ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ, 2021, том 57, № 5, с. 373–379

——— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ——

ОСОБЕННОСТИ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ НЕЙРОНОВ НАРУЖНОГО КОЛЕНЧАТОГО ТЕЛА КОШКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ФРОНТАЛЬНЫХ И САГИТТАЛЬНЫХ СРЕЗОВ

© 2021 г. А. А. Михалкин^{1,*}, Н. С. Меркульева¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия *e-mail: mikhalkin@infran.ru Поступила в редакцию 27.03.2021 г. После доработки 04.05.2021 г.

Принята к публикации 18.05.2021 г.

Проведен сравнительный анализ возрастной динамики морфометрических показателей нейронов дорсального наружного коленчатого тела (НКТд) кошки (*Felis catus*) на срезах, изготовленных во фронтальной и сагиттальной плоскостях. Исследована возрастная динамика площади, округлости и ориентации сомы геникулятных нейронов, иммунопозитивных к нефосфорилированным доменам тяжелых нейрофиламентов (антитела SMI-32). Анализ проведен на животных в возрасте 0, 4, 10, 14, 21, 28, 34, 62 и 123 дней и на взрослых животных. Между пулами данных, полученными с использованием фронтальных и сагиттальных срезов, выявлены достоверные отличия: 1) площадь сомы на фронтальных срезах меньше, чем на сагиттальных срезах во всех возрастных группах, с возрастом разница в площади сомы увеличивается; 2) сома нейронов ориентирована под разными углами в двух плоскостях резки, с возрастом происходит достоверное изменение ориентации сомы на сагиттальных, но не фронтальных срезах. Было предположено, что различия в площади сомы являются следствием пространственной организации SMI-32(+) клеток в пределах НКТд, ввиду чего резка в сагиттальной плоскости, в отличие от фронтальной, проходила через длинную ось их сомы. В свою очередь, возрастные изменения в ориентации сомы могут отражать внутреннюю перестройку ретинотопической организации НКТд с возрастом.

Ключевые слова: морфометрия, плоскость резки, наружное коленчатое тело, SMI-32, онтогенез **DOI:** 10.31857/S0044452921050053

Анализ морфологических параметров нервных клеток — одна из основ изучения нервной системы [1]. На основании этих параметров строят не только фундаментальные умозаключения [2, 3], но и выводы о действии фармакологических препаратов [4, 5], последствий экспериментальных манипуляций [6, 7], течении заболеваний [8–10], эти результаты также закладывают в основу математичемолелей [11]. Ha практике ских широко используют такие клеточные параметры, как размер [3-6, 8], вытянутость и ориентацию [12] клеточной сомы, организацию отростков нейрона [2, 13], количество и плотность залегания нейронов [3, 8, 10, 14], кластеризация [15-17] клеток в исследуемой структуре.

Современные экспериментальные методики дают возможность анализа интересующих клеточных параметров на основе трехмерных реконструкций исследуемых популяций [13, 18, 19]. Однако изготовление и анализ двумерных препаратов не теряют своей актуальности ввиду скорости, доступности и относительной простоты анализа большого

количества клеток, что особенно важно, например, в клинических исследованиях [14]. Очевидно, что в силу разнообразных причин: особенностей анатомии и морфологии живого объекта, особенностей гистологического метода, используемого при его изучении, допустимы определенные вариации в морфометрических величинах на двумерных гистологических препаратах. Для сокращения вариабельности исследуемых показателей критически важны верный выбор плоскости резки и позиционирование гистологического образца перед изготовлением гистологических срезов, особенно для структур, имеющих сложную форму [14]. В качестве примера можно представить клеточные популяции серого вещества спинного мозга, где, ввиду пространственной ориентации клеточной сомы и дендритов, достоверное определение различных типов нейронов возможно только при комбинировании разных плоскостей резки [20, 21].

