

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОАРХИТЕКТониКИ  
КОРЫ БОЛЬШОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ИШЕМИИ

А.В. СЕРГЕЕВ, А.В. МЫЦИК, В.А. АКУЛИНИН, С.С. СТЕПАНОВ

*ГБОУ ВПО Омская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ,  
Ленина, 13, Омск, Россия, 644099*

**Аннотация.** Изучение морфологии неокортекса человека в норме и при ишемии обусловлено стремлением выявления общих закономерностей и специфических особенностей компенсаторной реорганизации нейронных сетей, поиском средств регуляции деструктивных и восстановительных процессов. Появление большого объема информации о структуре нервной ткани сопряжено с потребностью увеличения точности морфометрического анализа. Это требует оценки методологического уровня современных морфологических исследований неокортекса человека. Нами проведен анализ литературных и собственных данных, полученных при морфологическом изучении коры большого мозга человека. Освящены основные тенденции, актуальные методические проблемы и перспективные направления изучения структурно-функционального состояния нейронов в норме и при ишемии. Большое внимание уделено иммуногистохимическим и морфометрическим методам получения объективной информации. Показано, что в настоящее время имеется методологическая и методическая основа для дальнейшего изучения морфологии головного мозга человека. Однако, общее количество статей по изучению прижизненной морфологии мозга человека несравненно меньше, чем экспериментальных работ. Для максимально полного использования биопсийного материала предложен комплексный подход, включающий методы автоматизированного компьютерного анализа изображений, морфометрии, иммуногистохимии и статистического анализа.

**Ключевые слова:** человек, кора большого мозга, цитоархитектоника.

MODERN PROBLEMS OF MORPHOLOGICAL STUDYING OF THE HUMAN CORTEX  
CYTOARCHITECTURE IN NORM AND DURING ISCHEMIA

A.V. SERGEEV, A.V. MYTSIK, V.A. AKULININ, S.S. STEPANOV

*Omsk State Medical Academy, Lenin St. 12, Omsk, Russia, 644099*

**Abstract.** Study of the human cortex morphology in norm and at the ischemia is due to the desire to identify common patterns and specific features of compensatory neural networks reorganization, seeking means of regulation of destructive and regenerative processes. The emergence of a large amount of information on the nervous tissue morphology is the need for increasing the accuracy of morphometric analysis. This requires an assessment of the overall methodological level of modern morphological studies of the human cortex. The authors analyzed the literature and their own data obtained from a morphological study of the human cortex. The main tendencies, current methodological issues and perspective directions of study the structural and functional state of neurons in norm and ischemia are presented. Great attention is paid to the immunohistochemical and morphometric methods of obtaining objective information. Currently there are methodological and methodical basis for further study of the human brain morphology. However, the total number of articles on the study of human brain morphology earned far less than the experimental works. For the fullest use of biopsy material is offered a comprehensive approach, including method of computer-aided analysis of images, immunohistochemistry, morphometry and statistical analysis.

**Key words:** individual, a cortex, cytoarchitectonic.

Актуальность исследования структурно-функционального состояния различных отделов, полей, слоев и нейронов коры большого мозга человека в норме и при ишемии обусловлена стремлением выявления общих закономерностей и специфических особенностей пространственной реорганизации нейронных сетей, а также поиском средств регуляции деструктивных и компенсаторно-восстановительных процессов, лежащих в ее основе [18].

Очень важные знания о структурной основе (cito- и гистоархитектоники) функционирования и компенсаторно-восстановительной реорганизации КБМ человека после повреждения получены с помощью морфометрического анализа нейронных популяций после ишемии, травмы, при опухолях мозга на аутопсийном и биопсийном материале [11].

В настоящее время широко используются методы иммуногистохимической идентификации специфических нейрональных и глиальных белков, которые длительно сохраняются в нейронах в аутопсийном материале и после фиксации [21]. В этой связи необходимо обсудить ряд проблем, связанных с получением объективных данных при изучении мозга человека. Прежде всего, необходимо отметить, что появление большого объема информации о структуре нервной ткани сопряжено с потребностью увеличения точности мор-

фометрического анализа клеток и межнейронных синапсов с помощью комплексного использования методов автоматизированного компьютерного анализа изображений, морфометрии и иммуногистохимии.

**Цель исследования** – оценить общий методологический уровень, результаты и перспективы морфологических исследований коры большого мозга человека в норме и при ишемии.

*1. Структурно-функциональная организация коры большого мозга в норме и при патологических изменениях.* Кора большого мозга (КБМ) представляет собой самое сложное и исторически самое новое образование больших полушарий. Она обладает уникальным многослойным строением, созревает позднее остальных отделов, имеет богатые и многообразные системы связей. Роль и место КБМ в формировании и функционировании полноценного головного мозга продолжает широко обсуждаться и уточняться. При этом не меняется главное – постулат о том, что без этого отдела мозга появление и функционирование человека, как высшего млекопитающего, было бы невозможным [9].

Гистологическое и цитологическое строение КБМ различных животных и человека интенсивно исследовалось в прошлом веке. Поэтому в настоящее время основные принципы пространственной организации и морфометрии этого отделов мозга хорошо изучены. Даны описание и классификация нейронов КБМ, основанные на классических (Гольджи, Ниссл, гематоксилин-эозин) гистологических методах исследования [2].

