



MIKROSKOPSKE SLIKE GRANIČNIH NEURONA
ZUPČASTOG JEDRA ČOVEKA: PARAMETRI NELINEARNE
KVANTITATIVNE ANALIZE I ISPITIVANJE NJIHOVE
RASPODELE SA STAROŠĆU

*MICROSCOPIC IMAGES OF THE HUMAN DENTATE
NUCLEUS BORDER NEURONS: PARAMETERS OF THE
NONLINEAR QUANTITATIVE ANALYSIS AND EXAMINATION
OF AGE DISTRIBUTION*

Sara Milovanović¹, Jelena Stevanović¹, Nebojša Milošević²

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za biofiziku, Beograd, Srbija

Correspondence: milovanovic.sara.994@gmail.com

Abstract

Introduction: Dentate nucleus represents a cluster of neurons located deep in white matter of cerebellum. Neurons from dentate nucleus, as the biggest and the most lateral from deep cerebellar nuclei, are classified into two groups by its morphology and function. The group of large neurons are further classified into four subgroups and one of them are border neurons.

Aim: This study investigates possibility to discriminate inner and outer neurons from small sample of border neurons, using quantitative and nonlinear parameters of the image analysis. In addition, this study investigates relations between nonlinear parameters and the age of neurons.

Material and methods: The small sample of 2D images of dentate nucleus border neurons have been used for this study: 16 images of inner and 12 images of outer neurons. Their morphology was quantified by 7 parameters which investigate the neuron area, dendritic length, number of primary dendrites, space-filling property, shape, dendritic complexity/tortuosity and neurons inhomogeneity/rotational invariance.

Results: The results have showed that means of three quantitative parameters, as well as the mean of one nonlinear parameter, are statistically equal for inner and outer border neurons. In contrast to this, three parameters of fractal analysis are statistically different between two types of border neurons. In addition, means of four nonlinear parameters does not change when the age of neurons increases.

Conclusion: Our results corroborate previous findings and conclusions: border neurons of the dentate nuclei can be classified into inner and outer type. Moreover, our study promotes hypothesis that morphology of neurons from the human dentate nucleus does not change with the age.

Keywords:

age,
border neurons,
classification,
dentate nucleus,
nonlinear analysis



Sažetak

Uvod: Zupčasto jedro (*nucleus dentatus*) čoveka predstavlja skup neurona smeštenih duboko u beloj masi malog mozga. Jedno je od četiri jedra i kao najveće smešteno je u najdaljoj lateralnoj poziciji. Neuroni zupčastog jedra na osnovu veličine, morfologije i funkcije podeljeni su na velike glavne i male neurone koji formiraju lokalne neuronske mreže. Veliki neuroni su dalje podeljeni u četiri podgrupe: centralni neuroni, granični neuroni (spoljašnji i unutrašnji), intermedijarni asimetrični i intermedijarni fuziformni.

Cilj: Cilj našeg istraživanja je bio da ispitamo da li nelinearni parametri slike potvrđuju klasifikaciju graničnih neurona na spoljašnje i unutrašnje, kao i da ispitamo postojanje zavisnosti između parametara slike i starosti neurona.

Materijal i metode: U našem istraživanju korišćeno je 28 slika graničnih neurona zupčastog jedra čoveka: 16 unutrašnjih i 12 spoljašnjih. Ispitivani parametri su: površina neurona, dužina dendrita, broj primarnih dendrita, popunjenost prostora, nehomogenost slike i invarijantnost rotacije slike, oblik neurona, krivudavost i složenost dendita.

Rezultati: Naši rezultati su pokazali da ne postoji statistička značajnost parametara površine neurona, dužine dendrita i broja primarnih dendrita, dok popunjenost prostora, nehomogenost slike i invarijantnost rotacije slike, oblik neurona, krivudavost i složenost dendita pokazuju statističku značajnost. Takođe, nije utvrđena statistički značajna veza između posmatranih parametara i starosti neurona.

Zaključak: Iz navedenih podataka možemo zaključiti da je postojeća klasifikacija na spoljašnje i unutrašnje granične neurone validna, kao i da ne postoji značajna povezanost morfologije neurona i starosti ispitanika.

