



Применение конфокальной микроскопии в фундаментальных исследованиях и клинической практике эндокринолога: современные возможности

© Н.Г. Мокрышева¹, С.А. Киселев³, Н.В. Кlementьева³, А.М. Горбачева^{1*}, И.И. Дедов^{1,4}

¹Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия;

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия;

³Приволжский исследовательский медицинский университет», Нижний Новгород, Россия;

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Конфокальная микроскопия – современный метод визуализации, открывающий широкие возможности для исследований *in vitro* и *in vivo*. В клинической части обзора основное внимание уделено прочно вошедшим в практику методикам, таким как конфокальная микроскопия роговицы при диагностике диабетической нейропатии или эндокринной офтальмопатии; кратко описаны новые методики (интраоперационная оценка тканей, получаемых при удалении аденом гипофиза, щитовидной и околощитовидной желез). В части, посвященной фундаментальным исследованиям, рассматривается использование конфокальной микроскопии для характеристики колокализации белков, а также трехмерных внутриклеточных структур и сигнальных путей *in vivo*. Анализируются индикаторы внутриклеточного кальция.

Ключевые слова: конфокальная микроскопия, эндокринология, методы.

The use of confocal microscopy in experimental studies and clinical practice of an endocrinologist: modern opportunities

© Nataliya G. Mokrysheva¹, Sergey L. Kiselev³, Nataliya V. Klementieva³, Anna M. Gorbacheva^{1*}, Ivan I. Dedov^{1,4}

¹Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia;

²Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

³Privolzhskiy Research Medical University, Nizhniy Novgorod, Russia;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Confocal microscopy is a modern imaging method that provides ample opportunities for *in vitro* and *in vivo* research. The clinical part of the review focuses on well-established techniques, such as corneal confocal microscopy for the diagnosis of diabetic neuropathy or endocrine ophthalmopathy; new methods are briefly described (intraoperative evaluation of tissues obtained by removing pituitary adenomas, thyroid and parathyroid glands). In the part devoted to fundamental research, the use of confocal microscopy to characterize the colocalization of proteins, as well as three-dimensional intracellular structures and signaling pathways *in vivo*, is considered. Indicators of intracellular calcium are analyzed.

Keywords: confocal microscopy, endocrinology, methods.

Конфокальная микроскопия – принцип работы

Конфокальная микроскопия (КМ) характеризуется высоким пространственным разрешением и контрастированием изображений. В КМ может использоваться как отраженный свет, так и различные флуорофоры, испускающие свет определенной длины волны. В традиционном микроскопе весь образец, находящийся в поле зрения, одновременно освещается и визуализируется, что сопровождается высоким уровнем фонового сигнала (шума) из-за освещения участков образца вне фокальной плоскости. Это снижает качество изображения. В конфокальном же микроскопе проблема решается за счет использования специальной диафрагмы (пинхола), расположен-

ной в плоскости промежуточного изображения. Такая диафрагма пропускает только небольшое количество световых лучей от точечного участка образца, находящегося в фокальной плоскости и, таким образом, ограничивает фоновую засветку. Размер детектируемого фокусного пятна определяется диаметром диафрагмы и сопоставим с длиной волны возбуждающего света (порядка 500 нм). В связи с потерей интенсивности полезного сигнала в КМ в качестве детекторов применяют высокочувствительные фотоэлектронные умножители. Для того, чтобы получить полноценное изображение, необходимо провести сканирование фокусного пятна в плоскости X–Y путем последовательного перемещения пучка освещения по образцу (лазерно-сканирующая КМ) [1]. По мере сканирования сигнал от детектора подается на

компьютер, который собирает все точечные изображения образца и последовательно создает изображение по одному пикселю.

Благодаря пинхолу КМ дает возможность получить гораздо более высокое разрешение по оси Z, чем обычные световые микроскопы, что важно при исследовании толстых образцов тканей. Путем перемещения фокальной плоскости вглубь образца можно создать ряд виртуальных послойных плоскостей, из которых будут сформированы трехмерные изображения, аналогичные реконструкциям, получаемым в ходе КТ или МРТ [1,2]. Таким образом, КМ является оптическим методом, который позволяет получать изображения высокого разрешения со свежих относительно толстых фрагментов ткани без использования микротомов.