При изучении постнатального развития популяций нейронов дорзального таламуса — а именно площади сомы клеток дорсального наружного ко-

ленчатого тела (НКТд), иммунопозитивных к нефосфорилированным доменам тяжелых нейрофиламентов — были получены неожиданные различия в данных при анализе срезов, изготовленных в сагиттальной и фронтальной плоскостях. В соответствии с этим целью работы был сравнительный анализ возрастной динамики морфометрических показателей нейронов дорсального наружного коленчатого тела (НКТд) на срезах, изготовленных во фронтальной и сагиттальной плоскостях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в соответствии с требованиями Директивы Совета Европейского Парламента по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (2010/63EU) и с одобрения Комиссии по этике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (заключение № 28/04 от 28.04.2021 г). В работе использована 31 кошка обоего пола: в возрасте 0, 4, 10, 14, 21, 28, 34, 62 и 123 дней (в каждой группе n = 2-4) и взрослые животные (n = 3). Протокол перфузии, взятия материала и иммуногистохимической реакции подробно рассмотрены в работе [21]. С помощью антител SMI-32 [22] выявляли нефосфорилированные домены тяжелых цепей нейрофиламентов непрямым иммуногистохимическим методом на свободно плавающих срезах толщиной 50 мкм. Оцифровку срезов проводили с помощью светлопольного микроскопа Olympus CX33 (Olympus Corporation, Япония) и камеры Nikon D3400 (Nikon corporation, Япония).

Морфометрический анализ нейронов, иммунопозитивных к SMI-32 (SMI-32(+)), проводили в программе CAS ("Cell annotation software") по ранее описанной методике [23]. Для выделения SMI-32(+) клеток на изображении применяли "Statistical dominance algorithm" [24] с последующей коррекцией неточностей автоматического выделения оператором. В анализ морфометрических параметров взяты только клетки с отсутствием иммуногистохимической реакции в центральной части сомы (что соответствовало положению неокрашенного клеточного ядра) с целью исключения из анализа малых фрагментов SMI-32(+) клеток [25]. Для замера параметров сомы нейрона выделенные отростки SMI-32(+) клеток отсекали, используя последовательные процедуры удаления и добавления одинакового числа пикселей по периметру выделенных объектов, количество пикселей было выбрано эмпирически и применено для всей экспериментальной выборки.

Исследовали следующие морфометрические параметры:

1) площадь поперечного сечения сомы SMI-32(+) клеток (мкм²);

 округлость клеточной сомы с использованием параметра "близость формы сомы к кругу", вычисленному по формуле: 4 [Площадь сомы] π*[Длинная ось сомы]².
Итоговые значения варьируют от 0 до 1, где 0, 1 – крайне вытянутый овал, 1 – круг.

3) ориентация длинной оси сомы (для определения этого параметра брали длинную ось наиболее подходящего к выделенной области эллипса). Угол длинной оси сомы вычисляли относительно границы между слоями A и A1, где 0° – сома ориентирована перпендикулярно межслойной границе, отрицательные значения – ростральный (на сагиттальных срезах) или медиальный (на фронтальных срезах) наклон сомы, положительные значения – каудальный (на сагиттальных срезах) и латеральный (на фронтальных срезах) наклон сомы.

НКТд имеет сложную форму; в первом приближении напоминает эллипсоид, ростральный и каудальный полюса которого утончены и отогнуты в противоположных направлениях. Как итог, на фронтальных срезах форма ядра варьирует от шарообразной — на ростральном и каудальном полюсах, до клиновидной – в центральной части. Соответственно, на сагиттальных срезах ядро имеет S-образную форму (рис. 1а). Иммунопозитивную реакцию оценивали в двух наиболее широких слоях НКТд – А и А1. Для анализа взяты SMI-32(+) клетки центральных участков слоев НКТд в обеих плоскостях резки (окрашены серым на рис. 1а), где возможно проведение прямой линии по межслойной границе слоев А и А1, относительно которой оценивали ориентацию клеточной сомы.