Ključne reči:

granični neuroni,
klasifikacija,
nelinearna analiza,
starost,
zupčasto jedro

Uvod

Zupčasto jedro (*nucleus dentatus*) čoveka predstavlja klaster neurona smeštenih duboko u beloj masi malog mozga (1). To je najveća samostalna struktura koja povezuje mali mozak sa ostatkom centralnog nervnog sistema. Kao najveće od njih smešteno je najdaljoj lateralnoj poziciji. Zupčasto jedro je odgovorno za planiranje, inicijaciju i kontrolu voljnih pokreta. Funkcionalno je podeljeno na ventralni i dorzalni region (2). Izlazna vlakna dorzalnog regiona su zadužena za motornu kontrolu skeletnih mišića, dok je ventralni region zadužen za nemotorne funkcije, kao što su kognitivne i vizuospacijalne sposobnosti.

Neuroni zupčastog jedra su na osnovu veličine, morfologije i funkcije podeljeni na velike i male neurone koji formiraju lokalne neuronske mreže (3). Veliki neuroni su dalje podeljeni u četiri podgrupe (4). Prvu grupu čine centralni neuroni, kružnog oblika i sa velikim brojem dendrita koji se cirkularno odvajaju od some. Drugu grupu čine granični neuroni, koji se nalaze na granici jedra i bele mase. Sa jednog pola neurona pruža se akson, dok se na drugom polu nalazi četiri do šest dendrita. Treću grupu čine intermedijarni asimetrični neuroni, raspoređeni u svim delovima jedra. Obično imaju eliptično telo i od pet do devet dendrita, dok su jedan ili dva dendrita mnogo duži od ostalih. Na kraju, četvrta grupa neurona poznata je pod imenom intermedijarni fuziformni neuroni, nalaze se raspoređeni u čitavom jedru. Telo im je eliptičnog ili vretenastog oblika, a karakterišu se činjenicom da se primarni dendriti sa jednog pola pružaju prema drugom polu neurona.

Kvalitativnom analizom su neuroni granične grupe podeljeni na spoljašnje i unutrašnje. Osim što se nalaze na različitim granicama (spoljašnja i unutrašnja granica) zupčastog jedra, ove dve vrste imaju različitou orijentaciju

dendrita, različitu veličinu dendritskog polja i različitu gustinu dendritske krošnje. Stoga, cilj ovog istraživanja je da se potvrdi kvalitativna klasifikacija graničnih neurona upotrebom nelinearnih parametara slike i da se ispita postojanje zavisnosti parametara slike i starosti neurona.

Materijal i metode

Materijal korišćen u našem istraživanju je sakupljen u periodu 2013-2015 u Centru za sudsku medicinu, toksikologiju i molekularnu genetiku Kliničkog centra Vojvodine, uz odobrenje Etičkog komiteta Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Mozgovi devet odraslih muškaraca, starosti od 23 do 75 godina (sedam neurona pripada ispitanicima starosti 23 godine, dva neurona starosti 35 godina, četiri starosti 45 godina, tri starosti 53 godine, jedan starosti 55 godina, tri starosti 63 godine, jedan starosti 67 godina, šest starosti 71 godinu i jedan starosti 75 godina) dobijeni na autopsiji bez neuroloških promena korišćeni su u našem istraživanju (3). Vremenski razmak između kliničke smrti i autopsije varirao je između dva i šest sati.

Nakon oslobađanja iz kranijalnih šupljina, mali mozak je disekovan na blokove debljine 2,5 cm odakle su uzeta zupčasta jedra (3). Obradeni su modifikovanom Goldžijevom (*Golgi*) metodom impregnacije srebrom po Kopš-Bubenetu (*Kopsch-Bubenaite*). Detaljan opis obrade tkiva preuzet je iz rada Marić i saradnici (6). Napravljeni su horizontalni rezovi kalupa debljine 90µm, postavljeni na mikroskopsko staklo, deparafinisani ksilenom i prekriveni medijumom. Svaki presek tkiva je analiziran svetlosnim mikroskopom pod uveličanjem 400x (3).

Neuroni su snimljeni i transformisani u digitalne slike digitalnom kamerom sa odgovarajućim softverom (*Leica Microsystem Wetzlar Ltd., Heerbrugg, Switzerland*).

