

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© А. С. Степанов, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев, 2018
УДК 611.813.1.018.86

А. С. Степанов, В. А. Акулинин, С. С. Степанов, Д. Б. Авдеев

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МОРФОМЕТРИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНАПТОАРХИТЕКТониКИ НЕОКОРТЕКСА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОМ ВЫЯВЛЕНИИ НЕЙРОМОДУЛИНА

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. В. А. Акулинин), ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

Цель — изучить возможности морфометрической характеристики синаптоархитектоники с помощью GAP-43.

Материал и методы. Использовали иммунофлюоресцентное выявление нейромодулина (GAP-43), конфокальную микроскопию и автоматизированный компьютерный анализ изображений слоя V (поле 4) коры головного мозга человека (n=4) с помощью программы ImageJ 1.46.

Результаты. Использование иммунофлюоресцентного выявления GAP-43 позволило установить распределение аксондеритических и аксосоматических синапсов, общую площадь аксонных терминалей, численную плотность средних и крупных терминалей.

Выводы. Необходимым условием получения точных данных является большое конечное увеличение цифровых изображений (600–900 пикселей/дюйм). Полученные результаты необходимо учитывать при изучении синаптоархитектоники неокортекса с помощью иммуногистохимических методов изучения структур синапсов.

Ключевые слова: неокортекс, синапсы, нейромодулин, иммунофлюоресценция, автоматизированный компьютерный анализ

В связи с малыми размерами синаптических контактов (0,1–0,5 мкм) и терминальных ветвильных аксонов (около 1–3 мкм) основная масса научной информации о них была получена с помощью электронной микроскопии (ЭМ) [4, 5, 10, 11]. Однако с помощью ЭМ трудно дать качественную и количественную характеристики распределения синапсов в пределах крупных анатомических образований мозга (например неокортекса). С этой задачей легко справляются методы световой и иммунофлюоресцентной микроскопии [1, 2, 3, 6]. Для этих целей широко используется иммуногистохимическая реакция на синаптофизин (p38) и нейромодулин (GAP-43) [1].

Реакция на p38 позволяет выявлять локализацию синаптических пузырьков (СП) диаметром 50 нм. Этот белок входит в группу семейства интегральных белков, связанных с мембраной СП, занимает 10% их объема и содержится во всех синапсах [7, 9]. Реакция на GAP-43 позволяет судить о структурно-функциональном состоянии терминалей аксосоматических и аксондеритических синапсов. Это связано с тем, что фосфопротеин GAP-43 является специфичным для мембраны аксонных терминалей ростовым маркером.

Наличие в нервной ткани экспрессии GAP-43 является признаком начала образования аксонов в эмбриогенезе и принимает активное участие в процессах регенерации и пластичности нервной ткани [8, 12].

Ранее были изучены возможности морфометрической характеристики синапсов неокортекса человека при иммуногистохимическом выявлении синаптофизина, т. е. СП [2]. Однако СП являются подсистемой синаптической терминали и в большей степени характеризуют ее везикулярный пул. Кроме того, СП — очень вариабельные структуры и подвергаются светлостимулирующей деструкции уже на раннем этапе постишемического периода, когда синаптическая терминаль остается относительно сохранной [4]. В связи с этим было целесообразно изучить возможности морфометрической характеристики синаптоархитектоники с помощью иммуногистохимического выявления GAP-43, что и явилось целью настоящей работы.

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Омского государственного медицинского университета». Материал для гистологического исследования получен в Омском областном

Сведения об авторах:

Степанов Александр Сергеевич (e-mail: ctepan55@yandex.ru), Акулинин Виктор Александрович (e-mail: akulinin@omsk-osma.ru), Степанов Сергей Степанович (e-mail: serg_stepanov@mail.ru), Авдеев Дмитрий Борисович (e-mail: avdeev86@inbox.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», 644099, г. Омск, ул. Ленина, 12

бюро судебно-медицинской экспертизы. Данное исследование одобрено этическим комитетом Омского государственного медицинского университета (протокол № 61 от 19.06.2014 г.).

