

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.32

doi: 10.26907/2542-064X.2022.4.519-534

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОСТРУКТУРЫ ПЕРИНЕЙРОНАЛЬНЫХ СЕТЕЙ

*Н.С. Липачев¹, А.С. Двоеглазова¹, А.А. Садреева², А.В. Аганов¹,
М.Н. Павельев³*

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет),
г. Москва, 119991, Россия

³Центр нейронаук, Университет Хельсинки, г. Хельсинки, 00290, Финляндия

Аннотация

Перинейрональные сети представляют собой особый высокоструктурированный тип внеклеточного матрикса центральной нервной системы. В последние годы была установлена важная роль перинейрональных сетей в нормальной физиологии ЦНС, а также показаны изменения их экспрессии при некоторых патологиях, что позволяет сделать предположение об участии перинейрональных сетей в патогенезе ряда заболеваний головного и спинного мозга. До недавнего времени количественные исследования пространственной геометрии ячеек перинейрональных сетей отсутствовали. В 2021 и 2022 гг. были опубликованы полученные нами результаты количественного изучения микроструктуры перинейрональных сетей коры головного мозга, которое проводилось с помощью двух разработанных нами, отличных друг от друга, методов анализа данных конфокальной микроскопии высокого разрешения. В настоящей работе выполнен сравнительный анализ этих двух методов количественного исследования микроструктуры перинейрональных сетей по данным микроскопии медиальной префронтальной коры в экспериментальной модели шизофрении. Установлена высокая корреляция результатов измерения площади ячеек, а также линейных размеров трехмерной структуры для двух методов, а также отсутствие корреляции результатов количественной оценки ряда параметров двумерной формы ячейки. Сделан вывод о взаимодополняющей ценности двух методов количественного исследования микроструктуры перинейрональных сетей.

Ключевые слова: перинейрональная сеть, внеклеточный матрикс, нейрон, центральная нервная система

Введение

Исследования пластичности синаптических сетей головного и спинного мозга стали, вероятно, самой быстроразвивающейся темой нейрофизиологии за последние десятилетия [1]. Как следствие, произошел стремительный рост понимания роли внеклеточного матрикса в молекулярных и клеточных механизмах пластичности ЦНС [2]. Особое место в этих механизмах занимают перинейрональные сети – пространственно структурированный комплекс молекул внеклеточного матрикса, покрывающий тела и проксимальные дендриты некоторых типов

нейронов в виде ячеистой сети [3]. Основными составляющими перинейрональных сетей являются полимерные цепи гиалуроновой кислоты, хондроитина сульфат протеогликаны и тенасцин [4]. Ячейки перинейрональной сети окружают синаптические терминалы на поверхности нейронов и, согласно ряду исследований, оказывают очень существенное влияние на функции синапсов, в том числе на синаптогенез и синаптическую пластичность [5].

В ряде исследований показано изменение экспрессии перинейрональных сетей в экспериментальных моделях эпилепсии, инсульта, синдрома Ретта, что свидетельствует об участии перинейрональных сетей в патогенезе ряда заболеваний головного и спинного мозга [6]. На фоне быстрого развития исследований физиологии и молекулярной биологии перинейрональных сетей становилось заметным некоторое отставание в области изучения их микроструктуры [7]. Нами ранее были предложены два количественных метода исследования микроструктуры перинейрональных сетей по данным конфокальной микроскопии высокого разрешения [8–10]. Следующим этапом нашего исследования стал сравнительный анализ указанных методов для того, чтобы определить их ценность в решении различных исследовательских задач, а также выявить, насколько они могут взаимозаменять и взаимодополнять друг друга. Для удобства изложения далее метод обведения ячеек вручную [8] обозначается как М1, а полуавтоматический метод обведения [9] – как М2.

В работе использованы данные конфокальной микроскопии в экспериментальной модели шизофрении крыс под действием инъекции кетамина. Кетамин подробно изучался как фармакологический агент, связывающийся с глутаматэргическими, дофаминэргическими и серотонинэргическими рецепторами [11]. Экспериментальные результаты по специфическому связыванию кетамина с этими рецепторами хорошо согласуются с данными о большом значении нарушений в дофаминэргической и глутаматэргической медиаторных системах в патогенезе шизофрении [12]. Описаны также значительные изменения в ГАМКэргической системе коры головного мозга при шизофрении, в том числе подавление ГАМКэргической передачи, нарушение баланса возбуждения/торможения и гамма-осцилляций [13], позволяющие предположить участие парвальбумин-экспрессирующих ГАМКэргических нейронов коры в патогенезе шизофрении. В литературе приведены данные об изменении структуры перинейрональных сетей парвальбумин-экспрессирующих нейронов префронтальной коры мозга крыс в кетаминовой модели шизофрении [14]. В работе [9] мы использовали срезы префронтальной коры для исследования изменений микроструктуры перинейрональных сетей на поверхности парвальбумин-экспрессирующих нейронов в кетаминовой модели шизофрении крыс [9]. Целью настоящей работы стал сравнительный анализ двух количественных методов (М1 и М2), разработанных и примененных нами ранее на разных экспериментальных объектах [8–10].

2. Методы

2.1. Экспериментальная часть. Нами были использованы экспериментальные данные, полученные методом конфокальной микроскопии высокого разрешения и описанные ранее в публикации [9]. Конфокальная съемка проводилась на срезах мозга взрослых крыс контрольной группы и группы взрослых крыс

в кетаминовой модели шизофрении, получавшей инъекции кетамина. Самцы крыс Sprague–Dawley возраста 8 недель получали интраперитонеальные инъекции кетамина, 30 мг/кг (экспериментальная группа) либо физраствора (контрольная группа) в соответствии с ранее опубликованным протоколом [15]. Инъекции проводили двумя сессиями по 5 дней, одна инъекция в день, с двухдневным перерывом между сессиями. Через 14 дней после окончания инъекций кетамина на животных проводили поведенческий тест социального взаимодействия. При этом пары животных помещали на открытое поле на 7 мин.

Образцы тканей собирали через 18 дней после окончания инъекций. Животных перфузировали 4%-ным параформальдегидом. Образцы мозга оставляли на ночь в 4%-ном растворе параформальдегида при +4 °С, затем криопротектировали в 30%-ном растворе сахарозы на 48 ч при +4 °С, замораживали в 100%-ном 2-метил бутане при –80 °С и изготавливали коронарные срезы толщиной 50 мкм. Образцы ткани были пермеабилезованы в 0.5%-ном Triton X-100 (Sigma T9284) 10 мин при комнатной температуре, а затем обработаны блокирующим раствором (фосфатный буфер с 0.1%-ным Triton X-100 и 5%-ной нормальной козьей сыворотки (Gibco 16210-064) 1 ч при комнатной температуре. Далее срезы головного мозга окрашивали биотинилированным агглютинином *Wisteria floribunda* (WFA, 1:500, Sigma, L1516) и первичными кроличьими антителами к парвальбумину (SWANT PV 25 1:300 36 ч, +4 °С, инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с флуорофором Alexa488 (Thermo Fisher Scientific, S11223, 1:1 000, 12 ч при комнатной температуре), и вторичными антителами анти-кролик, конъюгированными с флуорофором Alexa546 (Thermo Fisher Scientific, Cat no. A11035, 1:1 000, 3 ч при комнатной температуре), окрашивали Hoechst 3.342 (1 мг/мл в DMSO, 1:500, Sigma B2261) и заключали в среду Fluoromount (Sigma F4680) на стеклах SuperFrost.

