ядро уздечки, ЗЖ – полость третьего желудочка.

постнатальных сроках является барьером, препятствующим распространению красителя за пределы уздечки. Подобная картина описана ранее в случаях с нанесением Ди-Ай в мамилляр-

ные ядра гипоталамуса (Алпеева, Макаренко, 2007; Alpeeva, Makarenko, 2009). Диффузия Ди-Ай за пределы медиального и латерального ядер уздечки на сроках Э21–П2 не может оказать вли-



**Рис. 4.** Меченые тела нейронов, выявляемые в латеральном ядре уздечки после нанесения Ди-Ай на ИПЯ (а), ИПЯ и ВТО (б), область ядер шва (в): а – конфокальное изображение сагиттального среза уздечки на Э21; б – сагиттальный срез латерального ядра уздечки на П4; в – конфокальное изображение латерального ядра уздечки на П9. ХИТ – хабе-нулоинтерпедункулярный тракт.

яние на результаты выявления проекций на ИПЯ, поскольку связи прилежащих к уздечке ядер таламуса с интерпедункулярным ядром не описаны (Paxinos, 2004).

Использованный методический подход позволил впервые описать перинатальное развитие различных проводящих систем, образующих ХИТ, подробно изученный у взрослых животных (Araki et al., 1988; Contestabile, Flumerfelt, 1981). Поскольку меченые волокна были обнаружены в ХИТ на всех исследованных сроках развития, и учитывая особенность данного маркера, диффундировать как ретроградно, так и антероградно, потребовался специальный анализ для того

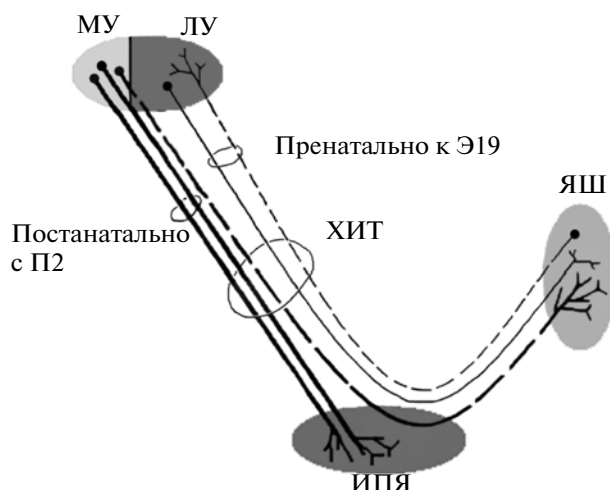
чтобы установить, какие именно нейроны являются источниками этих волокон.

Известно, что ХИТ является основным трактом, связывающим уздечку с интерпедункулярным ядром, и источником этих проекций являются преимущественно именно нейроны медиального ядра уздечки (Herkenham, Nauta, 1979). Однако наши нанесения на ИПЯ на Э21 и П0 выявляли в медиальном ядре уздечки лишь единичные меченые клетки, тогда как в латеральном ядре уздечки меченых нейронов и волокон было обнаружено довольно много. Проекции из латерального ядра уздечки в ИПЯ были ранее описаны лишь в единичных работах, где авторы

подчеркивали их малочисленность (Contestabile, Flumerfelt, 1981; Kim, 2009). По нашим данным распределение нейронов меченых Ди-Ай в латеральном ядре уздечки при нанесении на ИПЯ было неравномерным. Максимальная концентрация клеток наблюдалась в дорсо- и вентрокаудальных отделах латерального ядра уздечки, а ростральные и центральные области ядра не содержали меченых нейронов. Следовательно, встал вопрос, куда кроме ИПЯ следуют обнаруженные волокна из латерального ядра уздечки. Мы обнаружили, что с самых ранних из исследованных сроков в вентральной части ХИТ на уровне ВТО и ИПЯ часть меченых волокон отделялись от основного тракта и прослеживались дорсокаудально в направлении ядер шва, где ветвились и образовывали сплетение. Обнаруженная нами локализация нейронов в латеральном ядре уздечки, посылающих аксоны в медианное ядро шва, совпадает с данными (Behzadi et al., 1990), полученными с помощью транспорта холерного цитотоксина Б из медианного ядра шва к уздечке у взрослых крыс. Наши контрольные случаи (П6, П9) с нанесением маркера на медианное ядро шва выявили аналогичную картину распределения нейронов в латеральном ядре уздечки. Таким образом, результаты с выявлением нейронов в латеральном ядре уздечки, полученные нами в случае наложения на ИПЯ, можно трактовать как выявление не только проекций собственно на ИПЯ, но и в большей степени как мечение аксонов латерального ядра уздечки, иннервирующих ядра шва.