Для исследования использован аутопсийный материал (5–10 ч после смерти) из поля 4 (по Бродману) коры большого мозга (КБМ) людей, погибших в результате несчастных случаев ($n=4$, мужчины 23–45 лет).

Мозг фиксировали в 4% растворе параформы на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) при температуре 4 °С в течение 1 сут и заключали в парафин. Изготавливали серийные фронтальные срезы толщиной 10 мкм через все слои и помещали их на предметные стекла. Для флюоресцентного иммуногистохимического исследования использовали первичные кроличьи поликлональные антитела (ImG) к нейромодулину (GAP-43). Для визуализации иммунной реакции были использованы козьиные поликлональные вторичные антитела к иммуноглобулину кролика (Abcam, Англия), (разведение 1:200). Антитела были ассоциированы с флюоресцентным красителем текасский красный (Texas Red® Sulfonyl Chloride) (Abcam, Англия).

Препараты просматривали, используя конфокальный лазерный сканирующий микроскоп, присоединенный к флюоресцентному микроскопу Bio-Rad MRC 600 CLSM Nikon FXA (Nikon, Япония). Использовали аргоно-криптоновый лазер с фильтром для флюоресцеин-изотиоцианата (488DF-10) и липофусцина (568DF-10). Применялась двухканальная флюоресценция (увеличение линзы — 20, объектив Nikon; Fluor 1.30), шаг просмотра срезов — 2 мкм, увеличение поля — 3, средняя плотность — 1. Использован режим быстрого просмотра (10 просмотров каждого среза) с помощью фильтров

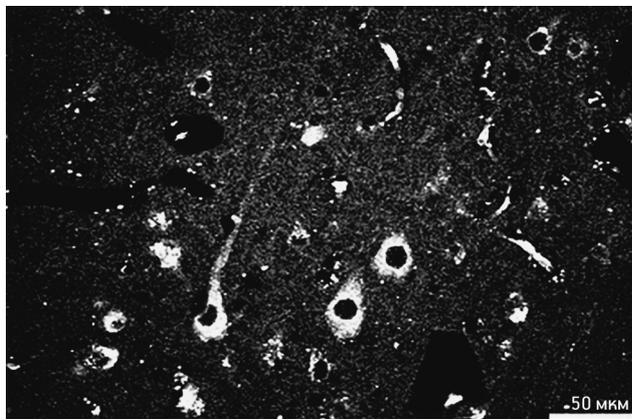


Рис. 1. GAP-43-позитивные структуры в слое V моторной коры большого мозга человека (поле 4).

Флюоресцентная иммуногистохимическая реакция

Калмана с коэффициентом 3 и размером блока $1/4$ и дальнейшим сохранением данных в памяти компьютера. Единица сканирования матрицы (пиксель) была $0,49 \times 0,49$ мкм.

Иммунофлюоресценцию и липофусциновую флюоресценцию сначала регистрировали с использованием фильтра 488DF-10 через 1-й канал (зеленый) с получением изображения 5–10 Z-серийных участков, затем эту же область исследовали для выявления липофусцина — с фильтром 568DF-10 через 2-й канал (красный). Формировали графические файлы, а затем на них с помощью программы ImageJ 1.46 анализировали изображение меченых синапсов.

Проверку статистических гипотез проводили при помощи программы Statistica 8.0 с использованием непараметрического U-критерия Манна—Уитни и Колмогорова—Смирнова (для парного сравнения), критерия χ^2 (относительные величины). Нулевую гипотезу отвергали при статистической значимости $p < 0,05$. В ходе морфометрического анализа определяли следующие характеристики: количество и площадь частиц в поле зрения, их средний и наименьший размеры, их относительную площадь, общую численную площадь (ОЧП) терминалей.

