

## РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ И УСТАНОВЛЕНИЯ СВЯЗЕЙ

УДК 591.3–148.11

### ПЕРИНАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ МАММИЛЛО-ТЕГМЕНТАЛЬНЫХ СВЯЗЕЙ У КРЫС<sup>1</sup>

© 2007 г. Е. В. Алпеева, И. Г. Макаренко

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

*119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

*E-mail: imakarenk@mail.ru*

Поступила в редакцию 17.07.06 г.

Исследование развития прямых аксональных связей мамиллярных тел гипоталамуса с вентральным и дорсальным тегментальными ядрами Гуддена (ядрами покрышки среднего мозга) проводили на фиксированном мозгу крыс с 14-го дня эмбрионального по 10-е сут постнатального развития с помощью метода диффузии липофильного флуоресцентного карбоцианинового красителя 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлората по мембранам нейронов. Маркер наносили на область мамиллярных тел или в область покрышки среднего мозга и после инкубации в фиксаторе выявляли флуоресцирующие тела нервных клеток и нервные волокна в ткани мозга. Было обнаружено, что мамилло-тегментальный тракт начинает развиваться раньше других проводящих систем мамиллярных тел. На 14–15-е дни эмбрионального развития он выявляется в виде пучка аксонов, идущего от мамиллярных тел каудально в средний мозг. Группа нейронов в покрышке среднего мозга и их аксоны, следующие в составе мамиллярной ножки к мамиллярным телам, впервые были обнаружены на 19-й день эмбрионального развития. С момента рождения идет прогрессивное развитие мамилло-тегментального тракта и мамиллярной ножки. К 10-м постнатальным сут в среднем мозгу обособляются вентральное и дорсальное тегментальные ядра. Таким образом, впервые было описано формирование реципрокных связей мамиллярных тел с тегментальными ядрами среднего мозга в процессе перинатального онтогенеза у крыс.

*Ключевые слова:* гипоталамус, мамиллярные тела, вентральное и дорсальное тегментальные ядра среднего мозга, аксональные связи, карбоцианиновый краситель Ди-Ай, онтогенез, крысы.

Мамиллярные тела (МТ) являются специфическим парным образованием промежуточного мозга, локализованным в вентральной части заднего гипоталамуса.

Они считаются одним из основных элементов лимбической системы мозга и наряду с другими структурами относятся к кругу Пэйпеца ('Papez circuit', Papez, 1937). Эта система последовательно включает гиппокамп, МТ, ядра переднего таламуса и поясную извилину коры мозга (Mark et al., 1995; Morgane et al., 2005). Она обеспечивает эмоциональный настрой и побуждение к действию (мотивации и эмоции), а также процессы научения и запоминания (Шеперд, 1987).

Исследованиям морфологии МТ и их связей у взрослых крыс посвящено много работ. В соответствии с терминологией Гардиана (Gurdjian, 1927) и на основе сведений о цитоархитектонике и связях МТ (Allen, Hopkins, 1988) в их составе были выделены латеральное и медиальное мамиллярные ядра, которые, как показано в физиологических экспериментах, играют важную роль в

пространственной навигации (Llinas, Alonso, 1992; Blair et al., 1999; Sharp et al., 2001) и в образовании пространственной памяти (Kopelman, 1995; Sziklas, Pertides, 1998; Kocsis et al., 2001). При помощи метода импрегнации серебром и с использованием прижизненных трейсеров было установлено, что большинство нейронов обоих ядер посылают аксоны в передний таламус посредством мамилло-таламического тракта (Cruce, 1975; Watanabe, Kawana, 1980; Seki, Zyo, 1984; Guison et al., 1995) и в средний мозг посредством мамилло-тегментального тракта (Cajal, 1911; Petrovicky, 1973; Cruce, 1977; Allen, Hopkins, 1990; Hayakawa, Zyo, 1990b). Эти тракты являются компактными миелинизированными волоконными системами. Аfferентные проекции к МТ от вентрального и дорсального тегментальных ядер среднего мозга осуществляются не через мамилло-тегментальный тракт, а с помощью другой проводящей системы, именуемой мамиллярной ножкой (Petrovicky, 1973; Allen, Hopkins, 1989; Hayakawa, Zyo, 1991). Было показано существование определенной топографической организации тегмента-мамиллярных проекций: более рострально расположены нейроны в тегментальных ядрах проециру-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 04-04-48073-а).

ются в медиальные области МТ, а более каудально расположенные – в латеральные (Shibata, 1987).

Известно, что у крыс маммилло-тегментальный тракт начинает развиваться намного раньше других проводящих систем МТ (Coggeshall, 1964). В работах, посвященных изучению образования и организации нейронов и трактов в мозгу у мышей, также было показано, что маммилло-тегментальный тракт формируется одним из первых (Easter, Ross, 1993; Mastick, Easter, 1996). Однако из всех имеющихся в нашем распоряжении данных не складывается ясной картины развития проводящих систем, связывающих МТ с ядрами среднего мозга, тогда как исследование ранних этапов развития внутримозговых связей, когда они еще не достигли сложности, характерной для взрослых животных, представляет большой интерес и может внести существенный вклад в представления о развитии нервной системы в целом.