Кроме волокон в медианном ядре шва уже на Э21 выявлялись меченые тела нейронов. На более поздних постнатальных сроках (П6), когда удалось сделать локальные нанесения в отдельные ядра уздечки, было обнаружено, что нейроны в медианном ядре шва выявляются лишь в том случае, когда маркер был нанесен в латеральное ядро уздечки, являющееся по данным литературы основной мишенью нейронов медианного ядра шва (Vertes et al., 1999). Полученные данные свидетельствуют о том, что реципрокные связи латерального ядра уздечки с медианным ядром шва формируются уже в перинатальном периоде развития.

Что касается медиального ядра уздечки — основной структуры, иннервирующей ИПЯ у взрослых животных (Herkenham, Nauta, 1977), то первые волокна, врастающие в область этого ядра, обнаруживаются уже на сроках Э21–П2, полностью занимая объем ИПЯ к П6. Соответственно, возникает закономерный вопрос, когда обнаруживаются и как распределяются нейроны в медиальном ядре уздечки при нанесении Ди-Ай



**Рис. 5.** Схема развития отдельных проекционных систем в составе ХИТ. ИПЯ — интерпедункулярное ядро; МУ — медиальное ядро уздечки; ЛУ — латеральное ядро уздечки; ХИТ — хабенулоинтерпедункулярный тракт; ЯШ — ядра шва; толстая непрерывная линия — эфферентные волокна из МУ в ИПЯ; толстая пунктирная линия — эфферентные волокна из МУ в ЯШ; тонкая непрерывная линия — эфферентные волокна из ЛУ в ЯШ; тонкая пунктирная стрелка — афферентные волокна в ЛУ из ЯШ.

на ИПЯ. Согласно данным литературы, в медиальном ядре уздечки выявляют 4 группы нейронов, иннервирующих разные отделы ИПЯ (Contestabile, Flumerfelt, 1981). Мы обнаружили, что на Э21 и П0 при нанесении Ди-Ай на область ИПЯ, при котором маркер распространялся по всему ядру, в медиальном ядре уздечки обнаруживались лишь единичные тела нейронов. Однако нельзя утверждать, что они посылают аксоны именно в ИПЯ, поскольку описаны также немногочисленные проекции медиального ядра уздечки на медианное ядро шва у взрослых крыс (Behzadi et al., 1990), и по нашим данным на этих сроках развития в медианном ядре шва обнаруживаются меченые аксоны от нейронов уздечки.

Начиная с П2 и далее на П6 в медиальном ядре уздечки уже выявлялось значительное количество меченых тел нейронов с характерным топографическим распределением внутри ядра. При обширном мечении ИПЯ, в котором затрагивались как центральная, так и латеральные отделы этого ядра, в медиальном ядре уздечки выявлялись нейроны, которые образовывали на коронарных срезах 2 заметных скопления: крупное — вентральное, занимавшее всю вентральную часть медиального ядра уздечки, и дорзальное с меньшим числом клеток. На сагиттальных срезах нами так же было обнаружено, что дорзальное скопление нейронов не является непрерывным, а делится на две



группы, сосредоточенные в ростральном и каудальном отделах медиального ядра уздечки. Эти данные свидетельствуют о том, что все основные группы нейронов медиального ядра уздечки, иннервирующие разные отделы ИПЯ, обнаруживаются лишь со второго дня постнатального развития.