Всего было проанализировано 26711 и 22495 SMI-32(+) клеток на фронтальных и сагиттальных срезах соответственно, в отдельных группах сравнения рассмотрено от 1113 до 4915 SMI-32(+) клеток в зависимости от возраста и плоскости резки. Для сравнения выборок использованы Nested ANOVA и post-hoc Tukey-тест (для множественных сравнений) и Nested t-test (для парных сравнений), разработанные специально для малых выборок [26], где N – количество животных определенной группы, *п* – количество срезов у животного. Для большинства животных было проанализировано по 3 среза в каждой плоскости, от некоторых животных использовали только фронтальные или только сагиттальные срезы. Данные по динамике площади и ориентации сомы SMI-32(+) нейронов на сагиттальных срезах были опубликованы ранее [27]. Числовые данные на рисунках представлены в виде среднее \pm ст. откл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Площадь сомы SMI-32(+) клеток

Первое, что обращает на себя внимание при сравнении двух плоскостей резки, — бо́льшая пло-



Рис. 1. Морфометрические параметры дорсального наружного коленчатого тела (*HKT*∂). (a) – фронтальный (спева, Frontal plane) и сагиттальный (справа, Sagittal plane) разрезы НКТд (LGNd). A/A1 – анализируемые слои, серым выделена зона анализа ориентации сомы на срезах. (b) – возрастная динамика площади сомы SMI-32 иммунопозитивных (SMI-32(+)) клеток: показаны достоверные различия новорожденных (0) и взрослых (Ad.) от ближайших групп и от максимального значения, а также различия между значениями для фронтальных и сагиттальных срезов внутри возрастных групп. (c) – внешний вид SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на сагиттальных и сагиттальных срезов внутри возрастных групп. (c) – внешний вид SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на сагиттальных проезе. (d) – угол наклона сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на фронтальных и сагиттальном срезе. (d) – угол наклона сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на фронтальных проезе сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на фронтальных проезе сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на сагиттальном срезе. (d) – угол наклона сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на фронтальных проезе сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на сагиттальном срезе. (d) – угол наклона сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на фронтальных проезе сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на фронтальных проезе сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на фронтальных проезе сомы SMI-32(+) клеток в слоях A/A1 на фронтальных проехости относительно меж-слойной границы A/A1 (interlaminar border A/A1). Frontal cutting plane – фронтальная плоскости относительно меж-слойной границы A/A1 (пьегамия: 0-123, Ad. – возраст экспериментальных групп; Frontal – фронтальные срезы; Sagittal – сагиттальные срезы; R – ростральное; C – каудальное; M – медиальное; L – латеральное; D – дорзальное; V – вентральное направления; на графиках указаны ср. знач. ± ст. откл.; @ – p < 0.05; **– p < 0.01; *** – p < 0.001. Попарные сравнения – роst-hoc Tukey тест или Nested *t*-тест.

Таблица 1. Отличие (ОТЛ) между площадью сомы SMI-32 иммунопозитивных нейронов (абсолютное отличие – ОТЛа, и процентное отличие – ОТЛп) между сагиттальной и фронтальной плоскостями резки у животных разных возрастов (0–123 дня и взрослые животные – Взр.). * p < 0.05

Возраст	OTЛа, мкм ²	ОТЛп, %	Nested <i>t</i> -тест
0Д	19.49	15.1	p = 0.22
4Д	30.9	17.7	p = 0.05
10Д	50.38	22.1	p = 0.09
14Д	75.43	30	p = 0.07
21Д	87.63	34.1	p = 0.15
28Д	103.47*	39.5	p = 0.05
34Д	95.13*	36.5	p = 0.02
62Д	100.12*	37.3	p = 0.01
123Д	91.07	32.1	p = 0.06
Взр.	127.06*	41	p = 0.04

щадь сомы нейронов на сагиттальных срезах, чем на фронтальных независимо от возраста животных (рис. 1b). При этом с возрастом разница между площадью сомы в различных плоскостях резки увеличивается: от 19 мкм² (15%) — у новорожденных животных, до 127 мкм² (41%) — у взрослых животных (табл. 1).

Анализ возрастной динамики в пределах плоскости резки показывает значительный рост площади сомы с возрастом (Фр.: $F_{(9.17)} = 18.75$, p < 0.001; Car.: $F_{(9.15)} = 19.18$, p < 0.001). Значительный рывок в росте площади сомы: как на фронтальных, так и на сагиттальных срезах происходит к 10-му дню (Фр.: 0Д vs 10Д, p < 0.01; Car.: 0Д vs 10Д, p < 0.05). После этого возраста рост сомы замедляется; разница в размере сомы теряет статистическую значимость на фронтальных срезах – к 14 дням (Фр.: 14Д vs Взр., p > 0.05), а на сагиттальных – неделей позже, к 21 дню (Car.: 21Д vs Взр., p > 0.05) (рис. 1b).