Histološki preseki svakog neurona posmatrani su kroz 20 optičkih rezova. Distanca između dva optička reza je bila 5 μm . U zavisnosti od veličine tela neurona i dendritske arborizacije, svaki neuron je snimljen u 4-20 optičkih ravni. Digitalne slike optičkih ravni su učitane u specijalizovani softver za rekonstrukciju i analizu slike-*Image J* (5). Sve slike (*ZProject* metodom) su projektovane duž ose normalne na ravan slike, dok su pozadinski artefakti digitalno uklonjeni (6). Dobijena slika predstavlja 2D binarnu digitalnu sliku neurona prikazanih crnom bojom na beloj pozadini.

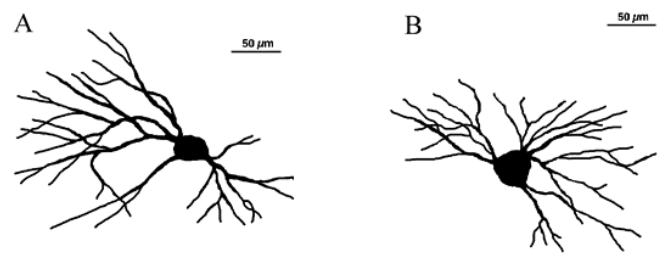
Obrada slike neurona

Postoje dva karakteristična prikaza i analize 2D slike objekta u svojoj skali: binarna (crno-bela) slika i slika granice objekta (7). Kada koristimo *ImageJ* ova dva tipa su generisana komandom: '*Process-Binary-Make Binary*' and '*Process-Binary-Outline*'. A kada se radi o crtežu, u kome anatom- specijalista olovkom prolazi kroz osu dendrita i tako rekonstruiše neuron, dobijeni crtež neurona se naziva skeletonizovana slika neurona(8). U *ImageJ* softveru komanda '*Process-Binary-Skeletonize*' koristi algoritam tanjenja i kreira oblike širine jednog piksela iz početne crno bele slike objekta (9). Dok boks dimenzija (tj. *box dimension*) binarne slike pokazuje osobinu popunjenja prostora objekta (5), boks dimenzija slike granice objekta pokazuje iregularnost u obliku objekta tj. ova vrednost pokazuje kako vrednost odstupa od klasičnih geometrijskih oblika do onih kompleksnijih (10). Posledično, proces skeletonizacije (11) bi trebalo da bude modifikovan posebno kada se istražuju neuroni sa debelim dendritima ili krupnim ćelijskim telima. Telo neurona na crno-belom slici bi trebalo digitalno ukloniti i preostale dendrite sublimirati u jednu pikselnu liniju dok su preostali artefakti izbrisani (5). Boks dimenzija takve slike pokazuje shemu dendritskog grananja i krivudavost dendrita (6).

Parametri koje smo pratili su korišćeni radi kvantitativne i nelinearne analize slike. Za kvantitativnu analizu koristili smo površinu neurona (A), dužinu dendrita (L) i broj primarnih dendrita (N_{pd}). Za nelinearnu analizu korišćeni parametri su: popunjenost prostora ($(D_B)_{bin}$), nehomogenost slike + invarijantnost rotacija slike (Λ), oblik neurona ($(D_B)_{out}$) i krivudavost i složenost dendrita ($(D_B)_{skel}$).

Uzorak graničnih neurona, ekstrahovanih iz devet mozgovga, sadrži 87 ćelija: 52 spoljašnjih graničnih neurona i 35 unutrašnjih graničnih neurona. Kako bismo standardizovali populaciju radi prikladnih zaključaka, kada su slike analizirane BC (*box counting*) metodom, izabrali smo ćelije sa statistički sličnom (ili istom) površinom neurona, ukupnom dužinom i gustom dendrita (9). Uzimajući ovo u obzir, izabrali smo 28 ćelija iz inicijalnog uzorka, među njima je bilo 12 koji pripadaju spoljašnjim graničnim neuronima i 16 unutrašnjim graničnim neuronima. Shematski prikaz slika graničnih neurona dat je na **Slici 1**.

Slika 1. Primer dva tipa graničnih neurona: unutrašnji granični neuron(A) i spoljašnji granični neuron(B)



Rezultati

Prvi deo našeg istraživanja ispituje postojanje razlike u morfologiji spoljašnjih i unutrašnjih neurona zupčastog jedra. Ispitivani parametri su: $(D_B)_{bin}$, $(D_B)_{out}$, $(D_B)_{skel}$, Λ , N, A i L.

