

УДК 576.31:612-014(.001.5)778.19:616-076(001.8)

DOI: 10.36604/1998-5029-2021-81-135-143

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ В МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Н.Н.Дорофиев¹, И.А.Андриевская¹, О.А.Удовиченко²

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

²Филиал №1 Федерального государственного казенного учреждения «411 Военный госпиталь» Министерства обороны Российской Федерации, 675000, г. Благовещенск, ул. Ленина, 172

РЕЗЮМЕ. Введение. В обзоре литературы раскрыты результаты научных трудов, относящихся к современному высокотехнологическому методу для проведения морфологических исследований в биологии и медицине – конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Данный метод в сочетании с иммунофлуоресцентной гистохимией может быть использован в разнообразных исследованиях: от быстрой визуализации динамических процессов в живых клетках до тщательного морфологического анализа тканей, пространственного распределения макромолекул в фиксированных или живых клетках, автоматического сбора трехмерных данных, визуализации нескольких меченых образцов и измерении физиологических процессов в живых клетках и тканях органов. Цель. Определить современные возможности и перспективы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в морфологических исследованиях. **Результаты.** При проведении анализа данных научной литературы представлены возможности и перспективы применения конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в биомедицинских и морфологических исследованиях. Показано использование конфокального метода диагностики в гинекологии, молекулярной биологии, эндокринологии, эндоскопии. Особое внимание уделено применению данного метода исследования в эмбриологии. Кроме того, приведены сведения о роли конфокальной микроскопии при изучении микробного патогенеза в трехмерном контексте. Представлены данные об истории, основных принципах, технических инновациях и преимуществах конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. **Заключение.** Изучение современной научной литературы показало важность применения конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в современных научных исследованиях и диагностике заболеваний в клинических условиях, что позволит по-новому взглянуть на некоторые аспекты в современной морфологии и медицине.

Ключевые слова: конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, медицина, морфология, флуоресценция, клетка.

CURRENT OPPORTUNITIES AND PROSPECTS OF CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY IN MORPHOLOGICAL RESEARCH (REVIEW)

N.N.Dorofienko¹, I.A.Andrievskaya¹, O.A.Udovichenko²

¹Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

²Branch No. 1 of the "411 Military Hospital" of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 172 Lenina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

SUMMARY. Introduction. The review discloses the results of scientific works related to a modern high-tech method for conducting morphological studies in biology and medicine – confocal laser scanning microscopy. This method, in

Контактная информация

Николай Николаевич Дорофиев, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, лаборатория механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, Россия, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22. E-mail: dorofienko-nn@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Nikolay N. Dorofienko, PhD (Med.), Senior Staff Scientist, Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery Processes of the Respiratory System at Non-Specific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: dorofienko-nn@mail.ru

Для цитирования:

Дорофиев Н.Н., Андриевская И.А., Удовиченко О.А. Современные возможности и перспективы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в морфологических исследованиях (обзор литературы) // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2021. Вып.81. С.135–143. DOI: 10.36604/1998-5029-2021-81-135-143

For citation:

Dorofienko N.N., Andrievskaya I.A., Udovichenko O.A. Current opportunities and prospects of confocal laser scanning microscopy in morphological research (review). *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ = Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2021; (81):135–143 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2021-81-135-143

combination with immunofluorescence histochemistry, can be used in a variety of studies: from rapid visualization of dynamic processes in living cells to thorough morphological analysis of tissues, spatial distribution of macromolecules in fixed or living cells, automatic collection of three-dimensional data, visualization of several labeled samples and measurement of physiological processes in living cells and tissues of organs. **Aim.** To determine the current possibilities and prospects of confocal laser scanning microscopy in morphological studies. **Results.** When analyzing scientific literature data, the opportunities and prospects of using confocal laser scanning microscopy in biomedical and morphological studies are presented. The use of the confocal diagnostic method in gynecology, molecular biology, endocrinology, endoscopy is shown. Particular attention is paid to the application of this research method in embryology. In addition, information about the role of confocal microscopy in the study of microbial pathogenesis in a three-dimensional context is provided. Data on the history, basic principles, technical innovations and advantages of confocal laser scanning microscopy are presented. Conclusion. The study of modern scientific literature has shown the importance of using confocal laser scanning microscopy in modern scientific research and diagnosis of diseases in a clinical setting, which will allow to take a new look at some aspects in modern morphology and medicine.

Key words: confocal laser scanning microscopy, medicine, morphology, fluorescence, cell.

На сегодняшний день все большее распространение получает конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, которая стала одним из наиболее распространенных методов флуоресцентной микроскопии для трехмерных структурных исследований биологических клеток и тканей. Гибкость этого подхода позволила применить его в разнообразных исследованиях: от быстрой визуализации динамических процессов в живых клетках до тщательного морфологического анализа тканей и совместной локализации паттернов экспрессии белков [1].

Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп был впервые разработан и запатентован в 1957 году профессором Массачусетского технологического университета Marvin Lee Minsky. Однако это изобретение осталось в значительной степени невостребованным из-за отсутствия источников интенсивного света, необходимых для получения изображений, а также компьютерного оснащения, необходимого для обработки больших объемов данных. В конце 1960-х годов David Egger и Mojmir Petran изготовили многолучевой конфокальный микроскоп, где использовал вращающийся диск для исследования неокрашенных срезов мозга и ганглиозных клеток. В последующем David Egger разработал первый механический сканирующий конфокальный лазерный микроскоп и опубликовал первые изображения клеток в 1973 году. В конце 1980-х годов были достигнуты успехи в области компьютерных и лазерных технологий в сочетании с новыми алгоритмами для цифровой визуализации изображения, что привело к растущему интересу к конфокальной микроскопии [2]. Так, Tony Wilson et al. разработали концепцию и продемонстрировали полезность конфокальной визуализации при исследовании флуоресцентных биологических образцов. Первые конфокальные микроскопы появились в 1987 году и уже в 1990-х годах достижения в области оптики и электроники позволили получить более стабильные и мощные лазеры, высокоэффективные сканирующие зеркальные блоки, высокопроизводительную волоконную оптику, улучшенные тонкопленочные диэлектрические покрытия и детекторы с пониженными шумовыми характеристи-

ками. Кроме того, начали синтезировать флуорохромы, которые были более тщательно подобраны к линиям лазерного возбуждения. Разработка высокотехнологичного прибора, использование быстросканирующих зеркал вместо медленного перемещения образца и возможность устранения размытия вне фокуса для получения серии тонких оптических срезов образца в 3D революционизировали флуоресцентную визуализацию с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [3, 4].

Современные конфокальные микроскопы можно рассматривать как полностью интегрированные электронные системы, в которых оптический микроскоп играет центральную роль в конфигурации, состоящей из одного или нескольких электронных детекторов, компьютера (для отображения, обработки, вывода и хранения изображений) и нескольких лазерных систем, в сочетании с устройствами выбора длины волны и блоком сканирования луча [5].

Конфокальная микроскопия позволила значительно продвинуться в области биологической визуализации, поскольку она представляет собой быстрое и экономичное средство исследования толстых образцов тканей. В большинстве случаев это включает флуоресцентную визуализацию и она все чаще используется в качестве основного инструмента в биомедицинских исследованиях. Конфокальная микроскопия позволяет собирать тонкие оптические срезы без необходимости физического сечения ткани. Кроме того, конфокальные микроскопы обычно могут создавать изображения с большей чувствительностью, контрастом и разрешением, чем те, которые получаются с помощью обычных световых микроскопов [6, 7].

Поскольку высококачественные, сфокусированные оптические срезы препаратов толстой ткани могут быть получены быстро, конфокальная микроскопия в сочетании с иммунофлуоресцентной гистохимией теперь можно использовать для изучения сложных трехмерных распределений различных структур в тканях, например, нервы в дыхательных путях. Кроме того, ультрафиолетовая конфокальная микроскопия позволяет оценивать как динамические, так и статические

явления в живых клетках и тканях. Таким образом, в дополнение к визуализации флуоресценции, связанной со структурными элементами, конфокальные микроскопы могут использоваться для количественной оценки распределения и потоков внутриклеточных ионов кальция, натрия и хлора. Скоростные конфокальные микроскопы с линейным сканированием можно использовать для оценки динамических явлений со скоростью от секунд до миллисекунд. Например, впервые стало возможным получение изображений проницаемости микрососудов в дыхательных путях *in vivo* [7] с использованием вращающегося диска Нипкова с микролинзами. В сочетании со сверхвысокой чувствительностью, скоростью и системой камер с высоким разрешением, основанных на лавинном умножении фотопроводимости, это позволило наблюдать чрезвычайно динамичное движение мельчайших пузырьков в живых клетках в режиме реального времени. Расширения систем конфокальной визуализации, такие как конфокальные микроэндоскопы, позволяют получать качественные изображения *in vivo* и в настоящее время применяются для визуализации и диагностики заболеваний в клинических условиях [8, 9].

Конфокальная микроскопия обеспечивает трехмерное разрешение за счет создания так называемых «оптических сечений» с использованием простой геометрической оптики.

В стандартном широкоугольном микроскопе флуоресценция, генерируемая образцом, улавливается линзой объектива и передается непосредственно на детектор. Хотя они и применяются для визуализации тонких образцов, толстые образцы становятся размытыми из-за флуоресценции, генерируемой выше и ниже фокальной плоскости объектива. Напротив, конфокальная микроскопия позволяет делать виртуальные оптические срезы образцов, отклоняя расфокусированный свет для создания трехмерных изображений образцов с высоким разрешением. Конфокальные микроскопы достигают этого за счет использования конфокальной апертуры на пути луча обнаружения. Флуоресценция, собранная объективом от образца, ретранслируется обратно через сканирующие зеркала и через главное дихроичное зеркало, для отражения более коротких длин волн, луча лазерного возбуждения, при прохождении более длинного флуоресцентного излучения со сдвигом Стокса. Этот длинноволновый сигнал флуоресценции затем передается на пару линз по обе стороны от точечного отверстия, расположенного в плоскости, точно сопряженной с фокальной плоскостью линзы объектива. Фотоны, собранные из фокального объема объекта, коллимируются линзой объектива и фокусируются конфокальными линзами через точечное отверстие. Флуоресценция, генерируемая выше или ниже фокальной плоскости, не будет правильно коллимирована и не будет проходить через конфокальное отверстие, соз-

давая оптическое сечение, в котором виден только свет из фокуса микроскопа. Таким образом, точечное отверстие эффективно действует как виртуальная апертура в фокальной плоскости, ограничивая детектируемое излучение только одним ограниченным пространственным местоположением [9–11].

