

Іванська К. М. – студентка VI курсу біологічного факультету Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки
Мотузок О. П. - доцент кафедри фізіології людини та тварини Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки
Міщенко І. В. – інженер лабораторії електронної мікроскопії кафедри фізіології людини та тварини Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки

Цитоархітектоніка префронтальної кори щурів, які зазнали впливу холодового стресу

*Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки,
кафедра фізіології людини і тварин*

Досліджено цитоархітектоніку префронтальної кори щура після дії холодового стресу за допомогою загальноприйнятих гістологічних методів. У всіх ділянках префронтальної кори нейрони різні за будовою і функціональним значенням, утворюють шість шарів. Цингулярна кора стресованих тварин є тоншою, характеризується менш вираженою стратифікацією. Щільність розташування нейронів експериментальної групи зростає, а об'єм їх ядер зменшується, що вказує на негативну дію холодового стресу. Щільність клітин у порівнюваних шарах прелімбічної кори експериментальної групи зменшилася. У порівнянні з контрольною групою інфралімбічна (IL) кора стресованих тварин характеризується зменшенням товщини та найгірше вираженою стратифікацією на шари.

Ключові слова: цингулярна кора, прелімбічна кора, інфралімбічна кора, холодний стрес.

Вступ

Незважаючи на своє короткочасне адаптивне значення, стрес може призвести до негативних наслідків шляхом зміни морфо-функціональних особливостей певних структур [6]. Вищим відділом ЦНС є кора великого мозку. Вона забезпечує досконалу організацію поведінки тварин на основі вроджених і набутих в онтогенезі функцій.

Префронтальна кора включає дорсолатеральну префронтальну зону, медіальну префронтальну зону і орбітофронтальну зону лобної частки [5]. Важливою ділянкою відповідей на стресові ситуації є медіальна префронтальна кора, яка може асоціювати безліч функцій: процеси уваги,

вісцеромоторної діяльності, процеси прийняття рішень, поведінки і робочої пам'яті.

Навіть помірний стрес може впливати на цитоархітекtonіку префронтальної кори. Медіальна префронтальна кора є мішенню для глюкокортикоїдів, демонструє нейрохімічні зміни у відповідь на стрес, а саме характеризується змінами в дендритах пірамідних нейронів. Також прослідковуються зміни об'єму нейронів та їх структур [7]. Не зважаючи на велику значимість досліджуваної тематики, зміни цитоархітекtonіки префронтальної кори щурів, які зазнали впливу холодного стресу вивчені недостатньо.

Матеріали та методи

Дослідження проводилися на десяти статевозрілих самцях білих щурів лінії Вістар масою 200 – 250 грам. Тварин було розподілено на дві групи: експериментальну та контрольну, по п'ять особини. Контрольна група утримувалася в звичайних віварних умовах, а експериментальна піддавалася впливові хронічного холодного стресу.

Холодовий стрес лабораторних щурів здійснювався шляхом загального охолодження тварин у водяній бані при температурі +4С на протязі 1 години 18 днів. Після експерименту тварин забивали декапітацією та відбирали для досліджень головний мозок, який фіксували у 7% формаліні.

Зневоднення матеріалу, заливку в парафін (Histomix®) проводили відповідно до стандартних методів дослідження [1].

Парафінових зрізи товщиною 10-15 мкм зафарбовували розчином гематоксилін-еозину за класичним методом Ф. Після та заливали в канадський бальзам.

Для визначення місця локалізації досліджуваної структур використовували стереотаксичний атлас мозку щура (Рис.1) [4].

Фотографування гістологічних препаратів, та їх збільшення здійснювали за допомогою світлового мікроскопа Axioskop – 40 (Carl Zeiss) з відеокамерою.

Вимірювання ширини кори та окремих цитоархітектонічних шарів проводили за допомогою програми “ Морфология 5 ”.

Об’єм клітин і їх ядер визначали за стандартною формулою С.М. Блінкова:

$$V = \frac{\pi ab^2}{6}, \text{ де}$$

a – найбільша вісь клітини проведена через ядерце;

b – найменша вісь клітини проведена через ядерце.

