

УДК 535.822: 57.086.2: 57.08

© Э. И. Лежнев, И. И. Попова, С. В. Кузьмин, С. М. Слащев

## КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ: ПРИНЦИПЫ, УСТРОЙСТВО, ПРИМЕНЕНИЕ (ЧАСТЬ 2)

Во второй части обзора приводятся сведения об особенностях применения КЛСМ в биологических исследованиях. В центре обсуждения — флуоресцентные методы, наиболее широко используемые в биологии и медицине. Приведены достаточно подробные данные о флуоресцентных красителях и стандартах для настройки КЛСМ, поскольку их номенклатура целиком сформирована зарубежными производителями и поставщиками и относится к расходным материалам. Свойства красителей определяют характеристики применяемых источников света и фотодетекторов. Из многочисленных примеров применения КЛСМ рассмотрены те, которые, по мнению авторов, могут сформировать представление у читателя о возможностях этой области аналитической микроскопии. В качестве примеров приведены краткие описания коммерческих КЛСМ, поставляемых на рынок ведущими фирмами, выпускающими оптическое оборудование для научных исследований.

### 6. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ И ИСТОЧНИКИ ИЗЛУЧЕНИЯ

Основные преимущества конфокальной микроскопии в биологических исследованиях реализуются при использовании флуоресцентных красителей — зондов. Это обстоятельство оказало существенное влияние на конструкции КЛСМ, формирование световых потоков, детектирование, фильтрацию, алгоритмы обработки сигналов и реконструкцию изображений. Естественно, что при развитии конфокальной микроскопии в первую очередь применялись флуорохромы, используемые в обычной флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и других методах флуоресцентного анализа. Вместе с этим специфика применения красителей в КЛСМ — степень насыщения, смещение спектров флуоресценции, требование устойчивости к фотовыцветанию, безартефактность, а также возрастающий перечень мишеней исследования — служит поводом для непрерывной разработки флуорохромов новых поколений и совершенствования известных.

В качестве примера новых красителей могут быть названы красители группы Alexa [1]. Красители этой группы обладают высокой фотостойкостью, стабильностью, интенсивностью флуоресценции. Перечень наиболее широко применяемых в конфокальной микроскопии флуоресцентных красителей приведен в табл. 1 [2]. В таблице указаны длины волн и типы лазеров, наиболее подходящих для возбуждения флуоресцентных красителей: аргоновый (Ar), аргон-криптоновый (ArKr), гелий-неоновый (HeNe), криптон-аргоновый (KrAr), аргоновый ультрафиолетовый

(ArUV). Кроме указанных типов лазеров в конфокальной микроскопии используются и другие источники света в зависимости от типа конкретного микроскопа, например ртутные лампы высокого давления, лазерные диоды, ртутно-ксеноновые лампы. Подробно различные источники света для конфокальной микроскопии рассмотрены в справочнике под ред. J.V. Pawley [3].

Основным фактором, на который следует обратить внимание при выборе конкретного флуорохрома, является степень его устойчивости к интенсивности светового потока возбуждения. Поток возбуждения в КЛСМ обеспечивается лазерными источниками света. Интенсивность потока возбуждения в КЛСМ в области фокусировки при лазерном освещении значительно выше, чем в обычном флуоресцентном микроскопе с освещением препарата от ртутной лампы. Однако полная доза облучения всего препарата в КЛСМ может быть значительно ниже, чем в обычном микроскопе, так как световому воздействию подвергается малая доля препарата. Уменьшению степени выцветания препарата способствует возможность ослабления интенсивности излучения лазера до значения, согласованного со скоростью сканирования и интенсивностью флуоресценции применяемых красителей.

Фирмы, выпускающие КЛСМ, как правило, рекомендуют перечень красителей, спектры поглощения которых хорошо согласованы с линиями применяемых в этих микроскопах лазеров и с оптическими элементами модулей сканирования. Основным источником света, применяемым в конфокальной микроскопии, следует считать охлаждаемый воздухом аргон-ионный лазер, которым укомплектовано большинство коммерческих КЛСМ.

Табл. 1. Красители, используемые в конфокальной микроскопии

Красители	Длина волны возбуждения, нм / тип лазера	Длина волны флуоресцентного излучения, нм	Примечание
Lucifer yellow CH	425 / Ar	533	Нейроны, межклеточные взаимодействия
BODIPY	665 / HeNe, ArKr	676	Нейтральные липиды
BODY-PY FL LDL	515 / Ar	520	Клеточные LDL-рецепторы
TRITC	542 / HeNe, ArKr	572	Белковые конъюгаты, флуоресцирующие антитела
Rhodamine Red-X	560 / HeNe, ArKr	580	Белки, олигонуклеотиды
Lissameine	570 / HeNe, ArKr	590	Белковые конъюгаты
Rhodamine Red-B			
Texas Red-X	560 / HeNe, ArKr	590	Белки, олигонуклеотиды
Texas Red (конъюгаты и производные)	583 / HeNe, ArKr	603	Вторая метка при окрашивании другими флуоресцентными красителями
DiI	576 / HeNe, ArKr	599	Структура мембран
Trans Fluospheres	488 / Ar, ArKr	560÷720	Внутриклеточные процессы и межклеточные взаимодействия
DAPI	358 / ArKr	461	ДНК, РНК
Hoechst 33342	333 / KrAr, ArUV	483	ДНК
Hoechst 33258	345 / KrAr	478	ДНК
YOYO-1	491 / Ar, ArKr	509	ДНК
Mithramycin	445 / Ar	575	ДНК
Acridine Orange	503 / Ar, ArKr	525 / 650	ДНК, РНК
Ettridium Bromide	518 / Ar	605	ДНК, РНК
Sitox Green	504 / Ar, ArKr	523	Соотношение живых и мертвых клеток, ДНК
TOTO-3	642 / HeNe, ArKr	660	Соотношение живых и мертвых клеток, ДНК
Indo-1	338 / KrAr	401, 475	Измерение концентрации Ca <sup>2+</sup>
Fluo-3	506 / Ar, ArKr	526	Внутриклеточный Ca <sup>2+</sup>
Rhod-2	552 / HeNe, ArKr	581	Внутриклеточный Ca <sup>2+</sup>
Fura Red	450÷500 / Ar, ArKr	660	Внутриклеточный Ca <sup>2+</sup>
Fura Indoline C-18	498 / Ar, ArKr	694	Концентрация Ca <sup>2+</sup> в мембранах
Oregon Green 488 BARTA	494 / Ar, ArKr	523	Внутриклеточный Ca <sup>2+</sup>
Magnesium Green	506 / Ar	531	Внутриклеточный Mg <sup>2+</sup>
Sodium Green	507 / Ar	735	Внутриклеточный Na <sup>+</sup>
SNARF	580 / ArKr	640	Внутриклеточный pH
Lucigenin	455, 368 / Ar, KrAr	505	Митохондрии, фагоцитоз, индикатор Cl <sup>-</sup>

Табл. 1 (продолжение)

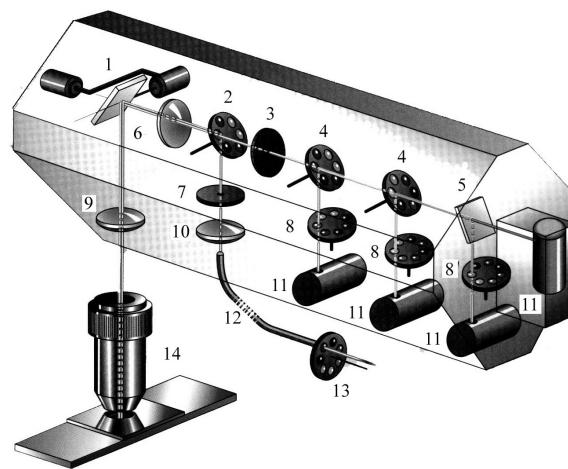
Красители	Длина волны возбуждения, нм/ тип лазера	Длина волны флуоресцентного излучения, нм	Примечание
FITC	494 / Ar	519	Белки, аминокислотные последовательности Конъюгаты олигонуклеотидов и пептидов
Oregon Green 514	506 / Ar	526	Белки
TMR	555 / HeNe, ArKr	580	Белковые конъюгаты, РН-зависимые процессы
7-AAD	546 / HeNe	647	ДНК (селективная связь с участками G-C)
Histamin fluorescein	493 / Ar	516	Гистаминовая проба
FICRhR	500 / Ar	517	С-АМР в живых клетках
BC ECF AM	300 / KrAr, ArUV	535	Цитотоксичность, пролиферативная активность

Как видно из табл. 1, три типа лазеров Ar (458, 488, 514 нм), ArKr (488, 568, 647 нм) и HeNe (543, 633 нм) обеспечивают возможность возбуждения большинства используемых в конфокальной микроскопии флуоресцентных красителей в видимой области, а лазеры KrAr (351, 364 нм) и ArUV (360 нм) — в ультрафиолетовой области.

