

УДК: 519.8

Моделирование морфологии астроцитов с применением алгоритма колонизации пространства

А. Н. Крючечникова^{1,a}, Т. Г. Левдик^{1,b}, А. Р. Браже^{1,2,c}

¹Отдел молекулярной нейробиологии, Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук,
Россия, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

²Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

E-mail: ^a anyak2802@gmail.com, ^b tanysa97@mail.ru, ^c brazhe@biophys.msu.ru

Получено 23.11.2024.

Принято к публикации 03.12.2024.

В настоящей работе рассматривается феноменологический алгоритм генерации морфологии глиальных клеток мозга — астроцитов, основанный на морфометрических данных протоплазматических астроцитов и общих тенденциях развития данного типа клеток *in vivo*, описанных в литературе. Мы адаптировали алгоритм пространственной колонизации (Space Colonization Algorithm, SCA) для процедурной генерации полной астроцитарной морфологии. Используемые в генерации аттракторные точки распределялись в пространственном объеме в соответствии с плотностью распределения синапсов в ткани гиппокампа на первой неделе постнатального развития мозга крысы. Нами были проанализированы и сопоставлены данные реконструкций астроцитарных морфологий на разных этапах развития мозга с использованием таких методик и параметров, как анализ Шолля, число точек ветвления, число терминалей, общая длина дерева и максимальный порядок ветвления. Используя данные морфометрического анализа протоплазматических астроцитов животных разных возрастов, были подобраны необходимые параметры генерации для получения наиболее реалистичных трехмерных моделей морфологии клеток. Мы показали, что разработанный нами алгоритм позволяет не только получить геометрию отдельных клеток, например, для задач вычислительной биологии, но и воссоздать феномен доменной организации клеточной популяции. Доменная организация в ходе генерации морфологий возникает из-за конкуренции клеток за территорию и присвоения их отростками уникальных аттракторных точек, которые становятся недоступными для других клеток и их отростков. Кроме того, нами было разработано дополнение оригинального алгоритма, позволяющее производить генерацию морфологии в две фазы, имитируя двухстадийное развитие структуры астроцитов на первой и третьей-четвертой неделях постнатального развития мозга крысы. Для достижения этого результата мы прибегаем к введению двух типов аттракторов, чтобы разделить две различные стратегии роста во времени: быстрое исследование пространства слабоветвящимися отростками и созревание сложной морфологии за счет обильного ветвления. Мы предполагаем, что модификация алгоритма с введением динамической генерации аттракторов может объяснить процесс формирования тонких структур астроцитарной клетки.

Ключевые слова: глия, астроцит, математическое моделирование, морфология

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-44-00103.

UDC: 519.8

Modelling of astrocyte morphology with space colonization algorithm

A. N. Kriuchechnikova^{1,a}, T. G. Levdik^{1,b}, A. R. Brazhe^{1,2,c}

¹Department of Molecular Neurobiology, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
16/10 Miklukho-Maklaya st., GSP-7, Moscow, Russia

²Department of Biophysics, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University,
1/24 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia

E-mail: ^a anyak2802@gmail.com, ^b tanyasa97@mail.ru, ^c brazhe@biophys.msu.ru

Received 23.11.2024.

Accepted for publication 03.12.2024.

We examine a phenomenological algorithm for generating morphology of astrocytes, a major class of glial brain cells, based on morphometric data of rat brain protoplasmic astrocytes and observations of general cell development trends in vivo, based on current literature. We adapted the Space Colonization Algorithm (SCA) for procedural generation of astrocytic morphology from scratch. Attractor points used in generation were spatially distributed in the model volume according to the synapse distribution density in the rat hippocampus tissue during the first week of postnatal brain development. We analyzed and compared astrocytic morphology reconstructions at different brain development stages using morphometry estimation techniques such as Sholl analysis, number of bifurcations, number of terminals, total tree length, and maximum branching order. Using morphometric data from protoplasmic astrocytes of rats at different ages, we selected the necessary generation parameters to obtain the most realistic three-dimensional cell morphology models. We demonstrate that our proposed algorithm allows not only to obtain individual cell geometry but also recreate the phenomenon of tiling domain organization in the cell populations. In our algorithm tiling emerges due to the cell competition for territory and the assignment of unique attractor points to their processes, which then become unavailable to other cells and their processes. We further extend the original algorithm by splitting morphology generation in two phases, thereby simulating astrocyte tree structure development during the first and third-fourth weeks of rat postnatal brain development: rapid space exploration at the first stage and extensive branching at the second stage. To this end, we introduce two attractor types to separate two different growth strategies in time. We hypothesize that the extended algorithm with dynamic attractor generation can explain the formation process of fine astrocyte cell structures and maturation of astrocytic arborizations.

Keywords: glia, astrocyte, computational modeling, morphology

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2025, vol. 17, no. 3, pp. 465–481 (Russian).

This work was supported by RSF grant No. 23-44-00103.

Введение

Астроциты представляют собой глиальные клетки центральной нервной системы (ЦНС) эпителиального происхождения, активно ветвящиеся и обладающие выраженной морфологической и функциональной гетерогенностью. Во многом нормальное функционирование нервных клеток и ткани мозга в целом обеспечивается и поддерживается за счет астроцитов. Последние исследования взаимодействия нейронов и астроглии показывают, что роль астроцитов не ограничивается только лишь поддержанием гомеостаза нервной ткани [Verkhratsky, Nedergaard, 2018; Brazhe et al., 2023; Baldwin et al., 2024]. Ниже будут более подробно рассмотрены особенности морфологии астроцитов серого вещества мозга и основные подходы к моделированию разветвленных пространственных структур. Физиологические изменения в функционировании мозга, в частности при патологических состояниях, сопровождаются изменением морфологии астроцитов, что вызывает особый интерес с точки зрения исследования и диагностики [Sofroniew, 2020; Liddelov, Barres, 2017].

Морфология астроцитов и особенности ее развития

Форма и функциональные особенности астроцитов отличаются как в различных частях мозга, так и в пределах одного структурного региона [Batiuk et al., 2020]. Подавляющее большинство зрелых астроцитов организовано в объеме ткани таким образом, что каждая отдельная клетка занимает свою строго определенную пространственную область — *домен*, в пределах которого практически не происходит перекрываний с отростками соседних клеток, благодаря чему астроциты обеспечивают пространственное разбиение отдельных нейронов и групп синапсов на отдельные группы, способствуя компарментализации нейронных сетей [Hayashi et al., 2022]. На рис. 1, *а* в качестве примеров приведены конфокальные изображения пар соседних астроцитов серого вещества коры головного мозга крыс различных возрастов. Видно, что в развитом мозге астроциты обильно ветвятся и образуют пространственные домены. Взаимодействие с синапсами и создаваемое астроцитами разграничение клеточных территорий вместе обеспечивают формирование областей контакта нейронов, связанных одним общим астроцитом. Таким образом, астроциты охватывают и могут регулировать множество синапсов, расположенных в пределах своего пространственного домена. Наиболее выражены астроцитарные домены в областях мозга, отличающихся высокой синаптической плотностью, таких как кора и гиппокамп, что может указывать на значимость доменной организации в механизме модуляции активности синапса астроцитами [Robertson, 2013].

В мозге модельных животных — мышей и крыс — подавляющее число астроцитов формируется ко второй неделе постнатального развития (P14), мигрируя и заселяя определенные пространственные домены мозга, где происходит их окончательное созревание к 4-й неделе постнатального периода (P32) [Bandeira et al., 2009; Clavreul et al., 2022]. Можно выделить несколько стадий созревания астроцитов (рис. 1, *б*): к *первой неделе* астроциты гиппокампа мыши обладают прямыми относительно длинными отростками первого и второго порядков ветвления, отростки направлены радиально от сомы, слабо разветвлены и могут перекрываться между соседними астроцитами; ко *второй неделе* значительно повышаются степень ветвления отростков и общее число отростков второго порядка, более выраженными становятся астроцитарные домены; начиная с *третьей недели* астроциты постепенно приобретают свою окончательную, зрелую форму: значительно более развитыми и разветвленными становятся тонкие отростки, появляются также и ультратонкие структуры («листочки»), окончательно формируются и границы астроцитарных доменов. Примечательно, что к третьей-четвертой неделям развития гиппокампа мыши наблюдается резкое увеличение числа синапсов до 4–5 раз, что предположительно может являться движущим механизмом возникновения новых тонких структур и повышения степени разветвленности астроцитов.