Таким образом, настоящая работа впервые описывает гетерогенное формирование отдельных проекционных систем, входящих в состав ХИТ у крыс в процессе перинатального онтогенеза. Реципрокные связи латерального ядра уздечки с ядрами шва формируются пренатально. Проекции медиального ядра уздечки на интерпедункулярное ядро обнаруживаются лишь постнатально с П2. Полученные результаты о сроках развития суммированы в виде схемы (рис. 5).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Савельев С.В., Негашева М.А.* Практикум по анатомии мозга человека. М.: Веди, 2005. 200 с.
- Алпеева Е.В., Макаренко И.Г.* Перинатальное развитие маммилло-теgmentальных связей у крыс // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 2. С. 1–8.
- Alpeeva E.V., Makarenko I.G.* Perinatal Development of the mammillothalamic tract and innervations of the anterior thalamic nuclei // Brain Res. 2009. V. 1248. P. 1–13.
- Altman J., Bayer S.A.* Atlas of prenatal rat brain development. London etc.: CRC Press Boca Raton, 1986.
- Andres K.H., During M.V., Ven R.W.* Subnuclear organization of the rat habenular complexes // J. Comp. Neurol. 1999. V. 407. P. 130–150.
- Araki M., McGeer P.L., Kimura H.* The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method // Brain Res. 1988. V. 441. P. 319–330.
- Beckstead R.M., Domesick V.B., Nauta W.J.* Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat // Ibid. 1979. V. 175. P. 191–217.
- Behzadi G., Kalen P., Parvopassu F., Wiklund L.* Afferents to the median raphe nucleus of the rat: retrograde cholera toxin and wheat germ conjugated horseradish peroxidase tracing, and selective D-[3H]aspartate labelling of possible excitatory amino acid inputs // Neuroscience. 1990. V. 37. P. 77–100.
- Contestabile A., Flumerfelt B.A.* Afferent connections of the interpeduncular nucleus and the topographic organization of the habenulo-interpeduncular pathway: an HRP study in the rat // J. Comp. Neurol. 1981. V. 196. P. 253–270.
- Gruber C., Kahl A., Lebenheim L., Kowski A., Dittgen A., Veh R.W.* Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat // Neurosci. Lett. 2007. V. 427. P. 165–170.
- Herkenham M., Nauta W.J.* Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem // J. Comp. Neurol. 1977. V. 173. P. 123–146.
- Herkenham M., Nauta W.J.* Efferent connections of the habenular nuclei in the rat // Ibid. 1979. V. 187. P. 19–48.
- Kalén P., Strecker R.E., Rosengren E., Björklund A.* Regulation of striatal serotonin release by the lateral habenula-dorsal raphe pathway in the rat as demonstrated by *in vivo* microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA // Brain Res. 1989. V. 492. P. 187–202.
- Kim U.* Topographic commissural and descending projections of the habenula in the rat // J. Comp. Neurol. 2009. V. 513. P. 173–187.
- Klemm W.R.* Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks // Med. Sci. Moint. 2004. Nov; 10(11). P. 261–273.
- Makarenko I.G., Ugrumov M.V., Derer P., Calas A.* Projections from the hypothalamus to the posterior lobe in rats during ontogenesis: 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate tracing study // J. Comp. Neurol. 2000. V. 422. № 3. P. 327–337.
- Makarenko I.G., Ugrumov M.V., Calas A.* Axonal Projections from the hypothalamus to the median eminence in rats during ontogenesis: DiI tracing study // Anat. Embryol. (Berl.) 2001. V. 204. № 3. P. 239–252.
- Makarenko I.G.* Prenatal carbocyanine dye tracing of septo-hypothalamic connections // Brain Res. 2007. V. 1130. P. 38–47.
- Makarenko I.G.* DiI tracing is a useful tool for studies of the hypothalamic connections during perinatal development // In Neural Pathways Research. Chapter II. F.L. Pichler, Ed. New-York: Nova Sci. Publishers, 2008. P. 31–71.
- McGeer E.G., Scherer-Singler U., Singh E.A.* Confirmatory data on habenular projections // Brain Res. 1979. V. 168. P. 375–386.
- Pasquier D.A., Anderson C., Forbes W.B., Morgane P.J.* Horseradish peroxidase staining of the lateral habenular-midbrain raphe nuclei connections in the rat // Brain Res. Bull. 1976. V. 1. P. 443–451.
- Paxinos G.* The rat nervous system // Elsevier Academic Press, 2004. 1329 p.
- Paxinos G., Watson C.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates // New York: Academic Press, 1998. 71 p.
- Phillipson O.T., Pycock C.J.* Dopamine neurons of the ventral tegmentum project to both medial and lateral habenula, some implications for habenular function // Exp. Brain Res. 1982. V. 45. P. 89–94.
- Sutherland R.D.* The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex // Neurosci. Biobehav Rev. 1982. V. 6. P. 1–13.
- Vercelli A., Repici M., Garbossa D., Grimaldi A.* Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals // Brain Res. Bull. 2000. V. 51. № 1. P. 11–28.
- Vertes R.P., Fortin W.J., Crane A.M.* Projections of the median raphe nucleus in the rat // J. Comp. Neurol. 1999. V. 407. P. 555–582.
- Villani L.* The septointerpeduncular projection in the rat, tracing with the carbocyanine dye // Brain Res. Bull. 1996. V. 40. P. 279–282.

## Development of the Habenulointerpeduncular Tract of Rats

A. A. Klepukov and I. G. Makarenko

*Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: imakarenk@mail.ru*

**Abstract**—Development of the habenulointerpeduncular tract has been carried out on fixed brain preparations obtained from 21 day rat embryos and from neonatal animals on the 0 and 9 days of postnatal development by diffusion of lipophilic fluorescent carbocyanine dye DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) through neuron membranes. The marker was introduced into the nuclei of the habenula, the interpeduncular nucleus, and into the area of raphe nuclei. Neurons and fibers that contained DiI were identified on vibratome sections by fluorescent and confocal microscopy. We have found that reciprocal links between the lateral habenula nucleus and raphe nuclei are formed in the prenatal period by stage E21. Raphe nuclei innervating neurons were located in dorso- and ventrocaudal parts of the lateral habenula nucleus. Projections of the medial habenula nucleus onto interpeduncular nucleus were found only in the postnatal P2 period. Neurons that provide a source of these projections form characteristic assemblies inside the medial habenula nucleus. Therefore, the present study for the first time describes heterogenic formation of different projection systems that are involved in the habenulointerpeduncular tract of rats at perinatal ontogenesis.

*Keywords:* habenula, midbrain, raphe nuclei, interpeduncular nucleus, habenulointerpeduncular tract, axonal links, carbocyanine dye DiI, ontogenesis, rats.