## 7. ФОТОДЕТЕКТОРЫ В КЛСМ

Роль фотодетекторов в КЛСМ, как и в других оптико-электронных приборах, состоит в преобразовании оптического сигнала в его электронный эквивалент. Корректировка сигналов, реконструкция изображения, его визуализация, количественная оценка исследуемых структур и процессов, архивирование полученных результатов осуществляется средствами вычислительной техники.

Анализ структур и процессов методом флуоресцентной конфокальной микроскопии (считаем уместным еще раз отметить определяющее значение и перспективность этого метода в биологических исследованиях) сопряжен с необходимостью регистрации отдельных составляющих полихроматического сигнала. Поэтому фотоприемным устройствам КЛСМ предшествует система оптического преобразования сигнала, работа которой иллюстрируется схемой конфокального сканера LEICA TCS 4D, приведенной на рис. 1. В подрисуночном тексте сделаны соответствующие пояснения к схеме. На схеме можно проследить



**Рис. 1.** Схема оптического разделения полихроматического луча на монохроматические составляющие в конфокальном микроскопе TCS 4D фирмы Leica. 1 — сканирующее зеркало, 2 — блок дихроичных зеркал в канале возбуждения, 3 — блок сменных измерительных конфокальных диафрагм, 4 — блоки дихроичных зеркал в каналах измерения, 5 — дихроичное зеркало, 6 — линза, 7 — осветительная конфокальная диафрагма, 8 — блок с запирающими фильтрами, 9 — линза сканера, 10 — объектив, 11 — фотомножители, 12 — оптическая волоконная связь с лазером, 13 — блок фильтров возбуждения, 14 — объектив микроскопа

ход лучей, поступающих от лазерного источника освещения. В конфокальном сканере LEICA TCS 4D использованы многомодовые Ar- и ArKr-лазеры и ArUV-лазер. Лазерный луч (в общем случае полихроматический), пройдя один из входных фильтров и световод, по оптическому тракту сканера и микроскопа поступает на препарат, структуры которого могут содержать различные красители, и трансформируется в люминисцентное излучение (в общем случае тоже полихроматическое). Система барьерных фильтров и дихроичных зеркал обеспечивает регистрацию каждым детектором выбранной монохроматической составляющей люминисцентного излучения на каждом шаге сканирования. В качестве детекторов в конфокальном сканере LEICA TCS 4D используются высокочувствительные быстродействующие фотоэлектронные умножители (ФЭУ). Аналогичные схемы, отличающиеся конструктивными элементами, содержат конфокальные блоки большинства КЛСМ.

В работах [4, 5] детально проанализированы характеристики, достоинства и недостатки используемых в КЛСМ детекторов и сформулированы требования, предъявляемые к ним. Основное требование состоит в том, чтобы система детектирования сигнала не снижала достигнутые в КЛСМ показатели по разрешению, быстродействию и не вносила дополнительных искажений. В КЛСМ в качестве детекторов нашли применение ФЭУ и многоэлементные твердотельные детекторы (ТТД). В настоящее время в КЛСМ со сканированием столиком и лучом применяются фотоэлектронные умножители. Их достоинства состоят в высоком быстродействии (разрешение по времени составляет 0.2–0.5 нсек) и малом темновом токе. В табл. 2 приведены характеристики фотокатодов современных ФЭУ. Эти характеристики могут быть полезными при выборе типа ФЭУ. Однако малая квантовая эффективность (QE 3–20 %) и спектральная зависимость ограничивают их применение при работе в режиме реального времени.

Табл. 2. Состав и спектральные характеристики фотокатодов ФЭУ

Материал фотокатодов. Обозначение / Состав	Материал окна	Красная граница чувствительности, нм	Длина волны на макс чувствительности $\lambda_{max}$ , нм	Световая чувствительность на $\lambda_{max}$ , мА/Вт	Квантовый выход на $\lambda_{max}$ , %
Серебряно-кислородно-цезиевый S1 (C) / AgOCs	Стекло	1100	800	2.3	0.36
Сурьмяно-цезиевые					
S4 / SbCs	Стекло	680	400	50	16
S11 (A) / SbCs	Стекло	680	440	60	17
Super A / SbCs	Стекло	700	440	80	22
S13 / SbCs	Плавленный кварц	680	440	60	17
Многощелочные					
S20 (T) / SbNaKCs	Стекло	850	420	70	20
S20 (R) / SbNaKCs	Стекло	900	550	3	8
TU / SbNaKCs	Плавленный кварц	850	420	70	20
Двухщелочные					
Двухщелочной / SbKCs	Стекло	630	400	85	26
Двухщелочной / SbKCs	Плавленный кварц	630	400	85	26
Двухщелочной / SbRbCs	Стекло	700	420	85	25
Теллурид-цезиевый SB / CsTe	Плавленный кварц	340	235	20	10

Поэтому в конфокальных микроскопах реального времени с дисковым сканированием, сканированием щелью и акустооптическим дефлектором нашли применение охлаждаемые многоэлементные ТТД с зарядовой связью (ПЗС). Эти приборы при высокой квантовой эффективности (QE 60–80 %) обладают широким динамическим диапазоном и возможностью параллельного считывания 2D-изображения. Однако в современных ПЗС имеет место перетекание заряда в соседние ячейки, вызывающее возникновение электронных шумов.

Скорость считывания кадра составляет 1–5 с. По мнению J.V. Pawley и V.E. Centonze [6], в будущем эти недостатки будут устранены созданием малоэлементных ПЗС, которые найдут широкое применение в конфокальной микроскопии. В заключение следует отметить, что разработанные и выпускаемые отечественной промышленностью ФЭУ и ПЗС по своим характеристикам не уступают зарубежным образцам и могут быть с успехом использованы при проектировании КЛСМ [7, 8].

Табл. 3. Основные технические характеристики КЛСМ

Параметры	Значения
Разрешение, мкм	0.2 (X—Y) при NA = 1.2 иммерсия, $\lambda = 488$ нм, 0.4 (Z) при NA = 1.2 иммерсия, $\lambda = 488$ нм, при дополнительной обработке изображений может быть получено разрешение $< 0.1$ (X—Y)
Элементарный сканируемый объем, нм	100(X) × 100(Y) × 400(Z)
Максимальное количество оптических срезов	До 90 ÷ 100
Сканирующие устройства	Сканирующий столик, акустооптический дефлектор, гальванометрические зеркала, резонансные гальванометрические зеркала, диск типа Нипкова
Максимальная скорость сканирования строки	64 мкс
Конфокальные диафрагмы	Круглые отверстия диаметром 10 ÷ 120 мкм, щелевые шириной 10 ÷ 100 мкм, кольцевые типа диска Нипкова: 150 000 апертур $\varnothing$ 20 мкм, 16 спиралей
Программное обеспечение	Цифровая фильтрация, управление, реконструкция 2D, 3D, 3D—t, 4D, 4D(t) изображений, макропрограммирование, анимация, анализ, документирование
Режимы сканирования	X—Y, X—Y—Z, X—Z, X—t
Виды изображений	2D, 3D, 3D—t, 4D
Скорость формирования изображения	От 1 кадр/10 с до 25 кадров/с (30 ÷ 480 кадров/с — КЛСМ Noran, 640 кадров/с — диск типа Нипкова)
Источники света	Лазеры: HeNe, Ar, ArKr, KrAr, ArUV. Лампы: ртутные, ртутно-ксеноновые, галогенные
Типы фотоприемников	Фотоумножители, ПЗС-матрицы, фотодиоды
Анализатор спектра фотолюминисценций	Набор светофильтров, монохроматоры, акустооптические фильтры
Оптические микроскопы	Leica DM Series: DMRB/E, DMIRB/E; Nikon: Optiophot 2, Diaphot 200/300; Olympus: BX, BH, IMT, AH, AX, IX; Zeiss: Axioscop, Axioplan, Axiovert

## 8. ПРИМЕРЫ КОММЕРЧЕСКИХ КОНФОКАЛЬНЫХ МИКРОСКОПОВ

В течение последних лет конфокальные микроскопы разрабатывали и поставляли на рынок разные фирмы. Некоторыми фирмами разработаны несколько модификаций приборов, совершенствование которых продолжается и в настоящее время.

В связи с тем что материалы с описанием КЛСМ рассредоточены в различного вида рекламных проспектах, на сайтах Интернета, в разделах "Материалы и методы" оригинальных публикаций, адресовать заинтересованного читателя к конкретному источнику, который содержал бы исчерпывающие сведения о конструкции и характеристиках приборов затруднительно. Поэтому авторы сочли возможным в настоящем разделе ограничиться примерами КЛСМ, выпускаемых ведущими оптическими фирмами: Leica, K. Zeiss, BioRad, Olympus. В этих приборах реализованы теоретически достижимые характеристики КЛСМ. Характерные параметры в обобщенном виде приведены в табл.3.