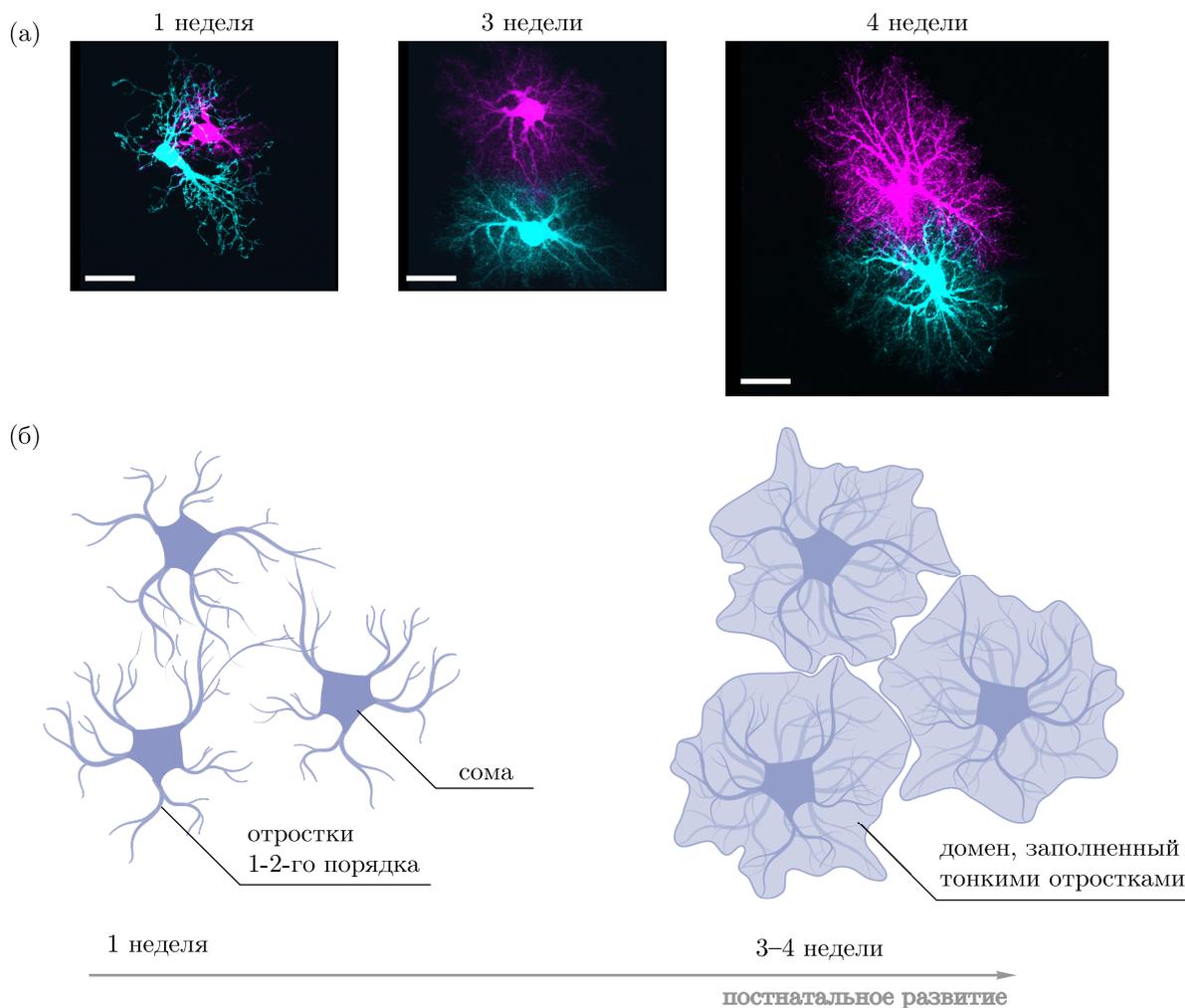


Рис. 1. Становление морфологии астроцитов в ходе постнатального развития. (а) Максимальные проекции трехмерных микрофотографий астроцитов, заполненных флуоресцентными красителями через пипетку, во всех трех изображениях соседние астроциты заполнялись красителем разного цвета (слева направо): 1 неделя развития, 3 недели, 4 недели; шкала масштаба — 10 мкм. Данные в открытом доступе из работы [Bushong et al., 2002]. (б) Схема морфологического созревания астроцитов: первоначально (слева) отростков немного, ветвление умеренное, отростки соседних клеток существенно перекрываются; по мере созревания (справа), помимо отростков первого-второго порядка, появляется масса мелких отростков и листочков, формируются пространственные домены астроцитов

Подходы к моделированию ветвящихся структур

Разветвленные паттерны широко распространены в природе, особенно в структурах, связанных с потребностью в эффективном транспорте различных веществ. В этой связи моделирование пространственной геометрии ветвящихся паттернов является довольно распространенной задачей. Особенное внимание уделяется структурным элементам органов, морфология которых непосредственно определяет эффективность их функционирования [Yu et al., 2019]. Например, для моделирования иннервации хвоста данио-рерио [Uçar et al., 2021] была использована модель на основе случайных блужданий с аннигиляцией, схожая по принципу действия с агрегацией, ограниченной диффузией. Дуальным аналогом агрегации, ограниченной диффузии является неустойчивость границы раздела между несмешивающимися жидкостями, например при впрыскивании менее вязкой жидкости в более вязкую. Аналогичной системой является формирование

структур в фронте коррозии металлов, где добавляется сложность в виде локальных неоднородностей материала [Шибков, Кочегаров, 2021].

Разветвленные иерархические структуры возникают в задачах, связанных с эффективным транспортом между отдельными элементами более крупной системы [Durand, 2007; Ronellenfisch, Katifori, 2019]. Это определяет востребованность моделирования таких структур в виде динамических направленных графов, оптимизирующих «поток» по ребрам между вершинами графов. При этом число вершин графа может достигать нескольких сотен тысяч [Булатов и др., 2021]. Ряд более простых популярных алгоритмов построения ветвящихся структур основан на связывании заранее заданного облака точек деревом, обладающим какими-либо целевыми свойствами. Например, для моделирования ветвления нейрональных дендритов был разработан алгоритм минимального покрывающего дерева с дополнительным фактором, балансирующим штраф на суммарную длину всего дерева и штраф на длину пути от каждой точки до центра дерева (тела нейрона) [Cuntz et al., 2010].

Таким образом, построение морфологии клетки сводится к заданию статистического распределения частоты встречаемости ветвей клетки в пространстве и построения полей распределения (ориг. *spanning fields*), служащих основой для генерации облака аттракторных точек и дальнейшего построения дерева с заданным балансирующим фактором.

Построение дерева путем соединения аттракторных точек, размещенных в пространстве произвольной геометрии, также используется в алгоритме колонизации пространства (ориг. *Space Colonization Algorithm*, SCA), изначально разработанном для моделирования морфологии жилкования листьев и кроны деревьев [Runions et al., 2007].

В данном подходе формирование дерева происходит от корня к терминальным ветвям. На начальном этапе алгоритма создаются произвольно сгенерированное облако точек (с количеством порядка сотен или тысяч), координаты точки начала роста и вектор направления роста. Облако точек является набором аттрактантов, наличие которых указывает на доступное, незаполненное структурой пространство. На каждом шаге итеративного процесса выполняется построение сегментов фиксированной длины («рост дерева»), расположенных вдоль вектора направления роста, направление которого определяется аттракторными точками, лежащими в радиусе чувствительности (D_i , Influence Distance) данного узла. Если же точки, находящиеся около узла, лежат в пределах радиуса удаления (D_k , Kill Distance), то они исключаются из множества точек, влияющих на направление роста дерева.