Щільність клітин в 1 мм³ вимірювали за допомогою мікроскопа “БІОЛАМ – Р-15” та камери Горяєва.

$$N_{vi} = N_{ai} * D_i, \text{ де}$$

N_{vi} - кількість нейронів, що міститься в 1мм³;

D_i - середній “тангенціальний” діаметр клітини;

N_{ai} - числова щільність профілів структур (I) в площині зрізу.

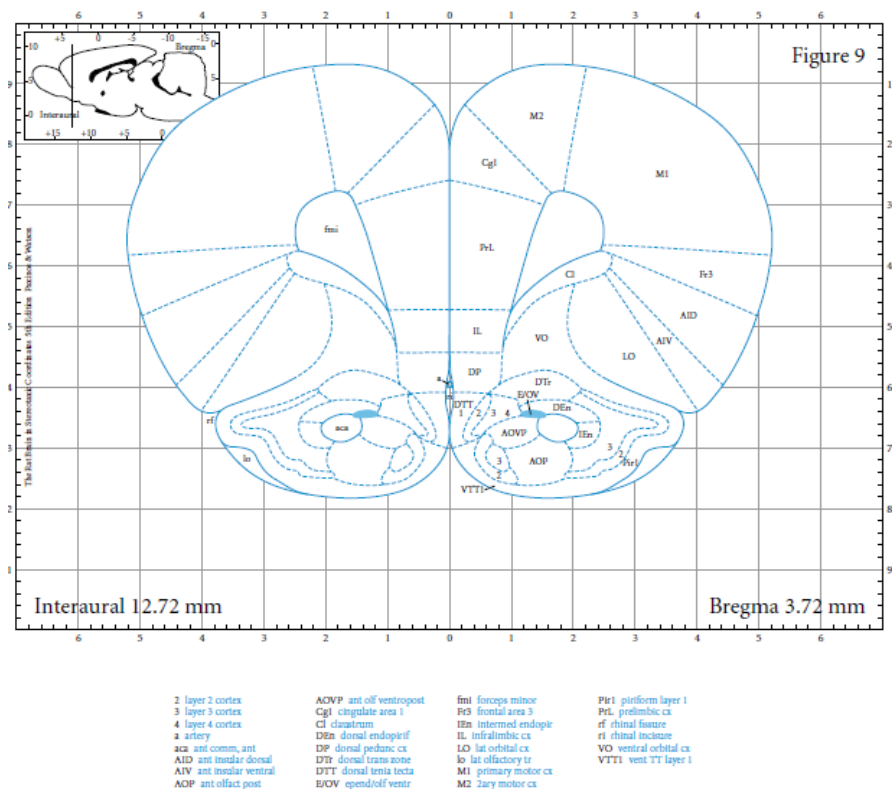


Рис.1. Топографія медіальної префронтальної кори згідно стереотаксичного атласу George Paxinos [4].

Статистична обробка даних передбачала обчислення середнього арифметичного M , похибку середнього арифметичного m , критерій достовірності t , для оцінки достовірності відмінностей між середніми арифметичними (рівень достовірності $p \leq 0,05$).

Результати та їх обговорення

Аналізуючи цитоархітектоніку різних ділянок префронтальної кори експериментальних і контрольних тварин виявлено зміни не лише в диференціації шарів, а й у їх товщині (рис.2). Так, на відміну від цингулярної кори контрольної групи, товщина якої становить $913,18 \pm 2,89$ мкм, товщина кори експериментальної групи тварин має меншу товщину – $826,12 \pm 4,9$ мкм ($p \leq 0,05$).