Примеры коммерческих КЛСМ фирм Leica, K. Zeiss, BioRad, Olympus приведены в табл. 4. В таблицу включены те модификации приборов, которые имеют отличия, расширяющие их эксплуатационные возможности. Конечно, в таблице не может быть отражено все многообразие разработанных КЛСМ. В нее не вошли, например, рекомендованные для применения в биологии и медицине обладающие широкими возможностями конфокальные микроскопы фирм Nogan и Meridian. В настоящем разделе не освещены вопросы, касающиеся создания конфокальных микроскопов, предназначенных для исследований *in vivo*. Это связано с тем, что производство этих приборов не вышло за рамки изготовления опытных образцов и макетов.

## 9. ТЕСТИРОВАНИЕ

В связи с тем что КЛСМ является прибором, обеспечивающим количественную оценку исследуемых структур и явлений, то эффективное его использование может быть достигнуто лишь при наличии специальных лабораторных мер и эталонов. В количественной микроскопии использование таких эталонов распространено достаточно широко. КЛСМ является высокоточным и сложным прибором; малейшие отклонения в условиях эксплуатации могут существенно повлиять на его характеристики и результаты исследований. При анализе препарата (особенно с использованием флуоресцентных красителей) возникает необходимость текущей настройки прибора. На ранних стадиях разработки КЛСМ для этих целей применялись тест-объекты биологического происхожде-

ния (диатомовые водоросли, эритроциты птиц и т.д.). В настоящее время созданы специальные стандарты для калибровки КЛСМ — Focal Check Microspheres, MultiSpeck Multicpectral Fluorescence Microscopy Standards Kits, TetraSpeck Fluorescent Microspheres. На рынок такие стандарты предоставляет фирма Molecular Probes [2].

Стандарты Focal Check разработаны для настройки КЛСМ и представляют собой полистироловые сферы Ø15 мкм, что близко к среднему диаметру животной клетки. Сферы окрашены специальным образом двумя или тремя флуоресцентными красителями. Красители наносятся тонким слоем на поверхность сферы, а в некоторых случаях заполняют внутренний объем, ограниченный сферой. Максимумы возбуждения / излучения (нм): 365/430, 505/515, 560/580, 660/680. Стандарты Focal Check выпускаются и используются в виде суспензий. При настройке микроскопа достигается четкость границы между окрашенной и неокрашенной частями изображения сферы на различной глубине фокусировки. Это дает возможность устранить погрешности несоосности элементов оптики, нестабильности источников освещения, уменьшить влияние внешних условий.

Стандарты для многоспектральной флуоресцентной микроскопии MultiSpeck имеют универсальное применение: калибровка обычных флуоресцентных микроскопов и КЛСМ, настройка оборудования для формирования трехмерных цветных изображений микрообъектов. Они представляют собой микросферы диаметром 4 мкм, равномерно окрашенные тремя красителями с четко различающимися полосами излучения (голубой, зеленой, красной). Препараты MultiSpeck поступают на рынок либо в виде слайдов с микросферами, иммобилизованными в заливочную среду, либо в виде суспензий. Слайды содержат зоны с наборами микросфер, обеспечивающими настройку всех параметров КЛСМ. Суспензии дают возможность включать микросферы непосредственно в препарат для уточнения пространственных взаимосвязей, а также изготавливать слайды индивидуального назначения по желанию исследователя.

Стандарты для многоспектральной флуоресцентной микроскопии TetraSpeck представляют собой модификацию микросфер MultiSpeck в направлении расширения спектрального диапазона красителей (голубая, зеленая, оранжевая, красная линии) и увеличения числа размеров микросфер: 0.1–0.2–0.5–1.0–4.0 мкм. Препараты TetraSpeck выпускаются как в виде слайдов, так и в виде суспензий в различных сочетаниях размеров и используемых красителей, открывая перед исследователями широкие возможности в получении при помощи КЛСМ изображений клеток и клеточных структур на уровне сверхразрешения, достижимого в флуоресцентной конфокальной микроскопии.

Табл. 4. Примеры коммерческих КЛСМ

Модель, фирма	Число каналов регистрации, тип фотодетектора	Число и тип осветителей	Системы сканирования	Тип базового микроскопа	Дополнительные эксплуатационные возможности	Рекомендации по применению
FLUOVIEW Olympus	2 канала, ФЭУ	2 канала, Ar и ArKr лазеры	Два гальванометрических зеркала	Микроскопы фирмы Olympus	Интерференционный контраст	Исследование тканей, клеток и субклеточных структур. Анализ ионов с высоким временным разрешением
MX 50-CF, Olympus	Камера с ПЗС матрицей	Галогеновая и ртутно-ксеноновая лампы	Диск типа Нипкова	MX 50, MX 50L	Формирование изображений в реальном времени	Широкое применение: биология, медицина, электронные технологии
TCS 4D, Leica	4 канала, ФЭУ	Ar-лазер 360, 488 нм, ArKr-лазер 488, 568, 647 нм	Одно зеркало с двумя гальванометрами	Leitz DMIRB, Leitz DM	Волоконная оптика, исключение рассеянного света, реконструкция изображения 2D, 3D, 4D	Исследование клеток и клеточных структур при раздельном и совместном использовании различных методов контрастирования
TCS NT, Leica	4 канала, ФЭУ	2 канала, ArKr лазер 488, 568, 647 нм	Карданный однозеркальный сканер по XY, 3 координатный механический столик	DMIRB, DMR	Детектор проходящего света DMR	Широкое применение: биология, медицина, электронные технологии

Табл. 4 (продолжение)

Модель, фирма	Число каналов регистрации, тип фотодетектора	Число и тип осветителей	Системы сканирования	Тип базового микроскопа	Дополнительные эксплуатационные возможности	Рекомендации по применению
LSM 510, Carl Zeiss	4 канала, ФЭУ	Ar-лазер 458, 488 нм, HeNe-лазер 543 нм	Два гальванометрических зеркала, 3 координатный механический столик	Axiovert 100 MBR, Axio-plan 2	Детекторы для регистрации проходящего света и флуоресценции, акустооптические фильтры для регулирования интенсивности света, разделения спектральных линий	Широкое применение в биологии и медицине
Radiance 2000 (7 модификаций), ф. Bio-Rad	3 канала, ФЭУ	3 канала, лазеры: Ar 457, 477, 488, 514 нм; KrAr 488, 568 нм; HeNe 543 нм	Два гальванометрических зеркала	E600, E800, E600 FN, Eclips TE 300, Eclips TE 300 DV	В зависимости от модификации: исследования в проходящем и отраженном свете. Дифференциальный интерференционный контраст, многофотонная микроскопия, режим счета фотонов	Исследование живых клеток и тканей, окрашенных 1–3 красителями, при одновременном или последовательном возбуждении. Исследование толстых срезов с помощью многофотонной микроскопии

Перечисленными микросферами не ограничивается перечень средств для калибровки и настройки КЛСМ. Находят применение выпускаемые Molecular Probes фиксированные образцовые окрашенные препараты клеток, которые, не являясь стандартами, могут быть полезны при подборе фильтров и фокусировке микроскопов.

В заключение настоящего раздела следует отметить, что создание тест-систем для работы с КЛСМ свидетельствует не столько о завершенности исследований в создании методов количественной микроскопии, сколько о достижениях на начальных этапах этих исследований, существенно снижающих фактор субъективности.