Цель настоящей работы – подробное исследование формирования основных проводящих путей, связывающих МТ с областью покрышки среднего мозга, в процессе перинатального развития у крыс. Использован метод антероградного и ретроградного распространения 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.

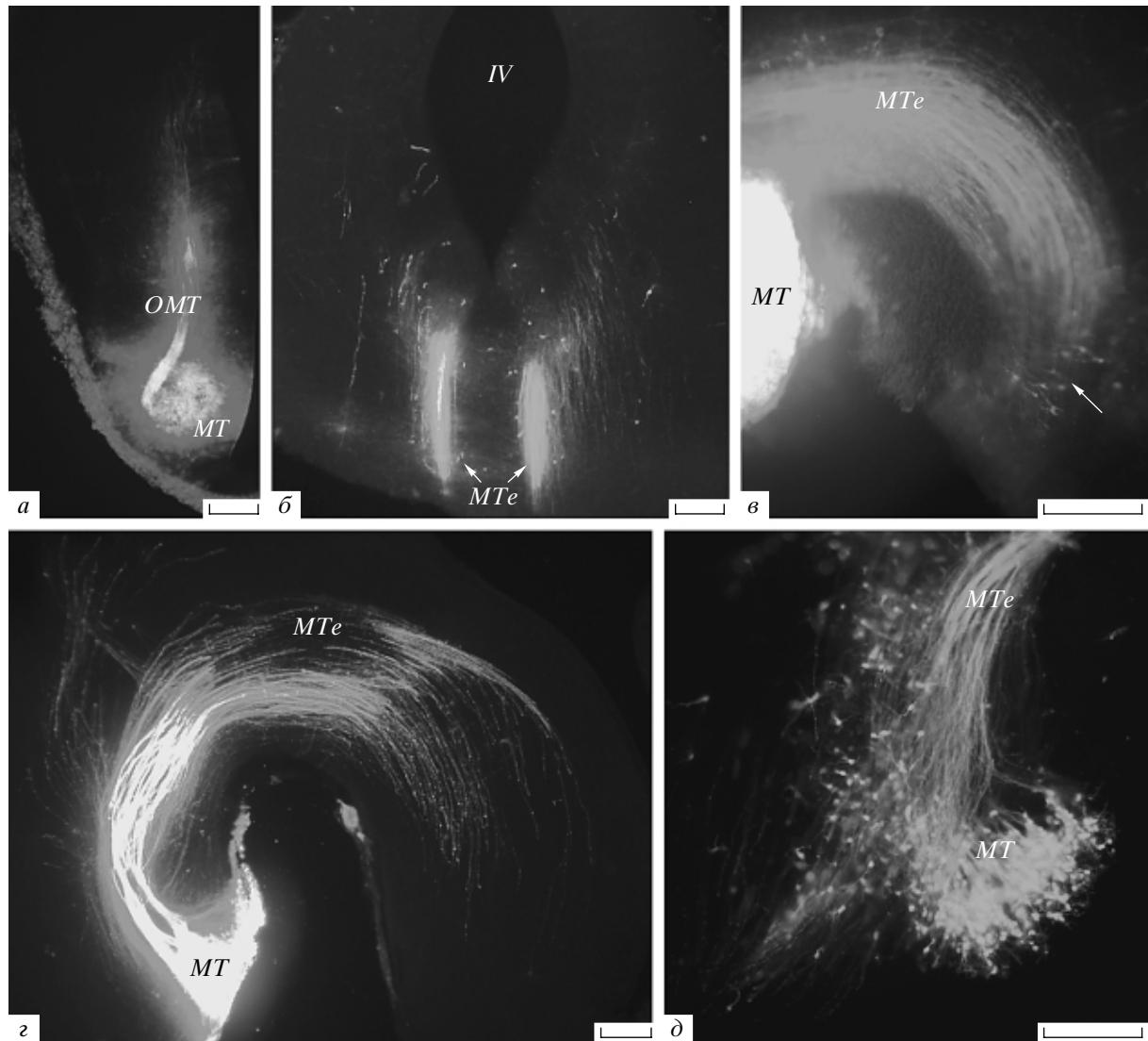
## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на крысах Вистар с датированной беременностью. День обнаружения спермы во влагалище самки считали нулевым днем беременности (Э0), а день рождения – нулевым днем постнатального развития (П0). Для исследования использовали плоды крыс и постнатальных животных на разных сроках развития/шт.: Э14/5, Э15/2, Э16/1, Э19/2, Э20/4, Э21/3, П1/3, П2/4 и П10/4. Для извлечения плодов из матки самок 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. Постнатальным крысятам перед перфузией вводили наркоз аналогичным образом. Эмбрионы на Э14–Э16 перфузировали через левый желудочек сердца физиологическим раствором для удаления крови из кровеносных сосудов, декапитировали и помещали целые головы, не извлекая мозга из черепа, для фиксации в 4%-ный раствор параформальдегида (ПФА) на 0.1 М фосфатном буфере, рН 7.2–7.4 на 1 сут. Плоды на Э19–Э21 и постнатальных животных перфузировали через левый желудочек сердца сначала фи-