Конфокальную съемку проводили на микроскопе Zeiss LSM700, объектив ×63/1.4. Конфокальные стаки перинеурональных сетей собирали для парвальбумин-положительных нейронов IV и V слоев коры, размер вокселя 99 × 99 × 170 нм.

2.2. Анализ изображений. Анализ изображений проводили с помощью программного комплекса ImageJ (Fiji) [16]. Обведение ячеек вручную на конфокальных снимках выполнено согласно процедуре, описанной ранее в [8].

Вершины ячейки были определены с помощью инструмента Point Picker в FIJI. Все пиксели, принадлежащие конкретной ячейке, были выбраны с помощью команды FIJI makeSelection в качестве многоугольника на основе координат вершины. Все пиксели многоугольника были количественно определены с помощью команды FIJI getHistogram. Площадь ячейки была рассчитана как сумма количества пикселей для всего диапазона значений интенсивности. Используются данные для 8 крыс, общее число нейронов 23, общее число ячеек 1250.

Полуавтоматическое обведение на конфокальных снимках выполнено согласно процедуре, описанной ранее в [9]. Скрипт *Analysis of Perineuronal Net Units* (APNU v1.1) предлагает пользователю выбрать центральный пиксель внутри площади ячейки, а затем автоматически определяет контур PNN. После того как центральная точка в ячейке PNN выбрана вручную, скрипт вычисляет профили интенсивности флуоресценции вместе с заданным количеством направлений от-

слеживания для заданного количества конфокальных слоев, в которых ожидается наличие ячейки PNN. Отверстия определяются как области, в которых интенсивность флуоресценции остается ниже средней интенсивности в центре отверстия + заданный порог. Координаты барьера хондроитина сульфатов определяются локальными максимумами интенсивности флуоресценции в плоскости расположения центральной точки (2D) или трехмерными координатами, соответствующими максимальным интенсивностям для каждого из направлений трекинга (3D). Если для определенного направления не обнаружено локального максимума, используется линейная экстраполяция для расчета координат барьера внеклеточного матрикса по координатам четко определенных соседних точек барьера внеклеточного матрикса. Если имеется слишком много направлений, для которых не могут быть найдены локальные максимумы (> 50%), ячейка считается нечетко определенной и исключается из анализа. В настоящей работе координаты центра ячейки рассчитаны с использованием координат вершин, полученных при обведении вручную.

Для количественного анализа формы ячеек перинейрональной сети использовали следующие параметры:

1) округлость (*circularity*) – описывает, насколько ячейка приближается к форме круга. Значение “0” означает вытянутую фигуру, “1” – идеальный круг.

2) соотношение сторон (*aspect ratio*) – соотношение большой и малой оси овала, внутрь которого вписывается ячейка.

3) цельность (*solidity*) – отношение площади ячейки к площади многоугольника, который можно описать вокруг ячейки. Чем ближе это число к 1, тем меньше вогнутостей имеет ячейка.

Анализ толщины ячейки вдоль координаты *Z* на конфокальных стеках выполнен согласно процедуре, описанной ранее в [10]. Нами проанализировано трехмерное распределение интенсивности окрашивания хондроитина сульфатов по периметру ячейки. Мы вычисляли среднюю интенсивность хондроитин сульфатов по периметру ячейки для каждой конфокальной плоскости и использовали 10% от наивысшего значения в качестве порога сегментации по оси *Z* для определения верхней и нижней границы ячейки (показаны зеленым цветом на рис. 8, см. ниже).

3. Результаты

3.1. Площадь ячеек на конфокальной плоскости. В первую очередь мы сравнили площади ячеек, полученные методами M1 и M2 в двумерном пространстве конфокальной плоскости (рис. 1). В среднем метод M2 дает большие значения площади ячейки, чем M1 (рис. 1, *a–z*, рис. 2). В некоторых случаях это, возможно, объясняется тем, что ячейка нечетко либо не полностью очерчена (рис. 1, *д–з*). Для большей части ячеек методы M1 и M2 выдают контуры приблизительно одинаковой площади (рис. 1, *и–р*, рис. 3). При этом во многих случаях контуры, полученные методами M1 и M2, почти полностью совпадают (рис. 1, *н–р*). Для некоторой части ячеек метод M1 также дает большие значения площади ячейки, чем метод M2 (рис. 1, *с–ф*, рис. 3). Средние значения площади и периметра ячеек для двух методов представлены на рис. 2. Немаловажно отметить высокую корреляцию между значениями площади и периметра, полученными