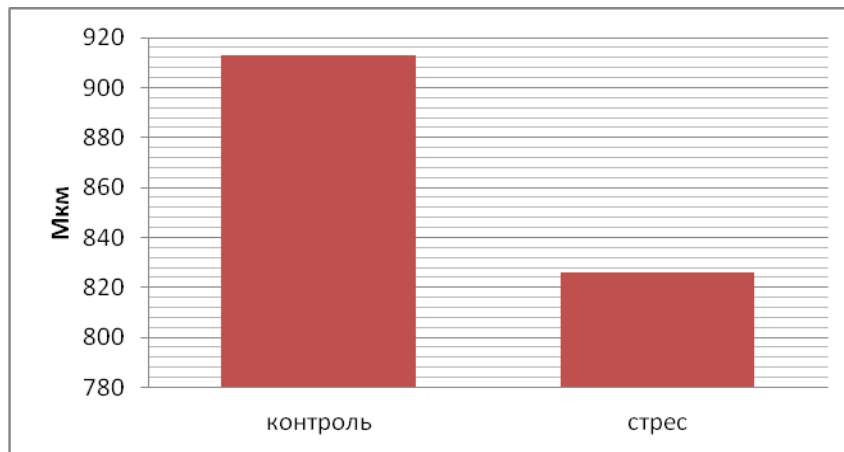
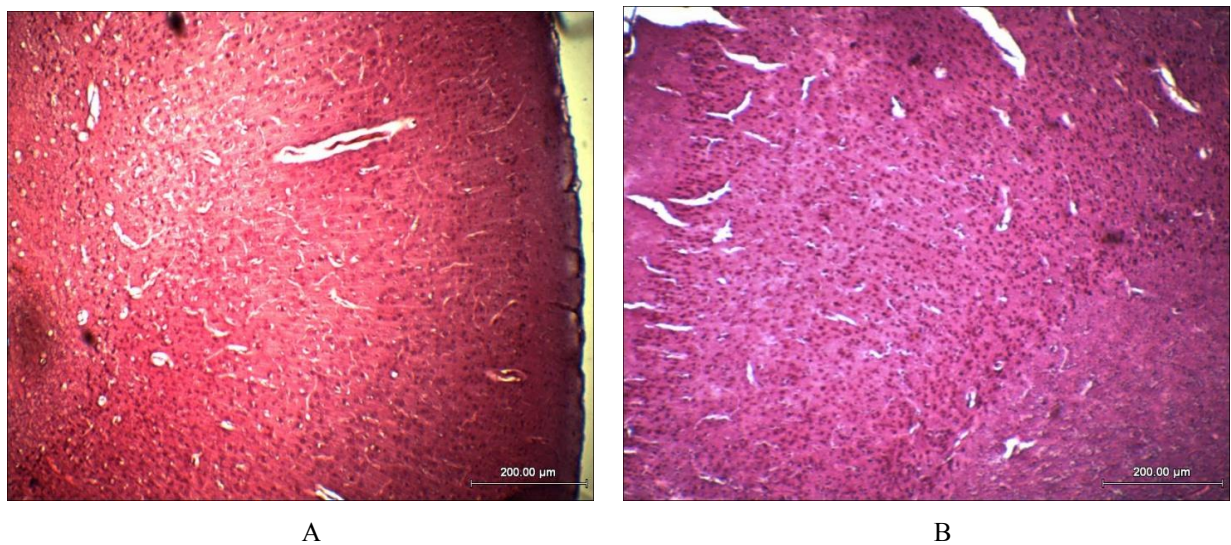


Рис.2. Відмінності товщини Сg кори контрольної і експериментальної групи, мкм.



А

В

Рис.3. Цингулярноа кора щурів, х 40.

А – контрольна група, В – експериментальна група.

Що стосується стратифікації цього відділу префронтальної кори, то в обох дослідних групах прослідковуються шість шарів, хоча деякі з них через нечіткість меж в обчисленнях не диференціюються (рис.3). У контрольній групі тварин відмічаємо чіткий поділ на шість шарів (Табл.1.). Негативна дія стресу на експериментальну групу тварин, в першу чергу відображається в диференціації шарів та зміні їх товщини. Щільність нейронів в експериментальній групі тварин збільшилася (табл.2).

Таблиця 1.