В исследованиях с применением КМ широко применяются различные флуорофоры, с помощью которых можно специфически метить те или иные внутриклеточные структуры (цитоскелет, ядро, митохондрии и др.). Использование нескольких флуорофоров, излучающих на разных длинах волн, позволяет одновременно визуализировать разные структуры и процессы в одном образце [1].

Возможна также КМ живых тканей в режиме реального времени. Особый интерес представляет изучение поверхностных тканей организма (кожи, слизистых, роговицы). При изучении кожи можно послойно визуализировать эпидермис и поверхностный слой дермы (в том числе, сосуды, нервные волокна, клетки иммунной системы и др.) [1].

Для исследования очень быстрых процессов в живых клетках может быть использована КМ на основе вращающегося диска Нипкова без лазерного сканирования. Следует учитывать, что при этом происходит потеря разрешающей способности и требуется приготовление более тонких срезов образца [1].

К сожалению, в эндокринологической клинической и исследовательской практике КМ применяется непростительно мало. Ниже рассматривается возможное применение этого метода в эндокринологии с учетом имеющегося ограниченного опыта.

Изучение трехмерной структуры объектов

Изначально конфокальный микроскоп разрабатывался для изучения трехмерной структуры различных объектов. Благодаря высокому аксиальному разрешению и возможности создавать серию «срезов», КМ позволяет моделировать исследуемый объект в трехмерном пространстве. Таким образом можно изучать структуру клеток, цитоскелета, клеточного ядра, хромосом, организацию нейронных сетей. Важным преимуществом КМ является возможность динамического исследования, т.е. оценки физиологического статуса материала в различных условиях. Такие

трехмерные реконструкции во времени называются 4D-сериями. Они, например, широко применяются при отслеживании делящихся клеток эмбрионов.

Используя КМ, R. Katoh и соавт. еще в 1999 г. продемонстрировали плотную ветвящуюся микросудистую сеть нормального фолликула щитовидной железы и ее отличия от более крупных и полиморфных микрососудов в фолликулярных аденомах. Они же выявили агрегированные сосудистые комплексы (гломерулоидные структуры) папиллярных карцином щитовидной железы, состоящие из извилистых, плотно упакованных и нерегулярно расположенных небольших сосудов [3].

Такого рода исследования не теряют своей актуальности. Так, например, Y. Pang и соавт. при помощи КМ и различных флуоресцентных меток удалось изучить структурные особенности васкуляризации биоинженерной костной ткани у мышей с визуализацией мезенхимальных стволовых клеток, эндотелиальных клеток и клеток крови. Были в динамике оценены функциональные свойства кровотока в костной ткани [4].

ФМ при исследовании внутриклеточных сигнальных путей

Классические индикаторы Ca^{2+}

Одной из основных областей применения КМ является исследование Са-опосредованных сигнальных путей с помощью флуоресцентных индикаторов, чувствительных к концентрации Ca^{2+} . Большинство таких индикаторов основано на хелаторах Ca^{2+} — этиленгликольтетрауксусной кислоте (EGTA) и 1,2-бис(2-аминофенокси)-этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоте (ВАРТА), в чью структуру были добавлены флуоресцирующие метки. Известны два основных класса кальциевых индикаторов — с одной и двумя длинами излучаемых волн. В первом случае, повышение концентрации Ca^{2+} усиливает флуоресценцию индикатора (например, fluo-3) без какого-либо спектрального сдвига. Связанная с Ca^{2+} форма индикатора флуоресцирует приблизительно в 40 раз ярче, чем несвязанный маркер. Основным недостатком одноволновых индикаторов является необходимость учета так называемого индекса кальция. Это означает, что при расчете концентрации Ca^{2+} приходится отталкиваться не от абсолютной интенсивности флуоресценции, а от интенсивности флуоресценции относительно исходного ее уровня, потому что на интенсивность флуоресценции маркера могут влиять изменение размера клеток (например, при сокращении кардиомиоцитов), утечка индикатора из клетки и фотообесцвечивание (необратимое повреждение молекул индикатора после воздействия света возбуждающего диапазона) [5].