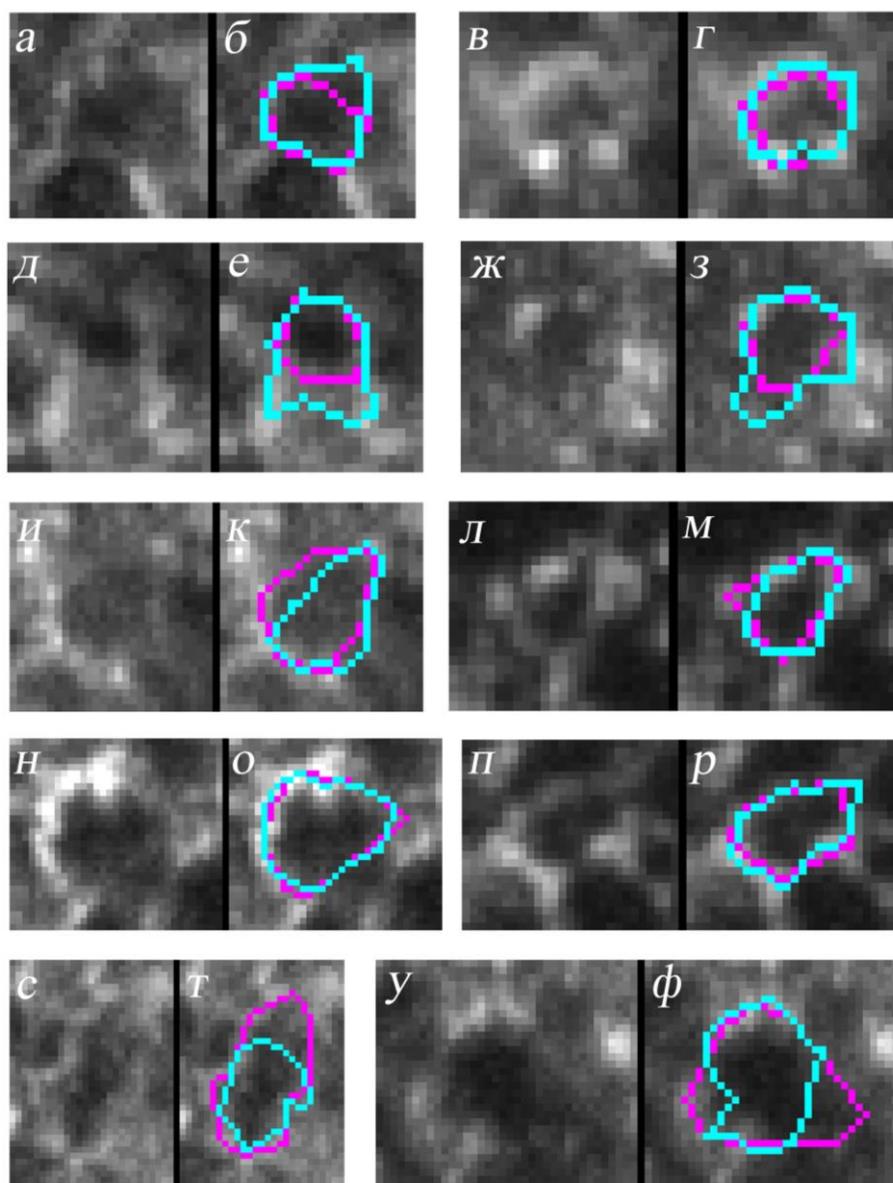


Рис. 1. Сравнение контуров ячеек на конфокальной плоскости, полученных методами М1 и М2. В каждой паре изображений слева приведен необработанный фрагмент конфокального снимка, справа – нанесенные на этот фрагмент контуры, полученные методом М1 (сиреневый) и методом М2 (голубой): *а-з* – типичные примеры, когда площадь М2 больше, чем площадь М1; *д-з* – площадь М2 больше, чем площадь М1, и ячейка нечетко очерчена; *и-р* – площадь М1 примерно равна площади М2; *и-м* – контуры М1 и М2 значительно различаются; *н-р* – контуры М1 и М2 почти полностью совпадают; *с-ф* – площадь М1 больше, чем площадь М2

двумя методами (рис. 4). Мы использовали парный тест ранговых сумм (парный критерий Уилкоксона) для сравнения с нулем значений разности М2 – М1 для площади и периметра ячеек (см. рис. 4) и показали достоверное отличие ($p < 0.001$), значения $M2 > M1$.

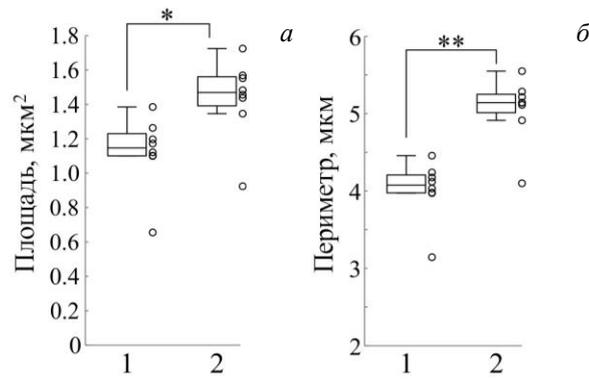


Рис. 2. Средняя площадь (а) и периметр (б) ячеек перинейрональной сети, полученные методами М1 и М2. Звездочками показаны статистически значимые отличия по результатам теста ранговых сумм (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Размер групп: 8 животных, 1250 ячеек. Нижние и верхние границы прямоугольников соответствуют 25-й и 75-й перцентилем. Линия внутри прямоугольника – медиана

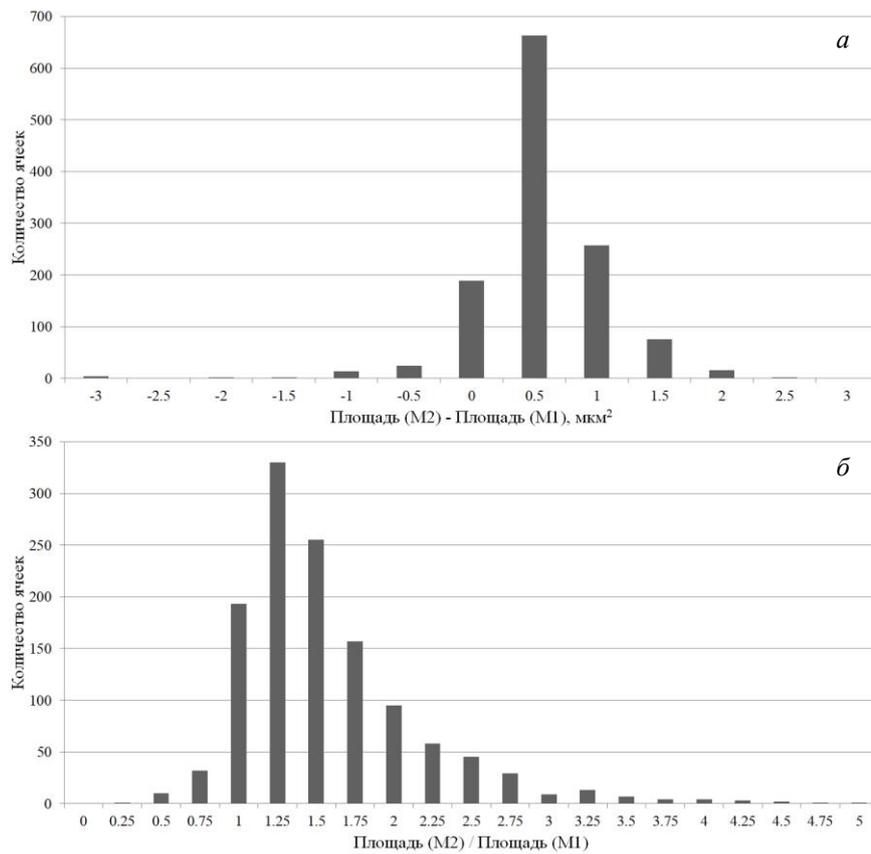


Рис. 3. Различия значений площади ячейки, полученных методами М1 и М2. Гистограммы распределения частот для значений параметров $M2 - M1$ (а) и $M2/M1$ (б)