Товщина шарів Сg кори контрольної групи тварин

	Шар

	I	II	III	IV	V	VI
Товщина (мкм)	115,48± 1,36	87,57±1,0 4	197,44±1, 32	261,06±2, 01	124,53±1, 82	132,38±2, 06
Щільність нейронів (в 1 мм ³)	7577,5± 3572,108	14144,8± 3984,853	14650± 4423,264	13639,66 ±4158,94 6	11113,79 ±3194,99 1	20712,07 ±2867,59 2

Таблиця 2.

Товщина шарів Сg кори експериментальної групи тварин

	Шар				
	I	II	III-IV	V	VI
Товщина (мкм)	110,02±1,44	96,34±2,33	421,9±1,21	89,04±2,34	108,66±1,98
Щільність нейронів (в 1 мм ³)	11113,7931± 3984,853	25258,62± 4124,715	16670,69± 3409,65	18186,21± 4259,98	26268,97± 4642,214

В порівнянні з контрольною (1021,47±2,06 мкм), товщина прелімбічної кори експериментальної групи становить 778,36±1,83 мкм (рис.4), тобто є суттєво тоншою ($p \leq 0,05$). Наявні шари з не чітко вираженою стратифікацією (рис.5).

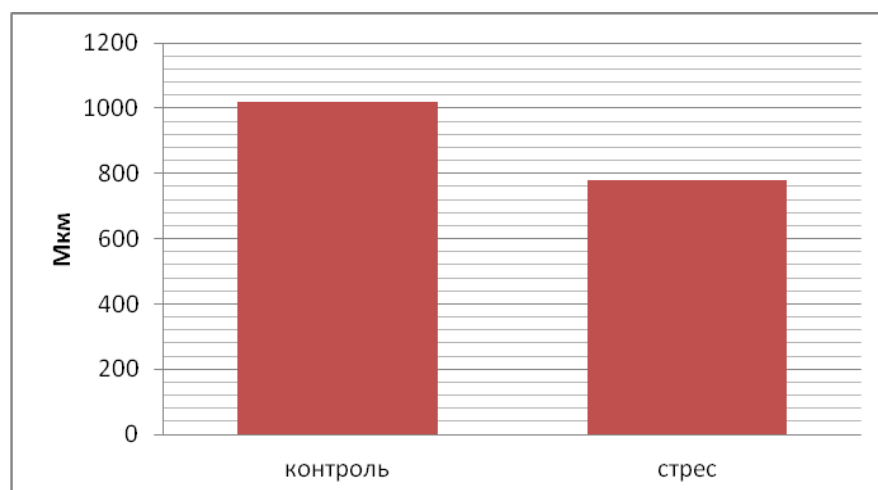
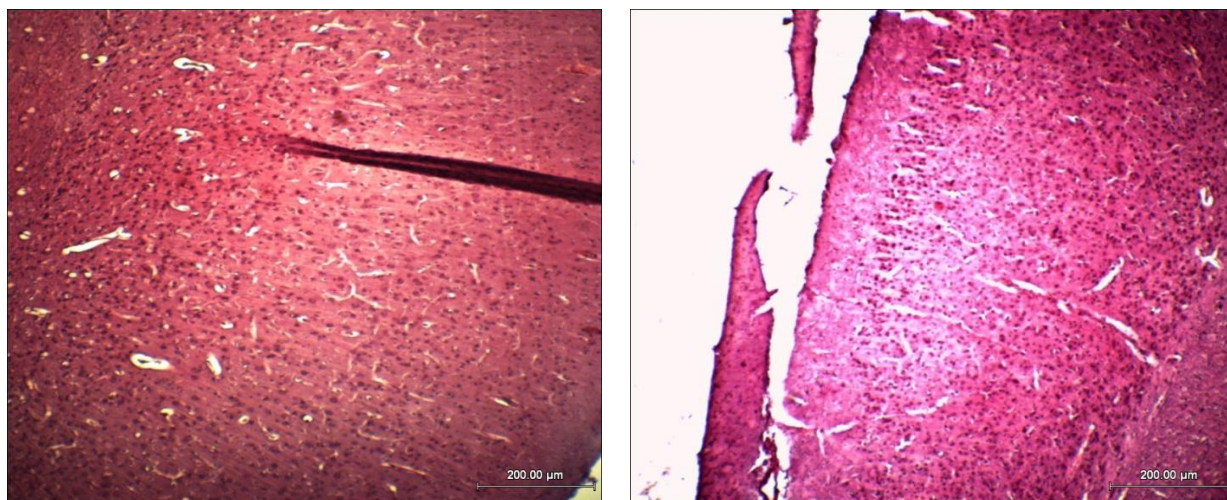


Рис.4. Товщина PrL кори контрольної і експериментальної групи, мкм.



