

УДК 612.822

ПРОСТОЙ МЕТОД ОЦЕНКИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АСТРОЦИТОВ: ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛОВОГО ДИМОРФИЗМА ДИНАМИКИ СОЗРЕВАНИЯ АСТРОЦИТОВ В МИНДАЛИНЕ КРЫС

© 2024 г. А. О. Манолова¹, *, Н. А. Лазарева¹, А. Э. Парамонова¹, А. А. Квичанский¹, М. С. Одринская¹, М. Ю. Степаничев¹, Н. В. Гуляева¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

*E-mail: anna.manolova@ihna.ru

Поступила в редакцию 25.03.2024 г.

После доработки 07.04.2024 г.

Принята к публикации 08.04.2024 г.

При проведении доклинических исследований важно иметь доступные, простые и надежные методы оценки состояния ткани мозга, с помощью которых можно оценить эффективность того или иного препарата или воздействия. Морфология астроцитов достаточно хорошо отражает функциональное состояние синапсов, поэтому может быть использована как косвенный показатель состояния нейрональных сетей. В статье описан метод оценки морфологических характеристик астроцитов с использованием эпифлуоресцентной микроскопии и программы ImageJ. Приведен пример применения этого метода для исследования динамики изменения морфологических характеристик астроцитов базолатерального ядра миндалины в ходе нормального онтогенеза. Предложенный метод позволяет оценить не только плотность популяции клеток, но и их морфологические показатели, соответствующие степени ветвления и длине отростков астроцитов. В результате применения метода был обнаружен половой диморфизм в динамике созревания астроцитов в базолатеральном ядре миндалины, выражающийся в увеличении длины отростков в ходе взросления от ювенильного до подросткового возраста у самок, но не у самцов.

Ключевые слова: астроглия, цифровая обработка изображений, базолатеральное ядро миндалины, половой диморфизм, онтогенез

DOI: 10.31857/S1027813324030092, EDN: EPZFTX

ВВЕДЕНИЕ

Миндалина является важной частью лимбической системы мозга. Ее функционирование вовлечено в обеспечение таких эмоциональных реакций, как страх и тревога, и необходимо для адекватного их проявления на поведенческом уровне, в том числе для социальных взаимодействий. Нарушения в работе миндалины обнаруживают при таких психоневрологических заболеваниях, как расстройства тревожно-депрессивного спектра, разного рода зависимости, шизофрения, аутизм. Исследования, проведенные с использованием магнитно-резонансной томографии (МРТ), показывают, что созревание структур лимбической системы мозга и их реципрокных проекций происходит в возрасте пубертата [1, 2]. Эти проекции существуют с раннего возраста, но в период с подросткового до взрослого возраста происходит их значительное изменение, характеризующееся уменьшением числа волокон

и увеличением силы синапсов [3, 4]. При этом сроки созревания структур мозга больше соответствуют пубертатному статусу со слов испытуемых, чем их биологическому возрасту, и ассоциированы с уровнем тестостерона [5]. Почти во всех исследованиях отмечают половой диморфизм в созревании структур лимбической системы [6]. В миндалине довольно большая концентрация рецепторов стероидных гормонов [7], и обнаружен как функциональный, так и морфологический половой диморфизм [8–10]. Существует представление о том, что зависящие от пола различия в функционировании миндалины могут лежать в основе диспропорции подверженности психоневрологическим заболеваниям мужчин и женщин.

На сегодняшний день не оставляет сомнений тот факт, что астроциты необходимы для нормального функционирования и жизнедеятельности нейронов. Более того, они необходимы и для

правильного созревания нейрональных сетей [11]. По морфологическим характеристикам астроцитов, таким, например, как степень разветвленности, можно судить о степени функциональной нагрузки на отдел мозга [12, 13]. Существует мнение, что астроциты миндалины являются очень чувствительными и пластичными клетками, развивающимися и отвечающими на внешние стимулы в очень специфичной манере, свойственной только этой субпопуляции [14]. Учитывая тот факт, что астроциты экспрессируют рецепторы эстрогена, можно предположить их участие в осуществлении различий созревания и функционирования миндалины в зависимости от пола индивидуума. Влияние половых гормонов на морфологические характеристики астроцитов обнаружено в аркуатном ядре [15], в гиппокампе [16] и в медиальном ядре миндалины [17].