зиологическим раствором, а затем ПФА. Мозг извлекали из черепа и помещали в ПФА комнатной температуры на 12–20 ч. Далее на фиксированный мозг наносили кристаллы липофильного карбоцианинового красителя 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианина перхлората (Ди-Ай, “Molecular Probes”, INC, США). Нанесение Ди-Ай осуществляли под бинокулярной лупой с помощью стеклянного капилляра как на целый мозг через прокол вентральной поверхности МТ, так и на мозг, разделенный вдоль по средней линии на две половины. В первом случае с области МТ удаляли мозговые оболочки, подсушивали мозг с помощью фильтровальной бумаги, делали прокол вентральной поверхности МТ, куда и помещали кристаллы маркера. Во втором случае Ди-Ай наносили на срез на разные области мозга: МТ, соседние участки роstralнее и каудальнее МТ, область ядер покрышки среднего мозга. Мозг с маркером хранили в ПФА в темноте при комнатной температуре от 6 до 12 мес, в течение которых происходила диффузия молекул липофильного маркера по липидному слою мембран нейронов в ретроградном и антероградном направлении. Дальнейшее исследование проводили на сериях вибраторных коронарных и сагиттальных срезов толщиной 100 мкм, заключенных в мовиол (“Calbiochem”, Германия). Препараты анализировали в фотомикроскопе Leica DM RXA2 (Германия), оснащенном 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 изображений 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, 1997).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Распределение Ди-Ай в месте его нанесения на задний гипоталамус.* В каждом случае проводили анализ распространения маркера в области его нанесения. На ранних эмбриональных стадиях развития (Э14–Э16) у МТ еще нет капсулы из нервных волокон, характерной для взрослых крыс. Нанесение Ди-Ай каудальнее воронки ги-



**Рис. 1.** Распределение меченых нейронов и волокон в мозгу крыс на 14–16-й дни эмбрионального развития (Э14–Э16) при нанесении кристаллов Ди-Ай на область мамиллярных тел (*a–г*) и на средний мозг (*д*): *a* – Э15, коронарный срез мозга на уровне закладки мамиллярных тел; *б* – Э15, коронарный срез среднего мозга; *в–д* – сагиттальные срезы мозга (Э15, Э16 и Э14 соответственно).

*MT* – мамиллярное тело; *MTe* – мамилло-тегментальный тракт; *OMT* – основной мамиллярный тракт; *IV* – четвертый желудочек мозга; (—→) – меченые нейроны в каудальной части среднего мозга. Масштаб: 200 мкм.

пофиза приводит к выявлению мощного пучка волокон, выходящего дорсально из зоны мечения (рис. 1, *a*). Он был идентифицирован нами как основной мамиллярный тракт, являющийся началом мамилло-тегментального тракта, и служил критерием точности нанесения Ди-Ай. Смещение прокола ростральнее в область медиобазального гипоталамуса не выявляет названный тракт.

На более поздних сроках (Э19–П10) МТ имеют капсулу из нервных волокон, которая ограничивает распространение Ди-Ай за пределы МТ в мозгу тех животных, у которых прокол располагается точно в пределах МТ. Незначительное смещение прокола, нарушающее их капсулу, при-

водит к мечению как области самих МТ, так и ближайших ядер заднего гипоталамуса. При этом во всех случаях также выявляется мамилло-тегментальный тракт.

*Распределение меченных Ди-Ай структур в мозгу крыс на стадиях Э14–Э16.* Начиная с Э14 билатеральное нанесение Ди-Ай в область закладки МТ выявляет многочисленные меченые волокна, идущие в каудальном направлении вдоль средней линии мозга в виде двух симметричных пучков (рис. 1, *б*). На сагиттальных срезах они прослеживаются от МТ в направлении среднего мозга вдоль изгиба его вентральной поверхности (рис. 1, *в*, *г*). Данная проводящая система

представляет собой развивающийся маммилло-тегментальный тракт, волокна которого собраны в отдельные маленькие пучки, идущие параллельно друг другу довольно плотно (рис. 1, з). В некоторых случаях на коронарных и сагиттальных срезах в каудальной области среднего мозга обнаруживаются немногочисленные, меченные Ди-Ай нейроны (рис. 1, в). Они не образуют групп и имеют короткие, еще не развитые дендриты.