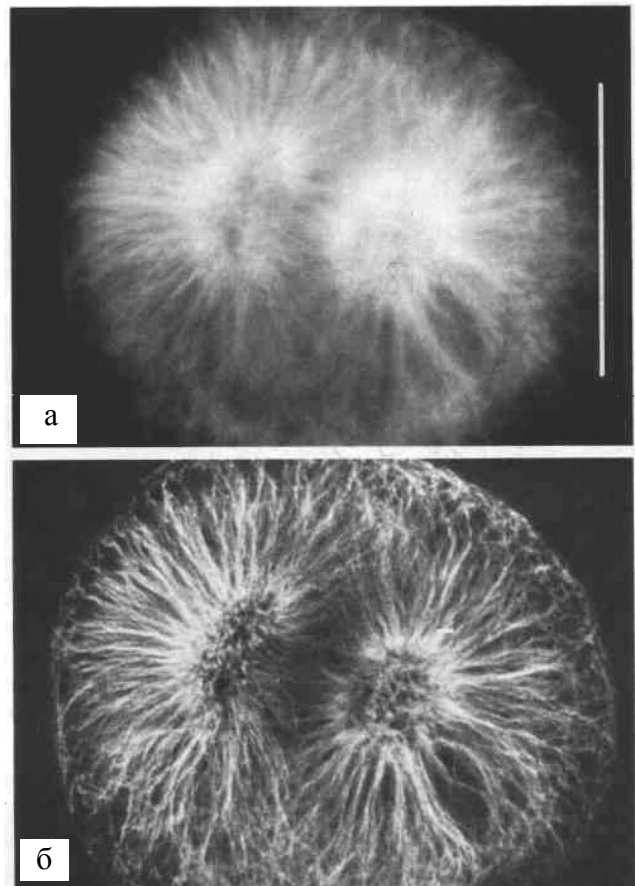


## 10. ПРИМЕНЕНИЕ КЛСМ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

К настоящему времени применение конфокальной микроскопии в значительной степени вышло за рамки первоначально предполагаемого М. Минским ее использования в качестве средства исследования микроструктур головного мозга. Для исследователей, чья работа связана с изучением биологии, биофизики, биохимии и физиологии клетки, КЛСМ стал незаменимым инструментом как для наблюдения внутриклеточных структур, так и для количественной оценки процессов в клетках, клеточных мембранах, внеклеточном окружении. Подробный анализ всех работ, связанных с применением КЛСМ, выходит за рамки тематического направления данного журнала, и поэтому авторы сочли возможным ограничиться лишь отдельными примерами, позволяющими специалистам различных отраслей науки, техники и медицины сформировать представление о состоянии этой области. Некоторой компенсацией краткости изложения может служить перечень литературы в конце статьи, который, к сожалению, несмотря на внушительный объем, не может в полной степени охватить всю литературу по обсуждаемому вопросу. Публикации, посвященные применению КЛСМ в биологических исследованиях могут быть условно отнесены к одному из следующих направлений.

1. Иллюстрация возможностей КЛСМ на многочисленных примерах сопоставления изображений, получаемых методами обычной и конфокальной микроскопии [9–11]. Цель этих работ в основном состояла в том, чтобы обратить внимание цитологов, гистологов, генетиков, морфологов на преимущества, заложенные в конфокальном принципе при исследовании внутриклеточных и тканевых структур. На рис. 2 приведено обычное (а) и конфокальное (б) изображения оплодотворенного яйца морского ежа, обработанного иммунофлуоресцентным красителем [11]. Анализ обычного и конфокального изображений на приведенных рисунках позволяет без труда выявить более тонкие внутриклеточные структуры при использовании конфокального принципа микроскопирования.

2. Обоснование возможностей достижения высокого разрешения, реконструкции трехмерного изображения, количественной оценки исследуемых микроструктур и процессов [12–14]. Эти работы сформировали теоретическую базу конфокальной микроскопии, послужили предпосылками для целенаправленного совершенствования конструктивных элементов КЛСМ. Биологические объекты (ДНК, фрагменты цитоскелета и т.д.) использовались как тест-системы для создания алгоритмов обработки информации и алгоритмов функ-



**Рис. 2.** Изображение оплодотворенного яйца морского ежа (*Psammechinus*), окрашенного антитубулином. а — обычное изображение, б — конфокальное. Длина линии 50 мкм

ционирования систем управления. На рис. 3. приведены изображения хромосом *Steppis capillaris* [12], находящиеся непосредственно на оптическом срезе (а) и реконструированные с использованием метода регуляризации (б). Видно, что в восстановленном изображении разрешение в фокальной плоскости значительно выше, чем в исходном.

3. Оригинальные исследования, посвященные различным разделам биологии клетки. Эти работы представлены обширным перечнем публикаций, в котором могут быть выделены исследования в области нейробиологии (исследования центральной и периферической нервной системы, микроциркуляции в сосудах мозга, внутриклеточных структур, цитоскелета, рецепторов, мембран нейронов [15]); исследования клеточного ядра и его генетического аппарата [14, 16–18]; исследования митохондрий и проблем митохондриального транспорта [19]; исследования транспорта кальция и его локализаций

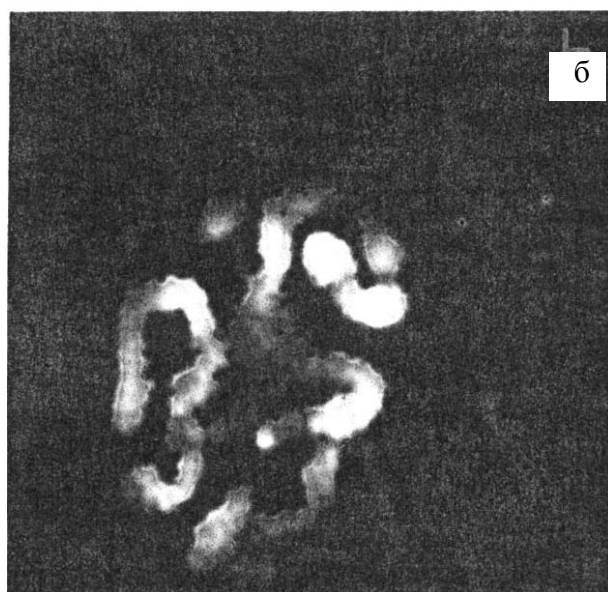
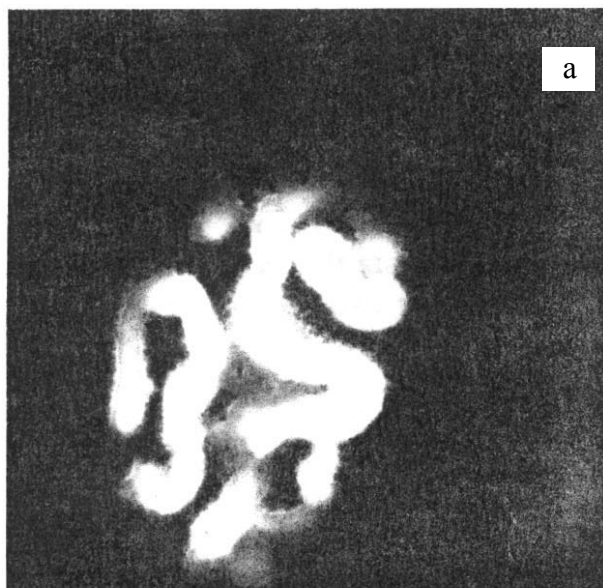


Рис. 3. Изображение набора хромосом *Streptococcus capillaris*. а — исходное изображение, б — восстановленное изображение при реконструировании с параметром регуляризации  $\mu = 10^{-2}$

[20]; исследования различных клеток (соединительнотканых, эпителиальных, секреторных и др.), формирующих структурно-функциональные компоненты печени, сердца, почек, крови и других органов [21–26]. В значительной степени многие из этих публикаций имеют непосредственное отношение к проблемам экспериментальной медицины: экспериментальной онкологии, иммунологии, вирусологии, эндокринологии. Как правило,

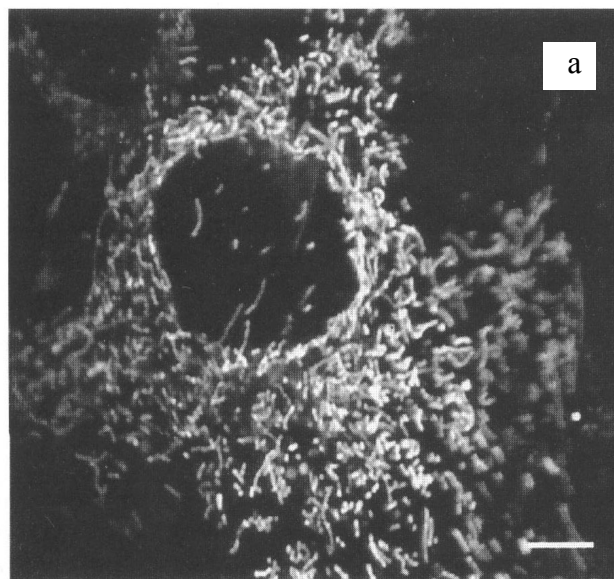
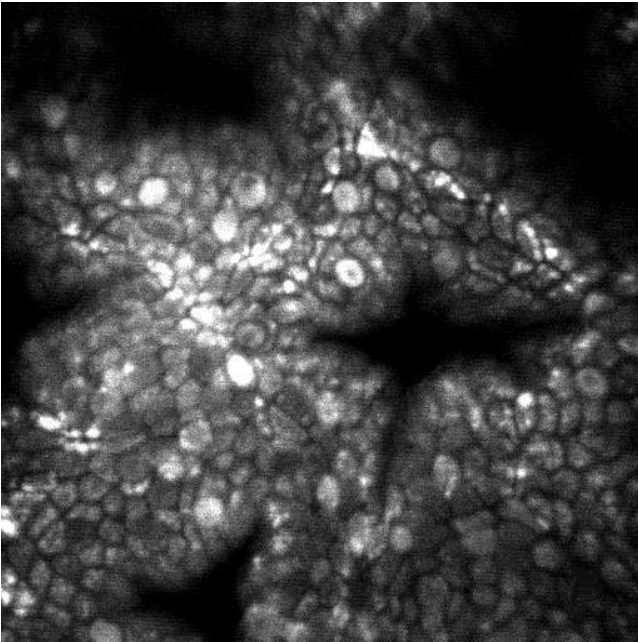