Исходя из принципа использования лазера в качестве источника света, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию разделяют на отражательную и флуоресцентную [12–14]. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия нашла практическое применение в производстве приборов, предназначенных для осуществления диагностики и научных исследований. При этом прослеживается четкое соответствие между видом конфокальной микроскопии и способом ее применения: отражательная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия оказалась весьма удобной для использования в диагностике, тогда как флуоресцентная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия прочно заняла свое место в фундаментальных и прикладных научных исследованиях [4, 15–17].

Флуоресцентная конфокальная микроскопия основана на улавливании сигнала, исходящего от возбужденного лазером флуорохрома. Свойствами флуорохрома могут обладать как нативные соединения (свойство аутофлуоресценции, присущее, например, коллагену), так и компоненты, окрашенные флуорохромными красителями или специфическими антителами, несущими такие красители [4].

При флуоресценции светоизлучающая молекула заметна на фоне других молекул, составляющих общую структуру. Если исследуемый образец не содержит такие молекулы (эндогенные флуорофоры), их внедряют в ткань извне – химическим методом или путем трансфицирования флуоресцентных белков в клетку. Чтобы молекула флуоресцировала, она должна поглотить фотон с соответствующим количеством энергии, достаточным для перехода молекулы из основного в возбужденное состояние. С момента появления зеленого флуоресцентного белка в 1960-х годах, были созданы многочисленные флуоресцентные белки с различными фотофизическими и спектральными свойствами, что значительно расширило доступную палитру флуоресцентных зондов для конфокальной микроскопии [18]. Кроме того, недавние улучшения в органических красителях позволили получить более яркие, меньшие по размеру и более светостойкие продукты. Флуорофоры включают синтетические флуорохромы, например красители Alexa и квантовые точки, и встречающиеся в природе флуоресцентные белки, например зеленый флуоресцентный белок (GFP) и его производные, например циановый флуоресцентный белок (CFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP). Многие из новых флуоресцентных зондов были разработаны так, чтобы их спектры возбуждения и излучения точно соответствовали длинам волн, доставляемых лазерами. Конфокальная визуализация с использова-

нием флуоресцентного белка, красителей и широкого спектра доступных вторичных антител была использована с большим эффектом для определения локализации белков и структур в целых клетках и тканях, и мониторинга быстрой динамики в живых клетках [19].

В отсутствие необходимых антител или при недостаточной концентрации исследуемого белка применяется трансфекция клеток генетическими конструкциями, которые кроме исследуемого белка кодируют белковые метки (tag-proteins), а для визуализации используются уже антитела к этим заранее известным меткам. Разработано достаточно много флуоресцирующих белков, на основании которых можно получать фьюжн-протеины для конкретных нужд. Использование двух и более меток позволяет одновременно исследовать субклеточную локализацию нескольких белков в живых клетках. Кроме того, оснащение конфокального микроскопа инкубатором, позволяющим контролировать температуру и содержание CO₂, дает возможность длительного наблюдения за различными внутриклеточными процессами. При выборе зондов для любого эксперимента по визуализации следует учитывать квантовую эффективность, яркость, а также спектры возбуждения и излучения, и оптические фильтры должны быть соответствующим образом настроены [19, 20].

Объектами исследования методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в медицине и биологии являются живые клетки (включая культуры клеток человека и животных, а также отдельные микроорганизмы) и фиксированные препараты (как отдельные клетки, полученные из соскобов слизистых покровов или проб крови, так и фрагменты тканей из биоптатов) [21–23]. Предмет исследования методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в медицине и морфологии представляют крупные биомолекулы и органеллы клетки, их структурная организация, внутриклеточный транспорт и межклеточные взаимодействия, позволяющие изучить особенности течения заболеваний на молекулярном уровне [4]. Наиболее частой задачей в биологии, в том числе гидробиологии, изучение количества и состава примесей в воде с применением конфокального микроскопа сегодня стало особенно актуальным. В медицинской деятельности в сфере диагностики, это получение результатов лабораторных исследований и постановка диагноза пациентам. Кроме того, диагностическая конфокальная микроскопия позволяет выявить нарушения в клетках и обнаружить различные заболевания, в том числе онкологические, уже на ранних стадиях их развития. Широко применяется конфокальный метод диагностики по таким направлениям, как офтальмология, проктология, дерматология и эндокринология. В эмбриологии конфокальная микроскопия позволяет наблюдать стадии эмбрионального развития живого организма, а в фармацевтической деятельности дает возможность разрабатывать новые лекарственные пре-

параты [24].

На сегодняшний день конфокальная микроскопия позволяет определить влияние определенных веществ и их количество в цитоплазме или других частях клетки, выявить наличие продуктов метаболизма в организме, сравнить интенсивность процесса метаболизма при различных условиях, а так же определить, как быстро выводятся вещества из клетки и степень влияния канцерогенов на клетки организма человека. С применением данного метода возможно точно определять оптимальную концентрацию того или иного медицинского препарата, исследовать влияние противоопухолевых лекарственных препаратов на клетки организма, выявлять и отличать клетки воспалительного характера от нормальных клеток (широко применяется на ранней стадии диагностики рака шейки матки), а так же упростить процесс биопсийного исследования лимфоузлов в случае определения злокачественной ткани [25, 26].

Флуоресцентная конфокальная микроскопия ввиду ряда причин не используется для диагностики, но имеет большое значение в научных исследованиях. В морфологии флуоресцентная конфокальная микроскопия находит применение в описании структуры органа и его компонентов, а так же в изучении причин и особенностей течения заболеваний на молекулярном уровне.