А

Б

Рис.5. Прелімбічна кора шурів, х 40.

А – контрольна група, В – експериментальна група.

У контрольній групі тварин чітко вираженими є такі шари: I, II-IV, V та VI (табл.3.). II-IV шар через відсутність чітких меж в обчисленнях не диференціюється. Експериментальна група характеризується чіткою стратифікацією на I, II, та VI шари, III-V слабо диференційований. Зміни щільності нейронів в експериментальній групі тварин є однотиповими в різних шарах прелімбічної кори. Так, в VI шарі спостерігали зменшення щільності нейронів (табл.4).

Таблиця.3.

Товщина шарів PrL кори контрольної групи тварин та щільність нейронів в шарах

	Шар			
	I	II-IV	V	VI
Товщина (мкм)	124,25±2,16	637,61±1,76	130,18±2,17	127,75±1,94

Щільність нейронів(в 1 мм ³)	8587,931± 3409,654	13639,66± 3409,654	18691,38± 4158,946	23743,1± 4158,946
-------------------------------------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	----------------------

Таблиця.4.

Товщина шарів PrL кори експериментальної групи тварин

	Шар			
	I	II	III-V	VI
Товщина(мкм)	113,02±1,41	95,73±2,22	459,54±1,58	108,70±1,41
Щільність нейронів (в 1мм ³)	10608,62± 3727,489	21217,24± 3194,991	15155,17± 3367,816	16670,69± 3409,654

Товщина інфралімбічної кори контрольної групи становить 528,09±1,87 мкм, а експериментальної групи – 434,72±3,07 мкм (рис.6.). Зменшення товщини кори вказує на негативну дію холодового стресу ($p \leq 0,05$).

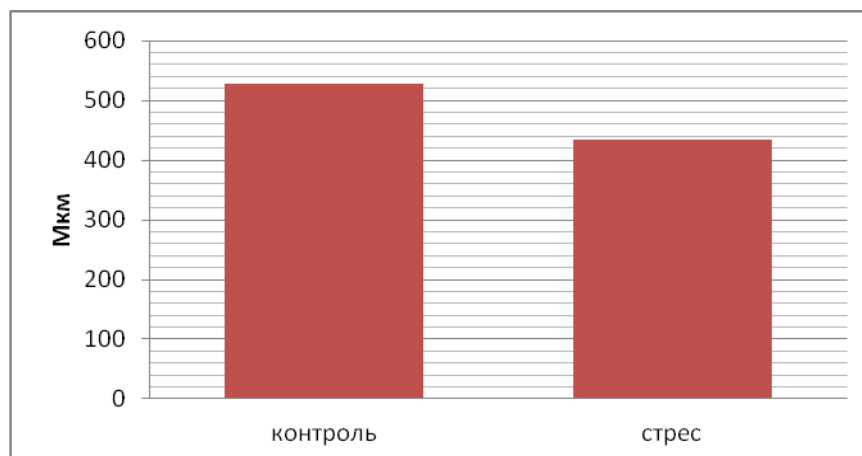
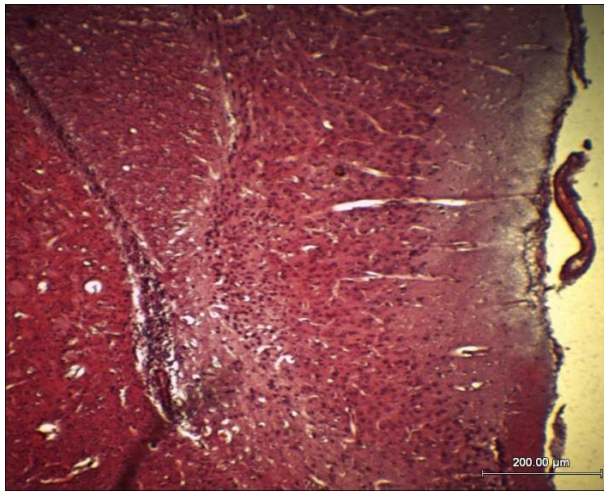
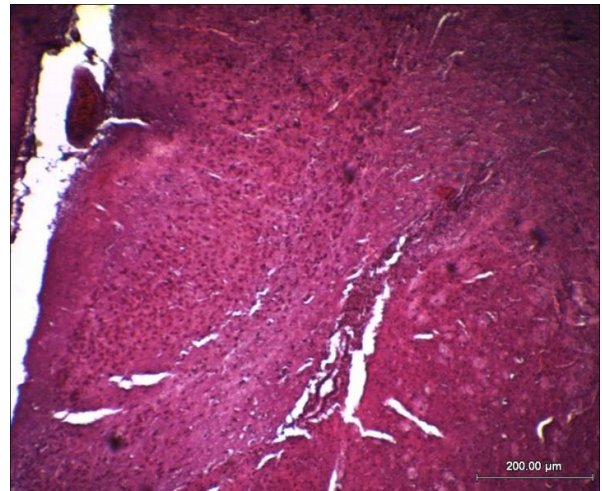