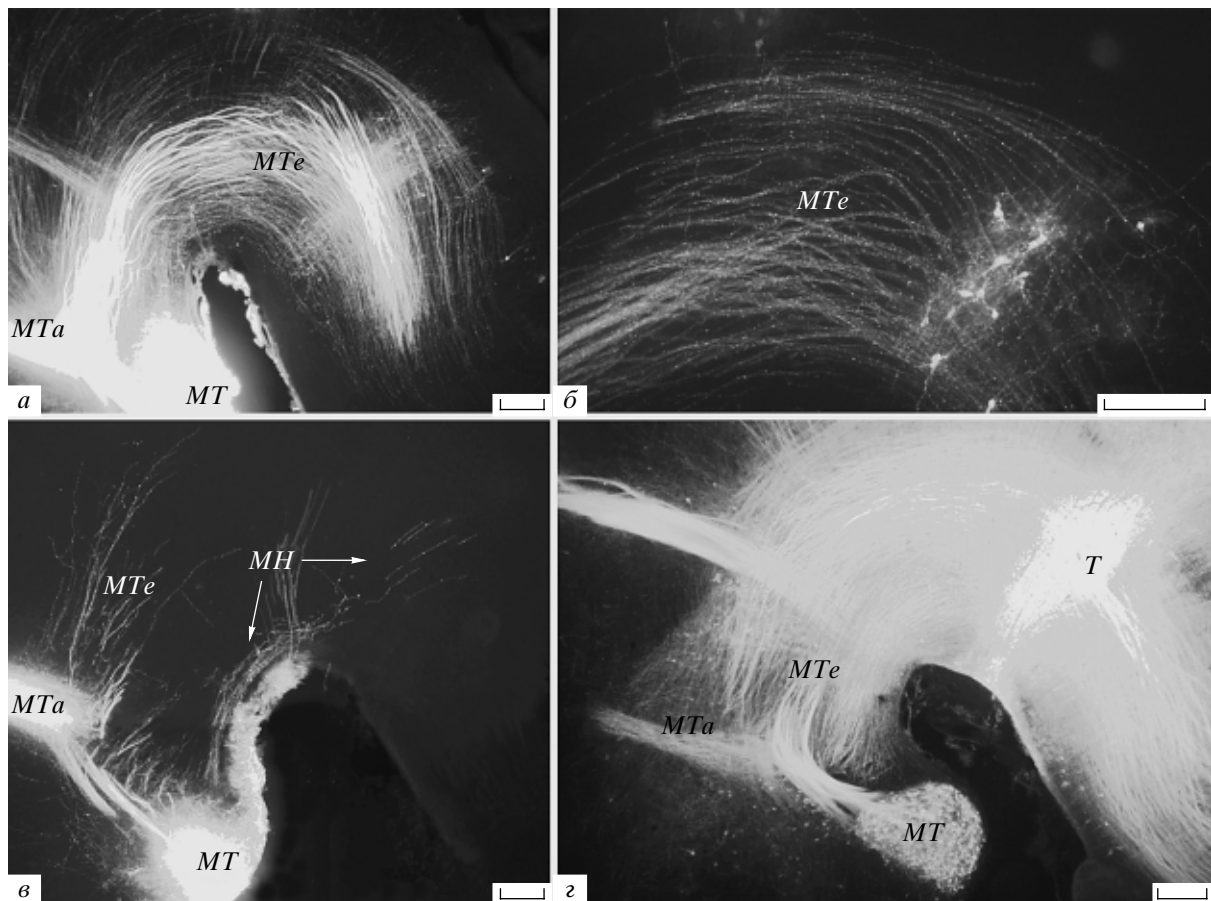
Нанесение Ди-Ай в область среднего мозга выявляет на Э14 не только волокна в маммилло-тегментальном тракте, но и многочисленные ретроградно меченные нейроны в области закладки МТ (рис. 1, д). Меченные нейроны располагаются в вентральной части заднего гипоталамуса небольшими группами, от которых отходят тонкие пучки аксонов. Объединяясь, они образуют основной маммиллярный тракт, который переходит в маммилло-тегментальный тракт.

*Распределение меченных Ди-Ай структур в мозгу крыс на стадиях Э19–Э21.* Маммилло-тегментальный тракт на этих сроках хорошо выражен. На небольшом расстоянии от МТ от него от-

ходит в ростродорсальном направлении компактный пучок волокон, представляющий собой растущий маммилло-таламический тракт (рис. 2, а). В каудальной части среднего мозга среди волокон маммилло-тегментального тракта выявляется группа ретроградно меченных нейронов с развивающимися дендритами (рис. 2, б).