Данный алгоритм имеет схожие черты с представленным в работе [Cuntz et al., 2010] механизмом конкуренции за аттракторные точки, однако ключевое его отличие заключается в том, что в SCA направление роста дерева рассчитывается как среднее взвешенное направление роста к набору точек, попавших в аттракторную область D_i , в то время как другой использует аттракторные точки непосредственно в качестве узлов дерева.

В случае астроцитарных клеток на их морфогенез оказывают влияние: (i) факторы внешнего воздействия в виде аттракторных молекул, выделяемых нейронами; (ii) пространственная геометрия среды; (iii) внутренние свойства стохастического роста с самоизбеганием и избеганием пересечения отростками соседних астроцитарных доменов; (iv) эффективное заполнение пространства с образованием максимального числа контактов типа «синапс – астроцит».

Принимая во внимание все обозначенные выше особенности формирования астроцитарной морфологии, одним из наиболее перспективных алгоритмов для их моделирования можно назвать алгоритм колонизации пространства. Такая модель не только объединяет в себе основные свойства моделей ветвящихся структур (избегания столкновений, апикального роста ветвей), но и учитывает наличие ориентиров из внешней среды. Ранее алгоритм SCA для моделирования морфологии астроцитов использовался в работе проекта Blue Brain, стремящейся воспроизвести строение кортикальной колонки мыши, учитывая нейрон-глиальные, глио-глиальные и глиоваскулярные взаимодействия [Zisis et al., 2021].

В настоящей работе мы также используем алгоритм SCA для моделирования пространственного строения астроцитов, но адаптируем его для более физиологичного описания стадий морфогенеза астроцитов путем добавления поколений аттракторных точек с различными свойствами. Поскольку основной объем доступных реконструкций морфологии астроцитов по экспериментальным данным ограничивается только основными, хорошо различимыми отростками, нашей целью было воспроизвести в модели ветвление именно таких отростков.

Материалы и методы исследования

Обработка, анализ данных и генерация модельных морфологий проводились с помощью языка программирования Python3, его библиотек и модулей, находящихся в свободном доступе. Исходный код модели и разработанные в ходе исследования программы по обработке также находятся в свободном доступе на платформе GitHub (для получения ссылки на исходный код просьба обращаться на почту, указанную в контактах). В качестве референсных данных для валидации результатов симуляции и получения статистических данных о морфологии астроцитарных клеток использовались как реконструкции трехмерных изображений клеток из коллекции, представленной в работе [Bushong et al., 2002], — изображения протоплазматических астроцитов гиппокампа трех групп крыс-самцов *Sprague-Dawley* в возрасте 1, 3 и 4 недели, окрашенных с помощью флуоресцентного красителя «люцифер желтый» (*lucifer yellow*), так и автоматические реконструкции, представленные в [Clavreul et al., 2019], — изображения протоплазматических астроцитов кортекса трансгенных мышей *CAG-Cytbow* в возрасте 1 и 3 недели, окрашенных с применением флуоресцентных белков *mCerulean/mTurquoise2*, *mEYFP*, *tdTomato/mCherry*, экспрессируемых под *CAG*-промотером.

Использованный метод автоматической реконструкции астроцитов из [Bushong et al., 2002] основан на алгоритме построения плотного графа, где узлами являются воксели изображения, принадлежащие астроциту, а вес ребер между соседними узлами задается на основании направлений собственных векторов матрицы Гессе для интенсивностей окрашивания в вокселе и значении контраста, основанного на собственных значениях матрицы Гессе и выделяющего анизотропные яркие структуры. Собственные векторы и значения матрицы Гессе определяют главные направления и резкость локальных изменений яркости [Sato et al., 1998]. После построения графа из каждой граничной точки домена строится оптимальный путь до сомы. После чего точки, которые встречаются в построенных путях не более одного раза, удаляются из графа. Полученный остов и будет являться итоговым графом морфологии клетки. Полученные в результате реконструкции сохранялись в файлах формата *.swc* для дальнейшего морфометрического анализа.

Морфометрический анализ

Для количественного описания трехмерной структуры астроцитов применялся классический анализ по Шоллю, который представляет собой график числа пересечений окружности с радиусом r и центром в соме с отростками анализируемой клетки как функцию от r . Поскольку ветвление астроцитарных отростков можно представить как иерархическую структуру, естественной репрезентацией таких реконструкций морфологии астроцитов являются направленные графы. Часть морфометрических характеристик, таких как суммарное число точек ветвления (число узлов графа, имеющее более одной дочерней связи), число терминалей (число узлов графа, не имеющих дочерних связей), общая длина дерева (сумма длин всех ребер) и максимальный порядок ветвления (максимальное число терминалей, до которых можно дойти от какого-либо узла, двигаясь только от сомы), оценивались на основании анализа полученных графов.

Проверка статистической значимости результатов оценки влияния параметров D_k и D_i на топологические характеристики структуры синтезированных клеток осуществлялась с использованием теста ранговой корреляции Спирмена ($p < 0,05$) при оценке влияния параметров моде-

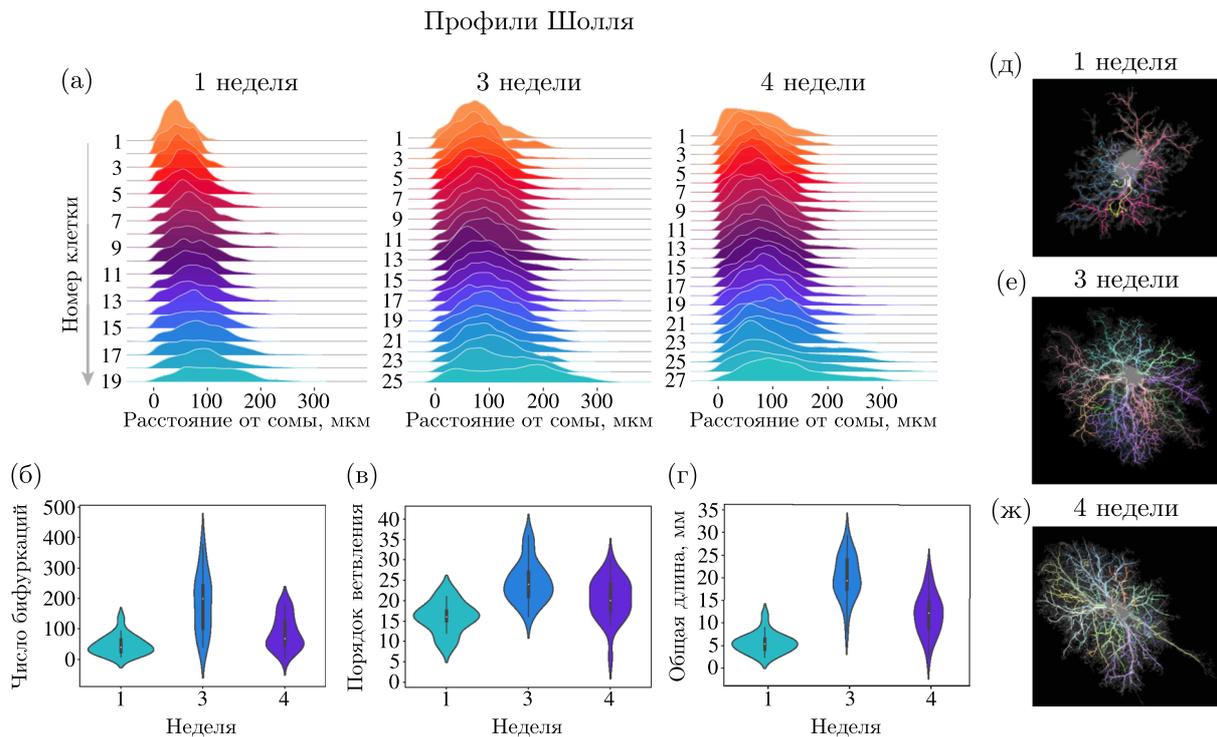


Рис. 2. Оценка морфометрических характеристик астроцитов на разных этапах развития на основании автоматической реконструкций клеток из работы [Bushong et al., 2002] методом вычисления собственных векторов матрицы Гессе. (а) Сравнение профилей Шолля трех выборок реконструированных клеток, относящихся к первой, второй и третьей неделям развития соответственно. (б, в, г) Оценка распределения морфометрических характеристик между тремя группами астроцитов разных возрастов, профили Шолля которых представлены на (а). На иллюстрациях последовательно приведены диаграммы распределения по числу точек ветвления, максимальному порядку ветвления дерева и его общей длине. (д, е, ж) Реконструкции изображений клеток из трех выборок разных возрастов. Нанесенные на микрофотографии астроцитов цветные линии показывают скелетную реконструкцию сегментов клетки. Разными цветами обозначены сегменты клетки с разными основаниями ветвей, выходящих из сомы

ли D_i и D_k на структуру клетки, а также критерия Краскела – Уоллиса для оценки распределения морфометрических признаков в трех группах клеток разных возрастов.