Пространственное расположение капилляров было изучено M.Jirkovská et al. [27] в терминальных ворсинках плаценты в срок с помощью конфокальной микроскопии и методов различных типов трехмерных реконструкций. Была выполнена топологическая реконструкция капиллярного русла и измерения его числа Эйлера, поверхностная и объемная визуализация, а так же каркасная. По результатам исследования отмечено, что капилляры ворсинок расположены либо в одну петлю, либо в более или менее сложную анастомозирующую систему. Таким образом, метод с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии может привести к получению объемной информации о структуре капиллярного ложе плаценты.

При исследовании действия гормонов щитовидной железы на костные клетки, S.Blouin et al. [28] изучали экспрессию остеокальцина (неколлагеновый белок костного матрикса, синтезируемого остеобластами, является маркером метаболизма костной ткани) в ответ на стимуляцию тиреоидным гормоном Т3. Во время 3D-наблюдения с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии идентифицировали белок остеокальцин, который накапливался в аппарате Гольджи, когда клетки инкубировали при 15°C, но немедленно высвобождался при повышении температуры. Отмечено, что вместо накопления в аппарате Гольджи, остеокальцин быстро секретируется для выполнения своей биологической функции. При исследовании влияния Т3 на морфологию, активность роста и актиновый цитоскелет остеобластов с помощью кон-

фокальной лазерной сканирующей микроскопии, авторами было показано, что ТЗ вызывал остановку пролиферации, но не подавлял синтез ДНК. Эти данные свидетельствуют о том, что ТЗ усиливает апоптоз клеток, что указывает на значимость тироидных гормонов для процесса дифференцировки остеобластов.

В работе J.B.Samarasena et al. [29] с помощью конфокальной лазерной эндомикроскопии на основе иглы, впервые, так как ранее этот неинвазивный метод не был возможен, продемонстрирована возможность неинвазивной визуализации *in vivo* нервной системы желудка, состоящей из подслизистого и миэнтерического сплетения, регулирующего мышечную активность и функцию слизистой оболочки. Флуоресцентная микроскопия срезов слизистой оболочки показала, что введенный *in vivo* флуорофор (NeuroTrace) сохранялся во всех компонентах нервной системы желудка и успешно визуализировал нервные клетки и нервные волокна в характерных образцах изображения.

С использованием метода флуоресцентной конфокальной микроскопии проводятся исследования, связанные с разработкой Ca^{2+} -чувствительных флуоресцентных зондов, для раскрытия сложностей передачи сигналов Ca^{2+} на клеточном и субклеточном уровне. В частности, изучение передачи сигналов Ca^{2+} на уровне отдельной клетки с использованием Ca^{2+} -чувствительного флуоресцентного индикатора. В сочетании с конфокальной микроскопией изучаются другие аспекты внутриклеточной передачи сигналов, такие как иммунофлуоресцентное мечение, использование биосенсоров с флуоресцентной меткой для измерения активности фосфолипазы C и использование лигандов с флуоресцентной меткой, для измерения интернализации рецептора или лиганда [30].

В частности, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия является хорошим методом, который оказался чрезвычайно ценным для изучения микробного патогенеза, поскольку он обеспечивает высокое оптическое разрешение, увеличенный контраст изображения и, что более важно, получение изображений из неразрезанной ткани, где сохраняется ее естественная архитектура. Анализ тканей без разрезов является очень желательной функцией, поскольку он позволяет изучать инфекцию в трехмерном контексте [31].

С появлением и применением флуоресцентной видеомикроскопии органические красители могут быть использованы для маркировки вирусов и механизмов почкования, а также слияния оболочечных вирусов, отслеживаемых в живых клетках [32]. В частности, визуализация транспортного поведения вирусов, меченых флуоресцентными белками, помогла ускорить понимание проникновения вируса, слияния и передачи вируса иммунодефицита человека от клетки к клетке [33]. Использование метода отслеживания одного вируса (SVT), позволило отслеживать отдельные вирусы на разных этапах их жизненного цикла и, таким образом, обеспечить динамическое понимание фундамен-

тальных процессов вирусов, происходящих в живых клетках. SVT обычно основывается на флуоресцентной визуализации и раскрывает ранее неизвестные механизмы заражения. Впоследствии различные виды вирусных компонентов, включая белок оболочки, тегумент и капсид, были генетически помечены флуоресцентными белками, что способствовало визуализации инфекционных процессов непосредственно и динамически в живых клетках и, тем самым, раскрыть механизмы заражения и распространения вируса в клетках-хозяевах с использованием SVT [34]. SVT также использовался для отслеживания поглощения и клеточного распределения искусственных вирусов и носителей доставки лекарств из-за их схожей природы [35].