Рис.6. Відмінності товщини ІІ кори контрольної і експериментальної групи, мкм.



А



В

Рис.7. Інфралімбічна кора шурів, х 40.

А – контрольна група, В – експериментальна група.

Що стосується інфралімбічної кори контрольної групи, то можна стверджувати, що чітко диференційованими є I, II, V та VI шари, а III-IV слабо виражений (табл.5.). Стратифікація інфралімбічної кори експериментальної групи тварин включає I, II-V та VI шар (табл.6.). Щільність нейронів експериментальної групи характеризується тенденцією до зниження, але достовірних змін не виявлено.

Таблиця 5.

Товщина шарів II кори контрольної групи тварин, мкм ($p \leq 0,05$).

	Шар				
	I	II	III-IV	V	VI
Товщина	191,38±2,04	67,06±1,15	160,09±2,1	55,75±1,3	54,27±1,27
Щільність нейронів (в 1 мм ³)	10608,62±4423,265	21217,24±3194,99	18186,21±2608,69	19196,56±3984,85	25763,79±2867,592

Таблиця 6.

Товщина шарів ІІ кори експериментальної групи тварин, мкм ($p \leq 0,05$).

	Шар		
	I	II-V	VI
Товщина	184,4±2,62	244,56±1,98	49,92±1,84
Щільність нейронів (в 1 мм ³)	11618,97± 5351,543	20712,07± 4423,265	24248,28± 5735,184

Нейрони контрольної групи мають великі, чітко окреслені ядра з нормальною кількістю хроматину. Внаслідок дії холодного стресу нейрони у всіх ділянках префронтальної кори зазнали змін (рис.8.). Прослідковувалися нейрони з вакуолізацією цитоплазми, гіперхромними та зморщеними ядрами, що свідчить про втрату ними можливості виконувати свої функції. Внаслідок тривалого стресового навантаження об'єм ядер нейронів зменшився, що свідчить про їх виснаження та розвиток передпатологічного стану [2].