При исследовании слоя V неокортекса было обнаружено, что иммунофлюоресцентная реакция GAP-43 маркировала мелкие, средние и крупные структуры в нейропиле и на телах нейронов (рис. 1).

Преобладали нейроны с интенсивным дискретным свечением GAP-позитивного материала на всей поверхности перикариона. Нейропил неокортекса содержал многочисленные четкие гранулы продукта иммуногистохимической реакции, преимущественно округлой формы. GAP-43-позитивные структуры в нейропиле располагались неравномерно в виде интенсивно флюоресцирующих гранул (см. рис. 1).

На первом этапе при автоматическом анализе частиц на масках изображений их размер и форма не лимитировались. Это позволило отразить все составляющие реального изображения GAP-43-позитивных структур. Так, на рис. 2 все такие структуры (терминали аксосоматических и аксодендритических синапсов) в зависимости от конечного разрешения изображения занимали 6,4 (разрешение 72 пикс./дюйм), 6,9 (300 пикс./дюйм) 9,5 (600 пикс./дюйм) и 13,7% (900 пикс./дюйм) поля зрения.

На втором этапе определялись только округлые частицы, отображающие GAP-43-позитивные структуры нейропиля (терминали аксошиповых и аксодендритических синапсов)

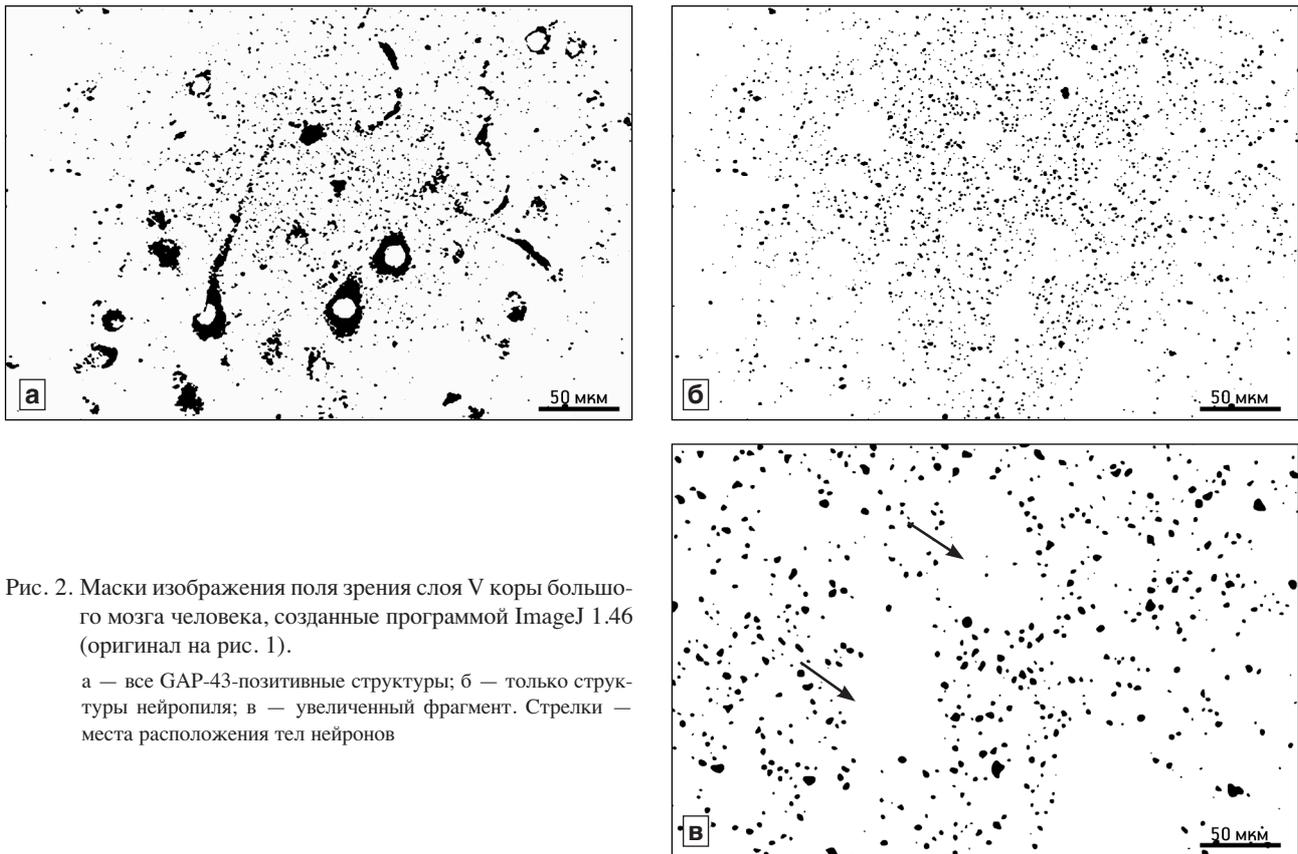


Рис. 2. Маски изображения поля зрения слоя V коры большого мозга человека, созданные программой ImageJ 1.46 (оригинал на рис. 1).

а — все GAP-43-позитивные структуры; б — только структуры нейрофила; в — увеличенный фрагмент. Стрелки — места расположения тел нейронов

(см. рис. 2, б). Структуры нейрофила занимали 1,6 (разрешение 72 пикс./дюйм), 1,9 (300 пикс./дюйм), 2,6 (600 пикс./дюйм) и 3,4% (900 пикс./дюйм) поля зрения (98 304 мкм²).