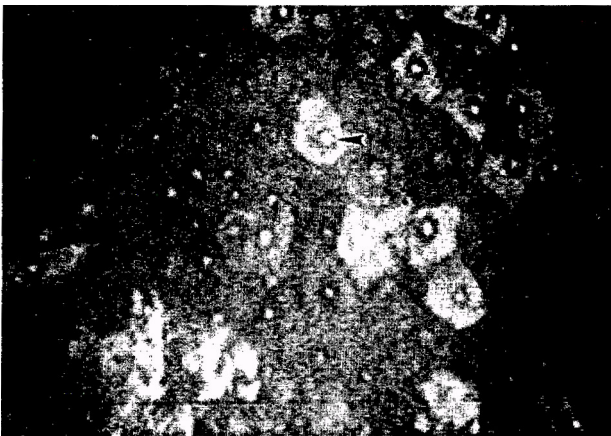
Рис. 4. Конфокальное изображение клеток МН1С1 (клетки гепатомы крысы) после окрашивания их calcein AM и при тушении его свечения с помощью  $Co^{2+}$  в цитозоле. Отчетливо видны ярко светящиеся митохондрии. Длина линии 6.5 мкм

объектами исследований в работах этого направления являются препараты *in vitro*, а основные требования к методам микрофотографирования состоят в достижении высокого разрешения, возможности количественной оценки исследуемых явлений, эффективного использования красителей и реконструкции трехмерного изображения. В качестве примера на рис. 4 приведено конфокальное изображение клеток МН1С1 (клетки гепатомы крысы) после окрашивания их Calcein AM и при тушении его свечения с помощью  $Co^{2+}$  в цитозоле [25]. Отчетливо видны ярко светящиеся митохондрии.

4. Оригинальные исследования, проводимые *in vivo*. Это перспективное направление применения конфокальной микроскопии в неинвазивной диагностике многих патологий активно развивается в офтальмологии, дерматологии и проктологии [27–31]. На рис. 5 изображен оптический срез поверхности слизистой оболочки толстой кишки крысы *in vivo* после локального применения флуоресцентного красителя (изображение среза представлено в Интернете Dr W. McLaren, Monash University). На рис. 6 и 7 в качестве примера приведены изображения клеточных слоев роговицы глаза, полученные методами конфокальной микроскопии [22]. Основные проблемы применения КЛСМ в офтальмологии состоят в создании



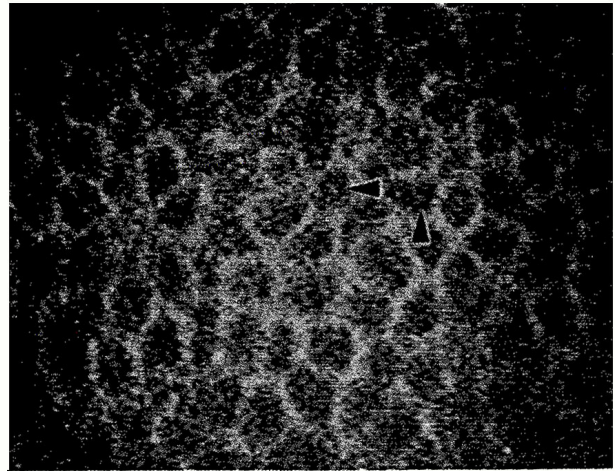
**Рис. 5.** Оптический срез поверхности слизистой оболочки толстой кишки крысы *in vivo* после локального применения флуоресцентного красителя



**Рис. 6.** Клетки эпителия роговицы глаза человека. Фокальная плоскость выбрана так, чтобы получить оптический срез поверхностных клеток (светлые клетки). Клетки, расположенные немного глубже фокальной плоскости, выглядят темнее. Объектив 25x, NA=0.6

приборов, обеспечивающих микрофотографирование в реальном времени с дозированной освещенностью исследуемых тканей.

Взяв на себя риск в прогнозировании развития



**Рис. 7.** Оптический срез клеток базального эпителия роговицы глаза человека. Объектив 50x, NA=1.0

этого направления, авторы считают возможным предположить появление в недалеком будущем в арсенале доступного медицинского оборудования специализированных диагностических конфокальных микроскопов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Созданием современных КЛСМ не завершены работы по применению принципа конфокальности в исследованиях биологических микрообъектов. Дальнейшее развитие этого принципа осуществляется в рамках следующих направлений.

— Создание так называемых "гибридных" систем. Гибридные системы позволяют расширить функциональные возможности конфокальной микроскопии за счет совместного использования различных микроскопических приборов: ближнепольного и сканирующего микроскопов, рамановского и обычного конфокального микроскопов.

— Разработка 4л-конфокальных микроскопов [32, 33]. В этих микроскопах флуоресцентное изображение формируется двумя расположенными встречно конфокальными объективами, а его реконструкция является результатом интерференции совмещенных изображений.

— Разработка методов и аппаратуры конфокальной микротомографии [34]. Конфокальная микротомография позволяет осуществить наблюдение исследуемого объекта под различными углами, что дает возможность выявлять особенности сложной топологии клеток и внеклеточного пространства.

Вместе с этим изготовители коммерческих конфокальных микроскопов непрерывно ведут работы по повышению эксплуатационных показателей существующих моделей КЛСМ за счет применения совершенных источников света, фотодетекторов, красителей, программного обеспечения, повышения виброустойчивости, достижения возможности регистрации флуоресценции при незначительном световом воздействии на клетки и низких концентрациях красителя для длительного наблюдения структур в интактных клетках и анализа происходящих в них процессов путем использования матричных ПЗС с микроканальными пластинами в качестве усилителей изображений.