Однако, необходимо отметить, что существуют только единичные морфологические исследования КБМ, выполненные на инцизионном биопсийном материале нервной ткани головного мозга [28]. Это связано с трудностью обоснования необходимости получения подобного материала. Инцизионный биопсийный материал получают в основном в ходе операции, когда удаление части нормальной ткани КБМ входит в структуру операции, например, глубококом расположение опухолей, кист.

Тем не менее, эти работы имеют особую ценность, они позволяют проводить своеобразный мета-анализ и сопоставлять результаты различных способов морфометрии (традиционный визуальный, автоматизированный с помощью программ ImageJ, CellProfiler) первичного изображения и выводов авторских коллективов. В результате снижается вероятность возможных систематических ошибок в последующих исследованиях.

Так в работе W.Y. Ong, L.J. Garey [22, 28], проведено детальное ультраструктурное исследование различных слоев лобной КБМ (поля 21, 8 и 9 у взрослых, 9 и 44 – у новорожденных, по Бродману) и типов клеток (пирамидные, непиримидные, глиальные) с предварительной верификацией клеток на полутонких срезах, окрашенных с помощью классических гистологических методов. Кроме того, представленные в статье микрофотографии позволяют провести собственное измерение размеров клеток и их численной плотности с помощью более совершенных современных способов (например, ImageJ). Это имеет большое значение, так как от морфометрии в норме зависят конечные результаты и выводы любого сравнительного исследования, а, следовательно, и сопоставление данных, полученных разными авторами. Недостатком работы является практически полное отсутствие, если не считать определение размеров клеток без статистического анализа результатов, морфометрии.

Имеется аналогичная работа этих же авторов по височной коре большого мозга человека [27], а также исследование, в котором дана сравнительная ультраструктурная и иммуногистохимическая (рецепторы ГАМК) характеристика непиримидных нейронов человека и обезьяны в норме [25]. Изучалось распределение ионо- и матаботропных глутаматовых рецепторов в различных слоях коры большого мозга [24]. Проведено исследование микрососудов и глиальных клеток (сочетанное иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование) [23].

На биопсийном материале осуществлен сравнительный ультраструктурный и иммуногистохимический анализ височной коры большого мозга человека в норме и при шизофрении. Выявлены существенные различия синаптоархитектоники при относительно стабильной организации нейронов и их распределения [26].

Очень важные знания о структурной основе (цито- и гистоархитектоники) функционирования и компенсаторно-восстановительной реорганизации головного мозга человека после повреждения позволяет получать морфометрический анализ нейронных популяций после патологического воздействия (ишемия, травма, опухоль) [11].

Однако необходимо отметить, что изучение прижизненной морфологии мозга человека сопряжено с рядом особенностей и часто недоступно, в результате чего фактические данные для новых гипотез этиологии и патофизиологии неврологических болезней получены в основном на посмертном гистологическом материале [21]. Это не смотря на то, что уже активно используются методы визуализации живых нейронов [36].

В имеющихся исследованиях аутопсийного материала проведены морфометрические исследования с определением размеров, численной плотности клеток и даже их общего содержания по полям в норме и при различных патологических состояниях. Так в работе E. Van Otterloo et al. [32], в частности, проведена морфометрия дорсолатеральной префронтальной и орбитофронтальной коры (поле 9) в норме и при депрессии у стариков. По данным этих авторов, толщина серого вещества лобной коры варьировала от 1,8 до 2,2 мм ( $2,02 \pm 0,245$  мм). На фронтальном срезе ширина слоя I составляла  $14 \pm 3\%$ , II –  $6 \pm 2\%$ , IIIa –  $7 \pm 1\%$ , IIIb –  $21 \pm 3\%$ , IIIc –  $12 \pm 2\%$ , IV –  $7 \pm 1\%$ , V –  $14 \pm 3\%$  и VI –  $19 \pm 5\%$ . Таким образом, максимальная ширина дорсолатеральной префронтальной коры в норме была характерна для слоя III ( $40\%$ , около 1 мм), а слой IIIb составлял половину ( $52,5\%$ ,  $0,5-0,6$  мм) всего этого слоя.

По данным этих авторов, общая численная плотность нейронов в дорсолатеральной префронтальной коре в норме варьировала от 18000 до 28000/мм<sup>3</sup>. При этом максимальная плотность пирамидных нейронов отмечена в слое IIIa и IIIb (32000±6000/мм<sup>3</sup> среднее±стандартные отклонение). В слое V численная плотность в норме была на уровне 28000±4000/мм<sup>3</sup>. В орбитофронтальной коре общая численная плотность варьировала от 14000 до 26000/мм<sup>3</sup>, а максимальная численная плотность пирамидных нейронов отмечалась в слое IIIc – 41000±14000/мм<sup>3</sup>. В слое V численная плотность в норме была на уровне 33000±7000/мм<sup>3</sup> [32].

При депрессии в старческом возрасте морфометрические параметры, характеризующие слой III статистически значимо не изменялись (в сравнении с аналогичным возрастом) [32].