Таким образом, количество и площадь частиц различных размеров и формы в маске реального изображения нейрофила зависели от его конечного разрешения (72, 300, 600 или 900 пикс./дюйм). Наиболее высокие значения общей площади и чис-

ленной плотности частиц нейрофила получены при разрешении 600 и 900 пикс./дюйм (табл. 1).

Таким образом, с помощью флюоресцентного иммуногистохимического выявления нейромодулина при использовании конфокального микроскопа и высокого (600–900 пикс./дюйм) конечного разрешения цифрового изображения удалось выявить в нейропиле неокортекса флюоресцирующие частицы размером менее 1 мкм² ($\geq 0,02$ мкм²). Однако эти частицы составляли

Таблица 1

Зависимость морфометрических параметров частиц масок (n=50) изображений нейрофила от его конечного разрешения (размер поля зрения 384×256 мкм)

Показатель в поле зрения	Разрешение конечного изображения, пикс./дюйм			
	72	300	600	900
Количество частиц, абс. число	929±155	1439±206 p<0,001*	2216±330 p<0,001*	2650±450 p<0,001*
Площадь всех частиц, пиксель	1598±340	32 291±6558	180 690±36 138	523 333±104 666
Средний размер частицы, мкм ²	1,72±0,3	1,31±0,2 p<0,001*	1,14±0,2 p=0,001*	1,18±0,3
Наименьший размер частицы, мкм ²	1,0	0,058 p<0,001*	0,014 p<0,001*	0,012
Относительная площадь всех частиц, %	1,54±0,4	1,85±0,6 p=0,004*	2,58±0,4 p<0,001*	3,36±0,6 p<0,001*
Общая численная плотность терминалей на 100 мкм ² нейрофила	1,0±0,2	1,5±0,5 p<0,001*	2,3±0,6 p<0,001*	2,7±0,5 p<0,001*

* В сравнении с предыдущим значением различия статистически значимы (t-критерий Стьюдента для зависимых выборок).

не более 2,5% от всех выявленных. Основная масса флюоресцирующих структур была представлена частицами размером 0,1–3,0 мкм² — это, вероятно, терминалы и их конгломераты с диаметром от 0,4 до 2,0 мкм.