Таким образом, по состоянию астроцитов можно косвенно судить о состоянии нейрональных сетей миндалины, а значит, исследование морфологических характеристик астроцитов может дать представление о степени отклика на экспериментальное воздействие в животных моделях психоневрологических заболеваний и об эффективности использования того или иного препарата в доклинических исследованиях. Учитывая, что иммуногистохимия и эпифлуоресцентная микроскопия являются довольно широко распространенными в лабораторной практике, метод оценки состояния астроцитов с их помощью может быть широко применен в различных лабораториях. Целью работы было описание такого простого и доступного метода, позволяющего получить данные о морфологических характеристиках астроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы фронтальные 50-микронные срезы мозга крыс, окрашенные иммунофлуоресцентно антителами к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) – маркеру фиброзных астроцитов. Биоматериал был получен от 27 животных следующих групп: самцы ПД18 (n = 5), самки ПД18 (n = 5), самцы ПД30 (n = 8), самки ПД30 (n = 9) (ПД – постнатальный день). Микрофотографии получали из области базолатерального ядра миндалины (координаты для возраста ПД18 -2.20...-2.80 mm Bregma по атласу мозга крыс Хазипова [18]; координаты для возраста ПД30 -3.14...-3.60 mm Bregma по атласу мозга Паксона и Уотсона [19]). Для получения микрофотографий использовали микроскоп Axio. Imager.Z2 (Zeiss, Германия), оснащенный цифровой фотокамерой MRm (Zeiss, Германия), с использованием объектива x40 (EC Plan-NEOFLUAR, NA = 0.75). Экспозиция выбиралась для каждого среза с тем, чтобы максимально

прослеживались отростки клеток, но при этом она не должна была превышать 2 мс, так как экспозиция дольше 2 мс значительно увеличивает фоновый шум. С помощью программного модуля ZEN blue edition (2011) (Zeiss, Германия) получали z-стеки, т.е. набор микрофотографий с последовательных фокальных плоскостей, отстоящих друг от друга на расстояние 1 мкм, так, чтобы была покрыта вся толщина среза мозга. При наших параметрах фотографирования такой z-стек является цифровым отображением части базолатерального ядра миндалины размером 224×168×50 мкм и вмещает в себя около 10–15 GFAP-позитивных клеток с отростками. От каждого животного получали по 2 z-стека с разных срезов мозга, расстояние между которыми составляло не менее 300 мкм в rostro-каудальном направлении.

Предварительную обработку полученных микрофотографий проводили в программе Fiji (ImageJ, NIH, ver. 1.53c) с использованием авторских скриптов и макросов. На первом этапе из полученных z-стеков делали проекции максимальной интенсивности, что позволяет работать дальше с изображениями как с обычными двумерными, но при этом сохраняет все детали морфологических особенностей объектов. При этом изображения сразу переводили в формат 8-битных (функция “8-bit”) и производили уменьшение фонового шума с использованием функции “Despeckle”. Далее из полученных изображений вырезали изображения отдельных клеток. Над каждым изображением отдельной клетки производили следующие действия: 1) увеличение контраста с нормализацией гистограммы изображения (функция “Enhance Contrast...”); 2) размытие контуров (функция “Gaussian Blur...”, $\epsilon = 1$); 3) бинаризация путем применения фильтра, использующего локальный порог интенсивности (фильтр Niblack с радиусом 5, функция “Auto Local Threshold”); 4) фильтрация полученных объектов по размеру с удалением всех объектов меньше 100 пикселей (функция “Analyze Particles...”). После этого при необходимости производили ручную доработку полученных объектов такую, как присоединение некоторых отростков к основному объекту и стирание объектов больше 100 пикселей, не относящихся к целевому объекту. Всю ручную доработку производили, сверяясь с изначальным, не бинаризованным, изображением клетки. Полученный массив бинаризованных изображений преобразовывали в скелетонизированные изображения функцией “Skeletonize”. Такие изображения представляют собой тонкие линии, толщиной 1 пиксель, точно повторяющие все отростки клетки. На рис. 1 представлены этапы преобразования микрофотографии астроцита. С математической точки зрения такое изображение является графом, поэтому к нему применимы методы работы с графами.

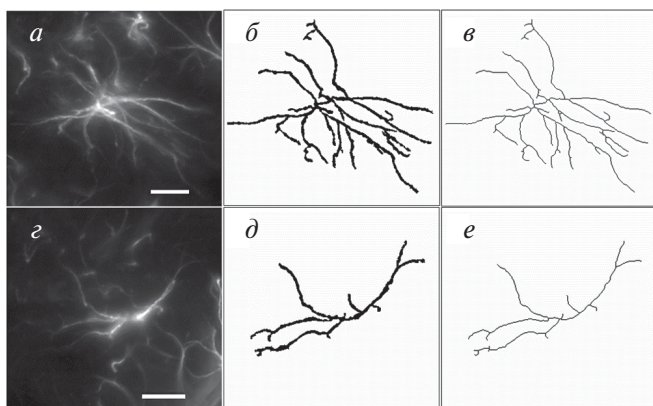


Рис. 1. Этапы обработки изображения астроцита от микрофотографии до графа-скелетона на примере более (*a–в*) и менее (*г–е*) разветвленных клеток. *a, г* – микрофотография астроцита, *б, д* – бинаризованное изображение, *в, е* – скелетонизированное изображение. Шкала – 10 мкм.