В первичной слуховой коре в норме объемная доля слоя I составляла – 11,1%, II – 8,7%, III – 35,6% (451 мм<sup>3</sup>), IV – 9,5%, V – 13,4% и VI – 21,8%. При шизофрении доля слоя I составляла – 11,7%, II – 9,0%, III – 34,3% (428 мм<sup>3</sup>), IV – 9,8%, V – 12,7% и VI слоя – 22,5%, что статистически значимо не отличалось от нормы. Численная плотность пирамидных нейронов в слое III в норме была 20700±270/мм<sup>3</sup>, а у больных шизофренией – 28600±280/мм<sup>3</sup>, что было статистически значимо больше на 38,2%. Однако, при пересчете на весь объем слоя III количество нейронов не различалось [14].

По данным W.Y. Ong, L.J. Garey [28], при изучении биопсийного материала на полутонких срезах, на 1 мм<sup>2</sup> фронтального среза зрительной коры выявлялось около 440 пирамидных нейронов. При пересчете на 1 мм<sup>3</sup> слоя III это соответствует примерно 22000-24000 клеткам, что близко результатам исследования аутопсийного материала.

Как правило, при исследовании аутопсийного материала для верификации очагов некротически измененных нейронов (например, при перивентрикулярной лейкомаляции, которая является формой «гипоксическо-ишемической энцефалопатии») использовали следующие гистологические критерии:

1. острые – коагуляционный некроз, гиперэозинофилия цитоплазмы и пикноз ядер всех клеточных элементов, гиперэозинофилия аксонов;
2. инфильтрация макрофагов и реактивных астроцитов в очаг некроза;
3. хронические – образование кист или рубцов с кальцинозом аксонов;
4. скопление реактивных астроцитов вокруг белого вещества (нервных волокон) на всех гистопатологических стадиях некроза [12].

В последнее время появились работы, свидетельствующие о том, что не только классические методы (по Нисслю) окраски нервной ткани после смерти пригодны для морфометрического исследования головного мозга человека, но и методы иммуногистохимической идентификации специфических нейрональных и глиальных белков [21]. При низких температурах специфические антигены длительно сохраняются в нейронах. Так, в мозге, посмертно фиксированном в формалине, практически полностью сохраняются все основные нейрон- и глиоспецифические белки не менее 1 суток, большинство – до 4 месяцев, а некоторые до 10 лет. Это позволяет накапливать материал, а также использовать ранее забранный, часто уникальный материал [21].

Для верификации нейронов, синапсов, глиальных клеток и сосудов используются различные иммуногистохимические маркеры, а их количество постоянно увеличивается в зависимости от задач конкретного исследования. Однако, для определения структурно-функционального состояния КБМ человека и морфометрического анализа её компонентов чаще всего используются реакции на следующие хорошо проверенные специфические белки/маркеры:

1. NeuN (белок ядер, маркер нейронов);
2. NSE (нейронспецифическая енолаза, маркер нейронов);
3. p38 (синаптофизин, маркер синаптических терминалей);
4. GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок, маркер астроцитов);
5. маркеры тормозных нейронов (соматостатин, кальбиндин, парвальбумин, кальретинин, холецистокинин, нейропептид-Y).

*NeuN.* Среди всех нейрон специфических белков только NeuN является маркером тела и ядра нейрона. Все остальные известные белки в той или иной степени выявляются в отростках (нейропиле). Иммуногистохимический анализ белка NeuN показал, что этот белок:

1. экспрессируется почти исключительно в нервной системе;
2. выявляется на протяжении всего онтогенетического развития мозга;
3. является специфическим маркером ядра и тела нейронов, а также проксимальных отростков;
4. способен связываться с ДНК нейронов;
5. может быть регулятором процесса дифференцирования и функции нейронов [21].

Поэтому подсчет именно NeuN-позитивных нейронов широко используется, наряду с классической окраской по Нисслю и окраской ядер с помощью DAPI, для проведения морфометрического анализа с целью выявления динамики содержания созревающих и функционирующих нейронов в неповрежденном и поврежденном головном мозге млекопитающих [1].

Таким образом, по данным литературы, белок NeuN может быть использован для идентификации нейронов КБМ человека, как специфический маркер, и морфометрического анализа закономерностей изменения цитоархитектоники КБМ в постишемическом периоде наряду с другими методами окраски нейронов.

Имеется большое количество экспериментальных работ, в которых показано, что после острой ишемии головного мозга происходит выраженное уменьшение количества NeuN-позитивных нейронов [34]. При этом исход для NeuN-негативных нейронов разными авторами оценивается неоднозначно. Так, в исследовании Unal-Cevik et al. [31], специально посвященном изучению этого вопроса, установлено, что в настоящее время нет убедительных доказательств наличия связи потери иммунореактивности NeuN и необратимой гибели нейрона. Это свидетельствует о том, что при нормализации микроциркуляции ткани мозга, структурной целостности ядра и цитоплазмы часть нейронов со сниженной экспрессией функциональных и регуляторных белков может выйти из патологического состояния.

В.А. Акулинин и др. [1] установили, что после клинической смерти в моторной коре происходит значительное уменьшение иммунореактивности NeuN: в слое III остается 35-42%, а в слое V – 48-56% экспрессирующих NeuN нейронов. С учетом того, что среди NeuN-негативных нейронов, по данным литературы [31], не все имеют признаки необратимого изменения, процент содержания способных функционировать нейронов несколько выше.