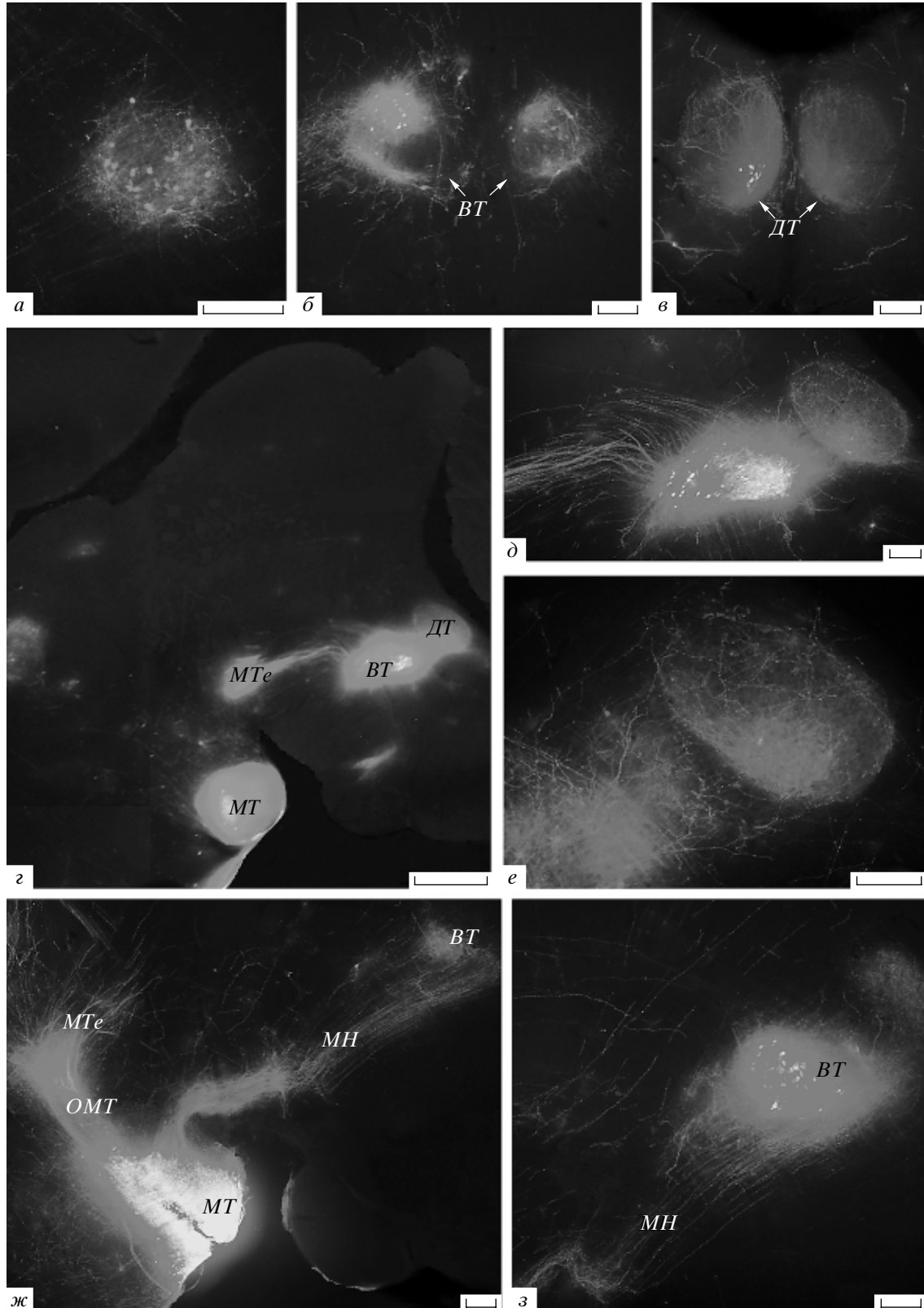
Кроме маммилло-тегментального и маммилло-таламического трактов на Э19–Э21 нанесение маркера в МТ приводит к мечению тонкого пучка волокон, прослеживающегося от МТ до тегментальной области среднего мозга вентральнее маммилло-тегментального тракта (рис. 2, в). Локализация обнаруженного пучка соответствует тракту, описанному у взрослых крыс как маммиллярная ножка.

Нанесение маркера в область покрывки среднего мозга на тех же сроках выявляет многочисленные Ди-Ай-положительные нервные волокна в составе разных проводящих систем. При этом маммилло-тегментальный тракт прослеживается до МТ, весь объем которых заполняют ретроградно меченные нейроны. Одновременно краси-



**Рис. 2.** Выявление проводящих трактов МТ на сагиттальных срезах мозга на поздних пренатальных стадиях развития: а, з – Э19; б, в – Э21.

*МН* – маммиллярная ножка; *MTa* – маммилло-таламический тракт; *T* – место нанесения Ди-Ай на тегментальную область среднего мозга; остальные обозначения см. на рис. 1. Масштаб: 200 мкм.



**Рис. 3.** Формирование тегментальных ядер Гуддена (ядер покрышки среднего мозга) на постнатальных (П) стадиях развития: *a* – П1, группа нейронов, ретроградно меченных Ди-Ай, на сагиттальном срезе каудальной области среднего мозга; *б–з* – П10, коронарные (*б, в*) и сагиттальные (*г–з*) срезы.

*BT* – вентральное тегментальное ядро; *DT* – дорсальное тегментальное ядро; остальные обозначения см. на рис. 2. Масштаб: *a–в, д–з* – 200 мкм; *г* – 1 мм.

тель обнаруживается и в волокнах маммилло-таламического тракта (рис. 2, з).

*Распределение меченных Ди-Ай структур в мозгу крыс на стадиях П1–П10.* На П1–П2 число меченых нейронов в тегментальной области среднего мозга увеличивается. Группа ретроградно меченых нейронов, окруженных сетью тонких меченых волокон, приобретает округлую форму с четкой границей (рис. 3, а). Тела нейронов занимают не весь объем формирующегося ядра, а располагаются эксцентрично.

На П10 в среднем мозгу отчетливо выявляются две группы ретроградно меченых нейронов, предположительно принадлежащих дорсальному и вентральному тегментальным ядрам. Они располагаются одно над другим близко к средней линии мозга (рис. 3, б, в). На сагиттальных срезах видно, что пучки маммилло-теgmentального тракта входят в вентральное тегментальное ядро (рис. 3, г, д), где они ветвятся, а часть их вырастает в дорсальное тегментальное ядро, образуя в нем сеть терминальных ветвлений (рис. 3, д, е). Большинство Ди-Ай-положительных нейронов локализуется в каудальной части вентрального тегментального ядра. Нейроны дорсального тегментального ядра располагаются преимущественно в вентральной его области (рис. 3, е).