Округлость сомы SMI-32(+) клеток

В ходе анализа других морфометрических характеристик изучаемой популяции клеток было отмечено, что их сома имеет в среднем не круглую, но овальную форму (рис. 1с) со средним значением округлости, равным 0.69 ± 0.04 , идентичным для фронтальных и сагиттальных срезов (данный показатель использован для обозначения сомы на рис. 1е).

Попарные сравнения значений округлости на фронтальных и сагиттальных срезах внутри возрастных групп показали достоверные отличия лишь в группе новорожденных животных (0Д: Фр. vs Car.; $F_{(1.6)} = 94.58$; p < 0.001), когда на фронталь-

ных срезах клетки несколько более округлые (0.72 ± 0.02) , чем на сагиттальных (0.66 ± 0.03) .

Ориентация сомы SMI-32(+) клеток

Исходя из овальной формы сомы нейронов НКТл и наблюдаемых различий в плошали сомы. представилось необходимым определить ориентацию исследуемой популяции клеток в пространстве. В качестве референтной плоскости выбрана граница между слоями А и А1. Показано, что на фронтальных срезах сома SMI-32(+) клеток ориентирована в целом перпендикулярно межслойной границе с небольшим медиальным уклоном (до -20° в группе 62Д), не демонстрируя какого-либо возрастного тренда ($F_{(9,18)} = 1.170; p > 0.05$) (рис. 1d, черные кружки). В то же время сома SMI-32(+) клеток на сагиттальных срезах ориентирована с ростральным уклоном, который значительно усиливается с возрастом ($F_{(9.15)} = 6.653$; p < 0.001) (рис. 1d, серые кружки): от -24° у новорожденных до -46° у взрослых животных (0Д vs Взр., p < 0.01).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате было определено, что: 1) сома SMI-32(+) клеток имеет вытянутую форму; 2) по мере постнатального развития происходит разворот длинной оси сомы по отношению к межслойной границе на сагиттальных, но не фронтальных срезах; 3) площадь сомы на сагиттальных срезах больше, чем на фронтальных, и с возрастом это различие увеличивается.

Возможна следующая интерпретация наблюдаемых зависимостей (рис. 1е). Фронтальная плоскость резки в целом проходит перпендикулярно межслойной границе слоев А и А1, в то же время сома SMI-32(+) клеток имеет некоторый ростральный уклон относительно этой границы. Для регистрации максимальной площади сомы необходимо произвести резку по длинной оси клетки. По всей видимости, это условие выполнено в большей степени при резке в сагиттальной плоскости, нежели во фронтальной. В результате получается, что регистрируемая площадь сомы на фронтальных срезах меньше таковой на сагиттальных. Происходящий с возрастом ростральный поворот сомы усиливает наблюдаемую разницу в ее площади на фронтальных и сагиттальных срезах. Кроме того, наблюдаемый поворот может объяснить недельную разницу в окончании роста сомы SMI-32(+) клеток (в две недели – на фронтальных срезах и три недели – на сагиттальных срезах): на фоне перманентного роста сомы нейронов НКТд происходит ее поворот в сагиттальной плоскости, что уменьшает захватываемую в процессе резки площадь сечения клеточной сомы на фронтальных срезах; таким образом оба параметра компенсируют друг друга на фронтальных, но не сагиттальных срезах. Поскольку первый месяц жизни крайне важен для развития зрительного анализатора кошки [28], недельная разница в определении временных границ роста сомы представляется существенной.