По данным В.А. Акулинина и др. [1], в моторной коре большого мозга человека в постреанимационном периоде сохраняется значительный резерв способных функционировать нейронов (экспрессия белка NeuN) и NeuN-негативных нейронов без признаков необратимых изменений ядра и цитоплазмы. Особенно много таких нейронов выявляется в слое V. Авторы полагают, что интегрирование этих нейронов в единую пространственную нейронную сеть на фоне вторичных нарушений микроциркуляции и отека мозга затруднено. В результате этого нарушается интегративно-пусковая функция моторной коры большого мозга и не реализуется репаративный потенциал сохранившихся нейронов.

*NSE.* Гликолитический фермент (2-фосфо-D-глицерат гидролаза), относящийся к семейству енолаз, участвует в предпоследнем этапе гликолиза – катализирует переход 2-фосфо-О-глицериновой кислоты в фосфоенолпируват. Иммуноцитохимическая реакция на NSE является хорошим индикатором активных нейронов в различных областях головного мозга, поскольку усиление метаболической активности клеток сопровождается увеличением количества этого белка в них [6].

*p38.* Наиболее стабильные результаты выявления функционально зрелых синапсов отмечаются при использовании специфических моно- и поликлональных антител к синаптофизину – интегральному белку p38 мембраны синаптических пузырьков [10, 15].

p38 обеспечивает контакт синаптического пузырька с цитоплазматической мембраной и участие в процессе экзо- и эндоцитоза медиатора при синаптической передаче импульса. В настоящее время p38 входит в панель маркеров, применяемых для оценки нейральной дифференцировки стволовых клеток. Иммуногистохимические методы выявления p38 используются для оценки синаптогенеза [30], а также синаптической плотности в нервной системе в различных модельных нейробиологических экспериментах [10]. С помощью этих методов установлено, что синаптическая плотность в мозге человека изменяется при старении [29], болезни Дауна [15] и ишемии [3, 4].

*GFAP.* Член семейства белков цитоскелета, представляет собой основной 8-9 нм промежуточный филамент зрелых астроцитов ЦНС, высокоспецифичный белок мозга, который не обнаружен за пределами ЦНС. Этот маркер давно и успешно применяется в практике иммуногистохимических исследований ЦНС животных и человека в норме и при патологических состояниях и воздействиях. В частности, выявлена выраженная динамика экспрессии GFAP и активация глиогенеза после ишемического воздействия [5, 33].

Большое теоретическое и практическое значение имеет изучение структурно-функционального состояния и цитоархитектоники тормозных клеточных систем КБМ человека после критических состояний, вызванных тотальной ишемией. Это связано с ключевой ролью цепей тормозных интернейронов в интеграции и реабилитации межнейронных взаимоотношений такого сложного отдела головного мозга, как неокортекс [16].

В целом интернейроны составляют от 15 до 30% от общего числа нейронов коры. В неокортексе млекопитающих тормозные интернейроны представляют собой разнородную популяцию непиримидных клеток, содержащих медиатор ГАМК, комедиаторы и нейропептиды (соматостатин, кальбиндин, парвальбумин, кальретинин, холецистокинин, нейропептид-Y) [8, 16].

ГАМК-эргичные тормозные интернейроны коры негомологичны в нейрхимическом отношении – в разных популяциях интернейронов используются разные комедиаторы и нейропептиды. В неокортексе 20-25% интернейронов экспрессирует парвальбумин, 45-50% – кальретинин и 20-25% – кальбиндин [16]. Это позволяет проводить их специфическую идентификацию и морфометрическую оценку с помощью иммуногистохимических методов [16].

Наличие тормозных интернейронов показано во всех без исключения слоях неокортекса, где они являются постоянным компонентом локальных межнейронных цепей. Форма и размеры тела, характер разветвления и длина отростков различных интернейронов существенно отличаются и, вероятно, зависят от функции конкретного нейрона [8, 16].

Интернейроны, экспрессирующие кальбиндин, распределяются во всех слоях неокортекса, а преобладают в супрагранулярных слоях II и III. Большинство этих интернейронов имеют вертикальную ориентацию, чаще (58%) биполярны и реже (31%) – мультиполярны. Их аксонные разветвления формируют плотную сеть вокруг тела клетки. Интернейроны, экспрессирующие кальбиндин, представляют гетерогенную популяцию

(клетки с «двойным букетом»), биполярные клетки, клетки Мартиногги, нейроглиоморфные клетки). Кроме кальбиндина в этих интернейронах выявляется парвальбумин, соматостатин и нейропептид Y [16].

Таким образом, с помощью иммуногистохимического исследования распределения кальбиндин и нейропептид Y позитивных клеток и морфометрического анализа можно судить о состоянии существенной части популяции тормозных интернейронов коры большого мозга человека.

Однако, иммуногистохимическое выявление кальбиндина в аутопсийном материале головного мозга человека имеет некоторые ограничения, которые связаны с тем, что уже через 2 часа после смерти при иммерсионной фиксации в некоторых нейронах снижается четкость контуров кальбиндин-позитивного материала. Это зависит от способа фиксации ткани мозга и затрудняет идентификацию нейронов, увеличивая величину систематической ошибки. Тем не менее, полностью иммунореактивность нейронов при этом не исчезает. Кальбиндин-позитивные нейроны длительно сохраняются после смерти мозга, что позволяет проводить морфометрическую оценку цитоархитектоники [20].