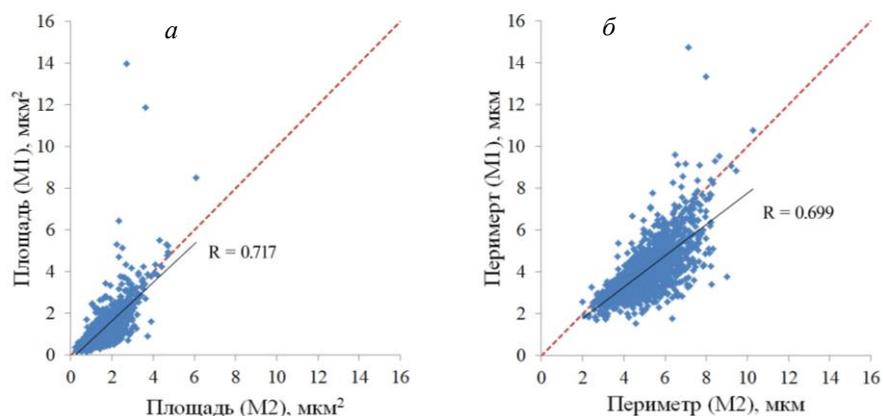


Рис. 4. Корреляция значений площади (а) и периметра (б) ячеек, полученных методами М1 и М2. Прямой линией показана линейная регрессия. Пунктирная линия в 45° показана для анализа отклонения в сторону больших значений для М2

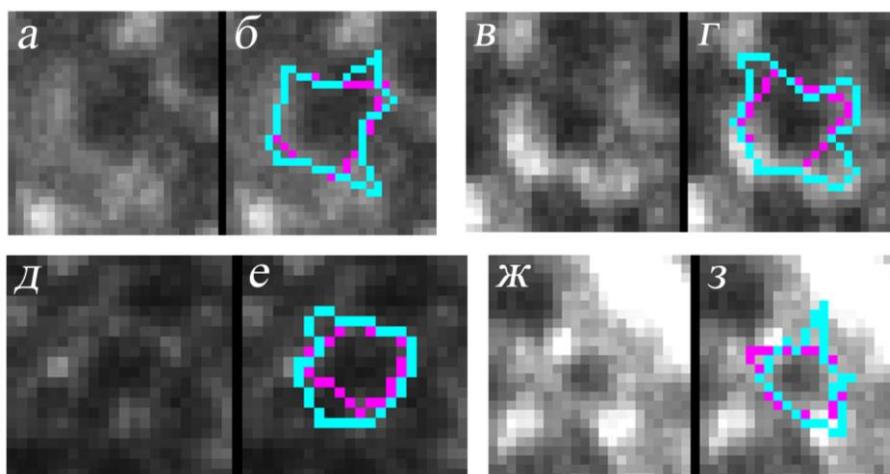


Рис. 5. Сравнение контуров ячеек на конфокальной плоскости, полученных методами М1 и М2: характерные примеры, когда форма ячейки значительно различается между М1 и М2

3.2. Количественные параметры формы ячеек на конфокальной плоскости. Для большей части ячеек контуры, полученные методами М1 и М2, значительно отличаются друг от друга (рис. 1, 5). Соответственно, анализ количественных параметров, характеризующих форму ячейки в проекции конфокальной плоскости, выявил отсутствие корреляции между значениями, полученными методами М1 и М2 (рис. 6).

3.3. Интенсивность флуоресценции. Наши результаты показывают высокую корреляцию между значениями, полученными методами М1 и М2, для параметров интенсивности флуоресценции окраски хондроитина сульфатов – средней интенсивности контура ячейки (рис. 7, а) и всех пикселей ячейки (рис. 7, б). Мы использовали парный тест ранговых сумм для сравнения с нулем значений

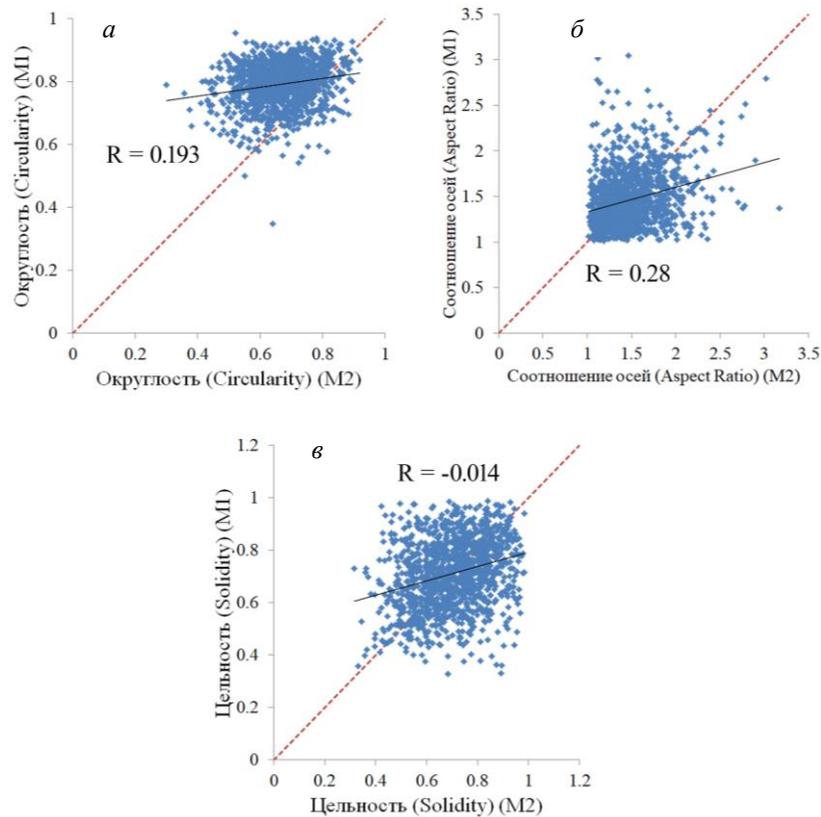


Рис. 6. Отсутствие корреляции значений параметров, характеризующих форму ячейки, полученных методами М1 и М2: *а* – округлость; *б* – соотношение осей; *в* – цельность

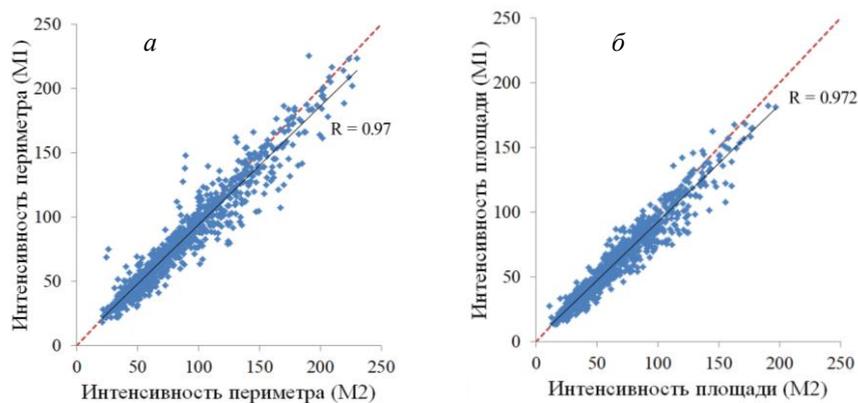


Рис. 7. Корреляция значений интенсивности пикселей, принадлежащих контуру (*а*), и всех пикселей ячейки (*б*), полученных методами М1 и М2. Пунктирная линия в 45° показана для анализа отклонения в сторону больших значений для М2

разности М2–М1 для интенсивности периметра и площади (см. рис. 7) и показали достоверное отличие ($p < 0.001$), значения М2 > М1.