При конечном разрешении 900 пикс./дюйм ОЧП терминалей в нейропиле КБМ была 2,7±0,5 на 100 мкм², эти терминалы занимали 35,8% площади всего GAP-43-позитивного материала. Остальную площадь (64,2%) занимали терминалы на перикарионах и крупных дендритах. При иммунофлюоресцентном выявлении GAP-43 популяция очень мелких (<0,1 мкм²) терминалей выявлялась лишь частично (10–20%). Вполне вероятно, что это было связано с недостаточной энергией флюоресцирующих молекул и низкой разрешающей способностью микроскопа. Кроме того, при просмотре срезов с шагом в 2 мкм некоторые терминалы просто накладывались друг на друга и не могли быть идентифицированы по отдельности.

Увеличение разрешения конечного изображения от 72 до 900 пикс./дюйм способствова-

ло более точному определению ОЧП терминалей — от 929 до 2650 в поле зрения (в 2,85 раза). Относительная площадь выявленных частиц при этом увеличивалась не прямо пропорционально — от 1,6 до 3,4% (в 2,13 раза) (см. табл. 1).

Распределение частиц (одиночных терминалей и групп), выявленных на масках реального изображения нейропиля, по размерам площадей представлено в табл. 2. При исходном (72 пикс./дюйм) разрешении конечного изображения терминалы площадью <1,0 мкм² не выявлялись, а были, вероятно, представлены в составе более крупных частиц. Увеличение разрешения до 300, 600 и 900 пикс./дюйм приводило к детализации изображения и статистически значимому увеличению количества мелких частиц, при этом доля крупных частиц уменьшалась (см. табл. 2).

Сложность изучения аксосоматических синапсов заключалась в том, что GAP-43-позитивные структуры, представляющие терминалы, на перикарионах большинства нейронов сливались в флюоресцирующие неструктурированные конгломераты высокой яркости (рис. 3, а, б).

С помощью автоматизированного анализа в составе такого конгломерата сложно определить форму и размеры образующих его структур. Для решения этой задачи в ручном режиме выделяли участки перикарионов, на которых были видны отдельные частицы округлой формы. Только после этого проводили морфометрический анализ (см. рис. 3, а).

Минимальная площадь отдельных частиц на перикарионах нейронов составляла 0,40 мкм² (диаметр 0,7 мкм), средняя — 2,40 мкм² (диаметр 1,75 мкм), а максимальная — 4,20 мкм² (диаметр 2,30 мкм). Чаще всего встречались округлые терминалы площадью 1,50–2,20 мкм². Из них формировались более крупные неправильной формы конгломераты, частично или полностью покрывающие тела нервных клеток (см. рис. 3, а, б).

ОЧП аксонных терминалей на единице плоскости перикариона пирамидных нейронов (в конгломератах) составляла 103±33/100 мкм², а в начальном сегменте апикальных дендритов — только 14,2±4,4/100 мкм². В совокупности аксосоматические и аксодендритические синапсы на крупных дендритах (по изучению 50 полей зрения) составляли 49,7–77,5% (95% доверительный интервал) всей площади GAP-43-позитивных структур слоя V неокортекса человека в норме, а все остальные — 22,7–50,6%. Выявлена закономерность: чем дальше от тела нейрона, тем меньше ОЧП терминалей на единицу площади/объема отдела (тело — 103±33/100, крупные дендриты — 14,2±4,4, нейропилы — 2,7±0,5/100 мкм²).

Таблица 2

Распределение размеров площадей выявленных частиц в маске одного поля зрения нейропиля

Разрешение, пикс./дюйм	Площадь частицы, мкм ²	Количество частиц	
		абс. число	%
72	<1,0	0	0
	1,0–1,7	631	67,9
	1,8–3,0	226	24,4
	3,1–4,6	28	3,0
	>4,6	44	4,7
300	0,2–0,9	783	54,4
	1–2,4	478	33,2
	2,5–4,0	114	7,9
	>4,0	63	4,5
ANOVA Фридмана	df=3; $\chi^2=55,1$; p<0,0001*		
600	0,02–0,96	1233	55,6
	1–2,8	802	36,2
	2,9–4,8	121	5,5
	>4,8	59	2,7
ANOVA Фридмана	df=3; $\chi^2=18,4$; p=0,0004*		
900	0,01–0,96	1459	55,1
	1–2,8	988	37,3
	2,9–4,8	154	5,8
	>4,8	49	1,8
ANOVA Фридмана	df=3; $\chi^2=4,3$; p=0,2		

* Различия структуры распределения частиц в сравнении с предыдущим разрешением конечного изображения статистически значимы при p<0,05 (критерий χ^2).