Алгоритм колонизации пространства и его модификации

В качестве основы для модели использовался классический алгоритм колонизации пространства (Space Colonization) [Runions et al., 2007]. К оригинальной модели роста дерева были добавлены свойства, регулирующие развитие морфологии в соответствии с характеристиками реальных астроцитов. Исходя из этого принципа, были добавлены:

- верхняя граница количества дочерних узлов: не более 5;
- ограничение частоты возникающих разветвлений с опорой на статистические данные о плотности распределения ветвей в зависимости от расстояния от сомы;
- верхняя граница размеров растущей клетки (выраженная в общей длине дерева) в соответствии с литературными данными.

Плотность распределения аттракторных точек на начальном этапе генерации соответствовала плотности распределения синапсов в ткани гиппокампа на этапе P7 постнатального развития мозга мыши.

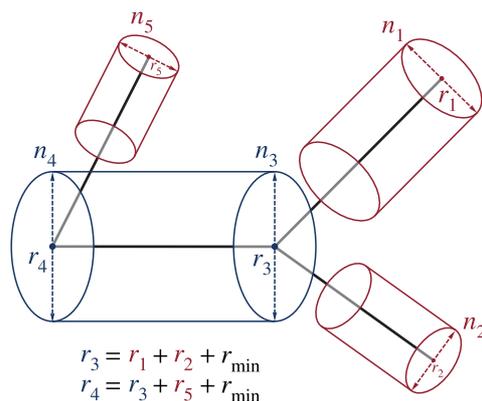


Рис. 3. Определение толщины ветви, основанное на теории сочленения труб. Расчет толщины ветвей выполняется на основании подхода, предложенного в [Shinozaki et al., 1964] (теория сочленения труб, или pipe model theory). Толщины ветвей вычисляются для сегментов, заданных между каждой парой связанных между собой узлов модельного дерева. Двигаясь от концевых участков, не имеющих дочерних ветвей (терминалей), для которых радиус r_{\min} задан по умолчанию, радиус узла рассчитывается как сумма радиусов вышестоящих прикрепленных к нему узлов

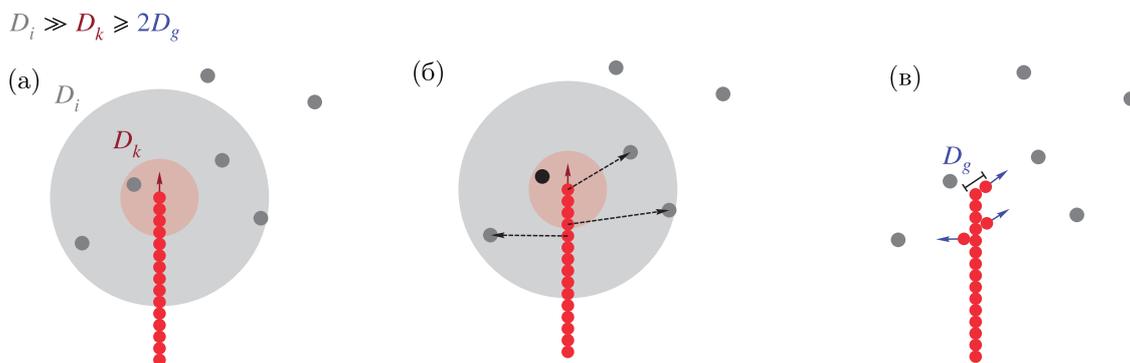


Рис. 4. Иллюстрация работы цикла алгоритма Space Colonization. (а) Формирование начального сегмента ветви вдоль вектора роста. Красные точки обозначают последовательные узлы уже сгенерированной структуры. Серые точки — аттракторы, определяющие направление роста. (б) Вычисление новых направлений роста на основе аттракторов, находящихся в радиусе чувствительности (D_i). Черные стрелки обозначают векторы воздействия аттракторов на растущую структуру. (в) Удаление аттракторов, находящихся в пределах радиуса удаления (D_k), и обновление направлений роста. Синие стрелки показывают расхождение векторов роста на концах структуры

На начальном этапе алгоритма создаются произвольно сгенерированное облако точек, координаты точки начала роста (сома астроцита) и начальный вектор направления роста. Облако точек является набором аттрактантов, наличие которых указывает на незанятое пространство. На каждом шаге итеративного процесса выполняется построение сегментов фиксированной длины, расположенных вдоль текущего вектора направления роста для каждого сегмента.

Вектор направления роста рассчитывается на каждом шаге алгоритма. Если на каком-либо из этапов в радиус чувствительности (D_i) текущей точки роста попадает какая-то из аттракторных точек, то вектор направления роста для данного узла дерева смещается к этой точке:

$$\vec{D}_b = \frac{1}{i_p} \sum_{n=0}^{i_p-1} \frac{\vec{P}[n] - \vec{E}_{b-1}}{\|\vec{P}[n] - \vec{E}_{b-1}\|}. \quad (1)$$

Таблица 1. Основные параметры, используемые в модели

Параметры алгоритма	
Название	Описание
D_i (influence distance)	Радиус чувствительности. Радиус области вокруг узла дерева, в пределах которого им распознаются аттракторные точки
D_k (kill distance)	Радиус удаления. Радиус области вокруг узла дерева, в пределах которой аттракторные точки инактивируются и перестают воздействовать на направление вектора роста сегментов
D_g (growth distance)	Длина элементарного сегмента между двумя связанными между собой узлами дерева. Во избежание некорректной работы кода необходимо, чтобы значение D_g было в два или более раз меньше значения D_k

Иначе говоря, направление роста новой ветви (D) рассчитывается как нормированная сумма нормированных направлений между вектором текущего направления роста (E) и направлений к n ближайшим аттракторам (P) в радиусе чувствительности (D_i). Аттракторы удаляются по мере достижения указанного пользователем расстояния между ними и деревом (D_k). Полученный в результате вектор роста отражает координаты следующего построенного узла. На этом этапе по необходимости убираются аттракторные точки, попавшие в область D_k , после чего начинается новая итерация алгоритма (табл. 1). Возникновение боковых ветвей в общем случае определяется появлением нескольких аттракторов в радиусе чувствительности.

Так как по мере удаления от центра радиус астроцитарных ветвей постепенно уменьшается, для имитации толщины ветвей дерева применялся подход теории сочленения труб, в котором диаметр отростка в каждой точке сочленения равен сумме диаметров дочерних отростков (*pipe model theory*) [Shinozaki et al., 1964]. Для его реализации был задан минимальный возможный радиус ветви $r_{\min} \leq 0,005$ в соответствии с [Reichenbach et al., 2010], где толщина тонких отростков составляет $d \approx 50$ нм, и далее применяется правило, определяющее толщину ветви в каждом узле дерева (рис. 3).

Визуализация полученных морфологий осуществлялась на базе программы Blender с применением библиотеки NeuroMorphoVis [Abdellah et al., 2021].

Результаты и обсуждение

Параметрами модели, определяющими конечную морфологию дерева, являются значения радиуса чувствительности (Influence Distance, D_i) и области удаления аттракторов (Kill Distance, D_k). Оба этих параметра можно параметризовать длиной новых сегментов дерева, т. е. значением дистанции, на которой возникает новый узел дерева за одну итерацию алгоритма (Growth Distance, D_g — минимальная длина сегмента):

$$\begin{aligned} D'_i &= D_i \cdot D_g, \\ D'_k &= D_k \cdot D_g. \end{aligned} \tag{2}$$

Минимальная длина сегмента выбиралась в соответствии с масштабами выбранной области генерации. Таким образом, в качестве наиболее оптимального варианта относительно масштабов астроцитарной клетки было выбрано значение $D_g = 0,001$.