Функция “Analyze Skeleton (2D/3D)” позволяет получить следующие характеристики для каждого графа-скелетона: число ребер графа, число точек ветвления (вершин графа, из которых выходит не менее трех ребер), число конечных точек (число вершин графа, из которых выходит только одно ребро), среднюю длину ребра, максимальную длину ребра и максимальный кратчайший путь (самое длинное расстояние от одной конечной точки до другой). На выходе мы получаем таблицу, в которой для каждой клетки указаны все характеристики соответствующего ей скелетона. С каждого изображения вырезали по 2–3 клетки, таким образом, было проанализировано от 4 до 6 клеток на животное.

Плотность популяции астроцитов оценивали на полученных на первом этапе обработки

микрофотографий проекциях максимальной интенсивности. Подсчитывали число клеток, имеющих не менее двух разветвленных отростков и не пересекающих запрещенные границы (левую и нижнюю границы изображения).

Статистическую обработку проводили в программе R-Studio (ver. 2022.02.0). Полученные характеристики для каждой клетки усредняли на животное, проверяли соответствие нормальному распределению (тест Шапиро-Уилка), проводили корреляционный анализ с целью выявления коллинеарности между различными характеристиками (тест Пирсона), затем проводили двухфакторный дисперсионный анализ с факторами “пол” и “возраст”, предварительно убедившись в равенстве дисперсий разных групп (тест Левена), в качестве *post hoc* анализа использовали тест Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Плотность популяции астроцитов в базолатеральном ядре миндалина в ходе взросления от ювенильного (ПД18) до подросткового (ПД30) возраста увеличивалась независимо от пола. Так, число астроцитов у самцов в ПД18 составила 5492 ± 4753 шт/мм³, у самок в ПД18 2498 ± 951 шт/мм³, у самцов в ПД30 – 8208 ± 3506 шт/мм³, у самок в ПД30 – 6643 ± 3891 шт/мм³. По данным двухфакторного дисперсионного анализа влияние фактора “возраст” было статистически достоверно значимым: $F(1, 26) = 5.46$, $p = 0.027$ (рис. 2).

При анализе автоматически полученных показателей графов-скелетонов важно понимать с какими физиологическими обусловленными морфологическими характеристиками астроцитов их можно соотнести. Так, например, число ребер графа, как и число точек ветвления, косвенно говорит о степени разветвленности отростков астроцита. Поскольку длина ребра является по сути расстоянием

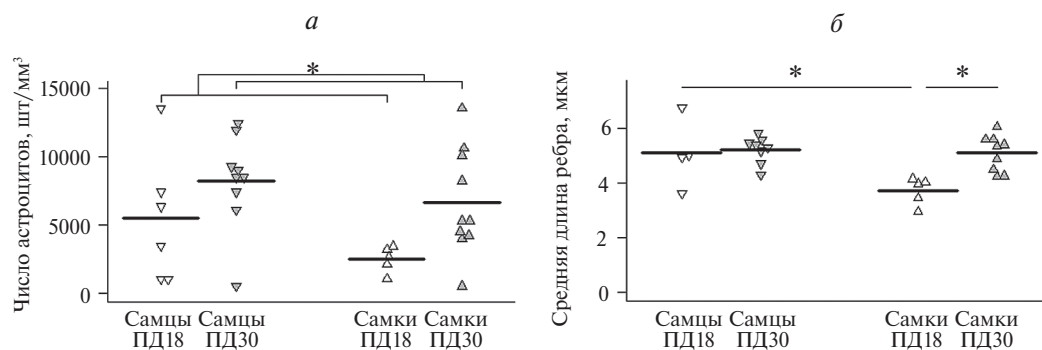


Рис. 2. Результаты статистической обработки полученных морфологических характеристик. *a* – увеличение плотности популяции астроцитов в базолатеральном ядре миндалина с возрастом: $F(1, 26) = 5.46$, $p = 0.027$, нет эффекта пола. *б* – увеличение средней длины ребра графа-скелетона обнаружено у самок, но не у самцов: “пол”*“возраст” – $F(1, 22) = 4.52$, $p = 0.045$, самцы ПД18 vs самки ПД18 – $p = 0.040$, самки ПД18 vs самки ПД30 – ($p = 0.011$) (Тьюки *post hoc*). Среднее значение по группе отмечено горизонтальной полосой.