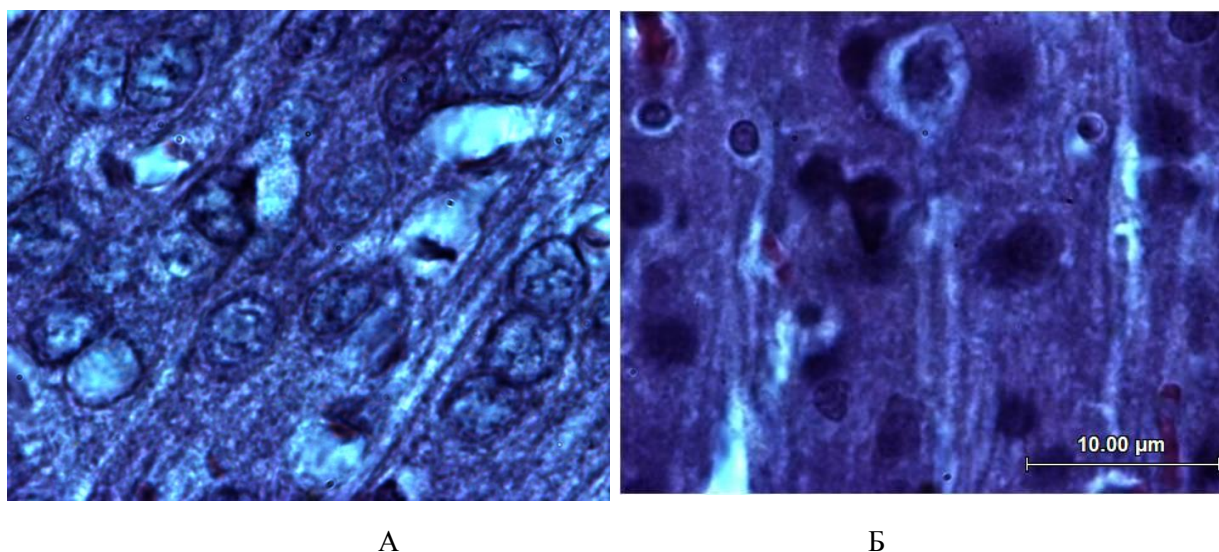


Рис.8. Особливості будови нейронів III-IV шару цингулярної кори щура, x 1000.

А – контрольна група, Б – експериментальна група.

Висновки

1. Цингулярна (Cg) кора двох груп поділяється на VI шарів. В порівнянні з контрольною групою, цингулярна (Cg) кора стресованих тварин є тоншою, характеризується менш вираженою стратифікацією. Щільність розташування нейронів експериментальної групи зростає, а об'єм їх ядер зменшується, що вказує на негативну дію холодового стресу.

2. Товщина PrL кори експериментальної групи значно зменшилася порівняно з контрольною групою. Щільність клітин у порівнюваних шарах прелімбічної (PrL) кори експериментальної групи зменшилася. Нейрони експериментальної групи зазнали негативних змін: вакуолізація цитоплазми, гіперхромне забарвлення ядра, зморщення та зменшення об'єму ядра свідчить про порушення здатності виконувати свої функції.

3. У порівнянні з контрольною групою інфралімбічна (IL) кора стресованих тварин характеризується зменшенням товщини та найгірше вираженою стратифікацією на шари. Об'єм нейронів експериментальної групи тварин та їх щільність не зазнала суттєвих змін.

Література

1. Коржевский Д.Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов / Д.Э. Коржевский. – Санкт-Петербург: “Кроф”, 2005. – 48 с.

2. Пишнов Г. Ю. Особливості морфологічних змін у внутрішніх органах щурів під впливом хронічного стресу різного рівня / Г. Ю. Пишнов, М. М. Діденко, І. В. Загородній // Експериментальна і клінічна медицина. – 2009. – № 2. – С. 10 – 15.

3. Pascucci Tiziana. The Medial Prefrontal Cortex Determines the Accumbens Dopamine Response to Stress through the Opposing Influences of Norepinephrine and Dopamine / Tiziana Pascucci, Rossella Ventura, Emanuele Claudio // J Cerebral Cortex. – 2007. – V. 17. – P. 2796 – 2804.

4. Paxinos George. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates – The New Coronal Set, Fifth Edition / George Paxinos and Charles Watson. – Elsevier Academic Press. – 2005. – P. 53 – 210.
5. Paxinos George. The rat nervous system / George Paxinos. – Elsevier Academic Press. – 2004. – V. – 3. – P. 32 – 1310.
6. Radley J. Jason. Repeated Stress Alters Dendritic Spine Morphology In The Rat Medial Prefrontal Cortex / Jason J. Radley, Anne B. Rocher // J Comp Neurol. – 2008. – V. 507(1). – P. 1141 – 1150.
7. Wellman Cara L. Dendritic Reorganization in Pyramidal Neurons in Medial Prefrontal Cortex after Chronic Corticosterone Administration / Cara L. Wellman // Inc. J Neurobiol. – 2001. – V. 49. – P. 245 – 253.