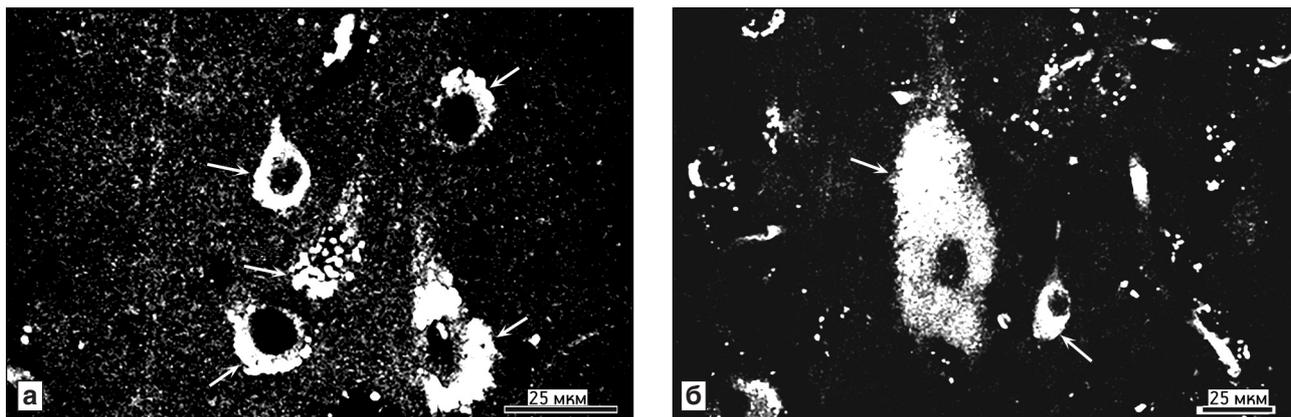


Рис. 3. GAP-43-позитивные структуры на телах и дендритах нейронов (стрелки) слоя V коры большого мозга человека (поле 4). а — нейроны среднего размера; б — крупный и мелкий нейроны. Флюоресцентная иммуногистохимическая реакция

При этом площадь рецептивного поля в основных отделах нейрона различалась менее значительно. Это свидетельствовало о том, что синапсы, локализованные на перикарионе и крупных дендритах за счет большой плотности, имели более высокую информационную емкость и влияние на пирамидный нейрон, чем аксошипиковые синапсы.

Таким образом, при иммунофлюоресцентном исследовании GAP-43 можно получить объективную информацию о расположении и площади аксошипиковых, аксодендритических и аксосоматических синапсов. Однако существуют ограничения при определении численной плотности мелких терминалей ($<1 \text{ мкм}^2$). Вероятно, это могло быть связано с недостаточной интенсивностью свечения небольших скоплений флюоресцирующих молекул, относительно низкой разрешающей способностью микроскопа и матрицы цифровой камеры, слиянием изображений соседних ярко светящихся терминалей в однородные конгломераты, вертикальным наложением терминалей разных уровней сканирования [1–3].

Частично решить эту проблему удалось путем увеличения разрешения конечного изображения до 600–900 пикс./дюйм. Однако и при этих разрешениях выявлялись только 10–20% самых мелких терминалей ($<0,01 \text{ мкм}^2$). В результате этого в нейропиле (место локализации мелких синапсов) ОЧП терминалей (маркированных GAP-43-частиц) была меньше ($2,7 \pm 0,5/100 \text{ мкм}^2$), чем при ЭМ ($15\text{--}18/100 \text{ мкм}^2$) [4]. Подобный подход использовался ранее при изучении синапсов слоя III лобной КБМ человека с помощью иммуногистохимического выявления синаптофизина [2]. Авторам удалось выявить ОЧП синапсов на уровне $1,0/100 \text{ мкм}^2$, что близко по значению к нашим результатам.