В случае двухволновых индикаторов Ca^{2+} , таких как fura-2 и indo-1, изменения в концентрации Ca^{2+}

также меняют интенсивность возбуждения/излучения, но спектры флуоресценции связанных с Ca^{2+} и свободных форм индикатора различаются. В случае fura-2 Ca^{2+} -зависимые сдвиги происходят в спектрах возбуждения, а в случае indo-1 — в спектрах излучения. Поскольку спектральные пики кальций-связанных и свободных форм индикаторов находятся на разных длинах волн, соотношение свободных и связанных форм (а, значит, и концентрацию кальция) можно посчитать в любой временной точке. Это соотношение не зависит от концентрации индикатора и, следовательно, минимизирует некоторые артефакты, которые могут возникнуть при использовании одноволновых индикаторов. Несмотря на очевидные преимущества двухволновых индикаторов, наиболее популярными для конфокальной визуализации Ca^{2+} являются одноволновые. В основном это связано с тем, что большинство одноволновых индикаторов имеют максимумы возбуждения в видимой части спектра, что делает их совместимыми с большинством конфокальных микроскопов. Fura-2 и indo-1 возбуждаются в ультрафиолетовом диапазоне, что требует использования дополнительной аппаратуры [5–7].

Y. Chen и соавт. исследовали динамику концентрации кальция в нейронах дорсальных ганглиев крыс с помощью сенсоров Fluo-4 AM и Oregon Green 488 BAPTA-1 AM [8]. Авторы стимулировали захват сенсоров культурами дорсальных ганглиев и глии. По стандартной методике моделировалось воспаление, в ходе которого благодаря введенным ранее сенсорам были выявлены изменения внутриклеточного метаболизма кальция и доказано изменение нейрон-глияльного взаимодействия в ходе воспалительной реакции (рис. 1, 2) [5].

Возможность с помощью КМ регистрировать ответ клеток на изменения внеклеточных концентраций кальция представляет особый интерес в отношении опухолей околощитовидных желез. J. Koh и соавт., используя кальциевый сенсор Fluo-4, продемонстрировали гетерогенность ответа разных популяций паратиреоцитов на изменение концентрации внеклеточного кальция. Таким образом, КМ позволяет регистрировать ответ опухоли или гиперплазированной железы на изменение концентраций внеклеточного кальция и, в перспективе, тестировать эффекты различных лекарственных препаратов при гиперпаратиреозе *ex vivo* [9].

Кальциевые индикаторы на основе белковых молекул

С помощью классических флуоресцентных индикаторов невозможно оценивать колебания концентрации Ca^{2+} в органеллах (исключением является rhod-2, локализующийся в митохондриях). Для решения этой проблемы были разработаны кальциевые сенсоры на основе белка акворина (выделенного из медузы *Aequoria victoria*), позволяющие исследовать

концентрацию кальция внутри органелл. Поскольку акворин слабо флуоресцирует, ему на смену пришли сенсоры на основе белков *A. victoria* — зеленый флуоресцирующий протеин (GFP) и его генноинженерные вариации — синий (CFP) и желтый (YFP) флуоресцирующие протеины и др. [5].

Преимуществом GFP является максимум возбуждения в видимом спектре и достаточная яркость флуоресценции. На его основе были разработаны три группы кальциевых сенсоров: «хамелеоны», «камгару» и «перикамы». Все они имеют в своем составе кальмодулин (CaM) [5].

Хамелеоны — химерные белки из зеленого или желтого производного GFP, CaM и пептида M13 (CaM-связывающего домена киназы легкой цепи миозина). Связывая кальций, CaM меняет свою конформацию, происходит сближение двух флуорофоров, сопровождающееся флуоресцентным резонансным переносом энергии (Ферстеровским переносом энергии, FRET) и флуоресценцией [5].

Камгару были получены путем циклической перестановки в молекуле YFP. Это позволило получить кальцийчувствительный флуоресцирующий белок с несколько отличными от GFP свойствами: интенсивность флуоресценции таких соединений выше, чем в молекулах, флуоресцирующих благодаря FRET. Существенным недостатком камгару является их высокая чувствительность к колебаниям pH. Использование таких зондов ограничено и в связи с низким отношением сигнала к шуму, снижающим пространственное и временное разрешение [5, 10].