Rezultati su prikazani na tabeli 1. Statistički značajna razlika uočena je kod sledećih parametara - $(D_B)_{bin}$, $(D_B)_{out}$ i $(D_B)_{skel}$. Parametri N, A, Λ i L ne pokazuju statistički značajnu razliku.

Tabela 1. Kvantitativni (A, L, N_{pd}) i nelinearni ($(D_B)_{bin}$, $(D_B)_{out}$, $(D_B)_{skel}$, Λ) parametri analize morfologije spoljašnjih i unutrašnjih graničnih neurona zupčastog jedra

Parametar	Spoljašnji	Unutrašnji	t	p
A (μm^2)	86193 \pm 6	86205 \pm 8	1,124	
L (μm)	5624,2 \pm 0,2	5624,5 \pm 0,2	1,124	> 0,05
N_{pd}	6,2 \pm 0,2	5,9 \pm 0,4	-0,635	
$(D_B)_{bin}$	1,599 \pm 0,007	1,572 \pm 0,005	-3,233	
$(D_B)_{out}$	1,391 \pm 0,006	1,352 \pm 0,006	-4,337	< 0,01
$(D_B)_{skel}$	1,270 \pm 0,007	1,227 \pm 0,007	-4,187	
Λ	0,46 \pm 0,01	0,48 \pm 0,01	1,015	> 0,05

U drugom delu našeg istraživanja ispitivali smo povezanost parametara- $(D_B)_{bin}$, $(D_B)_{out}$, $(D_B)_{skel}$ i Λ sa starošću neurona. Rezultati prikazani u **Tabeli 2** pokazuju da ne postoji statistički značajna povezanost datih parametara sa vremenom tj. godinama ispitivanja. Na osnovu dobijenih rezultata možemo reći da ne postoji nikakva korelacija između parametara i starosti neurona. Parametri niti rastu niti opadaju sa vremenom, i ne možemo tvrditi da se menjaju tokom starosti.

Tabela 2. Parametri statističke analize koeficijenta korelacije (R) nelinearnih parametara ($(D_B)_{bin}$, $(D_B)_{out}$, $(D_B)_{skel}$, i Λ) analize slike neurona i njihove starosti. a je koeficijent pravca prave linije, ti je izračunata t-vrednost i p je nivo značajnosti.

Parametar	A	R	ti	p
$(D_B)_{bin}$	0,0005	0,978	8,151	
$(D_B)_{out}$	-0,0006	0,646	1,691	
$(D_B)_{skel}$	-0,0006	0,593	1,471	
Λ	-0,0001	0,233	0,479	> 0,05

Diskusija

Zupčasto jedro čoveka u dosadašnjim istraživanjima je bilo predmet mnogih studija (1,2). Studije su se uglavnom bavile spoljašnjom morfologijom zupčastog jedra, dok o unutrašnjoj morfologiji i klasifikaciji neurona zupčastog jedra postoji relativno malo podataka.

Prva studija koja se bavila ovom tematikom je sprovedena 2010 godine (13). U njoj su korišćeni oblik i veličina dendritskog polja, oblik i veličina tela, oblik dendritske krošnje i njen položaj u zupčastom jedru. Na osnovu datih parametara neuroni zupčastog jedra su klasifikovani na velike i male neurone. Veliki neuroni su dalje klasifikovani na tri podklase: spoljašnje i unutrašnje granične neurone i centralne neurone.

Novije studije koje su se bavile ovom tematikom koristile su više parametara za klasifikaciju kako bi dobile precizniju podelu (5). U studiji sprovedenoj 2016. godine (12) korišćeno je 17 parametara (površina neurona, površina tela neurona, površina dendritskog stabla, površina neuronskog polja, površina dendritskog polja, površina perineuralnog prostora, fraktalna dimenzija neurona, indeks asimetrije neurona, indeks asimetrije tela neurona, broj primarnih dendrita, fraktalna dimenzija skeletonizovane slike neurona, gustina dendritskog stabla, fraktalima slična kompleksnost šeme grananja dendrita, totalna

dužina dendrita, radijus kruga gustine dendritskog stabla, broj tačaka grananja dendrita, broj sekundarnih i tercijarnih grana), da bi se granični neuroni klasifikovali na unutrašnje i spoljašnje. Statističku značajnost su pokazali: površina neurona, površina dendritskog stabla, površina neuronskog polja, površina dendritskog polja, totalna dužina dendrita i broj tačaka grananja neurona.