между точками ветвления, то по этому показателю можно косвенно судить о длине отростков астроцита. Максимальный кратчайший путь соответствует суммарной длине двух наиболее длинных отростков клетки. По результатам корреляционного анализа измеренные показатели можно разделить на две группы, внутри которых показатели статистически достоверно коррелируют. К первой группе относятся показатели, описывающие степень разветвленности астроцита, а ко второй – показатели, так или иначе соотносящиеся с длиной отростков астроцита. В таблице 1 указаны средние значения и ошибка среднего для всех перечисленных параметров.

Поскольку использование большого числа параметров для описания морфологии клетки нецелесообразно, необходимо выбрать несколько из них. По результатам корреляционного анализа оказалось, что достаточными для анализа параметрами являются число ребер графа и средняя длина ребра графа. Действительно, эти два параметра не коррелируют между собой и соотносятся с разными характеристиками морфологии астроцита. По числу ребер графа-скелетона, соответствующего астроциту, можно судить о степени ветвления отростков: чем больше ребер у графа, тем больше точек ветвления. Средняя длина ребра не соответствует напрямую длине отростков, но поскольку отростки складываются из отрезков от ветвления до ветвления, то косвенным образом эта величина будет говорить о длине отростков астроцита. Для каждого из этих параметров был проведен двухфакторный дисперсионный анализ. Целью анализа было выявление влияния факторов “пол” и “возраст” на морфологию астроцитов в миндалине. Среднее число ребер графа-скелетона составило у самцов ПД18 33 ± 21 , у самок ПД18 21 ± 12 , у самцов ПД30 35 ± 7 , у самок ПД30 36 ± 13 .

Дисперсионный анализ не выявил статистической значимости ни эффекта фактора “возраст”, ни эффекта фактора “пол” на число ребер графа. По всей видимости, с возраста ПД18 по возраст ПД30 не наблюдается значительного увеличения ветвления отростков у астроцитов базолатерального ядра миндалины ни у самцов, ни у самок крыс.

Среднее расстояние от точки ветвления до точки ветвления составило: у самцов ПД18 5.1 ± 1.3 мкм, у самок ПД18 3.7 ± 0.5 мкм, у самцов ПД30 5.2 ± 0.5 мкм, у самок ПД30 5.1 ± 0.7 мкм. Дисперсионный анализ показал статистически значимый эффект фактора “возраст” ($F(1, 22) = 7.93$, $p = 0.010$) и взаимодействия факторов “пол” и “возраст” ($F(1, 22) = 4.52$, $p = 0.045$). Эффект фактора “пол” был выражен только на уровне тенденции: $F(1, 22) = 3.93$, $p = 0.060$. Апостериорный анализ (тест Тьюки) выявил достоверное различие между группами самцы ПД18 и самки ПД18 ($p = 0.040$), и между группами самки ПД18 и самки ПД30 ($p = 0.011$). Таким образом, в базолатеральном ядре миндалины наблюдается увеличение примерно на 20% средней длины отрезка отростка астроцита между двумя соседними ветвлениями у самок крыс при взрослении от ювенильного до подросткового возраста. У самцов аналогичного увеличения длины отростков в этом возрастном периоде не выявлено. Стоит отметить, что у самцов в ювенильном возрасте эта величина уже составляет около 5 мкм, а у самок как раз до этого размера доходит к подростковому возрасту. Для таких характеристик, как максимальная длина ребра и максимальное кратчайшее расстояние, также были обнаружены статистически достоверные эффекты фактора “возраст” ($F(1, 23) = 15.17$, $p = 0.0007$ и $F(1, 23) = 4.31$, $p = 0.049$, соответственно) и взаимодействия факторов на уровне тенденции. Учитывая наличие корреляции между

Таблица 1. Усредненные значения параметров графов-скелетонов астроцитов для каждой из исследованных групп. Приведены средние и ошибка среднего. \$ – $p < 0.07$ по сравнению с группой другого пола того же возраста, * – $p < 0.05$ по сравнению с группой животных ПД18 того же пола.

	Морфологические характеристики	Самцы ПД18	Самцы ПД30	Самки ПД18	Самки ПД30
Параметры, характеризующие разветвленность астроцита	Число ребер графа	33 ± 11	35 ± 2	21 ± 5	36 ± 4
	Число точек ветвления	16 ± 5	17 ± 1	10 ± 3	17 ± 2
	Число конечных точек	18 ± 5	19 ± 1	12 ± 3	19 ± 2
Параметры, характеризующие длину отростков астроцита	Средняя длина ребра, мкм	5.1 ± 0.6	5.2 ± 0.2	3.7 ± 0.2 \$	5.0 ± 0.2 *
	Максимальная длина ребра, мкм	18 ± 2	21 ± 1	13 ± 2	21 ± 1 *
	Максимальное кратчайшее расстояние, мкм	60 ± 8	59 ± 2	40 ± 8	58 ± 3 *

этими тремя характеристиками, которые, по сути, по-разному описывают такую физиологическую характеристику, как длина отростка астроцита, схожесть результатов статистической обработки очевидна.