Кроме того, возможности иммуногистохимической морфометрии популяции кальбиндин-позитивных нейронов усиливаются при сочетанном использовании других способов идентификации интернейронов (окраска по Нисслю и Гольджи, иммуногистохимическая окраска на холинацетилтрансферазу и гамма-аминомасляную кислоту, нейропептид Y и DAPI) [20].

Имеются сравнительные морфометрические исследования состояния нейронных популяций тормозных и возбуждающих систем головного мозга человека, в которых показана существенная роль интернейронов в реорганизации межнейронных отношений КБМ после ее повреждения [13]. Установлено, что после различных патологических воздействий на головной мозг экспериментальных животных человека происходит реорганизация тормозных и возбуждающих нейронных систем неокортекса. Так, в работе Vuritica E. et al. [13] показано, что после черепно-мозговой травмы в зоне ишемической полутени увеличивается количество кальбиндин-позитивных пирамидных нейронов в слое III и непиримидных нейронов в слое IV. Увеличение количества и большая сохранность кальбиндин-позитивных нейронов рассматривается как результат компенсаторной экспрессии белков, регулирующих внутриклеточную концентрацию ионов кальция, играющих ключевую роль в инициации механизмов некроза и апоптоза [13, 16].

Таким образом, в настоящее время КБМ человека хорошо изучена с помощью анатомических, гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования. При этом основная информация о структурно-функциональном состоянии ее компонентов получена при аутопсии. Существенно меньше публикаций посвящено детальному морфологическому изучению различных отделов коры при конкретных патологических состояниях, в частности при ишемии.

*II. Методические проблемы и перспективные направления изучения структурно-функционального состояния КБМ.* Получение объективных данных о структурно-функциональном состоянии нейронов при морфологическом изучении головного мозга человека, как и любого сложного пространственного образования, сопряжено с рядом проблем [18].

Сравнительный морфометрический анализ нейронных популяций в норме и после патологического воздействия на биопсийном материале, позволяющий получить новые оригинальные, наиболее объективные, знания о структурной основе цито-, гистоархитектоники различных отделов головного мозга, связан с этическими особенностями получения материала для изучения мозга человека [11].

Детальный морфометрический анализ морфологических объектов очень трудоемкий и длительный процесс, сопряженный с появлением различных систематических ошибок. Складывается ситуация, при которой для принятия объективного заключения о характере изменений нейронов требуется несколько гистологических и иммуногистохимических методов, а также проведение соответствующего морфометрического анализа. Все это существенно увеличивает объем исходной информации и затрудняет анализ необходимой для цели исследования репрезентативной выборки [3].

Проведенный нами поиск литературных данных показал, что основные проблемы получения объективной информации о структурно-функциональном состоянии нейронов коры большого мозга человека связаны с компромиссом между приемлемым уровнем ошибок первого и второго рода при проверке статистических гипотез. Чем больше размеры групп, тем меньше вероятность ошибки второго рода и выше мощность статистических критериев. Зависимость эта как минимум квадратичная, то есть уменьшение объема выборки в два раза приведет к падению мощности минимум в четыре раза. Отсюда стремление к увеличению размера выборок. Кроме того, необходимо учитывать наличие систематических ошибок при проведении измерений и оценке типа клеток, зависящих от уровня подготовки специалиста. Для устранения такого рода субъективных ошибок требуется привлечения других специалистов и расчета индекса соответствия Каппа, что еще больше усложняет исследование и затрудняет принятие объективного решения [3].

По мнению ряда исследователей, решение данных проблем получения объективной информации при изучении структурно-функционального состояния нейронов коры большого мозга человека лежит в рамках комплексного использования методов автоматизированного компьютерного анализа изображений, морфометрии и иммуногистохимии [3, 4, 7, 19]. Задача автоматического анализа 2D- и 3D-изображений успешно решается с помощью различных компьютерных программ, специально разработанных для морфологии [35].

Необходима разумная стандартизация и ускорение всех этапов морфологического исследования от взятия материала до конечного заключения с учетом задач конкретного исследования. Наиболее реальным в этом плане является увеличение точности морфометрической оценки клеток головного мозга с помощью комплексного использования методов автоматизированного компьютерного анализа изображений, морфометрии, иммуногистохимии и соответствующего дискриминантного статистического анализа. Оптимальным инструментом для решения этих задач является программа ImageJ 1.46, которая обеспечивает быстрый и качественный анализ графических объектов [3, 17].

Имеются работы, в которых программа ImageJ успешно используется для анализа. Так, в работе S-Y. Ho et al. [19] представлены результаты применения разработанного авторами плагина NeurphologyJ для анализа сложных древовидных образований с большим количеством отростков и их ветвлений – нейронов головного мозга в культуре. Программа успешно справляется с задачей определения численной плотности нейронов, их площади, количества отростков, их длины, точек разветвления и дискриминацией по интенсивности окраски объекта на иммунофлуоресцентных препаратах. Плагин поддерживает пакетную обработку информации, легко интегрируется в среду программного обеспечения анализа научных данных. Эффективность программы авторы продемонстрировали в исследовании, посвященном изучению влияния фармакологических препаратов на структурно-функциональное состояние нейронов в культуре.