Обзор изученной современной научной литературы показал, что конфокальная микроскопия – метод оптической визуализации, в котором используется точечное освещение через пространственное точечное отверстие для устранения сигналов, не находящихся в фокусе. В конфокальной микроскопии возбуждающий свет обычно создается лазером для создания высокой интенсивности флуоресценции или отражения от фокального пятна. Флуоресцентная конфокальная микроскопия чаще всего используется в дерматологии, гинекологии и морфологии для анализа образцов *ex vivo* и *in vitro*. Отражательная конфокальная микроскопия может применяться для микроскопии в реальном времени и использует меланин в качестве естественного контрастного вещества. Конфокальная микроскопия имеет множество преимуществ, включая увеличение оптического разрешения и контрастности изображения образца, облегчение реконструкции трехмерных изображений, возможность сбора серийных оптических срезов из толстых образцов, и включение *in vivo* визуализации без артефакта, вызванного обработкой ткани. В дополнение к конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, трехмерные изображения неживых образцов так же могут быть получены с помощью конфокальной сканирующей просвечивающей электронной микроскопии, где для освещения используется электронный луч, что приводит к более высокому разрешению по сравнению с конфокальной микроскопией. Ограничения конфокальной микроскопии включают глубину изображения в толстых образцах ткани и высокую стоимость по сравнению с обычными микроскопами. Проблемы фотообесцвечивания флуоресцентных зондов и фототоксичности, присущие традиционной флуоресцентной микроскопии, также присутствуют при конфокальной микроскопии. Многофотонная микроскопия – альтернативная стратегия флуоресцентной микроскопии, которая предлагает более высокое разрешение, несколько большую глубину изображения и минимальное фотообесцвечивание [36].

Достижения в области физики (многофотонная), химии (зонды) и биологии (модели на животных) пре-

доставили в морфологической дисциплине специализированные инструменты для количественной оценки молекулярных и клеточных механизмов, управляющих различными метаболическими процессами в различных тканях и органах, путем прямой визуализации клеточного поведения в 3-х измерениях с течением времени. Благодаря временному и пространственному разрешению конфокальной микроскопии, морфологи получили новое представление о нормальном гомеостазе в органах и клетках, ответах «хозяина» на патогены, противоопухолевых иммунных ответах и процессах, вызывающих развитие аутоиммунных патологий, путем количественной оценки гистологического анализа. Достижения в области визуализации

глубоких тканей, включая новые флуоресцентные белки, повышенное разрешение, скорость получения изображений, чувствительность, количество сигналов и улучшенные методы анализа данных, обеспечили беспрецедентную возможность количественной оценки патофизиологических процессов на уровне отдельных клеток.

Таким образом, изучение современной научной литературы показало важность применения конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в современных научных исследованиях и диагностике заболеваний в клинических условиях, что позволит по-новому взглянуть на некоторые аспекты в современной морфологии и медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bayguinov P.O., Oakley D.M., Shih C.C., Geanon D.J., Joens M.S., Fitzpatrick J-A.J. Modern laser scanning confocal microscopy // *Curr. Protoc. Cytom.* 2018. Vol. 85, №1. Article number: e39. doi: 10.1002/cpcy.39
2. Paddock S.W., Eliceiri K.W. Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques // *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol.1075. P.9–47. doi: 10.1007/978-1-60761-847-8_2
3. Amos W.B., White J.G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research // *Biol. Cell.* 2003. Vol.95, №6. P.335–342. doi: 10.1016/s0248-4900(03)00078-9
4. Волков И.А., Фриго Н.В., Знаменская Л.Ф., Катунина О.Р. Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в биологии и медицине // *Вестник дерматологии и венерологии.* 2014. Т.90, №1. С.17–24. doi: 10.25208/0042-4609-2014-90-1-17-24
5. Потекаев Н.Н., Ткаченко С.Б., Овчинникова А.Ю., Лукашева Н.Н. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия на примере Vivascope 1500: принцип работы и возможности применения в дерматологии // *Российский медицинский форум.* 2008. №2. С. 38–44.
6. Gomes da Costa S., Richter A., Schmidt U., Breuninger S., Hollricher O. Confocal raman microscopy in life sciences // *Morphologie.* 2019. Vol.103, №341. P.11–16. doi: 10.1016/j.morpho.2018.12.003
7. Rigby P.J., Goldie R.G. Confocal microscopy in biomedical research // *Croat. Med. J.* 1999. Vol.40, №3. P.346–52.
8. Gräf R., Rietdorf J., Zimmermann T. Live cell spinning disk microscopy // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2005. Vol.95. P.57–75. doi: 10.1007/b102210
9. Nichols A.J., Evans C.L. Video-rate scanning confocal microscopy and microendoscopy // *J. Vis. Exp.* 2011. Vol.20, №56. Article number: 3252. doi: 10.3791/3252
10. Callamaras N., Parker I. Construction of a confocal microscope for real-time x-y and x-z imaging // *Cell Calcium.* 1999. Vol.26, №6. P.271–279. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0085>
11. Elliott A.D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices // *Curr. Protoc. Cytom.* 2020. Vol.92, №1. Article number: e68. doi: 10.1002/cpcy.68.
12. Fink-Puches R., Hofmann-Wellenhof R., Smolle J., Kerl H. Confocal laser scanning microscopy: a new optical microscopic technique for applications in pathology and dermatology // *J. Cutan. Pathol.* 1995. Vol.22, №3. P.252–259. doi: 10.1111/j.1600-0560.1995.tb00747.x
13. Ono I., Sakemoto A., Ogino J., Kamiya T., Yamashita T., Jimbow K. The real-time, three-dimensional analyses of benign and malignant skin tumors by confocal laser scanning microscopy // *J. Dermatol. Sci.* 2006. Vol.43, №2. P.135–141. doi: 10.1016/j.jdermsci.2006.05.001
14. Branzan A.L., Landthaler M., Szeimies R-M. In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology // *Lasers Med. Sci.* 2007. Vol.22, №2. P.73–82. doi: 10.1007/s10103-006-0416-8
15. Becker B.E., Gard D.L. Visualization of the cytoskeleton in *Xenopus* oocytes and eggs by confocal immunofluorescence microscopy // *Methods Mol. Biol.* 2006. Vol.322. P.69–86. doi: 10.1007/978-1-59745-000-3_6
16. Wertheim M.S., Mathers W.D., Suhler E.B., Wilson D.J., Rosenbaum J.T. Histopathological features of conjunctival sarcoid nodules using noninvasive in vivo confocal microscopy // *Arch. Ophthalmol.* 2005. Vol.123, №2. P.274–276. doi: 10.1001/archophth.123.2.274
17. Suihko C., Serup J. Fluorescence confocal laser scanning microscopy for in vivo imaging of epidermal reactions to two experimental irritants // *Skin Res. Technol.* 2008. Vol.14, №4. P.498–503. doi: 10.1111/j.1600-0846.2008.00323.x
18. Specht E.A., Braselmann E., Palmer A.E. A. Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging // *Annu. Rev. Physiol.* 2017. Vol.79. P.93–117. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034055
19. Ni M., Zhuo S., So P.T., Yu H. Fluorescent probes for nanoscopy: four categories and multiple possibilities // *J.*