С применением алгоритма SCA было сгенерировано 2000 тестовых клеток: использовалось 20 начальных условий (пространственных паттернов аттракторных точек), для каждого варианта строились деревья для комбинации из 10 значений D_i и 10 значений D_k . В результате было показано статистически значимое влияние параметров D_i и D_k на ряд морфометрических

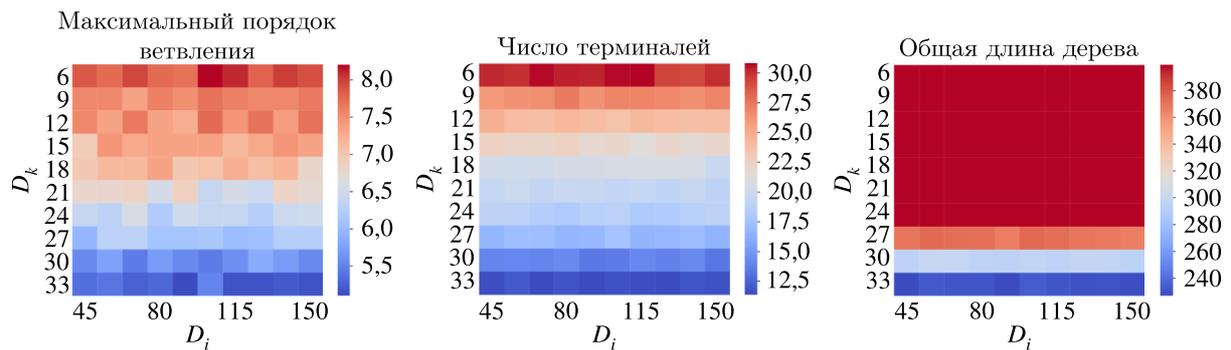


Рис. 5. Тепловые карты зависимостей морфометрических характеристик модельных клеток от параметров D_i и D_k . При высоких значениях D_k (радиуса удаления) снижаются максимальный порядок ветвления, количество терминальных ветвей, общая длина дерева. Параметр D_i (радиус чувствительности) оказывает влияние на структуру только при малых значениях данного параметра в случае максимального порядка ветвления. Коэффициенты корреляции Спирмена для параметров для максимального порядка ветвления: $\rho(D_k) = 0,56$, $\rho(D_i) = 0,3$; числа терминалей: $\rho(D_k) = 0,67$, $\rho(D_i) = 0,042$; общей длины дерева: $\rho(D_k) = 0,65$, $\rho(D_i) = 10^{-6}$ (p-value < 0,05 для всех случаев)

характеристик (рис. 5). Для проверки достоверности полученных результатов использовался корреляционный тест Спирмена. Увеличение значения параметра D_k ведет к снижению общей длины дерева, уменьшению общего объема дерева и снижению максимального порядка ветвления. Число терминальных отростков значимо зависит только от параметра D_k : число терминалей уменьшается с ростом D_k . Параметр D_i в меньшей степени влияет на конечную морфологию и только при малых значениях параметра ($\frac{D'_i}{D'_k} \approx 2$). Эффект усиливается в случае ограниченного в пространстве облака точек.

Таким образом, конечная морфология дерева определяется сочетанием указанных параметров. Интересным дальнейшим развитием алгоритма представляется изменение значения параметров в процессе выполнения алгоритма путем привязывания их изменения к внешним источникам воздействия (например, количество или свойства аттракторов). Эффект изменения динамики и качества ветвления действительно наблюдается в живых астроцитах как на этапе созревания, так и в случае физиологических изменений в результате перехода к реактивному астроглиозу.

Модификации алгоритма: фазы роста

Для решения задачи приближения модельной морфологии к естественной нами была предложена модель динамики роста астроцитарной клетки на этапе созревания, претерпевающей изменения в течение первого месяца постнатального развития мозга. Аналогично первым двум неделям развития, когда рост ветвей астроцита происходит преимущественно в длину, работает первая фаза алгоритма — элонгация. На этом этапе перед началом синтеза дерева в пространстве генерируются относительно разреженные и равномерно распределенные аттракторы первого типа. Их взаимодействие с узлами дерева определяется соотношением значений параметров $\frac{D'_i}{D'_k} \approx 5$ и $D'_k > 25D'_g$ для обеспечения снижения тенденции к ветвлению дерева и уменьшению угла между соседними сегментами ветви. По достижении клеткой пределов ее роста, соответствующих физиологическому пределу размера астроцитарного домена, включается вторая фаза алгоритма — созревание. В этой фазе используется другой тип аттракторных точек. Обращая внимание на то, что созревание реальных астроцитов сопровождается возрастанием количества синапсов в объеме нервной ткани, который они занимают, мы будем исходить из того, что второй тип аттракторных точек имитирует тенденцию астроцита охватывать синаптические окончания своими

тонкими отростками. В отличие от аттракторных точек первого типа, которые удалялись только по мере попадания в область D_k , данные аттракторы обладают ограниченным временем жизни. Их время жизни продлевается на один цикл в том случае, если между ними и каким-либо из узлов дерева устанавливается связь. Если за время жизни аттрактор второго типа окажется на расстоянии D_k относительно дерева, он также будет удален и участия в дальнейшем формировании дерева принимать не будет. Так как в ходе созревания стратегия роста меняется с образования прямых протяженных отростков на формирование большого числа новых малых ветвей, необходимо изменить и соотношение параметров: $\frac{D_i}{D_k} \gg 5$ и $D_k \approx 2D_g$. Предлагаемый двухстадийный алгоритм позволяет имитировать ход развития астроцитов в естественных условиях организма, что позволяет дополнительно оценить вклад в морфологию клетки как первой, так и второй фазы роста. Мы прибегаем к введению двух типов аттрактантов для того, чтобы разделить две различные стратегии роста во времени и динамике роста.