Изучение мозга человека с применением подобных подходов компьютерного морфометрического анализа изображений только начинается и требует адаптации имеющегося методического арсенала для конкретных задач исследования. Программа ImageJ 1.46, обладая очень гибкими инструментами и возможностью интеграции в нее множества плагинов, позволяет это сделать [1, 3, 4, 7].

Таким образом, в настоящее время, имеется методологическая и методическая основа для дальнейшего изучения/уточнения морфологии головного мозга человека в норме и при различных патологических состояниях. Широкое внедрение в практику морфологических исследований иммуногистохимических методов и автоматического компьютерного анализа изображений позволяет получить новые объективные данные обо всех структурных компонентах нервной ткани.

#### Литература

1. Акулинин В.А., Мыщик А.В., Степанов С.С. [и др.] Структурно-функциональное состояние пирамидных нейронов коры большого мозга человека в постреанимационном периоде // Вестник НГУ. 2012. Т.10. №4. С. 21–28.
2. Блинков С.М., Глезер И.И. Мозг в цифрах и таблицах. Л.: Медицина, 1964. 471 с.
3. Мыщик А.В., Степанов С.С., Ларионов П.М., Акулинин В.А. Актуальные проблемы изучения структурно-функционального состояния нейронов коры большого мозга человека в постишемическом периоде // Журнал анатомии и гистопатологии. 2012. Т.1. №1. С. 37–47.
4. Мыщик А.В., Акулинин В.А., Степанов С.С. [и др.]. Иммунофлуоресцентная верификация и морфометрия аксосоматических синапсов неокортекса человека при острой и хронической ишемии // Морфологические ведомости. 2012. №3. С. 53–60.
5. Мыщик А.В., Степанов С.С., Ларионов П.М. [и др.]. Актуальные проблемы изучения нейроглиальных взаимоотношений коры большого мозга человека в постишемическом периоде // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2012. № 6. С. 48–51.
6. Мыщик А.В., Акулинин В.А., Степанов С.С., Ларионов П.М. Влияние ишемии на нейро-глиальные взаимоотношения лобной коры большого мозга человека // Омский научный вестник. 2013. №1(118). С. 74-77.
7. Мыщик А.В., Акулинин В.А., Степанов С.С., Ларионов П.М. Иммуногистохимическая и морфометрическая характеристика межнейронных взаимоотношений лобной коры большого мозга человека при острой и хронической ишемии // Вестник НГУ. 2013. Т.11. №3. С. 154–161.
8. Охотин В.Е., Калинин С.Г. Гистофизиология корзинчатых клеток неокортекса // Морфология. 2001. Т. 120. № 4. С. 7–24.
9. Савельев С.В. Сравнительная анатомия нервной системы позвоночных. М.: Гэотар-мед, 2001. 272 с.
10. Хренов Ф.И., Беличенко П.В., Шамакина И.Ю. Количественный анализ синаптофизина (p38) в мозге потомства второго поколения от самцов крыс с длительной морфинной интоксикацией // Бюллетень экспер. биол. и мед. 2000. Т. 129. №1. С. 50–52.
11. Abitz M., Nielsen R.D., Jones E.G. [et al]. Excess of neurons in the human newborn mediodorsal thalamus compared with that of the adult // Cereb. Cortex. 2007. V. 17. P. 2573–2578.
12. Andiman S.E., Haynes R.L., Trachtenberg F.L. [et al]. The cerebral cortex overlying periventricular leukomalacia: analysis of pyramidal neurons // Brain Pathol. 2010. V. 20. N4. P. 803–814.
13. Buritica E., Villamil L., Guzman F. [et al]. Changes in calcium-binding protein expression in human cortical contusion tissue // Journal of Neurotrauma. 2009. V.26. P. 2145–2155.
14. Dorph-Petersen K-A., Delevich K.M., Marcisisin M.J. [et al]. Pyramidal neuron number in layer 3 of primary auditory cortex of subjects with schizophrenia // Brain Res. 2009. V. 1285. P. 42–57.