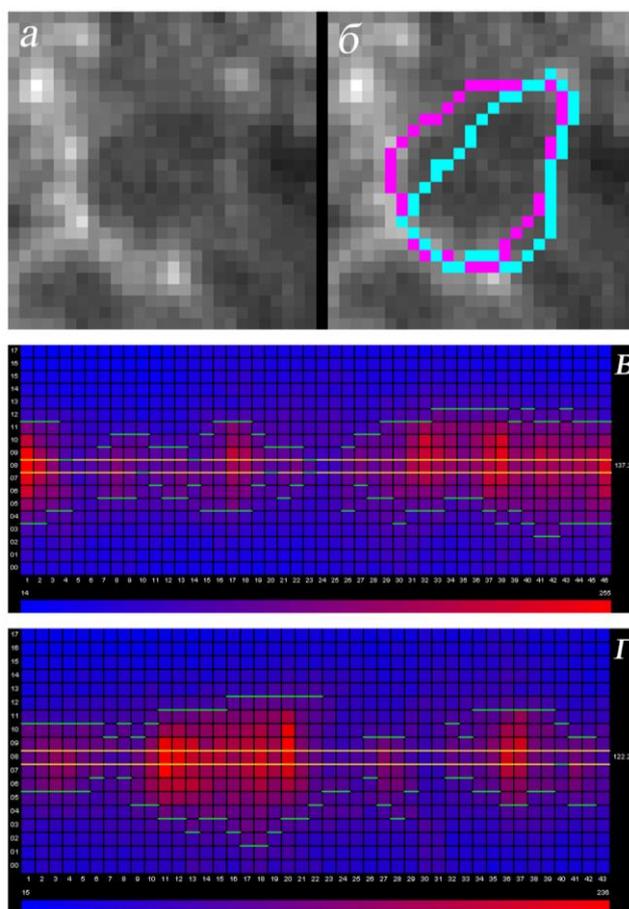


Рис. 8. Анализ толщины ячейки на поверхности нейрона вдоль оси Z конфокального стака: $a, б$ – анализируемая ячейка; $в-г$ – карты интенсивности флуоресценции вдоль контура ячейки в конфокальном стака, построенные для контуров M1 ($в$) и M2 ($г$). Желтыми линиями отмечена конфокальная плоскость с наибольшей средней интенсивностью, зелеными – верхние и нижние границы ячейки, определенные на основе порога интенсивности

3.4. Толщина ячейки вдоль оси Z . Предложенный нами ранее метод измерения толщины ячейки [10] был использован в настоящей работе для сравнения толщины ячеек по контурам, полученным методами M1 и M2 (рис. 8). Средние величины толщины, полученные двумя методами, хорошо согласуются между собой (рис. 9, a), гистограммы разности значений, полученных методами M1 и M2, показывают небольшие расхождения результатов измерений двумя методами для отдельных ячеек (рис. 9, $в$). Наблюдается также высокая корреляция между значениями толщины ячейки, полученными методами M1 и M2 (рис. 9, $б$). Мы использовали парный тест ранговых сумм для сравнения с нулем значений разности $M2 - M1$ толщины ячейки на рис. 9, $б$ и не обнаружили значимого отличия.

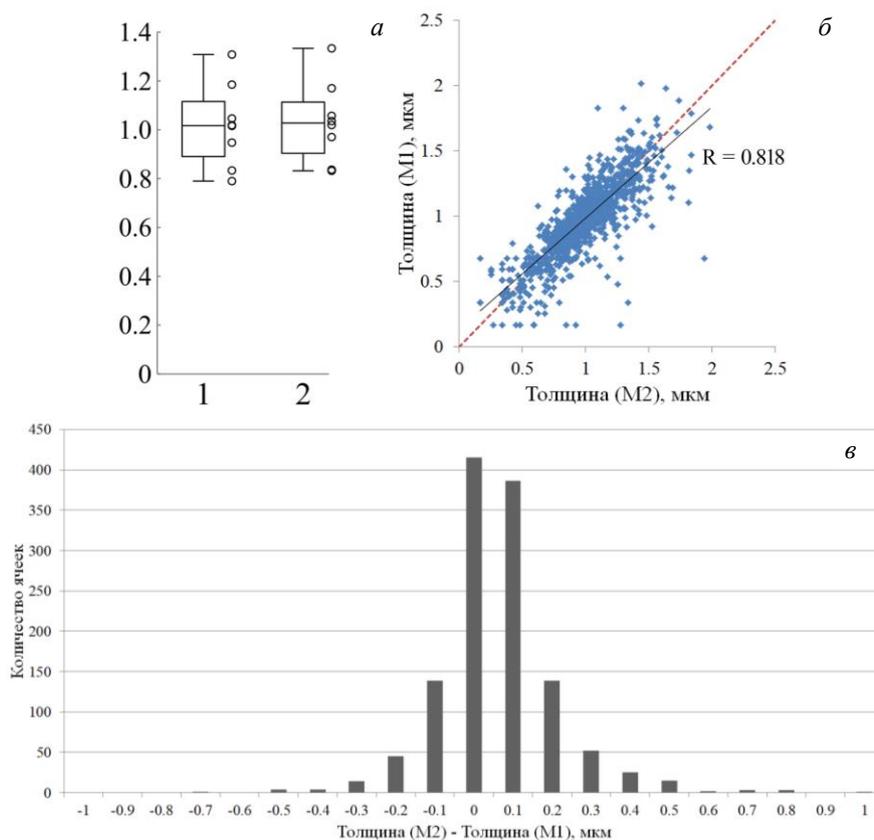


Рис. 9. Сравнительный анализ измерений толщины ячейки, полученных методами M1 и M2: *а* – средние значения толщины ячейки. Нижние и верхние границы прямоугольников соответствуют 25-й и 75-й перцентилям. Линия внутри прямоугольника – медиана; *б* – корреляция значений толщины; *в* – различия значений толщины ячейки. Гистограммы распределения частот для значений параметра (M2 – M1)

4. Обсуждение

Представленные здесь результаты получены в продолжение наших предыдущих исследований микроструктуры ячеек перинейрональных сетей по данным конфокальной микроскопии высокого разрешения [8–10]. В тот же период другими авторами были показаны изменения микроструктуры перинейрональных сетей в экспериментальных моделях инсульта и синдрома Ретга [17, 18]. Быстрое развитие этих исследований обусловило необходимость сравнительного анализа используемых методов, результаты которого представлены в настоящей статье. В частности, сравнение площадей ячеек в конфокальной плоскости позволило установить, что метод M2 дает в среднем более высокое значение площади (рис. 1–3). Это можно объяснить тем, что в методе M1 контур достраивается на основе выбранных вручную вершин ячейки, а в методе M2 алгоритм последовательно ищет границу, двигаясь в направлении от центра ячейки к периферии до тех пор, пока не обнаружит достаточно яркий воксел, удовлетворяющий условиям определения границы ячейки.