Перикамы являются результатом дополнительных генетических изменений YFP. Путем мутаций нескольких аминокислот вблизи хромофора были получены три типа перикамов: флуоресценция «флэш перикама» становится ярче при добавлении кальция, у «инверсного перикама» она, наоборот, затухает, а у «относительного перикама» длина волны возбуждения изменяется в зависимости от концентрации кальция [5, 10].

Описанные соединения успешно используются для изучения эндоплазматического ретикула, ядер, митохондрий и плазматической мембраны клеток. Однако сигнал от этих молекул относительно слаб, и производные GFP более чувствительны к фотовыгоранию, чем другие сенсоры. Самым большим лимитирующим использованием производных GFP-фактором является их способность влиять на кальций-опосредованные сигнальные пути (они создают своеобразный буфер Ca^{2+}), что может менять результат эксперимента [5, 10].

S. Pahlavan и соавт., использовали перикамы FKBP-YCaMP и FKBP-GCaMP6 для окраски кальция в миоцитах. FKBP-GCaMP6 связывался преимущественно с рианодиновыми рецепторами 2-го типа (RyR2) и обладал достаточными скоростными

характеристиками для определения Ca^{2+} в диадических щелях (в отличие от других сенсоров). Дальнейшие исследования внутриклеточной динамики кальция в кардиомиоцитах при помощи сенсора FKBP-GCaMP6 позволят более детально охарактеризовать процессы возбуждения и реализации импульса в миокарде [11].

Сенсоры активности фосфолипазы C (PLC)

Фосфолипаза C (PLC) — фермент, являющийся важным звеном метаболизма фосфатидилинозитола и, соответственно, липидных сигнальных путей. Недавно был получен ряд флуоресцентно меченых белковых биосенсоров, которые позволяют изучать активность PLC в режиме реального времени. Объектом интереса является не уровень флуоресценции как таковой, а распределение сенсора внутри клетки, поскольку на его локальную концентрацию оказывают непосредственное влияние вторичные мессенджеры — инозитол 1,4,5-трисфосфат [$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$] и диацилглицерол (DAG). На основании изменений в концентрации сенсора делается вывод об индексе активности PLC [5].

Биосенсоры, используемые в настоящее время, представляют собой химерный белок из молекулы флуорофора (обычно производного GFP) с белковым доменом, который взаимодействует с внутриклеточной сигнальной молекулой — одним из компонентов PLC-опосредованного пути [5].

Например, биосенсор DAG — комбинация C1-домена протеинкиназы C (PKC) и GFP. В условиях покоя сенсор равномерно распределен в ядре и цитоплазме клетки, но при активации PLC и увеличении концентрации DAG сенсор прикрепляется к клеточной мембране. Снижение цитозольной флуоресценции и увеличение флуоресценции цитоплазматической мембраны является показателем образования DAG и, следовательно, активации PLC [5].

Существуют зонды и для других компонентов фосфоинозитольного сигнального пути — например, сенсор $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ позволяет обнаруживать изменения в концентрации циклического аденозинмонофосфата (сAMP) в клетке [5, 12].

Выявление рецепторов, связанных с G-белками и интернализации лигандов

Интернализация мембранных рецепторов, связанных с G-белками (GPCR) — типичный ответ на воздействие агониста этих рецепторов, позволяющий клеткам регулировать их чувствительность и интенсивность последующего ответа. После связывания с лигандом, GPCR фосфорилируются, затем интернализируются и либо дефосфорилируются и возвращаются обратно на мембрану, либо подвергаются протеолитической деструкции. Измерения интернализации играют важную роль в регуляции работы таких рецепторов [5].

Конфокальная микроскопия делает возможной как количественную оценку интернализирующихся рецепторов, так и их визуализацию. Например, с помощью двухкомпонентной конфокальной иммуноцитохимии можно определить внутриклеточную локализацию рецепторов и использовать ее для получения информации об их перемещении. В отличие от иммуногистохимии, белки можно напрямую маркировать флуорофорами (GFP или другими) и, хотя маркировка сама по себе может влиять на рецепторную функцию и перемещение внутри клетки, этот подход позволяет не только определить субклеточную локализацию рецепторов, но и визуализировать их движение в реальном времени, и при разумном планировании эксперимента можно добиться количественной оценки интернализации рецепторов с помощью конфокальной микроскопии [5].