15. Downes E.G., Robson J., Grailly E. [et al]. Loss of synaptophysin and synaptosomal-associated protein 25-kDa (SNAP-25) in elderly Down syndrome individuals // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2008. N 34. N1. P. 12–22.
16. Druga R. Neocortical inhibitory system (cortical interneurons / GABAergic neurons/calcium-binding proteins/neuropeptides) // *Folia Biologica (Praha)*. 2009. V. 55. P. 201–217.
17. Fiala J.C. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy // *Journal of Microscopy*. 2005. V. 218. N 1. P. 52–61.
18. Ho S-Y., Chao C-Y., Huang H-L. [et al]. NeurophologyJ: An automatic neuronal morphology quantification method and its application in pharmacological discovery // *BMC Bioinformatics*. 2011. V. 12. P. 1–18.
19. Lavenex P., Lavenex P.B., Bennett J.L., Amaral D.G. Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: the hippocampal formation // *J. Comp Neurol.* 2009. V. 512. N1. P. 27–51.
20. Lyck L., Dalmau I., Chemnitz J. [et al]. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2008. V. 56. N3. P. 201–221.
21. Ong W.Y., Garey L.J., Leong S.K., Reynolds R. Localization of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in the human cerebral cortex and subcortical white matter – a double immunolabelling and electron microscopic study // *J Neurocytol.* 1995. V. 24. N8. P. 602–610.
22. Ong W.Y., Garey L.J., Reynolds R. Distribution of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in human cerebral cortical astrocytes – a light and electron microscopic study // *J Neurocytol.* 1993. V. 22. N10. P. 893–902.
23. Ong W.Y., He Y., Tan K.K., Garey L.J. Differential localisation of the metabotropic glutamate receptor mGluR1a and the ionotropic glutamate receptor GluR2/3 in neurons of the human cerebral cortex // *Exp Brain Res.* 1998. V. 119. N3. P. 367–374.
24. Ong W.Y., Yeo T.T., Balcar V.J., Garey L.J. A light and electron microscopic study of GAT-1-positive cells in the cerebral cortex of man and monkey // *J Neurocytol.* 1998. V. 27. N10. P. 719–730.
25. Ong, W.Y., Garey L.J. Ultrastructural features of biopsied temporopolar cortex (area 38) in a case of schizophrenia // *Schizophr Res.* 1993. V. 10. N1. P. 15–27.
26. Ong, W.Y., Garey, L.J. Neuronal architecture of the human temporal cortex // *Anat Embryol (Berl)*. 1990. V. 181. N4. P. 351–364.
27. Ong, W.Y., Garey, L.J. Ultrastructural characteristics of human adult and infant cerebral cortical neurons // *J. Anat.* – 1991. – V. 175. – P. 79–104.
28. Shimada A., Keino H., Satoh M. et al. Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: a model of cerebral degeneration // *Synapse*. 2003. Vol. 48. №4. P. 198–204.
29. Tarsa L., Balkowiec A. Nerve growth factor regulates synaptophysin expressing in developing trigeminal ganglion neurons in vitro // *Neuropeptides*. 2009. V. 43. C. 47–52.
30. Unal-Cevik I., Kilinc M., Gursoy-Ozdemir Y. et al. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note // *Brain Res.* 2004. V. 1015. N 1–2. P. 169–174.
31. Van Otterloo E., O'Dwyer G., Stockmeier C.A. Reductions in neuronal density in elderly depressed are region Specific // *Int J Geriatr Psychiatry*. 2009. V. 24. N8. P. 856–864.
32. Wang Q., Ishikawa T., Michiue T. [et al]. Quantitative immunohistochemical analysis of human brain basic fibroblast growth factor, glial fibrillary acidic protein and single-stranded DNA expressions following traumatic brain injury // *Forensic Sci Int.* 2012. V. 221. N1-3. P. 142–151.
33. Xu G.P., Dave K.R., Vivero R. [et al]. Improvement in neuronal survival after ischemic pre-conditioning in hippocampal slice cultures // *Brain Res.* 2002. V. 952. N 2. P.153–158.
34. Yu W., Lee H.K., Hariharan S. [et al]. Quantitative neurite outgrowth measurement based on image segmentation with topological dependence // *Cytometry A*. 2009. V. 75. N4. P. 289–297.
35. Zink D., Sadoni N., Stelzer E. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells // *Methods*. 2003. V.29. N1. P. 42–50.

## References

1. Akulinin VA, Mytsik AV, Stepanov SS, et al. Strukturno-funktsional'noe sostoyanie piramid-nykh neyrovov kory bol'shogo mozga cheloveka v postreanimatsionnom periode. *Vestnik NGU*. 2012;10(4):21-8. Russian.
2. Blinkov SM, Glezer II. *Mozg v tsifrakh i tablitsakh*. L.: Meditsina; 1964. Russian.
3. Mytsik AV, Stepanov SS, Larionov PM, Akulinin VA. Aktual'nye problemy izucheniya strukturno-funktsional'nogo sostoyaniya neyrovov kory bol'shogo mozga cheloveka v postishemicheskom periode. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2012;1(1):37-47. Russian.
4. Mytsik AV, Akulinin VA, Stepanov SS, et al. Immunofluorescentnaya verifikatsiya i morfometriya aksozomatskikh sinapsov neokorteksa cheloveka pri ostroy i khronicheskoy ishemii. *Morfologicheskie vedomosti*. 2012;3:53-60. Russian.
5. Mytsik AV, Stepanov SS, Larionov PM, et al. Aktual'nye problemy izucheniya neyrogial'nykh vzaimootnosheniy kory bol'shogo mozga cheloveka v postishemicheskom periode. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2012;6:48-51. Russian.