В завершение настоящего обзора следует отметить, что в нем представлены лишь общие черты конфокальной микроскопии как метода исследований, в создании которого сконцентрированы усилия большого числа отдельных исследователей и коллективов. Авторы надеются на то, что поставленная ими в начале обзора цель достигнута хотя бы частично и вместе с тем сожалеют о том, что потенциал отечественной промышленности оказался не востребуемым в решении этой важной для биологии и медицины проблемы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar R.K., Chapple C.C., Hunter N. // J. Histochemistry and Cytochemistry. 1999. V. 47, N. 9. P. 1213–1217.
2. Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes Inc., 1996, XII. Sixth edition. 680 p.
3. Handbook of biological confocal microscopy / Ed. J.B. Pawley. New York—London: Plenum Press, 1990. 233 p.
4. Webb R.H., Dorey C.K. The pixelated image // Handbook of biological confocal microscopy / Ed. J.B. Pawley. New York—London: Plenum Press, 1990. P. 41–51.
5. Art J. Photon detectors for confocal microscopy // Handbook of biological confocal microscopy / Ed. J.B. Pawley. New York—London: Plenum Press, 1990. P. 127–139.
6. Pawley J.B., Centonze V.E. Practical laser-scanning confocal light microscopy: obtaining optimal performance from your instrument // Cell Biology: A Laboratory Handbook / Ed. by Celis Julio E. San Diego (CA): Academic Press, 1994. P. 44–64.
7. Шелтакова И.Р., Гаранин В.Г., Лабусов В.А. // Заводская лаборатория: Диагностика материалов. 1999. Т. 65. № 10. С. 3–16.
8. Ветохин С.С., Ермалицкий Ф.А., Мельников С.М. и др. // Приборы и техника эксперимента. 1998. № 2. С. 5–12.
9. Amos W.B., White J.G., Fordham M. // Appl. Opt. 1987. V. 26. P. 3239–3243.
10. Shotton D.M. // Proc. R. Microsc. Soc. 1988. V. 23. P. 289–297.
11. White J.G., Amos W.B., Fordham M. // J. Cell Biology. 1987. V. 105. P. 41–48.
12. Bertero M., Boccacci P., Brakenhoff G.J. et al. // J. Microscopy. 1990. V. 157. P. 3–20.
13. Brakenhoff G.J., van der Voort H.T.M., van Spronsen E.A. et al. // Nature. 1985. V. 317. P. 748–749.
14. Jones S.J., Taylor M.L., Baarslag M.W. et al. // J. Microscopy. 1990. V. 158. Pt. 2. P. 235–248.
15. Trogadis J.E., Ng G. Y.-K., O'Dowd B.F. et al. // J. Histochemistry and Cytochemistry. 1995. V. 43, N. 5. P. 497–506.
16. Van Dekken H., van Rotterdam A., Jonker R. et al. // J. Microscopy. 1990. V. 158. P. 207–214.
17. Bauman J.G.J., Bayer J.A., Dekken H. // J. Microscopy. 1990. V. 157. P. 73–81.
18. Goldstein S.R., Hubin T., Rosenthal S. et al. // J. Microscopy. 1990. V. 157. Pt. 1. P. 29–38.
19. Fink C., Morgan F., Loew L.M. // Biophysical J. 1998. V. 75. P. 1648–1658.
20. Cleemann L., Wang W., Morad M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95, N. 18. P. 10984–10989.
21. Vassy J., Rigaut J.P., Hill A.-M. // J. Microscopy. 1990. V. 157. P. 91–104.
22. Masters B.R., Thaer A. A. // Applied Optics. 1994. V. 33, N. 4. P. 695–701.
23. Andrews P.M., Petroll W.M., Cavanagh H.D. et al. // Am. J. Anat. 1991. V. 191. P. 95–102.
24. Petroll W.M., Jester J.V., Cavanagh H.D. // Scanning. 1994. V. 16. P. 131–149.
25. Petronilli V., Miotto G., Canton M. et al. // Biophysical J. 1999. V. 76, N. 2. P. 725–734.
26. Tadrous P.J. // J. Pathol. 2000. V. 191, N. 4. P. 345–354.
27. Cavanagh H.D., Jester J.V., Essepian J. et al. // CLAO J. 1990. V. 16. P. 65–73.
28. Corcuff P., Bertrand C., Lewequ J.L. // Arch. Dermatol. 1993. V. 285. P. 475–481.
29. Ichijima H., Petroll W.M., Jester J.V. et al. // Cornea. 1993. V. 12. P. 369–378.
30. Zhu G., Tekola P., Baak J.P.A. et al. // Analytical and Quantitative Cytology and Histology. 1994. V. 16, N. 2. P. 145–152.
31. Massig J.H., Preissler M., Wegener A.R. et al. // Applied Optics. 1994. V. 33, N. 4. P. 690–694.
32. Hell S.W., Stelzer E.H.K. // Opt. Commun. 1992. V. 93. P. 277–282.
33. Hänninen P.E., Hell S.W., Salo J. et al. // Appl. Phys. Lett. 1995. V. 66. P. 1698–1700.
34. Porwol T., Strehmaier A.-R., Spiess E. et al. // European Microscopy and Analysis. 1997, July. P. 21–23.

**Рекомендуемая литература  
по теме раздела 6**

1. *Bacallo R., Garfinkel A.* // Three-dimensional Confocal Microscopy: Investigation of Biological Systems / Eds J.K. Stevens et al. London: Academic Press, 1994. P. 172–174.
2. *Bacallo R., Bomsel M., Stelzer E. H. K. et al.* Guiding principles of specimen preservation for confocal fluorescence microscopy // Handbook of biological confocal microscopy / Ed. J.B. Pawley. New York—London: Plenum Press, 1990. P. 197–205.
3. *Bock G., Hilchenbach M., Schauenstein K. et al.* Photometric analysis of antifading reagents with laser and conventional illumination sources // J. Histochem. & Cytochem. 1985. V. 33, N. 7. P. 699–705.
4. *Chen R. F., and Scott C. H.* Atlas of Fluorescence Spectra and Lifetimes of Dyes attached to proteins // Anal. Lett. 1985. V. 18. P. 393–422.
5. *Gerdes H.-H., Kaether C.* Green fluorescent protein: applications to cell biology // FEBS Lett. 1996. V. 389. P. 44–47.
6. *Haugland R. P.* Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes Inc., 1996, XII. Sixth edition. 680 p.
7. *Johnson G.D., Davidson R.S., McNamee K.C. et al.* Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. // J. Immunol. Methods. 1982. V. 55. P. 231–236.
8. *Kneen M., Farinas J., Li Y. et al.* Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator // Biophys. J. 1998. V. 74. P. 1591–1600.
9. *Krenik K.D., Kephart G.M., Offord K.P. et al.* Comparison of antifading reagents used in immunofluorescence // J. Immunol. Methods. 1989. V. 117. P. 91–97.
10. *Longin A., Souchier C., French M. et al.* Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study // J. Histochem. & Cytochem. 1993. V. 41, N. 12. P. 1833–1840.
11. *Tsien R.Y., Waggoner A.* Fluorophores for confocal microscopy: photophysics and photochemistry // Handbook of biological confocal microscopy / Ed. by J.B. Pawley. New York—London: Plenum Press, 1995. P. 267–279.
12. *Wells S., Johnson I.* // Three-Dimensional Confocal Microscopy: Investigation of Biological Systems / Eds J.K. Stevens et al. London: Academic Press, 1994. P. 101–129.
13. *Fine A., Amos W.B., Durbin R.M. et al.* Confocal microscopy: applications in neurobiology // Trends Neurosci. 1988. V. 11. P. 346–351.
14. *Hiraoka Y., Sedat J.W., Agard D.A.* The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures // Science. 1987. V. 238. P. 36–41.
15. *Ploem J.S.* Laser scanning fluorescence microscopy // Appl. Opt. 1987. V. 26. P. 3226–3231.
16. *Ploem J.S.* New instrumentation for sensitive image analysis of fluorescence in cell and tissues // Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences / Eds Taylor D.L. et al. 1986. New York: A. R. Liss. Inc. P. 289–300.
17. *Sheppard C.J.R., Wilson T.* Image formation in scanning microscopes with partially coherent source and detector // Optica Acta. 1978. V. 25. P. 315–325.
18. *Sheppard C.J.R., Cogswell C.J.* Confocal microscopy with detector arrays // J. Modern Optics. 1990. V. 37. P. 267–279.
19. *Shuman H.* Contrast in confocal scanning microscopy with a finite detector // J. Microscopy. 1988. V. 149. P. 67–71.
20. *Wilson T., Carline A.R.* Size of the detector in confocal imaging systems // Optics Lett. 1987. V. 12. P. 227–229.
21. *Connor J.A.* Fluorescence imaging applied to the measurement of Ca in mammalian neurons // Calcium and ion channel modulation / Eds Grinell A.D., Armstrong D., Jackson M.B. New York: Plenum Press, 1988. P. 395–406.
22. *Shotton D.M.* Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens // J. Cell Sci. 1989. V. 94. P. 175–206.
23. *Носов Ю.П., Шуман В.А.* Основы физики приборов с зарядовой связью. М.: Наука, 1986. 318 с.
24. Приборы с зарядовой связью / Под ред. Д.Ф. Барба. М.: Мир, 1982. 240 с.
25. *Секен К., Томпсон М.* Приборы с переносом заряда. М.: Мир, 1978. 328 с.
26. *Шелпакова И.Р., Гаранин В.Г., Лабусов В.А.* Многоэлементные твердотельные детекторы и их использование в атомно-эмиссионном спектральном анализе (обзор) // Заводская лаборатория: Диагностика материалов. 1999. Т. 65. № 10. С. 3–16.
27. *Ветохин С.С., Ермалицкий Ф.А., Мельников С.М. и др.* Современные фотоумножители для кинетической и одноквантовой спектрометрии (обзор) // Приборы и техника эксперимента. 1998. № 2. С. 5–12.

**Рекомендуемая литература  
по теме раздела 7**

1. *Cox I.J., Sheppard C.J.R., Wilson T.* Superresolution by confocal fluorescence microscopy. // Optik. 1982. V. 60. P. 391–396.