К П10 число волокон в составе маммиллярной ножки заметно возрастает, и они четко прослеживаются от вентрального тегментального ядра до МТ (рис. 3, ж, з).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Мы впервые последовательно описали развитие основных проводящих систем, связывающих МТ с тегментальной областью среднего мозга у крыс, а также формирование вентрального и дорсального тегментальных ядер среднего мозга с помощью метода транспорта карбоцианиновых красителей. Как было показано нами ранее (Макаренко et al., 2000, 2001), данный метод дает хорошие результаты при изучении внутримозговых связей, в том числе и у плодов крыс. В настоящей работе нанесение Ди-Ай осуществлялось в прокол вентральной поверхности МТ. Это обеспечивает мечение всего маммиллярного тела и выявление маммилло-теgmentальных связей. Такое нанесение позволяет оценивать точность наложения маркера, так как при нанесении кристаллов на область закладки МТ даже на Э14 хорошо выявляется основной маммиллярный тракт, являющийся началом маммилло-теgmentального и маммилло-таламического трактов. Мы показали, что начиная с Э19 сформированная капсула МТ препятствует распространению Ди-Ай за их пределы, если при нанесении кристаллов в прокол вентральной поверхности МТ нет допол-

нительного повреждения капсулы. Именно в пределах капсулы при нанесении маркера на тегментальную область среднего мозга были выявлены нейроны – источники проекций на тегментальные ядра.

Полученные результаты подтвердили имеющиеся представления о раннем развитии маммилло-теgmentального тракта в мозгу мышей и крыс (Cajal, 1911; Easter, Ross, 1993; Mastick, Easter, 1996). Таким образом, аксоны нейронов МТ начинают расти и образуют тракт еще до того, как маммиллярное тело сформируется в самостоятельное, окруженное волоконной капсулой образование мозга.

По литературным данным, маммилло-теgmentальный тракт образован только волокнами МТ (Cajal, 1911; Petrovicky, 1973; Cruce, 1977; Allen, Hopkins, 1990; Hayakawa, Zyo, 1990b), а маммиллярная ножка – только волокнами тегментальных ядер среднего мозга (Petrovicky, 1973; Allen, Hopkins, 1989; Hayakawa, Zyo, 1991). Используемый нами метод не позволяет различать эфферентные и афферентные волокна, поскольку маркер распространяется по мембранам нейронов в обоих направлениях. Однако выявление конусов роста на концах аксонов маммилло-теgmentального тракта на Э14–Э19 при больших увеличениях микроскопа подтверждает наличие эфферентных волокон в его составе. Что касается маммиллярной ножки, то она выявляется в мозгу крыс начиная с Э19, когда обнаруживаются и нейроны дифференцирующихся тегментальных ядер.

По результатам радиоавтографических исследований (Altman, Bayer, 1980), нейроны тегментальной области среднего мозга образуются между Э13–Э15. Мы обнаружили, что при нанесении маркера в область МТ первые меченые нейроны в среднем мозгу выявляются уже на Э14. Однако на данном сроке развития из-за отсутствия у МТ волоконной капсулы маркер при нанесении распространяется и на соседние области. Это может приводить к окрашиванию дополнительных структур, не относящихся и не связанных с областью закладки МТ. На Э19–Э21 при попадании Ди-Ай только в МТ в среднем мозгу обнаруживается четкая группа меченых нейронов, которая предположительно является закладкой тегментальных ядер. Это подтверждается тем, что именно на этих сроках Ди-Ай окрашивает и маммиллярную ножку.

Кроме описанных трактов, связывающих МТ со средним мозгом, нанесение маркера на тегментальную область среднего мозга начиная с Э19 выявляет растущий маммилло-таламический тракт. Это является подтверждением классических представлений о том, что маммилло-таламический тракт образован коллатеральными аксонами

нейронов мамиллярных тел (Van der Kooy et al., 1978; Takeuchi et al., 1985; Hayakawa, Zyo, 1989).

Развитие внутримозговых связей в процессе онтогенеза определяется многочисленными факторами (Tessier-Lavigne, Goodman, 1996). Выявлен ряд регуляторных генов, экспрессия которых необходима для формирования аксональных проекций. Так, для мамилло-таламического тракта одним из таких генов является *Pax-6*. В его отсутствие у мышей не развивается мамилло-таламический тракт, хотя он не влияет на развитие мамилло-теgmentального тракта (Valverde et al., 2000). В то же время транскрипционный фактор *Myf5* – член семейства миогенных регуляторных факторов MRF – неожиданно оказался аксональным маркером развивающегося мамилло-теgmentального тракта (Daubas et al., 2000).