Примером оценки функционирования рецепторов, связанных с G-белками, при помощи методов конфокальной микроскопии является исследование Q. Zhang и соавт. Известно, что активность рецептора к паратормону (связанного с G-белком) регулируется путем обратимого убиквитинирования, однако сайты убиквитинирования ранее не были известны. Методами масс-спектрометрии было установлено, что искомыми сайтами для посттрансляционных модификаций являются Lys-388 и Lys-434 C-конца рецептора, а при помощи конфокальной микроскопии было доказано, что убиквитинирование именно этих сайтов оказывает значительное влияние на функционирование белка [13].

ФМ как инструмент выявления белков и их колокализации: мультиспектральные исследования

Флуоресцентная КМ позволяет определять как постоянно присутствующие, так и транзиторно экспрессирующиеся в клетке белки [14]. Основным и наиболее широко используемым методом является иммунофлуоресценция, в ходе которой меченые флуорофором антитела соединяются с исследуемым белком. В отсутствие необходимых антител или при недостаточной концентрации исследуемого белка применяется трансфекция клеток генетическими конструкциями, которые кроме исследуемого белка кодируют белковые метки (т.н. 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 CO_2 , дает возможность длительно-

го наблюдения за различными внутриклеточными процессами [14].

Следует учитывать однако, что включение метки в структуру белков или их гиперэкспрессия (при использовании плазмид) может изменять расположение белка внутри клетки и функцию конечного соединения. Чтобы убедиться в том, что исследуемый белок действительно локализован в той или иной органелле, необходимо использовать органеллоспецифичные метки, векторы и моноклональные антитела. Так, например, для визуализации митохондрий разработан краситель MitoTracker (Molecular Probes) и митохондриальные векторы, такие как pECFP-Mito (Clontech; Palo Alto, CA) [14].

Демонстрация внутриклеточной колокализации двух эндогенных белков дает более достоверную информацию, чем визуализация структур, меченых эпитопами или GFP. К основным ограничениям методики колокализации относится необходимость использования высокоспецифичных первичных антител; кроме того, исследуемые белки должны экспрессироваться клеточной линией в достаточном для визуализации количестве [14].

Методы колокализации активно используются в современных исследованиях. Так, C. Stancu и соавт. с помощью этого метода было установлено, что у гетерозиготных по гену *MEN-1* мышей в пролактиномах (в отличие от неопухолевых тканей тех же мышей) отсутствует колокализация пролактина и ФСГ [15].

Примером исследования активности PLC при помощи флуоресцентного микроскопа является работа L. Mercurio и соавт. [16] Изучались взаимосвязи между активацией хемокинового рецептора CXCR4, играющего важную роль в туморогенезе, и активностью фосфатидилхолин-специфичной PLC. Благодаря методам колокализации удалось доказать связь между активацией CXCR4 и PLC. Это означает, что ингибирование PLC не только модулирует метаболизм, пролиферативную и миграционную активность клетки глиомы, но и непосредственно блокирует одну из ключевых молекул определяющих туморогенность глиомы (рис. 3).

Изучение жизнедеятельности клеток и органелл в динамике

КМ можно использовать для изучения жизненного цикла различных клеточных органелл при помощи вышеописанных меток. Так, M. Sagalines и соавт., используя различные флуорофорные метки (ATF6, Renilla люциферазы, YFP-Parkin) на культуре нейронов с мутацией гена *WFS1* (характерной для синдрома Вольфрама) показали, что данная мутация изменяет динамику митохондрий (ингибировалось слияние митохондрий, замедлялся их транспорт по аксону, нарушалась митофагия), что в итоге нарушает функцию нейронов [17].

Динамика передвижения митохондрий и их коммуникация являлась предметом исследования и J. Walczak и соавт. [18]. На линиях клеток NARP и Rho0 (моделях умеренного и выраженного хронического митохондриального стресса, соответственно) была продемонстрирована зависимость формы митохондрий, их внутриклеточного распределения и тенденции к аутофагии от экспрессии некоторых белков митохондриального стресса (Drp1, p62, Mfn2 и др.) (рис. 4).