6. Mytsik AV, Akulinin VA, Stepanov SS, Larionov PM. Vliyanie ishemii na neyro-gliial'nye vzaimootnosheniya lobnoy kory bol'shogo mozga cheloveka. Omskiy nauchnyy vestnik. 2013;1(118):74-7. Russian.
7. Mytsik AV, Akulinin VA, Stepanov SS, Larionov PM. Immunogistokhimicheskaya i morfometri-cheskaya kharakteristika mezhneyronnykh vzaimootnosheniy lobnoy kory bol'shogo mozga cheloveka pri ostroy i khronicheskoy ishemii. Vestnik NGU. 2013;11(3):154-61. Russian.
8. Okhotin VE, Kalinichenko SG. Gistofiziologiya korzinchatykh kletok neokorteksa. Morfologiya. 2001;120(4):7-24. Russian.
9. Savel'ev SV. Sravnitel'naya anatomiya nervnoy sistemy pozvonochnykh. Moscow: Geotar-med; 2001. Russian.
10. Khrenov FI, Belichenko PV, Shamakina IYu. Kolichestvennyy analiz sinaptofizina ( $\tau$ 38) v mozge potomstva vtorogo pokoleniya ot samtsov krysa s dlitel'noy morfinooy intoksikatsiyey. Byulleten' eksper. biol. i med. 2000;129(1):50-2. Russian.
11. Abitz M, Nielsen RD, Jones EG, et al. Excess of neurons in the human newborn mediodorsal thalamus compared with that of the adult. *Cereb. Cortex*. 2007;17:2573-8.
12. Andiman SE, Haynes RL, Trachtenberg FL, et al. The cerebral cortex overlying periventricular leukomalacia: analysis of pyramidal neurons. *Brain Pathol*. 2010;20(4):803-14.
13. Buritica E, Villamil L, Guzman F, et al. Changes in calcium-binding protein expression in human cortical contusion tissue. *Journal of Neurotrauma*. 2009;26:2145-55.
14. Dorph-Petersen K-A, Delevich KM, Marcisin MJ, et al. Pyramidal neuron number in layer 3 of primary auditory cortex of subjects with schizophrenia. *Brain Res*. 2009;1285:42-57.
15. Downes EG, Robson J, Grailly E, et al. Loss of synaptophysin and synaptosomal-associated protein 25-kDa (SNAP-25) in elderly Down syndrome individuals. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2008;34(1):12-22.
16. Druga R. Neocortical inhibitory system (cortical interneurons / GABAergic neurons/calcium-binding proteins/neuropeptides). *Folia Biologica (Praha)*. 2009;55:201-17.
17. Fiala JC. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *Journal of Microscopy*. 2005;218(1):52-61.
18. Ho S-Y, Chao C-Y, Huang H-L, et al. NeurphologyJ: An automatic neuronal morphology quantification method and its application in pharmacological discovery. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:1-18.
19. Lavenex P, Lavenex PB, Bennett JL, Amaral DG. Postmortem changes in the neuroanatomical characteristics of the primate brain: the hippocampal formation. *J. Comp Neurol*. 2009;512(1):27-51.
20. Lyck L, Dalmau I, Chemnitz J, et al. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2008;56(3):201-21.
21. Ong WY, Garey LJ, Leong SK, Reynolds R. Localization of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in the human cerebral cortex and subcortical white matter – a double immunolabelling and electron microscopic study. *J Neurocytol*. 1995;24(8):602-10.
22. Ong WY, Garey LJ, Reynolds R. Distribution of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in human cerebral cortical astrocytes – a light and electron microscopic study. *J Neurocytol*. 1993;22(10):893-902.
23. Ong WY, He Y, Tan KK, Garey LJ. Differential localisation of the metabotropic glutamate receptor mGluR1a and the ionotropic glutamate receptor GluR2/3 in neurons of the human cerebral cortex. *Exp Brain Res*. 1998;119(3):367-74.
24. Ong WY, Yeo TT, Balcar VJ, Garey LJ. A light and electron microscopic study of GAT-1-positive cells in the cerebral cortex of man and monkey. *J Neurocytol*. 1998;27(10):719-30.
25. Ong, WY, Garey LJ. Ultrastructural features of biopsied temporopolar cortex (area 38) in a case of schizophrenia. *Schizophr Res*. 1993;10(1):15-27.
26. Ong WY, Garey LJ. Neuronal architecture of the human temporal cortex. *Anat Embryol (Berl)*. 1990;181(4):351-64.
27. Ong WY, Garey LJ. Ultrastructural characteristics of human adult and infant cerebral cortical neurons. *J. Anat*. 1991;175:79-104.
28. Shimada A, Keino H, Satoh M, et al. Age-related loss of synapses in the frontal cortex of SAMP10 mouse: a model of cerebral degeneration. *Synapse*. 2003;48(4):198-204.
29. Tarsa L, Balkowiec A. Nerve growth factor regulates synaptophysin expressing in developing trigeminal ganglion neurons in vitro. *Neuropeptides*. 2009;43:47-52.
30. Unal-Cevik I, Kilinc M, Gursoy-Ozdemir Y, et al. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res*. 2004;1015(1-2):169-74.
31. Van Otterloo E, O'Dwyer G, Stockmeier CA. Reductions in neuronal density in elderly depressed are region Specific. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2009;24(8):856-64.
32. Wang Q, Ishikawa T, Michiue T, et al. Quantitative immunohistochemical analysis of human brain basic fibroblast growth factor, glial fibrillary acidic protein and single-stranded DNA expressions following traumatic brain injury. *Forensic Sci Int*. 2012;221(1-3):142-51.
33. Xu GP, Dave KR, Vivero R, et al. Improvement in neuronal survival after ischemic pre-conditioning in hippocampal slice cultures. *Brain Res*. 2002;952(2):153-8.

34. Yu W, Lee HK, Hariharan S, et al. Quantitative neurite outgrowth measurement based on image segmentation with topological dependence. *Cytometry A*. 2009;75(4):289-97.

35. Zink D, Sadoni N, Stelzer E. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods*. 2003;29(1):42-50.