**Рекомендуемая литература  
по теме раздела 10**

1. *Akulinin V.A., Belichenko P.V., Dahlstrom A.*

- The cellular distribution of GAP-43 immunoreactivity in human neocortical areas using immunofluorescence and confocal microscopy: post-ischemic influence // *Brain Res.* 1998. V. 784, N. 1–2. P. 341–346.
2. *Amos W.B., White J.G., Fordham M.* Use of confocal imaging in the study of biological structures // *Appl. Opt.* 1987. V. 26. P. 3239–3243.
  3. *Andrews P.M., Petroll W.M., Cavanagh H.D. et al.* Tandem scanning confocal microscopy (TSCM) of normal and ischemic living kidneys // *Am. J. Anat.* 1991. V. 191. P. 95–102.
  4. *Antonini J.M., Charron T.G., Roberts J.R. et al.* Application of laser scanning confocal microscopy in the analysis of particle-induced pulmonary fibrosis // *Toxicol. Sci.* 1999. V. 51, N. 1. P. 126–134.
  5. *Arribas S.M., Daly C.J., Mc Grath I.C.* Measurements of vascular remodeling by confocal microscopy // *Methods Enzymol.* 1999. V. 307. P. 246–273.
  6. *Attawia M.A., Devin J.E., Laurencin C.T.* Immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy studies of osteoblast growth and phenotypic expression in three-dimensional degradable synthetic matrices // *J. Biomed. Mater. Res.* 1995. V. 29. P. 843–848.
  7. *Babcock G.F.* Quantitation of phagocytosis by confocal microscopy // *Methods Enzymol.* 1999. V. 307. P. 319–328.
  8. *Bauman J.G.J., Bayer J.A., Dekken H.* Fluorescent in-situ hybridization to detect cellular RNA by flow cytometry and confocal microscopy // *J. Microscopy.* 1990. V. 157. P. 73–81.
  9. *Beaudet A., Nouel D., Stroh T. et al.* Fluorescent ligands for studying neuropeptide receptors by confocal microscopy // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998. V. 31, N. 11. P. 1479–1489.
  10. *Bertero M., Boccacci P., Brakenhoff G.J. et al.* Three-dimensional image restoration and super-resolution in fluorescence confocal microscopy // *J. Microscopy.* 1990. V. 157. P. 3–20.
  11. *Bohnke M., Masters B.R.* Confocal microscopy of the cornea // *Prog. Retin. Eye Res.* 1999. V. 18, N. 5. P. 553–628.
  12. *Brakenhoff G.J., van der Voort H.T.M., van Spronsen E.A. et al.* 3-dimensional imaging of biological structures by high resolution confocal scanning laser microscope // *Scan microscopy.* 1988. V. 2. P. 33–40.
  13. *Brakenhoff G.J., van der Voort H.T.M., van Spronsen E.A. et al.* Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal laser scanning microscope // *Nature.* 1985. V. 317. P. 748–749.
  14. *Carlsson K., Wallen P., Brodin L.* Three-dimensional imaging of neurons by fluorescence microscopy // *J. Microscopy.* 1989. V. 155. P. 15–26.
  15. *Castano P., Marcucci A., Miani J.R.A. et al.* Central and peripheral nervous structures as seen at the confocal scanning laser microscopy // *J. Microscopy.* 1994. V. 175. Pt. 3. P. 229–237.
  16. *Cavanagh H.D., Jester J.V., Essepian J. et al.* Confocal microscopy of the living eye // *CLAO J.* 1990. V. 16. P. 65–73.
  17. *Cheng C., Reynolds I.J.* Subcellular localization of glutamate-stimulated intracellular magnesium concentration changes in cultured rat forebrain neurons using confocal microscopy. // *Neuroscience.* 2000. V. 95, N. 4. P. 973–979.
  18. *Chew S.J., Beuerman R.W., Assouine M. et al.* Early diagnosis of infections keratitis with in vivo real time confocal microscopy // *CLAO J.* 1992. V. 18. P. 197–201.
  19. *Chiou A.G., Kaufman S.C., Beuerman R.W.* Differential diagnosis of linear corneal images on confocal microscopy. // *Cornea.* 1999. V. 18. N. 1. P. 63–66.
  20. *Chiou A.G., Kaufman S.C., Beuerman R.W. et al.* Confocal microscopy in the iridocorneal endothelial syndrome // *Br. J. Ophthalmol.* 1999. V. 83, N. 6. P. 697–702.
  21. *Cleemann L., Wang W., Morad M.* Two-dimensional confocal images of organization density and gating of focal  $Ca^{2+}$  release sites in rat cardiac myocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95 (18). P. 10984–10989.
  22. *Cheng C., Reynolds I.J.* Subcellular localization of glutamate-stimulated intracellular magnesium concentration changes in cultured rat forebrain neurons using confocal microscopy // *Neuroscience.* 2000. V. 95, N. 4. P. 973–979.
  23. *Corcuff P., Bertrand C., Lewequ J.L.* Morphometry of human epidermis in vivo by real time confocal microscopy // *Arch. Dermatol.* 1993. V. 285. P. 475–481.
  24. *Evington R.J., Fricker M.D., Wood J.L. et al.* Four-dimensional imaging of living chondrocytes in cartilage using confocal microscopy: a practical approach // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 273. P. 1040–1051.
  25. *Fine A., Amos W.B., Durbin R.M. et al.* Confocal microscopy: applications in neurobiology // *Trends Neurosci.* 1988. V. 11. P. 346–351.
  26. *Fox M.H., Arndt-Jovin T.M., Baumann P.H. et al.* Spatial and temporal distribution of DNA replication sites localized by immunofluorescence and confocal microscopy in mouse fibroblasts // *J. Cell Sci.* 1991. V. 99. P. 247–253.
  27. *Frueh B.E., Bohnke M.* In vivo confocal microscopy of fleck dystrophy // *Cornea.* 1999. V. 18, N. 6. P. 658–660.

28. *Frueh B.E., Cadez R., Bohnke M.* In vivo confocal microscopy after photorefractive keratectomy in humans. A prospective, long-term study // *Arch. Ophthalmol.* 1998. V. 116, N. 11. P. 1425–1431.
29. *Gard D.L.* Confocal microscopy and 3-D reconstruction of the cytoskeleton of *Xenopus* oocytes // *Microsc. Res. Tech.* 1999. V. 44, N. 6. P. 388–414.
30. *Hepler P.K., Gunning B.E.S.* Confocal fluorescence microscopy of plant cells // *Protoplasma.* 1998. V. 201, N. 3–4. P. 121–157.
31. *Hernandez-Quintela E., Mayer F., Dighiero P. et al.* Confocal microscopy of cystic disorders of the corneal epithelium // *Ophthalmology.* 1998. V. 105, N. 4. P. 631–636.
32. *Howell D.N., Miller S.E.* Identification of viral infection by confocal microscopy // *Methods Enzymol.* 1999. V. 307. P. 573–591.
33. *Ichijima H., Petroll W.M., Jester J.V. et al.* In vivo confocal microscopic studies of endothelial wound healing in rabbit cornea // *Cornea.* 1993. V. 12. P. 369–378.
34. *Itoh J., Osamura R. Y., Watanabe K.* Subcellular visualization of light microscopic specimens by laser scanning microscopy and computer analysis: a new application of image analysis // *J. Histochemistry cytochemistry.* 1992. V. 40, N. 7. P. 955–967.
35. *Jester J.V., Petroll W.M., Garana R.M.R. et al.* Comparison of in vivo and ex vivo cellular structure in rabbit eyes detected by tandem scanning confocal microscopy // *J. Microscopy.* 1992. V. 165. P. 169–181.
36. *Jirkovska M., Kubinova L., Krekule I.* Spatial arrangement of fetal placental capillaries in terminal villi: a study using confocal microscopy // *Anat. Embryol. Berl.,* 1998. V. 197, N. 4. P. 263–272.
37. *Koester C.J.V., Auran J.D., Rapaport R. et al.* Confocal scanning slit microscopy of normal human corneal basal epithelium centripetal slide and presumed Langerhans cell movement // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993. V. 34 (suppl.). P. 1014.
38. *Koester C.J.V.* Scanning mirror microscope with optical sectioning characteristics: Applications in ophthalmology // *Appl. Optics.* 1980. V. 19. P. 1749–1757.
39. *Komuro H., Raki C.P.* Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations // *J. Neurosci.* 1995. V. 15, N. 2. P. 1110–1120.
40. *König K., Simon U., Halhuber K.-J.* 3-D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using modified confocal laser scanning microscope // *Cellular and Molecular Biology.* 1996. V. 42, N. 8. P. 1181–1194.
41. *Kumar S.D., Tay S.S.* Changes in peptidergic nerves in the atrioventricular valves of streptozotocin-induced diabetic rats: a confocal microscopy study // *Anat. Rec.* 2000. V. 258, N. 3. P. 277–285.
42. *Leclerc P., Jibard N., Meng X. et al.* Quantification of the nucleocytoplasmic distribution of wild type and modified proteins using confocal microscopy: interaction between 90-k heat shock protein (Hsp90 alpha) and glucocorticosteroid receptor (GR) // *Exp. Cell Res.* 1998. V. 242, N. 1. P. 255–264.
43. *Lemasters J.J., Qian T., Elmore S.P. et al.* Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy // *Biofactors.* 1998. V. 8, N. 3–4. P. 283–285.
44. *Lemp M.A., Shields W.M., Essepian J. et al.* The clinical use of tandem scanning confocal microscopy of the cornea // *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 1992. V. 33 (suppl.). P. 1234–1239.
45. *Lwigale P.Y.* Nuclear morphologies of bovine corneal cells as visualized by confocal microscopy // *Cells Tissues Organs.* 1999. V. 165, N. 2. P. 104–112.
46. *Mayr C.A., Sami S.M., Remers W.A. et al.* Intracellular localization of 6- and 7-substituted 2-[2'-(dimethylamino)ethyl]-1,2-dihydro-3H-dibenz[de,h]isoquinoline-1,3-diones (azonafides) is not the limiting factor for their cytotoxicity: an in vitro confocal microscopy study // *Anticancer Drugs.* 1999. V. 10, N. 2. P. 163–170.
47. *Morris D.C., Zhang Z., Davies K. et al.* High resolution quantitation of microvascular plasma perfusion in non-ischemic and ischemic rat brain by laser-scanning confocal microscopy // *Brain Res. Protoc.* 1999. V. 4, N. 2. P. 185–191.
48. *Motoyama K., Karl I.E., Flye M.W. et al.* Effect of  $Ca_2^+$  agonists in the perfused liver: determination via laser scanning confocal microscopy // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 276, N. 2. Pt. 2. P. 575–585.
49. *Mustonen R.K., Mc Donald M.B., Srivannaboon S. et al.* In vivo confocal microscopy of Fuchs' endothelial dystrophy // *Cornea.* 1998. V. 17, N. 5. P. 493–503.
50. *New K.C., Petroll W.M., Boyde A. et al.* In vivo imaging of human teeth and skin using real-time confocal microscopy // *Scanning.* 1991. V. 13. P. 369–372.
51. *Petroll W.M., Cavanagh H.D., Jester J.V.* 3-dimensional reconstruction of corneal cells using in vivo confocal microscopy // *J. Microscopy.* 1993. V. 170. P. 213–219.
52. *Petroll W.M., Cavanagh H.D., Jester J.V.* Assessment of stress fiber orientation during healing of radial keratotomy wounds using confocal microscopy // *Scanning.* 1998. V. 20, N. 2. P. 74–82.
53. *Petroll W.M., Jester J.V., Cavanagh H.D.* In vivo