Ориентация сомы SMI-32(+) нейронов, выявленная в данной работе, близка к направлению изолиний ретинотопической карты зрительного пространства, представленной в НКТд [29-31]. В свою очередь другие наблюдения показывают, что вытянутость сомы нейронов НКТд зачастую совпалает с общей ориентацией их дендритного древа [32, 33]. Несмотря на то что антитела SMI-32 выявляют сому и лишь проксимальные отростки крупных клеток НКТд [34, 35], можно предположить, что дендритное древо описанных в данной работе SMI-32(+) клеток, как и их сома, в целом вытянуто параллельно изолиниям ретинотопического представительства вне зависимости от возраста. Изменение угла наклона сомы в сагиттальной плоскости говорит о ранее неизвестных изменениях внутренней структуры НКТд кошки (в частности, смещении изолиний ретинотопического представительства), происходящих наряду с общим увеличением его объема [36, 37]. Также постнатальный рост клеток НКТд сопровождается увеличением диаметра и реорганизацией их дендритного древа [38-40], морфометрические показатели дендритного древа, в связи с вышеизложенными предположениями, вероятно, так же, как и размер сомы, могут отличаться в зависимости от анализируемой плоскости резки.

Таким образом, наблюдаемая в работе разница в размере сомы SMI-32(+) клеток на фронтальных и сагиттальных срезах определяется ростральным уклоном их сомы по отношению к межслойной границе слоев А и А1. С возрастом ростральный уклон сомы становится более выраженным, увеличивая регистрируемую разницу в размере сомы на фронтальных и сагиттальных срезах и, возможно, отражая смещение структур, отвечающих за общую архитектонику HKTд.

Данные результаты указывают на важность учета особенностей залегания анализируемых клеток в исследуемой структуре при анализе временного паттерна развития их морфометрических характеристик.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП "Научно-технологическое развитие Российской Федерации" (2019—2030), тема 0134-2019-0006 (теоретическая часть) и гранта РНФ № 21-15-00235 (экспериментальная часть).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы информируют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн исследования: А.А. Михалкин, Н.С. Меркульева.

Сбор и обработка материала: А.А. Михалкин.

Статистическая обработка данных: А.А. Михалкин.

Анализ и интерпретация данных: А.А. Михалкин, Н.С. Меркульева.

Написание текста: А.А. Михалкин, Н.С. Меркульева.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Никитиной Н.И. за помощь в микроскопическом анализе данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oberlaender M (2019) Neuronal Morphology and Its Significance. In: Singer W., Sejnowski T.J., Rakic P (eds) The Neocortex. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 124–138.
- 2. *Hendry SHC, Jones EG* (1983) The organization of pyramidal and non-pyramidal cell dendrites in relation to thalamic afferent terminations in the monkey somatic sensory cortex. J Neurocytol 12: 277–298. https://doi.org/10.1007/BF01148465
- Herculano-Houzel S, Manger PR, Kaas JH (2014) Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size. Front Neuroanat 8: 1–28. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00077
- Zhou J, Blundell J, Ogawa S, Kwon CH, Zhang W, Sinton C, Powell CM, Parada LF (2009) Pharmacological inhibition of mTORCl suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific PTEN knock-out mice. J Neurosci 29: 1773–1783. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5685-08.2009
- Sklair-Tavron L, Shi WX, Lane SB, Harris HW, Bunney BS, Nestler EJ (1996) Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. Proc Natl Acad Sci USA 93: 11202–11207. https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11202
- Loopuijt LD, Villablanca JR, Sharifi P (2001) Soma size of substantia nigra neurons increases after a prenatal neocortical lesion in cats. Dev Brain Res 130: 143–147. https://doi.org/10.1016/S0165-3806(01)00223-1
- Duffy KR, Slusar JE (2009) Monocular deprivation provokes alteration of the neuronal cytoskeleton in developing cat lateral geniculate nucleus. Vis Neurosci 26: 319– 28.

https://doi.org/10.1017/S0952523809090130

- Flood DG, Coleman PD (1988) Neuron numbers and sizes in aging brain: Comparisons of human, monkey, and rodent data. Neurobiol Aging 9: 453–463. https://doi.org/10.1016/S0197-4580(88)80098-8
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. Acta Neuropathol 118: 5–36. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1
- 10. Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HBM, Friedman L, Raj-

ЖУРНАЛ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ том 57 № 5 2021

kowska G (2004) Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. Biol Psychiatry 56: 640-650.

https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.08.022

- 11. Raiković K. Marić DL. Milošević NT. Jeremic S. Arsenijević VA. Raiković N (2016) Mathematical modeling of the neuron morphology using two dimensional images. J Theor Biol 390: 80–85. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.11.019
- 12. FitzGibbon T (2006) Does the development of the perigeniculate nucleus support the notion of a hierarchical progression within the visual pathway? Neuroscience 140: 529-546.