**Цитоархитектоника префронтальной коры крыс, подвергшихся
воздействию холодового стресса**

Иванская К.М., Мотузюк О.П, Мищенко И.В.

*Восточноевропейский национальный университет имени Леси Украинский,
кафедра физиологии человека и животных*

Реферат

Стресс зачастую формулируют как сильную неблагоприятную для организма физиологическую или психологическую реакцию на действие агрессора. Несмотря на свое кратковременное адаптивное значение, стресс может стать причиной поведенческих, эмоциональных, познавательных и иммунных изменений. Кроме того, стресс может косвенно привести к другим негативным последствиям для здоровья путем изменения морфофункциональных особенностей определенных структур.

Целью исследования было установить изменения цитоархитектоники префронтальной коры крыс, подвергшихся воздействию холодового стресса.

Материалы и методы. Исследовано цитоархитектонику префронтальной коры крысы после воздействия холодового стресса с помощью общепринятых гистологических методик.

Результаты и выводы. Во всех участках префронтальной коры нейроны различные по строению и функциональному назначению образуют шесть слоев. Цингулярна (Cg) кора двух групп делится на VI слоев. По сравнению с контрольной группой, цингулярна кора стрессированных животных является более тонкой, характеризуется менее выраженной стратификацией. Плотность расположения нейронов экспериментальной группы растет, а объем их ядер уменьшается, что указывает на негативное воздействие холодового стресса.

Толщина прелимбичной (PrL) коры экспериментальной группы значительно уменьшилась по сравнению с контрольной группой. Плотность клеток в сравниваемых слоях прелимбичной коры экспериментальной группы уменьшилась. Нейроны экспериментальной группы получили негативных изменений: вакуолизация цитоплазмы, гиперхромной окраски ядра, сморщивание и уменьшение объема ядра свидетельствует о нарушении способности выполнять свои функции.

По сравнению с контрольной группой инфралимбична (IL) кора стрессированных животных характеризуется уменьшением толщины и хуже выраженной стратификацией на слои.

Ключевые слова: цингулярная кора, прелимбическая кора, инфралимбическая кора, холодовой стресс.

Abstract.

TSYTOARHITEKTONIKA PREFRONTAL CORTEX OF RATS EXPOSED TO
COLD STRESS.

IVANSKA K.M., MOTUZIUK O. P. MISCHENKO I.V.

Eastern European National Lesia Ukrainka University

Aim: set the changes tsytoarhitektoniky prefrontal cortex of rats exposed to cold stress.

Materials and methods. Investigated tsytoarhitektoniku prefrontal cortex of rats after cold stress.

Results and conclusions. In all areas of the prefrontal cortex neurons are different in structure and functionality consists of six layers. Cingular (Cg) cortex is divided into two groups VI layers. Compared with controls, animals cingular bark that is exposed to stress thinner, characterized by less pronounced stratification. Density of neurons in the experimental group increases and decreases the volume of their nuclei, indicating a negative effect of cold stress.

Thickness prelimbic (PrL) crust experimental group significantly decreased compared with the control group. The density of cells in the cortex compared layers prelimbic experimental group decreased. Neurons experimental group experienced adverse changes: vacuolization of the cytoplasm, hyperchromatic nuclei staining, shrinkage and reduce the volume of the nucleus suggests that the ability to function.

Compared with the control group Infralimbic (IL) cortex animals are exposed to stress is characterized by a decrease in thickness and the worst pronounced stratification into layers. Volume neurons experimental group of animals and their density has not changed.

Key words: anterior cingulate (Cg), prelimbic prefrontal cortex (PrL), Infralimbic prefrontal cortex (IL), cold stress.