Таким образом, в ходе нормального онтогенеза при взрослении крыс с ПД18 до ПД30 популяция астроцитов в базолатеральном ядре миндалины увеличивается у самцов примерно в 1.5 раза, а у самок в 2.5 раза. При этом степень разветвленности астроцитов не изменяется ни у самцов, ни у самок, и только у самок увеличивается длина отростков между двумя соседними ветвлениями. По всей видимости, астроциты базолатерального ядра миндалины самок претерпевают более значительные изменения при взрослении животных от ювенильного до подросткового возраста, чем у самцов. Использование автоматически полученных морфологических характеристик клеток позволило выявить как наличие полового диморфизма в созревании астроцитов, так и уточнить специфику этого различия.

При поставленном и отработанном методе оценки морфологических особенностей астроцитов на обработку данных по базолатеральному ядру миндалины потребовалось примерно следующее количество человеко-часов (оценка для эксперимента, в котором участвовало около 25 животных): иммуногистохимическое окрашивание – 2 дня, микрофотографирование – около 10 часов, обработка микрофотографий (включающая этапы ручной обработки, такие как вырезание отдельных клеток и правку полученных бинаризованных изображений) – 12–15 часов (около 3 часов на настройку скриптов и подбор фильтров для бинаризации, 1–2 часа на вырезание отдельных клеток, 7–10 часов на правку полученных бинаризованных изображений), 1–2 часа – время для стандартной статистической обработки. Последний этап ручной обработки (правка автоматически полученных бинаризованных изображений) является одним из самых трудоемких и времязатратных. Облегчить и ускорить этот этап можно улучшением качества иммуногистохимического окрашивания (увеличение соотношения сигнал/шум, уменьшение фонового окрашивания) и подбором наиболее оптимальных фильтров бинаризации. Суммарно получается, что результаты эксперимента можно получить за две недели рабочего времени.

ОБСУЖДЕНИЕ

Половой диморфизм в экспрессии наиболее часто используемого маркера астроцитов – GFAP – известен довольно давно. Повышенный его уровень у самцов по сравнению с самками связывают с более высоким уровнем тестостерона в крови. В структурах, относящихся к проявлению полового

поведения, показаны различия в экспрессии уже в первые дни жизни [15]. В лимбических структурах, в том числе в миндалине, указывают на зависимость иммунореактивности GFAP от уровня половых гормонов [17, 20, 21]. При этом основную роль отводят не самому тестостерону, а его метаболиту – эстрогену. Распространенность фермента, превращающего тестостерон в эстроген, в различных структурах мозга также зависит от пола животного, и в лимбических структурах, в том числе в миндалине, его экспрессия выше у самцов [22]. Механизм индукции тестостероном (или эстрогеном) повышенной экспрессии GFAP до сих пор неизвестен. В недавнем довольно обширном обзоре по регуляции экспрессии гена GFAP нет упоминания стероидных гормонов [23], но ранее была показана возможность астроцитарного ответа на активацию рецепторов эстрогена без вовлечения геномного аппарата (through nongenomic activity) [24]. Учитывая, что состояние, а значит и внешний облик астроцитов отражают функциональное состояние синапсов [13, 25], различие между самцами и самками в морфологии астроцитов миндалины может говорить о половом диморфизме функционирования нейрональных сетей этой структуры, что, как предполагается, может лежать в основе различий в подверженности психоневрологическим заболеваниям у мужчин и женщин. Поэтому исследование морфологических характеристик астроцитов в лимбических структурах может помочь в понимании механизмов психоневрологических патологий. В особенности важен для исследования подростковый период, так как именно в это время образуются реципрокные связи миндалины с гиппокампом и другими структурами [1, 2, 5, 6].