Za razliku od prethodnih studija naša studija nije pokazala statističku značajnost površine neurona, dužine svih dendrita i broja primarnih dendrita. Ove razlike se mogu objasniti malim brojem ispitanika (tačnije, slika neurona) u našem uzorku, sa povećanjem uzorka verovatno bismo dobili rezultate u skladu sa prethodnim studijama. Na osnovu dobijenih podataka iz naše ali i prethodnih studija možemo potvrditi prethodno postavljenu klasifikaciju graničnih neurona na spoljašnje i unutrašnje na osnovu morfoloških parametara neurona.

Prethodne studije nisu ispitivale zavisnost morfologije neurona od starosti ispitanika. Naša studija nije pokazala statistički značajnu povezanost ispitivanih parametara sa starošću neurona. Rezultati bi možda bili drugačiji kada bismo u istraživanju koristili veći uzorak.

Na kraju, možemo zaključiti da je postojeća klasifikacija na spoljašnje i unutrašnje granične neurone validna, kao i da ne postoji značajna povezanost morfologije neurona i starosti ispitanika.

Literatura

1. Sultan F, Hamodeh S and Baizer JS. The human dentate nucleus: A complex shape untangled. *Neuroscience* 2010; 167(4): 965-8.
2. Dum RP and Strick PL. An unfolded map of the cerebellar dentate nucleus and its projections to the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 2003; 89(1): 634-9.
3. Marić DL, Milošević NT, Jelinek HF and Rajković K. Neurons of the human dentate nucleus: box-count method in the quantitative analysis of cell morphology. In: *Proceedings of 19th International Conference on Control Systems and Computer Science, Vol. 2: Interdisciplinary approaches in fractal analysis IAFA 2013*, I. Dumitrache, A. Magda Florea, F. Pop, Eds. Los Alamitos: The Institute of Electrical and Electronics Engineers; 2013, p. 319-24.
4. Grbatinić I, Marić DL and Milosevic NT. Neurons from the adult human dentate nucleus: neural networks in the neuron classification. *J Theor Biol* 2015; 370: 11-20
5. Krstonošić B, Milošević NT, Marić DL and Babović S. Quantitative analysis of spiny neurons in the adult human caudate nucleus: can it confirm the current qualitative cell classification? *Acta Neurol Belg* 2014; doi: 10.1007/s13760-014-0365-0.
6. Milošević NT. Fractal analysis of two dimensional images: parameters of the space-filling and shape. In: *Proceedings of 20th International Conference on Control Systems and Computer Science, Vol. 2: IAFA: Fractal Analysis of Medical Images*, I. Dumitrache, A. Magda Florea, F. Pop, A. Dumitrascu, Eds. Los Alamitos: The Institute of Electrical and Electronics Engineers 2015, p. 539-44.
7. Smith TG, Lange GD and Marks WB. Fractal methods and results in cellular morphology – dimensions, lacunarity and multifractals. *J Neurosci Methods* 1996; 69(2): 123-36.
8. Jelinek HF and Fernández E. Neurons and fractals: how reliable and useful are calculations of fractal dimension? *J Neurosci Methods* 1998; 81: 9-18.
9. Zhang TY and Suen CY. A fast parallel algorithm for thinning digital patterns. *CACM* 1984; 27: 236-39.
10. Milošević NT. The morphology of brain neurons: box-counting method in quantitative analysis of 2D image, In: *The Fractal Geometry of the Brain*, A. Di Ieva, Ed. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2016, p. 109-27.
11. Ristanović D, Milosevic NT, Stefanovic BD, Marić DL and Rajkovic K. Morphology and classification of large neurons in the adult human dentate nucleus: a qualitative and quantitative analysis of 2D images. *Neurosci Res* 2010; 67: 1-7.
12. Grbatinić I and Milošević N. Classification of adult human dentate nucleus border neurons: Artificial neural networks and multidimensional approach. *J Theor Biol* 2016; 404: 273-284.
13. Marić DL. *Qualitative and Quantitative Analysis of Adult Human Dentate Nucleus Neurons Morphology* (PhD thesis). Serbia: University of Novi Sad, 2010.