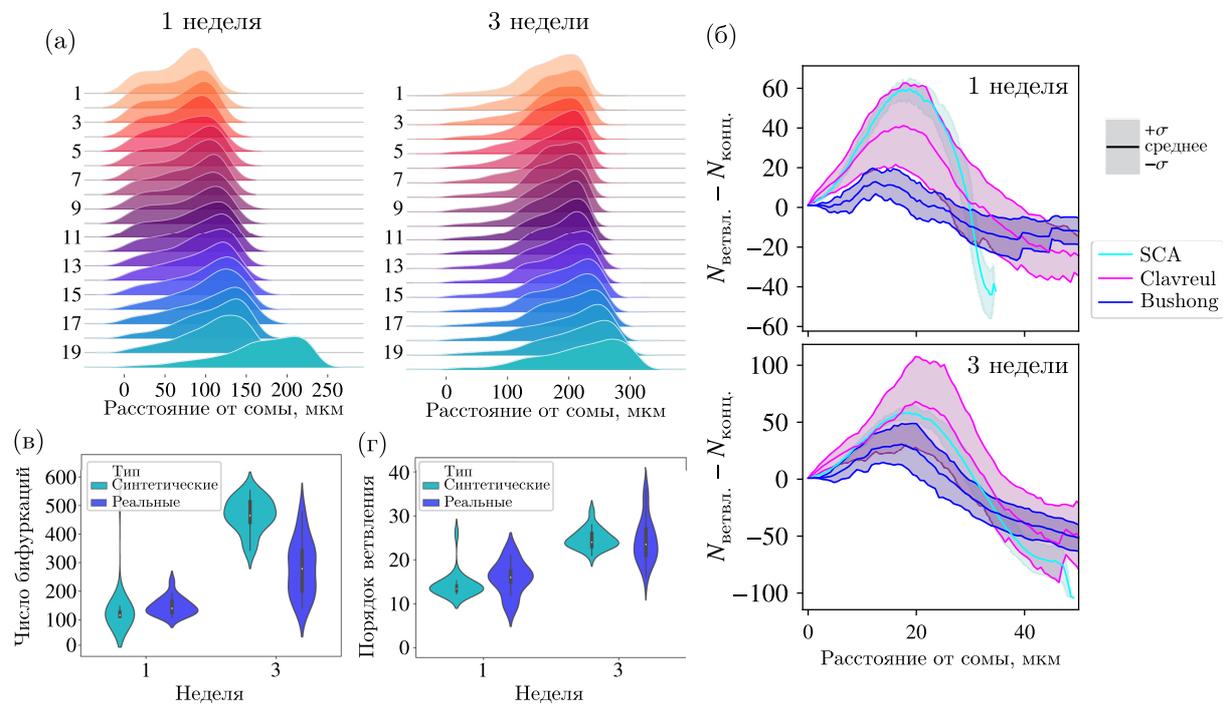


Рис. 6. Оценка морфометрических характеристик искусственных астроцитов, сгенерированных при помощи модели с двумя фазами развития. (а) Сравнение профилей Шолля двух выборок модельных клеток, относящихся к условным первой и третьей неделям развития (незрелые и зрелые). Диаграммы иллюстрируют количество пересечений концентрических окружностей различного радиуса (шаг 0,1 мкм) с морфологиями различных клеток. Каждый профиль Шолля соответствует самостоятельной клетке, номер которой отображен в столбце слева от графиков. (б) Профили ветвления [Khalil et al., 2022] (разница между числом точек ветвления и числом конечных участков, расположенных не далее заданного радиуса, как функция от расстояния до тела клетки) для экспериментальных (Clavreul, Bushong) и модельных (SCA) астроцитов на разных стадиях развития, 1 неделя — сверху, 3 недели — внизу. Группы экспериментальных астроцитов названы по соответствующим публикациям: Clavreul [Clavreul et al., 2019], Bushong [Bushong et al., 2002]. Кривые — средние значения, затененные участки — разброс \pm стандартное отклонение. (в, г) Оценка распределения морфометрических характеристик между тремя группами астроцитов разных возрастов, профили Шолля которых представлены на (а). На иллюстрациях последовательно приведены диаграммы распределения по общему числу точек ветвления (числовая характеристика разветвленности дерева, определяющая общее количество узлов, в которых происходит ветвление), максимальному порядку ветвления дерева (числовая характеристика, определяющая количество дочерних узлов в точках ветвления, исходящих из каждого узла, имеющего сомю клетки в качестве родительского узла) и его общей длины

С использованием модифицированного алгоритма колонизации пространства, включающего в себя два этапа с различающимися стратегиями роста, было построено две группы модельных клеток. Распределения аттракторных точек для них соответствовали плотности распределения синапсов в развивающемся гиппокампе (в соответствии с референсными гиппокампулярными астроцитами мозга крыс) для одной выборки и плотности распределения синапсов в верхних слоях зрелой коры для второй соответственно (рис. 6). По результатам статистического сравнения, данные группы клеток не имели резких различий по большинству морфометрических характеристик от их синтезированных версий. В работе [Khalil et al., 2022] было предложено несколько морфологических характеристик, следующих общей идеологии анализа по Шоллю, т. е. профили определенной морфологической метрики как функции от расстояния до тела клетки. Один из таких параметров — профиль ветвления — описывает морфологию дерева отростков через разницу между числом точек ветвления и числом концевых участков (листочков), расположенных не далее определенного радиуса от сомы. Видно, что профили ветвления модельных клеток укладываются в разбросы, характерные для набора экспериментальных данных (рис. 6, б). Тем не менее визуально число точек ветвления у модельных зрелых астроцитов превышает аналогичный параметр у реальных клеток. Это, очевидно, связано с тем, что реконструкция морфологии по флуоресцентным изображениям не всегда позволяет идентифицировать мелкие отростки, тогда как в модельных астроцитах они присутствуют, более детализированные реконструкции реальных астроцитов приблизили бы распределение точек ветвления к выборке модельных астроцитов (рис. 6, в, г). Кроме того, в силу фиксированно заданных параметров роста и отсутствия конкуренции за пространство вариативность внутри группы модельных клеток ниже, чем у референсной выборки. Это в первую очередь вызвано однородностью среды для генерации модельных клеток, что является редкостью для живых систем. Тем не менее структура модельных клеток имеет сходство с теми референсными астроцитами, которые наиболее часто встречаются в популяции, что заметно при сравнении профилей Шолля.

Одним из набирающих популярность способов морфометрической параметризации ветвящихся структур является так называемый топологический дескриптор морфологии (topological morphology descriptor, TMD) [Kanari et al., 2018]. Если вкратце, то этот подход рассматривает для каждой ветви взаимные плотности распределения расстояния до сомы от концевого сегмента и от точки слияния этой ветви с родительским отростком, так называемые персистентные диаграммы. Примеры трехмерных реконструкций морфологий и усредненные персистентные диаграммы модельных и экспериментальных астроцитов для двух стадий развития показаны на рис. 7. Видно, что персистентные диаграммы модельных астроцитов укладываются в естественный разброс экспериментальных данных.

Можно отметить визуальные различия между экспериментальными изображениями, приведенными на рис. 1 и 2, и модельными астроцитами на рис. 7: отростки незрелого астроцита выглядят более прямыми, а зрелый астроцит выглядит менее заполняющим пространство, чем экспериментальное изображение. Часть визуальных различий является особенностью визуализации модельных морфологий и реконструкций: на визуализации не представлена сома, модель сочленения труб лишь приблизительно соответствует реальному масштабированию толщины отростков с их порядком ветвления, кроме того, экспериментальные изображения также показывают и неразрешенные отростки и структуры, не попадающие в реконструкцию, тогда как в модельные репрезентации эти субклеточные элементы не попадают. Вдобавок зрелый модельный астроцит отражает в определенном смысле идеализированное представление о его структуре, поскольку его формирование проходило в изотропном пространстве без взаимодействия с соседними астроцитами, тогда как реальные астроциты конкурируют за пространство с соседними клетками и вынуждены адаптироваться к другим пространственным структурам ткани мозга: слоям нейронов, кровеносным сосудам и т. д. Создание модельных астроцитов в условиях про-