Полученные результаты показывают отсутствие корреляции значений параметров формы ячейки, которые были измерены методами М1 и М2 (рис. 4, 5). Это, очевидно, отражает значительное различие в выборе контура ячейки, как показывает проведенный здесь сравнительный анализ (рис. 1–4). Поскольку методы М1 и М2 существенно различаются с точки зрения базового принципа определения контура ячейки, полученные этими двумя методами контуры в конфокальной плоскости отражают разные структурные характеристики распределения флуоресцентного сигнала хондроитин сульфатов вдоль границы ячейки. Таким образом, методы М1 и М2 могут взаимно дополнять друг друга при количественном описании геометрии перинейрональной сети.

Наряду с изучением количественных параметров двумерной проекции ячейки перинейрональной сети на конфокальную плоскость значительный интерес представляет определение толщины ячеек перинейрональной сети на поверхности нейронов, то есть распределение интенсивности флуоресценции гистологической окраски хондроитина сульфатов вдоль оси Z конфокального стака. Такой метод количественного анализа толщины ячеек был предложен нами в [10] на экспериментальном материале соматосенсорной коры мыши. Исследование толщины ячеек может быть актуально для понимания особенностей анатомии и физиологии мозга, поскольку перинейрональные сети, пресинаптические окончания и отростки астроцитов плотно упакованы в межклеточном пространстве на поверхности нейрона и эта пространственная упаковка, вероятно, играет важную роль в регуляции синаптической передачи. В настоящей работе мы использовали экспериментальные данные кетаминовой модели шизофрении крыс для измерений толщины ячеек перинейрональной сети вдоль контуров, полученных методами М1 и М2. Представленные нами результаты измерения толщины ячеек хорошо согласуются для контуров, полученных методами М1 и М2 (рис. 9). Поскольку метод М2 дает в среднем большую площадь ячейки, можно предположить, что толщина перинейрональной сети на поверхности нейронов не изменяется в направлении от центра ячейки к периферии.

Таким образом, высокая корреляция результатов измерения площадей ячеек в конфокальной плоскости и толщины ячеек в трехмерных конфокальных стаках, полученных с использованием методов М1 и М2 позволяет сделать вывод о надежности и воспроизводимости методов, описанных в работах [8–10].

Представленные результаты будут использованы в дальнейших исследованиях, а также при разработке новых более совершенных методов, что обусловлено важностью перинейрональных сетей в физиологических и патологических процессах центральной нервной системы.

Благодарности. Авторы выражают благодарность профессору А.Э. Дитятеву (Германский центр исследования нейродегенеративных заболеваний, г. Магдебург, ФРГ) за предоставленные данные конфокальной съемки перинейрональных сетей, а также доценту Казанского федерального университета А.В. Захарову за помощь в подготовке рукописи.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-31-70001.

Литература

1. Scott D.N., Frank M.J. Adaptive control of synaptic plasticity integrates micro- and macroscopic network function // *Neuropsychopharmacology*. – 2023. – V. 48, No 1. – P. 121–144. – doi: 10.1038/s41386-022-01374-6.
2. Senkov O., Andjus P., Radenovic L., Soriano E., Dityatev A. Neural ECM molecules in synaptic plasticity, learning, and memory // *Prog. Brain Res.* – 2014. – V. 214. – P. 53–80. – doi: 10.1016/B978-0-444-63486-3.00003-7.
3. Carulli D., Verhaagen J. An extracellular perspective on CNS maturation: Perineuronal nets and the control of plasticity // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22, No 5. – Art. 2434, P. 1–26. – doi: 10.3390/ijms22052434.
4. Testa D., Alain Prochiantz A., Di Nardo A.A. Perineuronal nets in brain physiology and disease // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2019. – V. 89. – P. 125–135. – doi: 10.1016/j.semcdb.2018.09.011.
5. Bosiacki M., Gąssowska-Dobrowolska M., Kojder K., Fabiańska M., Jeżewski D., Gutowska I., Lubkowska A. Perineuronal nets and their role in synaptic homeostasis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20, No 17. – Art. 4108, P. 1–22. – doi: 10.3390/ijms20174108.
6. Ulbrich P., Khoshneviszadeh M., Jandke S., Schreiber S., Dityatev A. Interplay between perivascular and perineuronal extracellular matrix remodelling in neurological and psychiatric diseases // *Eur. J. Neurosci.* – 2021. – V. 53, No 12. – P. 3811–3830. – doi: 10.1111/ejn.14887.
7. Zeug A., Stawarski M., Bieganska K., Korotchenko S., Wlodarczyk J., Dityatev A., Poni maskin E. Current microscopic methods for the neural ECM analysis // *Prog. Brain Res.* – 2014. – V. 214. – P. 287–312. – doi: 10.1016/B978-0-444-63486-3.00013-X.
8. Arnst N., Kuznetsova S., Lipachev N., Shaikhutdinov N., Melnikova A., Mavlikeev M., Uvarov P., Baltina T.V., Rauvala H., Osin Yu.N., Kiyasov A.P., Paveliev M. Spatial patterns and cell surface clusters in perineuronal nets // *Brain Res.* – 2016 – V. 1648, Pt. A. – P. 214–223. – doi: 10.1016/j.brainres.2016.07.020.
9. Kaushik R., Lipachev N., Matuszko G., Kochneva A., Dvoeglazova A., Becker A., Paveliev M., Dityatev A. Fine structure analysis of perineuronal nets in the ketamine model of schizophrenia // *Eur. J. Neurosci.* – 2021. – V. 53, No 12. – P. 3988–4004. – doi: 10.1111/ejn.14853.
10. Lipachev N., Melnikova A., Fedosimova S., Arnst N., Kochneva A., Shaikhutdinov N., Dvoeglazova A., Titova A., Mavlikeev M., Aganov A., Osin Yu., Kiyasov A., Paveliev M. Postnatal development of the microstructure of cortical GABAergic synapses and perineuronal nets requires sensory input // *Neurosci. Res.* – 2022. – V. 182. – P. 32–40. – doi: 10.1016/j.neures.2022.06.005.
11. Frohlich J., Van Horn J.D. Reviewing the ketamine model for schizophrenia // *J. Psychopharmacol.* – 2014. – V. 28, No 4. – P. 287–302. – doi: 10.1177/0269881113512909.
12. Gomes F.V., Grace A.A. Cortical dopamine dysregulation in schizophrenia and its link to stress // *Brain*. – 2018. – V. 141, No 7. – P. 1897–1899. – doi: 10.1093/brain/awy156.
13. Steullet P., Cabungcal J.-H., Bukhari S.A., Ardelt M.I., Pantazopoulos H., Hamati F., Salt T.E., Cuenod M., Do K.Q., Berretta S. The thalamic reticular nucleus in schizophrenia and bipolar disorder: Role of parvalbumin-expressing neuron networks and oxidative stress // *Mol. Psychiatry*. – 2018. – V. 23, No 10. – P. 2057–2065. – doi: 10.1038/mp.2017.230.
14. Matuszko G., Curreli S., Kaushik R., Becker A., Dityatev A. Extracellular matrix alterations in the ketamine model of schizophrenia // *Neuroscience*. – 2017 – V. 350. – P. 13–22. – doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.010.
15. Becker A., Grecksch G., Zernig G., Ladstaetter E., Hiemke C., Schmitt U. Haloperidol and risperidone have specific effects on altered pain sensitivity in the ketamine model of schizophrenia // *Psychopharmacology (Berlin)*. – 2009. – V. 202, No 4. – P. 579–587. – doi: 10.1007/s00213-008-1336-z.