Несмотря на то, что визуализация с использованием иммуногистохимического окрашивания на GFAP позволяет проявить только около 15% самой клетки [26, 27], метод оценки состояния астроцитарной глии по морфологическим характеристикам GFAP-позитивных клеток считается достаточно валидным [28, 29]. Однако если оценка проводится только по иммунореактивности ткани (процент иммуногистохимически окрашенной площади ко всей площади исследуемой структуры), то сложно сделать вывод о причине обнаруженных различий. Изменения иммунореактивности ткани могут быть проявлением как увеличения плотности популяции астроцитов, так и увеличения числа их отростков, их утолщения или усиления ветвления. Так, в нашем исследовании оказалось, что половой диморфизм в созревании астроцитов в базолатеральном ядре миндалины проявляется в различии длины отростков GFAP-позитивных клеток. По нашим данным можно предположить, что у самцов отростки астроцитов достигают длины, близкой к таковой у зрелых астроцитов, раньше, чем у самок. Мы можем судить об этом по тому, что

максимальное кратчайшее расстояние у самцов уже в ПД18 составляет около (60 ± 8) мкм и не изменяется к подростковому возрасту (ПД30: (59 ± 2) мкм). При этом считается, что диаметр площади, занимаемой астроцитом во взрослом мозге у грызунов составляет примерно 40–60 мкм (в зависимости от структуры мозга) [30, 31], что достаточно точно совпадает с полученной нами оценкой (суммарной длины двух наиболее длинных отростков). У самок же обнаружено статистически достоверное увеличение средней длины отрезка между ветвлениями, что говорит об увеличении длины отростков астроцитов в период с ПД18 до ПД30. При этом увеличение плотности популяции GFAP-позитивных клеток происходило как у самцов, так и у самок крыс. У самок число GFAP-позитивных клеток увеличилось значительно, но это не было статистически значимо. Другие исследования также указывают на большее число новых GFAP-позитивных клеток в миндалине у самок, чем у самцов в подростковом возрасте. Так, группа MM MacCarthy показала, что в препубертатном возрасте (ПД14) у самок в миндалине больше GFAP-позитивных клеток, чем у самцов [32]. В другом исследовании было показано, что число вновь появившихся клеток (включивших метку BrdU) в возрасте ПД30 в миндалине было больше у самцов, однако процент таких клеток локализованных с GFAP был примерно в полтора раза больше у самок [33]. Таким образом, полученные нами данные по динамике плотности популяции астроцитов при взрослении с ювенильного до пубертатного возраста, в целом, совпадают с данными литературы. В дополнение к этому мы впервые показали наличие полового диморфизма в динамике морфологических показателей астроглии базолатерального ядра миндалины в этот возрастной период.

Не смотря на широкое распространение методов цифровой обработки изображений, большинство исследователей ограничиваются оценкой иммунореактивности ткани или подсчетом числа клеток. Возможно, это вызвано тем, что исследование морфологических особенностей представляется времязатратным и трудоемким процессом. Действительно, в работах, в которых приводится оценка морфологических параметров астроцитов, как правило используют микрофотографии на большом увеличении с использованием масляных объективов и построение 3D-изображений при помощи рутинного ручного “трэйсинга” отростков с помощью дорогостоящих коммерческих программ (например, Neuro Lucida (MBF Bioscience, США)). Так, в работе [34] исследовали реакцию астроцитов миндалины взрослых крыс на повышение уровня тестостерона в крови. Полученные авторами данные по средней длине ребра, числу точек ветвления и числу конечных точек совпадают с данными, полученными нами (учитывая, что они использовали

другую линию крыс и взрослых животных). При этом их метод выглядит значительно более трудоемким, так как они производили микрофотографирование с использованием масляного объектива $\times 100$ и ручной трэйсинг отростков астроцитов. В другой работе [28] микрофотографирование осуществляли с использованием конфокального микроскопа и восстанавливали 3D-изображение астроцитов с помощью плагина Neurite Tracer (Fiji, NIH, США). Сравнение полученных ими данных с нашими несколько затруднено, так как работа выполнена на взрослых самцах мышей и использован метод Шолля для оценки морфологических характеристик астроцитов. Тем не менее, один из параметров является аналогом максимального кратчайшего расстояния, полученного в нашей работе, и результаты приблизительно совпадают: 35–50 мкм – в работе Bondi et al [28], 40–60 мкм – в нашей работе. При этом по сравнению с двумя вышеупомянутыми работами описанный в статье метод проще по выполнению и требует меньших затрат времени. Как указано в разделе результаты, на обработку эксперимента, в котором участвует около 25 животных, потребуется не более двух недель от стадии готовых срезов мозга до стадии получения результатов статистического анализа. Стоит также отметить, что данный метод не требует использования компьютера значительной производительности, а также особых навыков оператора.