Еще одна методическая проблема была связана с выявлением отдельных терминалей в составе больших интенсивно флюоресцирующих конгломератов GAP-43-позитивных структур на перикарионах. Возможным решением этой проблемы было уменьшение толщины среза сканирования или использование для морфометрии периферических зон конгломератов, в которых были видны отдельные терминали. По размерам этих терминалей удалось выявить очень высокую плотность аксосоматических синапсов на пирамидных нейронах моторной КБМ человека — $103 \pm 33/100 \text{ мкм}^2$. О высокой общей численной плотности аксосоматических синапсов свидетельствуют также и литературные данные [10, 11].

Полученные нами результаты необходимо учитывать при изучении синаптоархитектоники неокортекса с помощью иммуногистохимических методов изучения структур синапсов. Эти методы позволяют получить точные объективные данные о содержании синаптических белков в больших объемах нервной ткани, а также проводить выявление синапсов на перикарионах и дендритах нейронов. Однако для детального изучения численной плотности и расположения мелких синапсов необходимы дополнительные методы (реконструкция по серийным срезам, электронная, флюоресцентная микроскопия высокого разрешения).

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: А. С. С., В. А. А., С. С. С., Д. Б. А.

Сбор и обработка материала: А. С. С., Д. Б. А.

Статистическая обработка данных: А. С. С., В. А. А., С. С. С., Д. Б. А.