16. *Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis // *Nat. Methods.* – 2012. – V. 9, No 7. – P. 676–682. – doi: 10.1038/nmeth.2019.
17. *Dzyubenko E., Manrique-Castano D., Kleinschnitz C., Faissner A., Hermann D.M.* Topological remodeling of cortical perineuronal nets in focal cerebral ischemia and mild hypoperfusion // *Matrix Biol.* – 2018. – V. 74 – P. 121–132. – doi: 10.1016/j.matbio.2018.08.001.
18. *Sigal Y.M., Bae H., Bogart L.J., Hensch T.K., Zhuang X.* Structural maturation of cortical perineuronal nets and their perforating synapses revealed by superresolution imaging // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2019. – V. 116, No 14. – P. 7071–7076. – doi: 10.1073/pnas.1817222116.

Поступила в редакцию
16.09.2022

Липачев Никита Сергеевич, аспирант кафедры медицинской физики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: nikita.lipachev@gmail.com

Двоглазова Анастасия Сергеевна, студент кафедры физиологии человека и животных

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: dvoeglazovaanastasia@list.ru

Садреева Амина Айратовна, студент Международной школы «Медицина Будущего»

Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)
ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, г. Москва, 119991, Россия
E-mail: aminasa.android@gmail.com

Аганов Альберт Варганович, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской физики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Albert.Aganov@kpfu.ru

Павельев Михаил Николаевич, PhD, старший научный сотрудник

Центр нейронаук, Университет Хельсинки
ул. Хаартманнкату, д. 8, г. Хельсинки, 00290, Финляндия
E-mail: paveliev@outlook.com

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2022.4.519-534

**Comparative Analysis of the Methods
for Quantitative Study of the Perineuronal Net Microstructure***N.S. Lipachev*^{a*}, *A.S. Dvoeglazova*^{a**}, *A.A. Sadreeva*^{b***}, *A.V. Aganov*^{a****},
M.N. Paveliev^{c*****}^a*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*^b*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia*^c*Neuroscience Center, University of Helsinki, Helsinki, 00290 Finland*E-mail: **nikita.lipachev@gmail.com*, ***dvoeglazovaanastasia@list.ru*, ****aminasa.android@gmail.com*,
*****Albert.Aganov@kpfu.ru*, ******paveliev@outlook.com*

Received September 19, 2022

Abstract

Perineuronal nets (PNN) are a special and highly structured type of the CNS extracellular matrix. In past few years, the important role of PNN in the normal physiology of the CNS and the changes in their expression associated with some pathologies have been shown, thus suggesting that PNN are involved in the pathogenesis of a number of brain and spinal cord diseases. Until recently, no quantitative studies have focused on the spatial geometry of the PNN meshes. In 2021 and 2022, we published two quantitative studies of the PNN microstructure in the cerebral cortex based on two new, different methods developed by us to analyze high-resolution confocal microscopy data. This article summarizes the results of a comparative analysis of these two methods for quantitative study of the PNN microstructure using microscopy data on the medial prefrontal cortex in an experimental model of schizophrenia. A high correlation was found between the two methods for the mesh area and the linear dimensions of the three-dimensional mesh structure. No correlation was observed for the two-dimensional shape parameters of the mesh. The obtained results demonstrate that the two methods are complementary and have additive value for future quantitative studies of the PNN microstructure.

Keywords: perineuronal net, extracellular matrix, neuron, central nervous system

Acknowledgments. We thank Professor A.E. Dityatev (German Center for Neurodegenerative Diseases, Magdeburg, Germany) for providing us with the confocal images of perineuronal nets and Associate Professor A.V. Zakharov (Kazan Federal University) for his assistance with manuscript preparation.

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 20-31-70001).

Figure Captions

Fig. 1. Comparison of mesh contours on the confocal plane obtained by the M1 and M2 methods. In each pair of images, the unprocessed fragment of the confocal image is shown on the left, and the contours applied to this fragment obtained by the M1 method (magenta) and the M2 method (cyan) are shown on the right: *a-h* – the area value by M2 is larger than the area value by M1; *e-h* – the area of M2 is larger than the area of M1 and the mesh is not clearly defined; *i-p* – the area of M1 is approximately equal to the area of M2; *i-k* – the contours of M1 and M2 are significantly different; *j-p* – the contours of M1 and M2 almost completely coincide; *q-t* – the area of M1 is larger than the area of M2.

Fig. 2. Mean area (*a*) and perimeter (*b*) of meshes of the perineuronal net, both obtained by the M1 and M2 methods. Asterisks indicate significant differences based on the results of the rank sum test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Group size: 8 animals, 1250 meshes. The bottom and top borders of

the rectangles correspond to the 25th and 75th percentiles, respectively. The line inside the rectangle is the median.