Применение конфокальной микроскопии в генетических исследованиях

Применение флуоресцентных меток к различным последовательностям ДНК и РНК открывает возможности оценки экспрессии тех или иных генов. Например, определение стадий развития ооцитов *Danio rerio* позволило глубже проникнуть в детали дифференцировки половых клеток [19].

Применение флуоресцентных меток к белкам, характерным для различных фаз клеточного цикла, позволяет не просто констатировать наличие или отсутствие той или иной третичной структуры молекулы ДНК, но и привязывать это к стадии жизни клетки. Так, S. Legartova и соавт. [20], используя флуоресцентную метку к белку 53BP1 охарактеризовали частоту возникновения спонтанных разрывов ДНК (маркером которых является 53BP1) на протяжении всех фаз клеточного цикла.

Применение конфокальной микроскопии в клинической эндокринологии

Дистальная диабетическая нейропатия

КМ роговицы *in vivo* — методика, быстро превратившаяся в диагностический тест при офтальмологических и неврологических заболеваниях. Процедура неинвазивна и занимает относительно немного времени.

Несмотря на отсутствие международных стандартизированных критериев КМ широко используется для оценки плотности нервных волокон в роговице при нейропатиях [21].

Впервые связь между нейротрофическими язвами роговицы и сахарным диабетом была описана в 1977 г. [22]. Уникальность роговицы как объекта исследований заключается в ее прозрачности, позволяющей *in vivo* получать прямые изображения мелких немиелинизированных нервных окончаний. Была доказана высокая чувствительность (до 91%) и специфичность (до 93%) метода [21].

КМ позволяет диагностировать поражение периферических нервов даже при недавно выявленном

сахарном диабете [23] и у людей с нарушением толерантности к глюкозе [24]. Более того, снижение длины нервных окончаний в роговице коррелирует с уровнем гликированного гемоглобина даже у здоровых людей. Выявляемые с помощью КМ повреждения нервов коррелируют и с уровнем триглицеридов плазмы. Ввиду простоты и безопасности метода его можно применять и у детей [21].

Выявляемые при КМ роговицы повреждения нервных волокон соответствуют степени снижения плотности интраэпидермальных нервных волокон в биоптатах кожи («золотого стандарта» диагностики поражения мелких нервных окончаний) [25]. Длина нервных волокон в роговице коррелирует также с тремя независимыми показателями повреждения мелких нервных волокон: показателями холодовой пробы, лазерной доплеровской визуализацией и вариабельностью сердечного ритма [21, 26]. Роль КМ роговицы как суррогатной конечной точки продемонстрирована в исследованиях пациентов, перенесших трансплантацию поджелудочной железы и почки. Через 6 мес после операции различия в выраженности нейропатии обнаруживались исключительно с помощью КМ; стандартные методы (электронейромиография, клиническая оценка неврологического дефицита и др.) оказались менее чувствительными [27, 28].

В ряде работ было показано увеличение плотности нервных волокон в роговице после нормализации показателей углеводного и липидного обмена, а также артериального давления у пациентов с сахарным диабетом [29, 30]. В этом случае потенциальным ограничением метода является скорость анализа изображений, однако проблема решается путем автоматизации процесса. Такие программы уже разработаны [21].

К аргументам против использования КМ при диагностике диабетической нейропатии относится тот факт, что роговица, в отличие от соматических нервов, лишена кровоснабжения, а нарушение кровоснабжения нервов — одна из важных причин развития диабетической нейропатии. Однако, как уже отмечалось, плотность нервов в роговице коррелирует с плотностью нервов в биопсийном материале. Более того, в экспериментах на животных с сахарным диабетом была продемонстрирована связь между снижением кровотока в задней цилиарной артерии и снижением плотности нервных окончаний в роговице [28, 31].

КМ роговицы используется для диагностики и других нейропатий (в том числе, токсических, при болезни Фабри и др.). Альтернативой КМ являются исключительно инвазивные методы, такие как пункционная биопсия кожи или биопсия икроножного нерва [2, 21, 32].

Синдром диабетической стопы

Синдром диабетической стопы (СДС) — одно из поздних осложнений диабета, развивающееся вслед-

ствие поражения артерий и нервов нижних конечностей и характеризующееся длительно незаживающими раневыми дефектами стоп и голеней. В довольно большом проценте случаев СДС приводит к высоким ампутациям и инвалидизации [33].