Известно, что афференты ядер покрышки среднего мозга могут образовывать тормозные синапсы на нейронах МТ (Allen, Hopkins, 1989; Hayakawa, Zyo, 1991, 1992; Wirtshafter, Stratford, 1993), в то время как аксоны МТ образуют асимметричные синапсы на нейронах ядер покрышки среднего мозга (Allen, Hopkins, 1990; Hayakawa, Zyo, 1990a, b), что свидетельствует о возбуждающем характере этих синапсов. Существуют представления, что реципрокные связи между МТ и ядрами покрышки среднего мозга функционируют в качестве петли обратной связи (Gonzalo-Ruiz et al., 1999; Kocsis et al., 2001), являющейся важным элементом лимбической системы мозга. Полученные нами данные говорят о том, что эта система обратных связей начинает формироваться еще до рождения. Однако только после рождения происходит значительное ее развитие, включающее дифференцировку тегментальных ядер среднего мозга. Количество меченых волокон мамиллярной ножки возрастает пропорционально увеличению числа нейронов в них. Только к П10 происходит окончательное формирование мамилло-теgmentального тракта и мамиллярной ножки.

Таким образом, мы впервые последовательно описали формирование реципрокных связей МТ с областью покрышки среднего мозга и формирование тегментальных ядер среднего мозга в процессе перинатального онтогенеза крыс.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Шенерд Г.* Нейробиология. М.: Мир, 1987. Т. 2. 368 с.
- Allen G.V., Hopkins D.A.* Mamillary body in the rat: a cytoarchitectonic, Golgi, and ultrastructural study // *J. Comp. Neurol.* 1988. V. 275. № 1. P. 39–64.
- Allen G.V., Hopkins D.A.* Mamillary body in the rat: topography and synaptology of projections from the subicular complex, prefrontal cortex, and midbrain tegmentum // *Ibid.* 1989. V. 286. № 3. P. 311–336.
- Allen G.V., Hopkins D.A.* Topography and synaptology of mamillary body projections to the mesencephalon and pons in the rat // *Ibid.* 1990. V. 301. № 2. P. 214–231.
- Altman J., Bayer S.A.* Development of the brain stem in the rat. IV. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the pontine region // *Ibid.* 1980. V. 194. № 4. P. 905–929.
- Altman J., Bayer S.A.* Atlas of prenatal rat brain development. L. et al.: CRC Press Boca Raton, 1986.
- Blair H.T., Cho J., Sharp P.E.* The anterior thalamic head-direction signal is abolished by bilateral but not unilateral lesions of the lateral mamillary nucleus // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. № 15. P. 6673–6683.
- Cajal S.* Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres. Paris: Maloin, 1911.
- Coggeshall R.E.* A study of diencephalic development in the Albino rat // *J. Comp. Neurol.* 1964. V. 122. № 2. P. 241–270.
- Cruce J.A.* An autoradiographic study of the projections of the mammillothalamic tract in the rat // *Brain Res.* 1975. V. 85. № 2. P. 211–219.
- Cruce J.A.* An autoradiographic study of the descending connections of the mamillary nuclei of the rat // *J. Comp. Neurol.* 1977. V. 176. № 4. P. 631–644.
- Daubas P., Tajbakhsh S., Hadchouel J. et al.* Myf5 is a novel early axonal marker in the mouse brain and is subjected to post-transcriptional regulation in neurons // *Development.* 2000. V. 127. № 2. P. 319–331.
- Easter S.S., Ross L., Frankfurter A.* Initial tract formation in the mouse brain // *J. Neurosci.* 1993. V. 13. № 1. P. 285–299.
- Gonzalo-Ruiz A., Romero J.C., Sanz J.M., Morte L.* Localization of amino acids, neuropeptides and cholinergic neurotransmitter markers in identified projections from the mesencephalic tegmentum to the mamillary nuclei of the rat // *J. Chem. Neuroanat.* 1999. V. 16. № 2. P. 117–133.
- Guison N.G., Ahmed A.K., Dong K. et al.* Projections from the lateral mamillary nucleus to the anterodorsal thalamic nucleus in the rat // *Kobe J. Med. Sci.* 1995. V. 41. № 6. P. 213–220.
- Gurdjian E.S.* The diencephalon of the albino rat // *J. Comp. Neurol.* 1927. V. 43. № 1. P. 1–114.
- Hayakawa T., Zyo K.* Retrograde double-labeling study of the mammillothalamic and the mammillotegmental projections in the rat // *Ibid.* 1989. V. 284. № 1. P. 1–11.
- Hayakawa T., Zyo K.* Fine structure of the lateral mamillary projection to the dorsal tegmental nucleus of Gudden in the rat // *Ibid.* 1990a. V. 298. № 2. P. 224–236.
- Hayakawa T., Zyo K.* Ultrastructure of the mammillotegmental projections to the ventral tegmental nucleus of Gudden in the rat // *Ibid.* 1990b. V. 293. № 3. P. 466–475.
- Hayakawa T., Zyo K.* Quantitative and ultrastructural study of ascending projections to the medial mamillary nucleus in the rat // *Anat. Embryol. (Berl.)* 1991. V. 184. № 6. P. 611–622.
- Hayakawa T., Zyo K.* Ultrastructural study of ascending projections to the lateral mamillary nucleus of the rat // *Ibid.* 1992. V. 185. № 6. P. 547–557.
- Kocsis B., Di Prisco G.V., Vertes R.P.* Theta synchronization in the limbic system: the role of Gudden's tegmental nuclei // *Eur. J. Neurosci.* 2001. V. 13. № 2. P. 381–388.
- Kopelman M.D.* The Korsakoff syndrome // *Br. J. Psychiatry.* 1995. V. 166. № 2. P. 154–173.