- confocal imaging: general principles and applications // *Scanning*. 1994. V. 16. P. 131–149.
54. *Petronilli V., Miotto G., Canton M. et al.* Transient and long-lasting opening of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence // *Biophysical J.* 1999. V. 76, N. 2. P. 725–734.
  55. *Prydal J.I., Kerr Muir M.G., Dilly P.N. et al.* Confocal microscopy using oblique sections for measurement of corneal epithelial thickness in conscious humans // *Acta Ophthalmol. Scand.* 1997. V. 75, N. 6. P. 624–628.
  56. *Rosenberg M.E., Tervo T.M., Petroll W.M. et al.* In vivo confocal microscopy of patients with corneal recurrent erosion syndrome or epithelial basement membrane dystrophy // *Ophthalmology*. 2000. V. 107, N. 3. P. 565–573
  57. *Rothen-Rutishauser B., Kramer S.D., Braun A. et al.* MDCK cell cultures as an epithelial in vitro model: cytoskeleton and tight junctions as indicators for the definition of age-related stages by confocal microscopy // *Pharm. Res.* 1998. V. 15, N. 7. P. 964–971.
  58. *Satoh Y., Nishimura T., Kimura K. et al.* Application of real-time confocal microscopy for observation of living cells in tissue specimens // *Hum. Cell*. 1998. V. 11, N. 4. P. 191–198.
  59. *Shotton D.M.* The current renaissance in light microscopy; Blur-free optical sectioning of biological specimens by confocal scanning fluorescence microscopy // *Proc. R. Microsc. Soc.* 1988. V. 23. P. 289–297.
  60. *Silver M.A., Stryker M.P.* A method for measuring colocalization of presynaptic markers with anatomically labeled axons using double label immunofluorescence and confocal microscopy // *J. Neurosci. Methods*. 2000, Jan. 15. V. 94, N. 2. P. 205–215.
  61. *Smith G.J., Bagnell C.R., Bakewell W.E. et al.* Application of confocal scanning laser microscopy in experimental pathology // *J. Electron. Microsc. Tech.* 1991. V. 18. P. 38–49.
  62. *Soontornniyomkij V., Wang G., Kapadia S.B. et al.* Confocal microscopy assessment of lymphoid tissues with follicular hyperplasia from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1998. V. 122, N. 6. P. 534–538.
  63. *Stricker S.A., Whitaker M.* Confocal scanning microscopy of calcium dynamics in living cells // *Microscopy Research and Technique Directions*. 1999. V. 46. P. 356–369.
  64. *Sullivan K.F., Shelby R.D.* Using time-lapse confocal microscopy for analysis of centromere dynamics in human cells // *Methods Cell Biol.* 1999. V. 58. P. 183–202.
  65. *Turner J.N., Swann J.W., Szarowski D.H. et al.* Three-dimensional confocal light and electron microscopy of central nervous system tissue and neurons and glia in culture // *Intl. Rev. Exper. Path.* 1996. V. 36. P. 53–72.
  66. *Van Dekken H., van Rotterdam A., Jonker R. et al.* Confocal microscopy as a tool for the study of the intranuclear topography of chromosomes // *J. Microscopy*. 1990. V. 158. P. 207–214.
  67. *Van der Voort H.T.M., Strasters K.C.* Restoration of confocal images for quantitative analysis // *J. Microscopy*. 1995. V. 178. P. 165–181.
  68. *Van der Voort H.T.M., Brakenhoff G.J., Janssen G.C.A.M. et al.* Confocal scanning fluorescence and reflection microscopy: measurements of the 3-D image formation and application in biology // *Proc. Soc. Photo-Optical Instrument Ing. (SPIE)*. 1987. V. 809. P. 138–143.
  69. *Van Oostveldt P., Bauwens S.* Quantitative fluorescence in confocal microscopy // *J. Microscopy*. 1990. V. 158. Pt. 2. P. 121–132.
  70. *Vassy J., Rigaut J.P., Hill A.-M.* Analysis by confocal scanning laser microscopy imaging of the spatial distribution of intermediate filaments in foetal and adult rat liver cells // *J. Microscopy*. 1990. V. 157. P. 91–104.
  71. *Vesaluoma M.H., Linna T.U., Sankila E.M. et al.* In vivo confocal microscopy of a family with Schnyder crystalline corneal dystrophy // *Ophthalmology*. 1999. V. 106, N. 5. P. 944–951.
  72. *Werner L.P., Werner L., Dighiero P. et al.* Confocal microscopy in Bowman and stromal corneal dystrophies // *Ophthalmology*. 1999. V. 106, N. 9. P. 1697–1704.
  73. *White J.G., Amos W.B., Fordham M.* An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy // *J. Cell Biology*. 1987. V. 105. P. 41–48.
  74. *White J.G., Amos W.B., Fordham M.* An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structure by fluorescence light microscopy // *J. Cell Biol.* 1987. V. 105. P. 41–48.
  75. *White P.J., Fogarty R.D., Liepe I.J. et al.* Live confocal microscopy of oligonucleotide uptake by keratinocytes in human skin grafts on nude mice // *J. Invest. Dermatol.* 1999. V. 112, N. 6. P. 887–892.
  76. *Zhang Z., Davies K., Probst J.* Quantitation of microvascular plasma perfusion and neuronal microtubule-associated protein in ischemic mouse brain by laser-scanning confocal microscopy // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999. V. 19, N. 1. P. 68–78.
  77. *Zhu G., Tekola P., Baak J.P.A. et al.* Measurement



- by confocal laser scanning microscopy of the volume of epidermal nuclei in thick skin sections // Analytical and Quantitative Cytology and Histology. 1994. V. 16, N. 2. P. 145–152.
78. *Massig J.H., Preissler M., Wegener A.R. et al.* Real-time confocal laser scan microscope for examination and diagnosis of the eye in vivo // Applied optics. 1994. V. 33, N. 4. P. 690–694.
79. *Tadrous P.J.* Methods for imaging the structure and function of living tissues and cells: 3. Confocal microscopy and micro-radiology // J. Pathol. 2000. V. 191, N. 4. P. 345–354.

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцдино*

Материал поступил в редакцию 22.06.2001.

## CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY: PRINCIPLES, ARRANGEMENT, APPLICATION (PART 2)

**E. I. Lezhnev, I. I. Popova, S. V. Kuzmin, S. M. Slashchev**

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino*

Information on the features of CLSM application in biological investigations is given in the second part of the review. The discussion is mainly focused on the fluorescent methods most widely used in biology and medicine. Sufficiently detailed data on fluorescent dyes and standards for CLSM setting are cited since their nomenclature is wholly formed by foreign manufacturers and vendors and related to consumed materials. The features of dyes define used sources of light and photodetectors. Among numerous examples of CLSM application those are considered that can help readers, in the authors' opinion, to understand capabilities of this field of analytical microscopy. As an example, brief specifications of commercial CLSM from the leading manufacturers of optical research instrumentation are given.