- Fig. 3. Differences in the mesh area values obtained by the M1 and M2 methods. Frequency distribution histograms for the values of the parameters M2–M1 (a) and M2/M1 (b).
- Fig. 4. Correlation of the area (a) and perimeter (b) values of meshes obtained by the M1 and M2 methods. Linear regression is shown by a straight line. R is the correlation coefficient. The dotted line at 45° is shown for the analysis of the bias towards larger values for M2.
- Fig. 5. Comparison of the mesh contours on the confocal plane obtained by the M1 and M2 methods: the shape of the mesh differs significantly between M1 and M2.
- Fig. 6. Lack of correlation between the values of the parameters characterizing the shape of the mesh, obtained by the M1 and M2 methods: a – circularity; b – aspect ratio; c – solidity.
- Fig. 7. Correlation of the intensity values of pixels in the contour (a) and all pixels of the mesh (b), obtained by the M1 and M2 methods. The dotted line at 45° is shown for the analysis of the bias towards larger values for M2.
- Fig. 8. Analysis of the mesh thickness on the neuron surface along the Z axis of the confocal stack: a, b – the analyzed mesh; c–d – fluorescence intensity maps along the mesh contour in the confocal stack, plotted for the M1 (c) and M2 (d) contours. The yellow lines mark the confocal plane with the highest mean intensity. The green lines mark the upper and the lower mesh boundaries based on the intensity threshold.
- Fig. 9. Comparative analysis of the mesh thickness measurements obtained by the M1 and M2 methods: a – mean values of the mesh thickness. The bottom and top borders of the rectangles correspond to the 25th and 75th percentiles. The line inside the rectangle is the median; b – correlation of the thickness values; c – differences in the mesh thickness values. Frequency distribution histograms for the M2 – M1 parameter values.

References

1. Scott D.N, Frank M.J. Adaptive control of synaptic plasticity integrates micro- and macroscopic network function. *Neuropsychopharmacology*, 2023, vol. 48, no. 1, pp. 121–144. doi: 10.1038/s41386-022-01374-6.
2. Senkov O., Andjus P., Radenovic L., Soriano E., Dityatev A. Neural ECM molecules in synaptic plasticity, learning, and memory. *Prog. Brain Res.*, 2014, vol. 214, pp. 53–80. doi: 10.1016/B978-0-444-63486-3.00003-7.
3. Carulli D., Verhaagen J. An extracellular perspective on CNS maturation: Perineuronal nets and the control of plasticity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, no. 5, art. 2434, pp. 1–26. doi: 10.3390/ijms22052434.
4. Testa D., Alain Prochiantz A., Di Nardo A.A. Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2019, vol. 89, pp. 125–135. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.09.011.
5. Bosiacki M., Gąssowska-Dobrowolska M., Kojder K., Fabiańska M., Jeżewski D., Gutowska I., Lubkowska A. Perineuronal nets and their role in synaptic homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 17, art. 4108, pp. 1–22. doi: 10.3390/ijms20174108.
6. Ulbrich P., Khoshneviszadeh M., Jandke S., Schreiber S., Dityatev A. Interplay between perivascular and perineuronal extracellular matrix remodelling in neurological and psychiatric diseases. *Eur. J. Neurosci.*, 2021, vol. 53, no. 12, pp. 3811–3830. doi: 10.1111/ejn.14887.
7. Zeug A., Stawarski M., Bieganska K., Korotchenko S., Wlodarczyk J., Dityatev A., Ponimaskin E. Current microscopic methods for the neural ECM analysis. *Prog. Brain Res.*, 2014, vol. 214, pp. 287–312. doi: 10.1016/B978-0-444-63486-3.00013-X.
8. Arnst N., Kuznetsova S., Lipachev N., Shaikhutdinov N., Melnikova A., Mavlikeev M., Uvarov P., Baltina T.V., Rauvala H., Osin Yu.N., Kiyasov A.P., Paveliev M. Spatial patterns and cell surface clusters in perineuronal nets. *Brain Res.*, 2016, vol. 1648, pt. A, pp. 214–223. doi: 10.1016/j.brainres.2016.07.020.
9. Kaushik R., Lipachev N., Matuszko G., Kochneva A., Dvoeglazova A., Becker A., Paveliev M., Dityatev A. Fine structure analysis of perineuronal nets in the ketamine model of schizophrenia. *Eur. J. Neurosci.*, 2021, vol. 53, no. 12, pp. 3988–4004. doi: 10.1111/ejn.14853.

10. Lipachev N., Melnikova A., Fedosimova S., Arnst N., Kochneva A., Shaikhutdinov N., Dvoeglazova A., Titova A., Mavlikeev M., Aganov A., Osin Yu., Kiyasov A., Paveliev M. Postnatal development of the microstructure of cortical GABAergic synapses and perineuronal nets requires sensory input. *Neurosci. Res.*, 2022, vol. 182, pp. 32–40. doi: 10.1016/j.neures.2022.06.005.
11. Frohlich J., Van Horn J.D. Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J. Psychopharmacol.*, 2014, vol. 28, no. 4, pp. 287–302. doi: 10.1177/0269881113512909.
12. Gomes F.V., Grace A.A. Cortical dopamine dysregulation in schizophrenia and its link to stress. *Brain*, 2018, vol. 141, no. 7, pp. 1897–1899. doi: 10.1093/brain/awy156.
13. Steullet P., Cabungcal J.-H., Bukhari S.A., Ardelt M.I., Pantazopoulos H., Hamati F., Salt T.E., Cuenod M., Do K.Q., Berretta S. The thalamic reticular nucleus in schizophrenia and bipolar disorder: Role of parvalbumin-expressing neuron networks and oxidative stress. *Mol. Psychiatry*, 2018, vol. 23, no. 10, pp. 2057–2065. doi: 10.1038/mp.2017.230.
14. Matuszko G., Curreli S., Kaushik R., Becker A., Dityatev A. Extracellular matrix alterations in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience*, 2017, vol. 350, pp. 13–22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.010.
15. Becker A., Grecksch G., Zernig G., Ladstaetter E., Hiemke C., Schmitt U. Haloperidol and risperidone have specific effects on altered pain sensitivity in the ketamine model of schizophrenia. *Psychopharmacology* (Berlin), 2009, vol. 202, no. 4, pp. 579–587. doi: 10.1007/s00213-008-1336-z.
16. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 2012, vol. 9, no. 7, pp. 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
17. Dzyubenko E., Manrique-Castano D., Kleinschnitz C., Faissner A., Hermann D.M. Topological remodeling of cortical perineuronal nets in focal cerebral ischemia and mild hypoperfusion. *Matrix Biol.*, 2018, vol. 74, pp. 121–132. doi: 10.1016/j.matbio.2018.08.001.
18. Sigal Y.M., Bae H., Bogart L.J., Hensch T.K., Zhuang X. Structural maturation of cortical perineuronal nets and their perforating synapses revealed by superresolution imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2019, vol. 116, no. 14, pp. 7071–7076. doi: 10.1073/pnas.1817222116.

Для цитирования: Липачев Н.С., Двоеглазова А.С., Садреева А.А., Аганов А.В., Павельев М.Н. Сравнительный анализ методов количественного исследования микроструктуры перинейрональных сетей // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 4. – С. 519–534. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.4.519-534.

For citation: Lipachev N.S., Dvoeglazova A.S., Sadreeva A.A., Aganov A.V., Paveliev M.N. Comparative analysis of the methods for quantitative study of the perineuronal net microstructure. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 4, pp. 519–534. doi: 10.26907/2542-064X.2022.4.519-534. (In Russian)