- Llinas R.R., Alonso A.* Electrophysiology of the mammillary complex *in vitro*. I. Tuberomammillary and lateral mammillary neurons // *J. Neurophysiol.* 1992. V. 68. № 4. P. 1307–1320.
- 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.
- Mark L.P., Daniels D.L., Naidich T.P., Hendrix L.E.* Limbic connections // *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 1995. V. 16. № 6. P. 1303–1306.
- Mastick G.S., Easter S.S.* Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain // *Devel. Biol.* 1996. V. 173. № 1. P. 79–94.
- Morgane P.J., Galler J.R., Mokler D.J.* A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain // *Prog. Neurobiol.* 2005. V. 75. № 2. P. 143–160.
- Papez J.* A proposed mechanism of emotion // *Arch. Neurol. Psychiatry.* 1937. V. 38. P. 725–743.
- Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. N. Y.: Acad. Press, 1997. 474 p.
- Paxinos G., Törk I., Tecon L.H., Valentino K.L.* Atlas of the developing rat brain. San Diego et al.: Acad. Press Inc.; Harcourt Brace Jovanovich, Publ., 1991.
- Petrovicky P.* Note on the connections of gudden's tegmental nuclei. I. Efferent ascending connections in the mammillary peduncle // *Acta Anat. (Basel)*. 1973. V. 86. № 2. P. 165–190.
- Seki M., Zyo K.* Anterior thalamic afferents from the mammillary body and the limbic cortex in the rat // *J. Comp. Neurol.* 1984. V. 229. № 2. P. 242–256.
- Sharp P.E., Tinkelman A., Cho J.* Angular velocity and head direction signals recorded from the dorsal tegmental nucleus of Gudden in the rat: implications for path integration in the head direction cell circuit // *Behav. Neurosci.* 2001. V. 115. № 3. P. 571–588.
- Shibata H.* Ascending projections to the mammillary nuclei in the rat: a study using retrograde and anterograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase // *J. Comp. Neurol.* 1987. V. 264. № 2. P. 205–215.
- Sziklas V., Petrides M.* Memory and the region of the mammillary bodies // *Prog. Neurobiol.* 1998. V. 54. № 1. P. 55–70.
- Takeuchi Y., Allen G.V., Hopkins D.A.* Transnuclear transport and axon collateral projections of the mammillary nuclei in the rat // *Brain Res. Bull.* 1985. V. 14. № 5. P. 453–468.
- Tessier-Lavigne M., Goodman C.* The molecular biology of axon guidance // *Science.* 1996. V. 274. P. 1123–1133.
- Valverde F., Garcia C., Lopez-Mascaraque L., De Carlos J.* Development of the mammillothalamic tract in normal and *Pax-6* mutant mice // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 419. № 4. P. 485–504.
- Van der Kooy D., Kuypers H.G., Catsman-Berrevoets C.E.* Single mammillary body cells with divergent axon collaterals. Demonstration by a simple, fluorescent retrograde double-labeling technique in the rat // *Brain Res.* 1978. V. 158. P. 189–196.
- 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.
- Watanabe K., Kawana E.* A horseradish peroxidase study on the mammillothalamic tract in the rat // *Acta Anat. (Basel)*. 1980. V. 108. № 3. P. 394–401.
- Wirtshafter D., Stratford T.R.* Evidence for GABAergic projections from the tegmental nuclei of Gudden to the mammillary body in the rat // *Brain Res.* 1993. V. 630. № 1–2. P. 188–194.

## Perinatal Development of Mammillotegmental Connections in Rats

E. V. Alpeeva and I. G. Makarenko

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

*E-mail: imakarenko@mail.ru*

**Abstract**—Development of direct axonal connections of the hypothalamic mammillary bodies with ventral and dorsal tegmental nuclei of Gudden was studied on fixed rat brains from day 14 of embryonic development until day 10 of postnatal development using the method of diffusion of the lipophilic fluorescent carbocyanine tracer 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate along the neuronal membranes. The tracer was inserted into the mammillary bodies or into the tegmentum and after incubation in a fixative fluorescent nerve cells and nerve fibers were visualized in the brain tissue. The mammillotegmental tract was found to start developing earlier than other conducting systems of the mammillary bodies. On days 14–15 of embryonic development, it was visualized as a bundle of axons running from the mammillary bodies caudally to the midbrain. A group of neurons in the midbrain tegmentum and their axons going to the mammillary bodies via the mammillary peduncle were first visualized on day 19 of embryonic development. The mammillotegmental tract and mammillary peduncle developed progressively from the moment of birth. Ventral and dorsal tegmental nuclei were formed in the midbrain by day 10 of the postnatal development. Thus, the formation of reciprocal connections of the mammillary bodies with midbrain tegmental nuclei was first described during perinatal development in rats.

**Key words:** hypothalamus, mammillary bodies, ventral and dorsal tegmental nuclei of midbrain, axonal connections, carbocyanine tracer DiI, ontogenesis, rats.