Предложенный в статье метод является простым и осуществим в большинстве научно-исследовательских лабораторий. При этом он дает возможность более детально изучить изменения глиальных клеток, вызванные экспериментальным воздействием, что важно для понимания происходящих в мозге процессов. Используя приведенный метод, мы показали наличие полового диморфизма в динамике созревания астроглии в базолатеральном ядре миндалины крыс в период взросления с ювенильного до подросткового возраста. Обнаруженные нами различия могут помочь в выяснении механизмов этиологии психоневрологических заболеваний, имеющих половую диспропорцию представленности в социуме.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом № 23-25-00463.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Этическое одобрение. Все эксперименты с животными проводились в соответствии с этическими принципами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. и Приказа № 267 МЗ РФ от 19 июня 2003 г. в области

защиты и использования животных в экспериментальных исследованиях. Протокол эксперимента утвержден Этической комиссией ИВНД и НФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dennison M., Whittle S., Yücel M., Vijayakumar N., Kline A., Simmons J., Allen N.B. // *Dev. Sci.* 2013. V. 16. P. 772–791. doi:10.1111/desc.12057.
- Fish A.M., Nadig A., Seidlitz J., Reardon P.K., Mankiw C., McDermott C.L., Blumenthal J.D., Clasen L.S., Lalonde F., Lerch J.P., Chakravarty M.M., Shinohara R.T., Raznahan A. // *NeuroImage*. 2020. V. 204. P. 116122. doi:10.1016/j.neuroimage.2019.116122.
- Verwer R.W.H., Van Vulpen E.H.S., Van Uum J.F.M. // *J. Comp. Neurol.* 1996, 376, 75–96. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961202)376:1<75::AID-CNE5>3.0.CO;2-L.
- Arruda-Carvalho M., Wu W.-C., Cummings K.A., Clem R.L. // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. P. 2976–2985. doi:10.1523/JNEUROSCI.3097-16.2017.
- Wierenga L.M., Bos M.G.N., Schreuders E., Vd Kamp F., Peper J.S., Tamnes C.K., Crone E.A. // *Psychoneuroendocrinology*. 2018. V. 91. P. 105–114. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.02.034.
- Frere P.B., Vetter N.C., Artiges E., Filippi I., Miranda R., Vulser H., Paillère-Martinot M.-L., Ziesch V., Conrod P., Cattrell A., Walter H., Gallinat J., Bromberg U., Jurk S., Mennigen E., Frouin V., Papadopoulos Orfanos D., Stringaris A., Penttilä J., Van Noort B., Grimmer Y., Schumann G., Smolka M.N., Martinot J.-L., Lemaître H. // *NeuroImage*. 2020. V. 210. P. 116441. doi:10.1016/j.neuroimage.2019.116441.
- Simerly R.B., Swanson L.W., Chang C., Muramatsu M. // *J. Comp. Neurol.* 1990. V. 294. P. 76–95. doi:10.1002/cne.902940107.
- Cahill L., Uncapher M., Kilpatrick L., Alkire M.T., Turner J. // *Learn. Mem.* 2004. V. 11. P. 261–266. doi:10.1101/lm.70504.
- Cooke B.M., Stokas M.R., Woolley C.S. // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 501. P. 904–915. doi:10.1002/cne.21281.
- Kilpatrick L.A., Zald D.H., Pardo J.V., Cahill L.F. // *NeuroImage*. 2006. V. 30. P. 452–461. doi:10.1016/j.neuroimage.2005.09.065.
- Clarke L.E., Barres B.A. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. V. 14. P. 311–321. doi:10.1038/nrn3484.
- Nägler K., Mauch D.H., Pfriederger F.W. // *J. Physiol.* 2001. V. 533. P. 665–679. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.00665.x.
- Pfriederger F.W., Barres B.A. // *Science*. 1997. V. 277. P. 1684–1687. doi:10.1126/science.277.5332.1684.
- Johnson R.T., Breedlove S.M., Jordan C.L. // *Astrocytes in the Amygdala* / In *Vitamins & Hormones*. Elsevier, 2010. Vol. 82. P. 23–45. doi:10.1016/S0083-6729(10.82002-3.
- Mong J.A., Kurzweil R.L., Davis A.M., Rocca M.S., McCarthy M.M. // *Horm. Behav.* 1996. V. 30. P. 553–562. doi:10.1006/hbeh.1996.0058.
- Milner T.A., McEwen B.S., Hayashi S., Li C.J., Reagan L.P., Alves S.E. // *J. Comp. Neurol.* 2001. V. 429. P. 355–371.
- Johnson R.T., Breedlove S.M., Jordan C.L. // *J. Comp. Neurol.* 2013. V. 521. P. 2298–2309. doi:10.1002/cne.23286.
- Khazipov R., Zaynutdinova D., Ogievetsky E., Valeeva G., Mitrukhina O., Manent J.-B., Represa A. // *Front. Neuroanat.* 2015. V. 9. doi:10.3389/fnana.2015.00161.
- Paxinos G., Watson C. // *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3. ed. / Academic Press: San Diego, Calif., 1997.
- Martinez F.G., Hermel E.E.S., Xavier L.L., Viola G.G., Riboldi J., Rasia-Filho A.A., Achaval M. // *Brain Res.* 2006. V. 1108. P. 117–126. doi:10.1016/j.brainres.2006.06.014.
- Conejo N.M., González-Pardo H., Cimadevilla J.M., Argüelles J.A., Díaz F., Vallejo-Seco G., Arias J.L. // *J. Neurosci. Res.* 2005. V. 79. P. 488–494. doi:10.1002/jnr.20372.
- Immenschuh J., Thalhammer S.B., Sundström-Poromaa I., Biegon A., Dumas S., Comasco E. // *Biol. Sex Differ.* 2023. V. 14. P. 54. doi:10.1186/s13293-023-00541-8.
- Brenner M., Messing A. // *ASN Neuro.* 2021. V. 13. P. 175909142098120. doi:10.1177/1759091420981206.
- Khan M.M., Hadman M., Wakade C., De Sevilla L.M., Dhandapani K.M., Mahesh V.B., Vadlamudi R.K., Brann D.W. // *Endocrinology*. 2005. V. 146. P. 5215–5227. doi:10.1210/en.2005-0276.
- Elmariah S.B., Hughes E.G., Oh E.J., Balice-Gordon R.J. // *Neuron Glia Biol.* 2004. V. 1. P. 339–349. doi:10.1017/S1740925X05000189.
- Bushong E.A., Martone M.E., Jones Y.Z., Ellisman M.H. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 183–192. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-01-00183.2002.
- Reeves A.M.B., Shigetomi E., Khakh B.S. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. P. 9353–9358. doi:10.1523/JNEUROSCI.0127-11.2011.
- Bondi H., Bortolotto V., Canonico P.L., Grilli M. // *Neurobiol. Aging*. 2021. V. 100. P. 59–71. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2020.12.018.
- Tavares G., Martins M., Correia J.S., Sardinha V.M., Guerra-Gomes S., Das Neves S.P., Marques F., Sousa N., Oliveira J.F. // *Brain Struct. Funct.* 2017. V. 222. P. 1989–1999. doi:10.1007/s00429-016-1316-8.
- Baldwin K.T., Murai K.K., Khakh B.S. // *Trends Cell Biol.* 2023. S0962892423002040. doi:10.1016/j.tcb.2023.09.006.

31. Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A. // Trends Neurosci. 2003. V. 26. P. 523–530. doi:10.1016/j.tins.2003.08.008.
32. Krebs-Kraft D.L., Hill M.N., Hillard C.J., McCarthy M.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2010. V. 107. P. 20535–20540. doi:10.1073/pnas.1005003107.
33. Mohr M.A., Michael N.S., DonCarlos L.L., Sisk C.L. // Dev. Cogn. Neurosci. 2022. V. 57. P. 101141. doi:10.1016/j.dcn.2022.101141.
34. Johnson R.T., Schneider A., DonCarlos L.L., Breedlove S.M., Jordan C.L. // J. Comp. Neurol. 2012. V. 520. P. 2531–2544. doi:10.1002/cne.23061.

A Simple Method for Morphological Assessment of Astrocytes: Sexual Dimorphism in The Maturation Dynamics of Astrocytes in the Rat Amygdala

A. O. Manolova¹, N. A. Lazareva¹, A. E. Paramonova¹, A. A. Kvichansky¹, M. S. Odrinskaya¹, M. Yu. Stepanichev¹, and N. V. Gulyaeva¹

¹Federal state budget institution Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

Simple, affordable and reliable methods for assessing the status of brain structures maturation are vital for preclinical studies related to the effects of early-life stress. These methods make it possible to evaluate the effectiveness of specific therapies or the prevention of stress-related pathological changes. The morphology of astrocytes is one of the markers representing functional state of synapses and thus it is indicative of maturation state of neuronal networks. We performed the method for evaluating the morphological characteristics of astrocytes using epifluorescence microscopy and the ImageJ program. Application of the method to brain sections of rats on postnatal days 18 and 30 revealed the dynamics of morphological changes in the astrocytes of the basolateral nucleus of the amygdala during normal ontogenesis. The proposed method makes it possible to evaluate not only the density of the cell population, but also their morphological parameters associated with the degree of branching and the length of the astrocyte processes. The approach used revealed sexual dimorphism in the ontogenesis: the length of the astrocytic processes increased during maturation from juvenile to pubertal period in the basolateral nucleus of the amygdala only in female rats, but not in males.

Keywords: astroglia, digital image processing, basolateral amygdala, sexual dimorphism, ontogenesis