Biophotonics. 2017. Vol.10, №1. P.11–23. doi: 10.1002/jbio.201600042

20. Paddock S.W., Eliceiri K.W. Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques // *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol.1075. P.9–47. doi: 10.1007/978-1-60761-847-8_2

21. Kaufman G., Horwitz B.A., Duek L., Ullman Y., Berdicevsky I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes // *Med. Mycol.* 2007. Vol.45, №2. P.149–155. doi: 10.1080/13693780601113618

22. Santoro L., Nolano M., Faraso S., Fiorillo C., Vitiello C., Provitera V., Aurino S., Nigro V. Perioral skin biopsy to study skeletal muscle protein expression // *Muscle Nerve.* 2010. Vol.41, №3. P.392–398. doi: 10.1002/mus.21506

23. Johansson L., Thulin P., Sendi P., Hertzén E., Linder A., Akesson P., Low D.E., Agerberth B., Norrby-Teglund A. Cathelicidin LL-37 in severe *Streptococcus pyogenes* soft tissue infections in humans // *Infect. Immun.* 2008. Vol.76, №8. P.3399–3404. doi: 10.1128/IAI.01392-07

24. Мокрышева Н.Г., Киселев С.Л., Клементьева Н.В., Горбачева А.М., Дедов И.И. Применение конфокальной микроскопии в фундаментальных исследованиях и клинической практике эндокринолога: современные возможности // *Проблемы эндокринологии.* 2019. Т.65, №3. С.174–183. <https://doi.org/10.14341/probl10140>

25. Tovey S.C., Brighton P.J., Willars G.B. Confocal microscopy: theory and applications for cellular signaling // *Methods Mol. Biol.* 2005. Vol.312. P.57–85. doi: 10.1385/1-59259-949-4:057

26. Levi A., Ingber A., Enk D.C. In vivo reflectance-mode confocal laser microscopy: basic principles and clinical and research employments in dermatology // *Harefuah.* 2012. Vol.151, №10. P.576–580.

27. Jirkovská M., Kubínová L., Krekule I., Hach P. Spatial arrangement of fetal placental capillaries in terminal villi: a study using confocal microscopy // *Anat. Embryol. (Berl.).* 1998. Vol.197, №4. P.263–272. doi: 10.1007/s004290050136

28. Blouin S., Roschger A., Varga F., Misof B., Spitzer S., Roschger P., Klaushofer K. Confocal laser scanning microscopy—a powerful tool in bone research // *Wien Med. Wochenschr.* 2018. Vol.168, №11–12. P.314–321. doi: 10.1007/s10354-018-0639-x

29. Samarasena J.B., Ahluwalia A., Shinoura S., Choi K.D., Lee J.G., Chang K.J., Tarnawski A.S. In vivo imaging of porcine gastric enteric nervous system using confocal laser endomicroscopy & molecular neuronal probe // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2016. Vol.31, №4. P.802–807. doi: 10.1111/jgh.13194

30. Tovey S.C., Brighton P.J., Willars G.B. Confocal microscopy: theory and applications for cellular signaling // *Methods Mol. Biol.* 2005. Vol.312. P.57–85. doi: 10.1385/1-59259-949-4:057

31. Gonzalez R.J. Laser Scanning Microscopy of *Yersinia pestis* Infected Tissues // *Methods Mol. Biol.* 2019. Vol.2010. P.69–84. doi: 10.1007/978-1-4939-9541-7_6

32. Georgi A., Mottola-Hartshorn C., Warner A., Fields B., Chen L.B. Detection of individual fluorescently labeled reovirions in living cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990. Vol.87, №17. P.6579–6583. doi: 10.1073/pnas.87.17.6579

33. Koch P., Lampe M., Godinez W.J., Müller B., Rohr K., Kräusslich H.G., Lehmann M.J. Visualizing fusion of pseudotyped HIV-1 particles in real time by live cell microscopy // *Retrovirology.* 2009. Vol.18, №6. Article number: 84. doi: 10.1186/1742-4690-6-84