https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.038

- 13. Acciai L, Soda P, Iannello G (2016) Automated Neuron Tracing Methods: An Updated Account. Neuroinformatics 14: 353-367. https://doi.org/10.1007/s12021-016-9310-0
- 14. Garman RH, Li AA, Kaufmann W, Auer RN, Bolon B (2016) Recommended Methods for Brain Processing and Quantitative Analysis in Rodent Developmental Neurotoxicity Studies. Toxicol Pathol 44: 14-42. https://doi.org/10.1177/0192623315596858
- 15. Burnat K, Van Der Gucht E, Waleszczyk WJ, Kossut M, Arckens L (2012) Lack of early pattern stimulation prevents normal development of the alpha (Y) retinal ganglion cell population in the cat. J Comp Neurol 520: 2414-2429.

https://doi.org/10.1002/cne.23045

- 16. Merkulyeva NS, Mikhalkin AAA, Veshchitskii AAA, Merkul'eva NS, Mikhalkin AAA, Veshchitskii AAA (2016) Characteristics of the Distribution of Acetylcholinesterase in the Posterolateral Nucleus of the Thalamus in Cats. Neurosci Behav Physiol 46: 507-509. https://doi.org/10.1007/s11055-016-0267-0
- 17. Mooser F, Bosking WH, Fitzpatrick D (2004) A morphological basis for orientation tuning in primary visual cortex. Nat Neurosci 7: 872-879. https://doi.org/10.1038/nn1287
- 18. Yan C, Li A, Zhang B, Ding W, Luo Q, Gong H (2013) Automated and Accurate Detection of Soma Location and Surface Morphology in Large-Scale 3D Neuron Images. PLoS One 8: 1-12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062579
- 19. Radojević M, Meijering E (2019) Automated Neuron Reconstruction from 3D Fluorescence Microscopy Images Using Sequential Monte Carlo Estimation. Neuroinformatics 17: 423-442. https://doi.org/10.1007/s12021-018-9407-8
- 20. Lima D, Coimbra A (1986) A Golgi study of the neuronal population of the marginal zone (lamina I) of the rat spinal cord. J Comp Neurol 244: 53-71. https://doi.org/10.1002/cne.902440105
- 21. Merkulyeva N, Veshchitskii A, Makarov F, Gerasimenko Y, Musienko P (2016) Distribution of 28 kDa calbindin-immunopositive neurons in the cat spinal cord. Front Neuroanat 9: 166.

https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00166

- 22. Sternberger LA, Sternberger NH (1983) Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 6126-6130. https://doi.org/10.1073/pnas.80.19.6126
- 23. Nurzynska K, Mikhalkin A, Piorkowski A (2017) CAS: Cell Annotation Software – Research on Neuronal Tissue Has Never Been so Transparent. Neuroinformatics 15: 365-382.

https://doi.org/10.1007/s12021-017-9340-2

- 24. Piorkowski A. Piórkowski A (2016) A statistical dominance algorithm for edge detection and segmentation of medical images. Adv Intell Syst Comput 471: 3–14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39796-2 1
- 25. Kutcher MR, Duffy KR (2007) Cytoskeleton alteration correlates with gross structural plasticity in the cat lateral geniculate nucleus. Vis Neurosci 24: 775–785. https://doi.org/10.1017/S095252380707068X
- 26. Quené H, Van Den Bergh H (2004) On multi-level modeling of data from repeated measures designs: A tutorial. Speech Commun 43: 103–121. https://doi.org/10.1016/j.specom.2004.02.004
- 27. Mikhalkin A, Nikitina N, Merkulyeva N (2020) Heterochrony of postnatal accumulation of nonphosphorylated heavy-chain neurofilament by neurons of the cat dorsal lateral geniculate nucleus. J Comp Neurol 1–12. https://doi.org/10.1002/cne.25028
- 28. Feller MB, Scanziani M (2005) A precritical period for plasticity in visual cortex. Curr Opin Neurobiol 15: 94-100

https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.012

- 29. Eysel UT, Wolfhard U (1983) Morphological fine tuning of retinotopy within the cat lateral geniculate nucleus. Neurosci Lett 39: 15-20. https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90158-1
- 30. Bishop PO, Kozak W, Levick WR, Vakkur GJ (1962) The determination of the projection of the visual field on to the lateral geniculate nucleus in the cat. J Physiol 163: 503-539.