Написание текста: А. С. С., В. А. А., С. С. С., Д. Б. А.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гилерович Е. Г., Сухорукова Е. Г., Кирик О. В., Григорьев И. П., Коржевский Д. Э. Выявление специализированных синаптических групп (гломерул) в мозжечке человека при помощи иммуноцитохимической реакции на синаптофизин и конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2014. Т. 146, № 5. С. 73–77 [Gilerovich E. G., Suhorukova E. G., Kirik O. V., Grigor'ev I. P., Korzhevskij D. E. The identification of specialized synaptic groups (the glomeruli) in the cerebellum of the person using the immunocytochemical reaction for synaptophysin and confocal laser microscopy // Morfologiya. 2014. Vol. 146, № 5. P. 73–77. In Russ.].
2. Мыцик А. В., Акулинин В. А., Степанов С. С., Ларионов П. М. Возможности морфометрической характеристики синапсов неокортекса человека при иммуногистохимической верификации // Сибирск. мед. журн. 2013. Т. 118, № 3. С. 66–69 [Mycik A. V., Akulinin V. A., Stepanov S. S., Larionov P. M. Possibilities of morphometric characterization of the human neocortex synapses by immunohistochemical verification // Sibirskii meditsinskii zhurnal. 2013. Vol. 118, № 3. P. 66–69. In Russ.].
3. Мыцик А. В., Акулинин В. А., Степанов С. С., Сергеев А. В., Ларионов П. М. Иммунофлуоресцентная верификация и морфометрия аксосоматических синапсов неокортекса человека при острой и хронической ишемии // Морфол. ведомости. 2012. № 3. С. 53–60 [Mycik A. V., Akulinin V. A., Stepanov S. S., Sergeev A. V., Larionov P. M. Immunofluorescence verification and morphometry of the human neocortex axosomatic synapses in acute and chronic ischemia // Morfologicheskie vedomosti. 2012. № 3. P. 53–60. In Russ.].
4. Семченко В. В., Степанов С. С., Боголепов Н. Н. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). 2-е изд. М.: Медиа-Сфера, 2014 [Semchenko V. V., Stepanov S. S., Bogolepov N. N. Synaptic plasticity of the brain (fundamental and applied aspects), 2-е izdanie. M.: Media Sfera, 2014. In Russ.].
5. Семченко В. В., Степанов С. С., Еренев С. И. Структурно-функциональное восстановление нервной ткани головного мозга в постischemическом периоде с позиций представления о провизорности в репаративном гистогенезе // Тихоокеанск. мед. журн. 2016. № 2. С. 98–102 [Semchenko V. V., Stepanov S. S., Ereniev S. I. Structural and functional recovery of the nervous tissue of the brain in the postischemic period from the standpoint of view of provisory in reparative histogenesis // Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal. 2016. № 2. P. 98–102. In Russ.].
6. Сергеев А. В., Степанов С. С., Акулинин В. А., Мыцик А. В. Естественные механизмы защиты головного мозга человека при хронической ишемии // Общая реаниматол. 2015. Т. 11, № 1. С. 22–32 [Sergeev A. V., Stepanov S. S., Akulinin V. A., Mycik A. V. The natural protection mechanisms of the human brain in chronic ischemia // Obshchaya reanimatologiya. 2015. Vol. 11, № 1. P. 22–32. In Russ.].
7. Arthur C. P., Stowell M. H. B. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL — domainchannel protein // Structure. 2007. Vol. 15, № 6. P. 707–714. doi: 10.1016/j.str.2007.04.011
8. Grasselli G., Strata P. Structural plasticity of climbing fibers and the growth-associated protein GAP-43 // Front. Neural. Circuits. 2013. Vol. 7, № 25. P. 1–7. doi: 10.3389/fncir.2013.00025
9. Kwon S. E., Chapman E. R. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons // Neuron. 2011. Vol. 70, № 5. P. 847–854. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.001
10. Luebke J. I., Medalla M., Amatrudo J. M., Weaver C. M., Crimins J. L., Hunt B., Hof P. R., Peters A. Age-related changes to layer 3 pyramidal cells in the rhesus monkey visual cortex // Vis. Cereb. Cortex. 2015. Vol. 25, № 6. P. 1454–1468. doi: 10.1093/cercor/bht336
11. Peters A., Sethares C., Luebke J. I. Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex // Neurosci. 2008. Vol. 152, № 4. P. 970–981. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.07.014
12. Powell C. M. Gene targeting of presynaptic proteins in synaptic plasticity and memory: across the great divide // Neurobiol. Learn. Mem. 2006. Vol. 85, № 1. P. 2–15. doi: 10.1016/j.nlm.2005.08.014

Поступила в редакцию 15.03.2017
Получена после доработки 06.10.2017

METHODOLOGICAL PECULIARITIES OF THE MORPHOMETRIC CHARACTERIZATION OF HUMAN NEOCORTEX SYNOPTOARCHITECTONICS BASED ON IMMUNOFLUORESCENT DEMONSTRATION OF NEUROMODULIN

A. S. Stepanov, V. A. Akulinin, S. S. Stepanov,
D. B. Avdeyev

Objective — to explore the possibilities of morphometric characteristics of synoptoarchitectonics using GAP-43.

Material and methods. Used immunofluorescent detection of neuromodulin (GAP-43), confocal microscopy and automated computer image analysis (ImageJ 1.46. program) were used to study the layer V (field 4) of human cerebral cortex (n=4).

Results. Application of immunofluorescent demonstration of GAP-43 has allowed to detect the distribution of axodendritic and axosomatic synapses, the total area of axonal terminals, numerical density of medium and large terminals.

Conclusion. A necessary condition for obtaining accurate data is high resulting magnification of digital images (600–900 pixels/inch). The findings obtained should be taken into account when examining synoptoarchitectonics of the neocortex using the immunohistochemical methods for studying the structure of synapses.

Key words: neocortex, synapses, neuromodulin, immunofluorescence, automated computer analysis

Department of Histology, Cytology and Embryology, Omsk State Medical University, 12, Lenin St., Omsk 644099