34. Moradpour D., Evans M.J., Gosert R., Yuan Z., Blum H.E., Goff S.P., Lindenbach B.D., Rice C.M. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes // *J. Virol.* 2004. Vol.78, №14. P.7400–7409. doi: 10.1128/JVI.78.14.7400-7409.2004

35. Liu S.L., Wang Z.G., Xie H.Y., Liu A.A., Lamb D.C., Pang D.W. Single-Virus Tracking: From Imaging Methodologies to Virological Applications // *Chem. Rev.* 2020. Vol.120, №3. P.1936–1979. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00692

36. Nwaneshiudu A., Kuschal C., Sakamoto F.H., Anderson R.R., Schwarzenberger K., Young R.C. Introduction to confocal microscopy // *J. Invest. Dermatol.* 2012. Vol.132, №12. Article number: e3. doi: 10.1038/jid.2012.429

REFERENCES

1. Bayguinov P.O., Oakley D.M., Shih C.C., Geanon D.J., Joens M.S., Fitzpatrick J-A.J. Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.* 2018; 85(1):e39. doi: 10.1002/cpcy.39

2. Paddock S.W., Eliceiri K.W. Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1075:9–47. doi: 10.1007/978-1-60761-847-8_2

3. Amos W.B., White J.G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol. Cell* 2003; 95(6):335–342. doi: 10.1016/s0248-4900(03)00078-9

4. Volkov I.A., Frigo N.V., Znamenskaya L.F., Katunina O.R. Application of Confocal Laser Scanning Microscopy in Biology and Medicine. *Vestnik dermatologii i venerologii* 2014; 90(1):17–24 (in Russian). doi: 10.25208/0042-4609-2014-90-1-17-24

5. Potekaev N.N., Tkachenko S.B., Ovchinnikova A.Yu., Lukashova N.N. Confocal laser scanning microscopy on the example of Vivascope 1500: principle of operation and possibilities of application in dermatology. *Rossiiskiy meditsinskiy forum* 2008; (2):38–44 (in Russian).

6. Gomes da Costa S., Richter A., Schmidt U., Breuninger S., Hollricher O. Confocal Raman microscopy in life

sciences. *Morphologie* 2019; 103(341):11–16. doi: 10.1016/j.morpho.2018.12.003

7. Rigby P.J., Goldie R.G. Confocal microscopy in biomedical research. *Croat. Med. J.* 1999; 40(3):346–352.

8. Gräf R., Rietdorf J., Zimmermann T. Live cell spinning disk microscopy. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2005; 95:57–75. doi: 10.1007/b102210

9. Nichols A.J., Evans C.L. Video-rate scanning confocal microscopy and microendoscopy. *J. Vis. Exp.* 2011; 20(56):3252. doi: 10.3791/3252

10. Callamaras N., Parker I. Construction of a confocal microscope for real-time x-y and x-z imaging. *Cell Calcium* 1999; 26(6):271–279. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0085>

11. Elliott A.D. Confocal Microscopy: principles and modern practices. *Curr. Protoc. Cytom.* 2020; 92(1):e68. doi: 10.1002/cpcy.68

12. Fink-Puches R., Hofmann-Wellenhof R., Smolle J., Kerl H. Confocal laser scanning microscopy: a new optical microscopic technique for applications in pathology and dermatology. *J. Cutan. Pathol.* 1995; 22(3):252–259. doi: 10.1111/j.1600-0560.1995.tb00747.x

13. Ono I., Sakemoto A., Ogino J., Kamiya T., Yamashita T., Jimbow K. The realtime, three-dimensional analyses of benign and malignant skin tumors by confocal laser scanning microscopy. *J. Dermatol Science* 2006; 43(2):135–141. doi: 10.1016/j.jdermsci.2006.05.001

14. Branzan A.L., Landthaler M., Szeimies R-M. In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology. *Lasers Med. Sci.* 2007; 22(2):73–82. doi: 10.1007/s10103-006-0416-8

15. Becker B.E., Gard D.L. Visualization of the cytoskeleton in *Xenopus* oocytes and eggs by confocal immunofluorescence microscopy. *Methods Mol. Biol.* 2006; 322:69–86. doi: 10.1007/978-1-59745-000-3_6

16. Wertheim M.S., Mathers W.D., Suhler E.B., Wilson D.J., Rosenbaum J.T. Histopathological features of conjunctival sarcoid nodules using noninvasive in vivo confocal microscopy. *Arch. Ophthalmol.* 2005; 123(2):274–276. doi: 10.1001/archophth.123.2.274

17. Suihko C., Serup J. Fluorescence confocal laser scanning microscopy for in vivo imaging of epidermal reactions to two experimental irritants. *Skin Res. Technol.* 2008; 14(4):498–503. doi: 10.1111/j.1600-0846.2008.00323.x

18. Specht E.A., Braselmann E., Palmer A.E. A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. *Annu. Rev. Physiol.* 2017; 79:93–117. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034055

19. Ni M., Zhuo S., So P.T., Yu H. Fluorescent probes for nanoscopy: four categories and multiple possibilities. *J. Biophotonics* 2017; 10(1):11–23. doi: 10.1002/jbio.201600042

20. Paddock S.W., Eliceiri K.W. Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1075:9–47. doi: 10.1007/978-1-60761-847-8_2

21. Kaufman G., Horwitz B.A., Duek L., Ullman Y., Berdicevsky I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Med. Mycol.* 2007; 45(2):149–155. doi: 10.1080/13693780601113618