https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006991

- 31. Sanderson KJ (1971) The projection of the visual field to the lateral geniculate and medial interlaminar nuclei in the cat. J Comp Neurol 143: 101-117. https://doi.org/10.1002/cne.901430107
- 32. Stanford LR, Friedlander MJ, Sherman SM (1983) Morphological and physiological properties of geniculate Wcells of the cat: a comparison with X- and Y-cells. J Neurophysiol 50: 582-608. https://doi.org/10.1152/jn.1983.50.3.582
- 33. Friedlander MJ, Lin CS, Stanford LR, Sherman SM (1981) Morphology of functionally identified neurons in lateral geniculate nucleus of the cat. J Neurophysiol 46: 80-129.

https://doi.org/10.1152/jn.1981.46.1.80

- 34. Bickford ME, Guido W, Godwin DW (1998) Neurofilament proteins in Y-cells of the cat lateral geniculate nucleus: Normal expression and alteration with visual deprivation. J Neurosci 18: 6549-6557. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-16-06549.1998
- 35. Duffy KR, Crowder NA, LeDue EE (2012) Investigation of cytoskeleton proteins in neurons of the cat lateral genicu-

late nucleus. J Comp Neurol 520: 186–199. https://doi.org/10.1002/cne.22727

- 36. *Kalil R* (1978) Development of the dorsal lateral geniculate nucleus in the cat. J Comp Neurol 182: 265–291. https://doi.org/10.1002/cne.901820206
- 37. *Elgeti H, Elgeti R, Fleischhauer K* (1976) Postnatal growth of the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. Anat Embryol (Berl) 149: 1–13. https://doi.org/10.1007/BF00315081
- 38. Coleman LA, Friedlander MJ (2002) Postnatal dendritic development of Y-like geniculocortical relay neurons. Int

J Dev Neurosci 20: 137–159. https://doi.org/10.1016/S0736-5748(02)00018-7

39 Coleman LA, Friedlander MJ (1992) Intracellular injections of permanent tracers in the fixed slice: a comparison of HRP and biocytin J Neurosci Methods 44: 167–177

https://doiorg/101016/0165-0270(92)90009-3

 Friedlander MJ (1982) Structure of physiologically classified neurones in the kitten dorsal lateral geniculate nucleus. Nature 300: 180–183. https://doi.org/10.1038/300180a0

FEATURES OF THE AGE-RELATED DYNAMICS OF CAT LATERAL GENICULATE NUCLEUS NEURONS AS REVEALED IN FRONTAL VERSUS SAGITTAL SLICES

A. A. Mikhalkin^{*a*, #} and N. S. Merkulyeva^{*a*}

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia [#]e-mail: mikhalkin@infran.ru

We carried out a comparative morphometric analysis of neurons in the cat dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) in frontal *vs.* sagittal slices. Using the SMI-32 antibody to non-phosphorylated domains of heavy-chain neurofilaments, the postnatal dynamic of soma parameters (area, roundness, orientation) of dLGN neurons was studied. Measurements were performed in kittens aged 0, 4, 10, 14, 21, 28, 34, 62, 123 days, and in adult cats. A comparison of data obtained in frontal *vs.* sagittal slices revealed the following significant differences: 1) the soma area of the immunopositive neurons was smaller in frontal *vs.* sagittal slices in all age groups, and this difference increased with age; 2) the soma orientation was also different in two cutting planes, and a significant age-related change in the soma orientation occurred only in the sagittal, but not frontal, plane. We assume that the difference in the soma area is due to the spatial arrangement of SMI-32-immunopositive neurons in the dLGN, because of which, in the sagittal plane, in contrast to the frontal, neuronal somas were cut parallel to their long axis. In turn, age-related changes in the soma orientation may reflect an internal rearrangement of the dLGN retinotopic organization with age.

Keywords: morphometry, cutting plane, lateral geniculate nucleus, SMI-32, ontogenesis