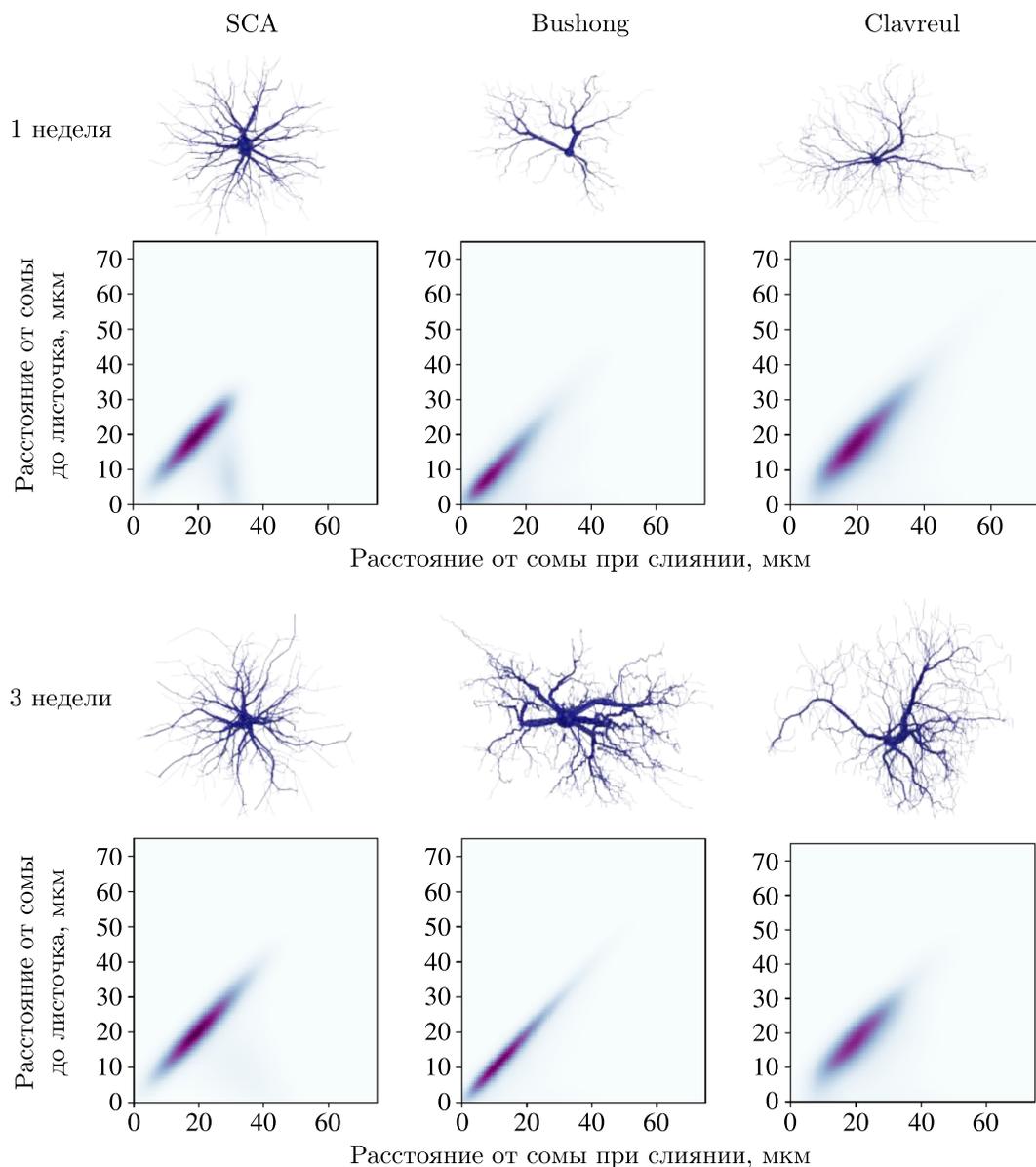


Рис. 7. Трёхмерные реконструкции и топологические метрики для экспериментальных и искусственных астроцитов, сгенерированных при помощи модели с двумя фазами развития. Вверху: примеры трёхмерных реконструкций и усредненные персистентные диаграммы паттернов ветвления для модельных (SCA) и экспериментальных (Bushong, Clavreul) незрелых астроцитов на 7-й день постнатального развития. Внизу: примеры трёхмерных реконструкций и усредненные персистентные диаграммы паттернов ветвления для модельных и экспериментальных зрелых астроцитов на 21-й день постнатального развития. Для наглядности все морфологии построены с одинаковым масштабированием диаметра отростков согласно модели сочленения труб. Группы экспериментальных астроцитов названы по фамилии первого автора в соответствующих публикациях [Clavreul et al., 2019; Bushong et al., 2002]

пространственных ограничений и конкуренции за объем представляется интересной задачей, однако выходит за рамки данной работы. Наконец, из-за методических ограничений пространственные портреты реконструкции экспериментальных астроцитов часто имеют худшее разрешение и неполный объем вдоль оси Z , тогда как модельные астроциты не имеют таких ограничений.

Заключение

Морфологическое созревание астроцитов зависит от химических сигналов, секретируемых нейронами, а также от прямых контактных взаимодействий с нейронами и другими астроцитами. В частности, химические сигналы могут включать такие классические сигнальные молекулы, как нейротрофический фактор мозга (BDNF), белки семейства Sonic hedgehog, а также нейротрансмиттеры, выделяемые нейронами (глутамат, ГАМК), и нейромодуляторы, такие как норадреналин [Holt et al., 2019; Xie et al., 2022; Morel et al., 2014; Cheng et al., 2023; Rosenberg et al., 2023]. Нейролигины, экспрессирующиеся на поверхности астроцитов, участвуют в синхронизации синаптогенеза и созревания астроцитарной морфологии [Stogsdill et al., 2017]. В то же время молекулы клеточной адгезии (СAM) необходимы для установления пространственных доменов и паттернов ветвления астроцитов, при этом самоизбегание собственных отростков и определение «свой – чужой» определяется особым семейством кадгеринов и важно для фазы экспансивного роста на ранних этапах и этапах формирования пространственных доменов позднее соответственно [Baldwin et al., 2024; Lee et al., 2025]. Резюмируем: становление нормальной морфологии астроцитов зависит от целого ряда химических и контактных факторов, однако биофизические и молекулярные механизмы, которые определяют этот процесс, на настоящий момент пока недостаточно понятны [Baldwin et al., 2024].

В настоящей работе мы использовали алгоритм колонизации пространства скорее для феноменологического воспроизведения морфологии астроцитов, чем для имитации механизмов морфогенеза этих клеток, однако можно провести аналогии между свойствами алгоритма и механизмами созревания астроцитов. Самоизбегание и отсутствие самопересечений отростков заложены в сам механизм работы алгоритма, поэтому не требуют дополнительного моделирования. Действие сигнальных молекул, заставляющее астроциты экспансивно захватывать окружающее пространство на ранних этапах развития, имитируется аттракторными точками первой фазы, обладающими большим расстоянием действия и сроком жизни, но относительно разреженными. Более плотно расположенные, но обладающие коротким радиусом действия и сроком жизни аттракторные точки второй фазы можно интерпретировать как устанавливающиеся синаптические контакты между нейронами, привлекающими за счет растекания нейромедиаторов рост тонких астроцитарных отростков в свою сторону.

Для получения наиболее естественных модельных структур мы исследовали, как параметры радиусов чувствительности и удаления влияют на конечную морфологию. Увеличение значения параметра D_k приводит к уменьшению общей длины и объема дерева, а также максимального порядка ветвления. Значение числа терминальных отростков зависит только от параметра D_k и понижается с его ростом. Параметр D_i оказывает влияние на структуру только при малых значениях параметра $\left(\frac{D_i}{D_k} \approx 2\right)$. Эффект усиливается в случае ограниченного в пространстве облака точек.

В результате мы пришли к двухфазной модели формирования морфологии астроцита с использованием алгоритма колонизации пространства, что позволило получить искусственные клетки, схожие по своей скелетной структуре с реальными астроцитами. Кроме того, так как в ходе генерации реализуются процесс конкуренции клеток за территорию и присваивание их отростками уникальных аттракторов, которые становятся недоступными для других клеток и их отростков, явление формирования пространственных доменов также отражается моделью.

Развитие данной работы может лежать в области дальнейшего исследования спектра морфологий, которые могут быть построены при помощи модифицированного алгоритма колонизации пространства: так, можно ожидать, что взаимные отношения между радиусом роста, радиусом удаления и радиусом влияния могут позволить изменять баланс между затратами на поддержание размера дерева и скоростью сообщения между концевыми отростками и сомой.

Кроме этого, длительность жизни и плотность аттракторных точек также могут влиять на характеристики паттернов ветвления модельных астроцитов. Мы планируем исследовать эти вопросы в последующих работах.

Пожалуй, наиболее полно отражающей сложную морфологию астроцита была бы модель, не только учитывающая положение и ветвление основных отростков, но и воспроизводящая элементы тонких структур, в том числе листочков, которые определяют значительное количество физиологических функций астроцитов. Модели подобного разрешения позволяют исследовать основные характеристики физиологии астроцитов (такие как кальциевые токи, отношение объема глутамата и ионов K^+ между внутри- и межклеточной средой) с различной морфологией путем интегрирования моделей в вычислительную среду NEURON для экспериментов *in silico*. Это также открывает потенциальную возможность создания совмещенных нейрон-астроцитарных систем.