22. Santoro L., Nolano M., Faraso S., Fiorillo C., Vitiello C., Provitera V., Aurino S., Nigro V. Perioral skin biopsy to study skeletal muscle protein expression. *Muscle Nerve.* 2010; 41(3):392–398. doi: 10.1002/mus.21506

23. Johansson L., Thulin P., Sendi P., Hertzén E., Linder A., Akesson P., Low D.E., Agerberth B., Norrby-Teglund A. Cathelicidin LL-37 in severe *Streptococcus pyogenes* soft tissue infections in humans. *Infect. Immun.* 2008; 76(8):3399–3404. doi: 10.1128/IAI.01392-07

24. Mokrysheva N.G., Kiselev S.L., Klementieva N.V., Gorbacheva A.M., Dedov I.I. The use of confocal microscopy in experimental studies and clinical practice of an endocrinologist: modern opportunities. *Problems of Endocrinology* 2019; 65(3):174–183 (in Russian). <https://doi.org/10.14341/probl10140>

25. Tovey S.C., Brighton P.J., Willars G.B. Confocal microscopy: theory and applications for cellular signaling. *Methods Mol. Biol.* 2005; 312:57–85. doi: 10.1385/1-59259-949-4:057

26. Levi A., Ingber A., Enk D.C. In vivo reflectance-mode confocal laser microscopy: basic principles and clinical and research employments in dermatology. *Harefuah* 2012; 151(10):576–580.

27. Jirkovská M., Kubínová L., Krekule I., Hach P. Spatial arrangement of fetal placental capillaries in terminal villi: a study using confocal microscopy. *Anat. Embryol. (Berl.)* 1998; 197:263–272. doi: 10.1007/s004290050136

28. Blouin S., Roschger A., Varga F., Misof B., Spitzer S., Roschger P., Klaushofer K. Confocal laser scanning microscopy – a powerful tool in bone research. *Wien Med. Wochenschr.* 2018; 168:314–321. doi:10.1007/s10354-018-0639-x

29. Samarasena J.B., Ahluwalia A., Shinoura S., Choi K.D., Lee J.G., Chang K.J., Tarnawski A.S. In vivo imaging of porcine gastric enteric nervous system using confocal laser endomicroscopy & molecular neuronal probe. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 31(4):802–807. doi: 10.1111/jgh.13194

30. Tovey S.C., Brighton P.J., Willars G.B. Confocal microscopy: theory and applications for cellular signaling. *Methods Mol. Biol.* 2005; 312:57–85. doi: 10.1385/1-59259-949-4:057

31. Gonzalez R.J. Laser Scanning Microscopy of *Yersinia pestis* Infected Tissues. *Methods Mol. Biol.* 2019; 2010:69–

84. doi: 10.1007/978-1-4939-9541-7_6

32. Georgi A., Mottola-Hartshorn C., Warner A., Fields B., Chen L.B. Detection of individual fluorescently labeled reovirions in living cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1990; 87(17):6579–6583. doi: 10.1073/pnas.87.17.6579

33. Koch P., Lampe M., Godinez W.J., Müller B., Rohr K., Kräusslich H.G., Lehmann M.J. Visualizing fusion of pseudotyped HIV-1 particles in real time by live cell microscopy. *Retrovirology* 2009; 18(6):84. doi: 10.1186/1742-4690-6-84

34. Moradpour D., Evans M.J., Gosert R., Yuan Z., Blum H.E., Goff S.P., Lindenbach B.D., Rice C.M. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.* 2004; 78(14):7400–7409. doi: 10.1128/JVI.78.14.7400-7409.2004

35. Liu S.L., Wang Z.G., Xie H.Y., Liu A.A., Lamb D.C., Pang D.W. Single-Virus Tracking: From Imaging Methodologies to Virological Applications. *Chem. Rev.* 2020; 120(3):1936–1979. doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00692

36. Nwaneshiudu A., Kuschal C., Sakamoto F.H., Anderson R.R., Schwarzenberger K., Young R.C. Introduction to confocal microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 2012; 132(12):e3. doi: 10.1038/jid.2012.429

Информация об авторах:

Николай Николаевич Дорофиевко, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, лаборатория механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания; e-mail: dorofienko-nn@mail.ru

Ирина Анатольевна Андриевская, д-р биол. наук, профессор РАН, зав. лабораторией механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов дыхательной системы при неспецифических заболеваниях легких, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания; e-mail: irina-andrievskaja@rambler.ru

Олег Алексеевич Удовиченко, начальник терапевтического отделения, Филиал №1 Федерального государственного казенного учреждения «411 Военный госпиталь» Министерства обороны Российской Федерации; e-mail: udol71@mail.ru

Author information:

Nikolay N. Dorofienko, PhD (Med.), Senior Staff Scientist, Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery Processes of the Respiratory System at Non-Specific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: dorofienko-nn@mail.ru

Irina A. Andrievskaya, PhD, DSc (Biol.), Professor of RAS, Head of Laboratory of Mechanisms of Etiopathogenesis and Recovery Processes of the Respiratory System at Non-Specific Lung Diseases, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: irina-andrievskaja@rambler.ru

Oleg A. Udovichenko, Head of Therapeutic Department of the Branch No. 1 of the "411 Military Hospital" of the Ministry of Defense of the Russian Federation; e-mail: udol71@mail.ru

Поступила 12.07.2021

Принята к печати 30.07.2021

Received July 12, 2021

Accepted July 30, 2021