Список литературы (References)

- Булатов А. А., Сысоев А. А., Иудин Д. И. Моделирование инициации молнии на базе динамического графа // Компьютерные исследования и моделирование. — 2021. — Т. 13, № 1. — С. 125–147.
- Bulatov A. A., Sysoev A. A., Iudin D. I. Modelirovanie iniciacii molnii na baze dinamicheskogo grafa [Simulation of lightning initiation on the basis of dynamical graph] // Computer Research and Modeling. — 2021. — Vol. 13, No. 1. — P. 125–147 (in Russian).
- Шибков А. А., Кочегаров С. С. Компьютерное и физико-химическое моделирование эволюции фрактального коррозионного фронта // Компьютерные исследования и моделирование. — 2021. — Т. 13, № 1. — С. 105–124.
- Shibkov A. A., Kochegarov S. S. Kompyuternoe i fiziko-khimicheskoe modelirovanie evolyutsii fraktal'nogo korrozionnogo fronta [Computer and physical-chemical modeling of the evolution of a fractal corrosion front] // Computer Research and Modeling. — 2021. — Vol. 13, No. 1. — P. 105–124 (in Russian).
- Abdellah M., Foni A., Zisis E., Guerrero N. R., Lapere S., Coggan J. S., Keller D., Markram H., Schürmann F. Metaball skinning of synthetic astroglial morphologies into realistic mesh models for *in silico* simulations and visual analytics // Bioinformatics. — 2021. — Vol. 37, Supplement 1. — P. i426–i433.
- Baldwin K. T., Murai K. K., Khakh B. S. Astrocyte morphology // Trends in Cell Biology. — 2024. — Vol. 34, No. 7. — P. 547–565.
- Bandeira F., Lent R., Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2009. — Vol. 106, No. 33. — P. 14108–14113.
- Batiuk M. Y., Martirosyan A., Wahis J., De Vin F., Marneffe C., Kusserow C., Koeppen J., Viana J. F., Oliveira J. F., Voet T., Ponting C. P., Belgard T. G., Holt M. G. Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution // Nature Communications. — 2020. — Vol. 11, No. 1. — P. 1220.
- Brazhe A., Verisokin A., Vervejko D., Postnov D. Astrocytes: New evidence, new models, new roles // Biophysical Reviews. — 2023. — Vol. 15. — P. 1303–1333.
- Bushong E. A., Martone M. E., Jones Y. Z., Ellisman M. H. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains // Journal of Neuroscience. — 2002. — Vol. 22, No. 1. — P. 183–192.
- Cheng Y.-T., Luna-Figueroa E., Woo J., Chen H.-C., Lee Z.-F., Harmanci A. S., Deneen B. Inhibitory input directs astrocyte morphogenesis through glial GABABR // Nature. — 2023. — Vol. 617, No. 7960. — P. 369–376.
- Clavreul S., Abdeladim L., Hernández-Garzón E., Niculescu D., Durand J., Ieng S.-H., Barry R., Bonvento G., Beaurepaire E., Livet J., Loulier K. Cortical astrocytes develop in a plastic manner at both clonal and cellular levels // Nature Communications. — 2019. — Vol. 10, No. 1. — P. 4884.

- Clavreul S., Dumas L., Loulier K.* Astrocyte development in the cerebral cortex: Complexity of their origin, genesis, and maturation // *Frontiers in Neuroscience*. — 2022. — Vol. 16.
- Cuntz H., Forstner F., Borst A., Häusser M.* One rule to grow them all: a general theory of neuronal branching and its practical application // *PLoS Computational Biology*. — 2010. — Vol. 6, No. 8. — P. e1000877.
- Durand M.* Structure of optimal transport networks subject to a global constraint // *Physical Review Letters*. — 2007. — Vol. 98, No. 8. — P. 088701.
- Hayashi M. K., Sato K., Sekino Y.* Neurons induce tiled astrocytes with branches that avoid each other // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23, No. 8.
- Holt L. M., Hernandez R. D., Pacheco N. L., Torres Ceja B., Hossain M., Olsen M. L.* Astrocyte morphogenesis is dependent on BDNF signaling via astrocytic TrkB.T1 // *eLife*. — 2019. — Vol. 8. — P. e44667.
- Kanari L., Dlotko P., Scolamiero M., Levi R., Shillcock J., Hess K., Markram H.* A topological representation of branching neuronal morphologies // *Neuroinformatics*. — 2018. — Vol. 16, No. 1. — P. 3–13.
- Khalil R., Kallel S., Farhat A., Dlotko P.* Topological Sholl descriptors for neuronal clustering and classification // *PLOS Computational Biology*. — 2022. — Vol. 18, No. 6. — P. e1010229.
- Lee J., Sergeeva A., Ahlsen G., Mannepalli S., Bahna F., Goodman K., Xu R., Khakh B., Weiner J., Shapiro L., Honig B., Zipursky S.* Astrocyte morphogenesis requires self-recognition // *Nature*. — 2025. — DOI: 10.1038/s41586-025-09013-y
- Liddelow S. A., Barres B. A.* Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential // *Immunity*. — 2017. — Vol. 46, No. 6. — P. 957–967.
- Morel L., Higashimori H., Tolman M., Yang Y.* VGluT1+ neuronal glutamatergic signaling regulates postnatal developmental maturation of cortical protoplasmic astroglia // *Journal of Neuroscience*. — 2014. — Vol. 34, No. 33. — P. 10950–10962.
- Reichenbach A., Derouiche A., Kirchhoff F.* Morphology and dynamics of perisynaptic glia // *Brain Research Reviews*. — 2010. — Vol. 63, No. 1–2. — P. 11–25.
- Robertson J. M.* Astrocyte domains and the three-dimensional and seamless expression of consciousness and explicit memories // *Medical Hypotheses*. — 2013. — Vol. 81, No. 6. — P. 1017–1024.
- Ronellenfitch H., Katifori E.* Phenotypes of vascular flow networks // *Physical Review Letters*. — 2019. — Vol. 123, No. 24. — P. 248101.
- Rosenberg M. F., Godoy M. I., Wade S. D., Paredes M. F., Zhang Y., Molofsky A. V.* β -adrenergic signaling promotes morphological maturation of astrocytes in female mice // *The Journal of Neuroscience*. — 2023. — Vol. 43, No. 50. — P. 8621–8636.
- Runions A., Lane B., Prusinkiewicz P.* Modeling trees with a space colonization algorithm // Ebert D., Merillou S. (eds.) *Eurographics Workshop on Natural Phenomena*. — The Eurographics Association, 2007.
- Sato Y., Nakajima S., Shiraga N., Atsumi H., Yoshida S., Koller T., Gerig G., Kikinis R.* Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images // *Medical Image Analysis*. — 1998. — Vol. 2, No. 2. — P. 143–168.
- Shinozaki K., Yoda K., Hozumi K., Kira T.* A quantitative analysis of plant form—the pipe model theory: II. Further evidence of the theory and its application in forest ecology // *The Ecological Society of Japan*. — 1964. — Vol. 14, No. 4.
- Sofroniew M. V.* Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity // *Trends in Immunology*. — 2020. — Vol. 41, No. 9. — P. 758–770.

- Stogsdill J. A., Ramirez J., Liu D., Kim Y. H., Baldwin K. T., Enustun E., Ejikeme T., Ji R.-R., Eroglu C.* Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis // *Nature*. — 2017. — Vol. 551, No. 7679. — P. 192–197.
- Uçar M. C., Kamenev D., Sunadome K., Fachet D., Lallemand F., Adameyko I., Hadjab S., Hannezo E.* Theory of branching morphogenesis by local interactions and global guidance // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12, No. 1. — P. 6830.
- Verkhratsky A., Nedergaard M.* Physiology of astroglia // *Physiological Reviews*. — 2018. — Vol. 98, No. 1. — P. 239–389.
- Xie Y., Kuan A. T., Wang W., Herbert Z. T., Mosto O., Olukoya O., Adam M., Vu S., Kim M., Tran D., Gómez N., Charpentier C., Sorour I., Lacey T. E., Tolstorukov M. Y., Sabatini B. L., Lee W.-C. A., Harwell C. C.* Astrocyte-neuron crosstalk through Hedgehog signaling mediates cortical synapse development // *Cell Reports*. — 2022. — Vol. 38, No. 8. — P. 110416.
- Yu W., Marshall W. F., Metzger R. J., Brakeman P. R., Morsut L., Lim W., Mostov K. E.* Simple rules determine distinct patterns of branching morphogenesis // *Cell Systems*. — 2019. — Vol. 9, No. 3. — P. 221–227.
- Zisis E., Keller D., Kanari L., Arnaudon A., Gevaert M., Delemontex T., Coste B., Foni A., Abdellah M., Calì C., Hess K., Magistretti P. J., Schürmann F., Markram H.* Digital reconstruction of the neuroglia-vascular architecture // *Cerebral Cortex*. — 2021. — Vol. 31, No. 12. — P. 5686–5703.