В рутинной клинической практике оценка состояния ран проводится методами визуального анализа, фотофиксации и измерения размеров ран специальными пленками. Основными ограничениями этих методов являются субъективность оценок и возможная болезненность процедуры. Для оценки динамики ранозаживления иногда используется биопсия краев ран, однако эта манипуляция может увеличивать раневой дефект и сопровождаться кровотечением из расширенных сосудов. КМ является бесконтактным, неинвазивным и информативным методом оценки состояния раны. С помощью КМ удастся получить не только морфологическую, но и функциональную и гемодинамическую оценку раневого поля, чего нельзя достичь ни одним из альтернативных методов [33].

N. Vardaxis и соавт., исследуя митотическую активность в образцах кожи свиней, одними из первых доказали информативность КМ в плане оценки заживления ран [34]. Позднее стали появляться работы с использованием КМ для оценки ранозаживления *in vivo*. O. Stumpp и соавт. с помощью КМ *in vivo* оценивали миграцию эпидермальных клеток и реакцию дермы на нанесение раневого дефекта [35]. Большинство подобных работ посвящено преимущественно различным дерматологическим заболеваниям и методам их лечения [36–38]. К сожалению, на данный момент стандарты оценки раневых дефектов при СДС методом КМ не разработаны.

Эндокринная офтальмопатия

Офтальмопатия при болезни Грейвса — аутоиммунное воспаление ретробульбарной клетчатки, соединительной ткани и экстраокулярных мышц. Эндокринная офтальмопатия (ЭОП) встречается у 25–50% пациентов с болезнью Грейвса; в клинической картине преобладают жалобы на ощущение сухости в глазах, светобоязнь, избыточное слезоотделение, двоение в глазах. При этом наблюдаются ретракция верхнего века, периорбитальный отек, конъюнктивальный хемоз, проптоз и рестриктивная экстраокулярная миопатия. Так называемый симптом сухого глаза — одна из самых частых причин дискомфорта у пациентов с ЭОП. Предположительно причиной данного состояния становится усиленное испарение слезной пленки на фоне расширенной глазной щели и недостаточная продукция слезных желез. Симптоматическая кератопатия наблюдается у 40–72% пациентов с ЭОП [39].

Для оценки тяжести кератопатии и динамического наблюдения за этим состоянием ряд исследователей используют КМ роговицы. Показано, что несмо-

тря на отсутствие различий в толщине конъюнктивы у здоровых людей и пациентов с ЭОП, плотность клеток эпителия в верхних отделах конъюнктивы у последних значительно ниже. Также у пациентов с ЭОП значительно ниже плотность бокаловидных клеток в верхних и височных отделах конъюнктивы, а плотность клеток Лангерганса, наоборот, выше. У пациентов с ЭОП более чем в 40% случаев наблюдается сквамозная метаплазия эпителия конъюнктивы. Описанные изменения оцениваются по клиническим шкалам (OSDI и MRD) [39, 40].

При болезни Грейвса еще до появления симптомов ЭОП зарегистрировано также снижение клеточной плотности в базальном слое эпителия роговицы, снижение суммарной плотности нервных волокон, а их суббазальное сплетение оказывается более извилистым [41].

Учитывая простоту и неинвазивность КМ, а также воспроизводимость ее результатов, этот метод может быть использован для ранней диагностики и динамического наблюдения патологии переднего отрезка глаза при ЭОП.

Опухоли эндокринных органов

Особый интерес приобретает использование КМ для экспресс-дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных опухолей эндокринных органов.

Объемные образования гипофиза составляют 10–15% всех первичных опухолей головного мозга. Объемные образования гипофиза преимущественно доброкачественны, однако в связи с определенным риском злокачественности и отсутствием высокоспецифичных ее предикторов особый интерес представляет интраоперационная гистологическая экспресс-диагностика, позволяющая хирургу быстро принять решение о необходимом объеме операции. Исследование занимает не больше времени, чем стандартная гистология *sito*. КМ с флуорофором демеклоциклином позволяет оперативно исследовать образцы тканей и определять степень злокачественности опухолей. Точность диагностики сопоставима с таковой при привычной полноценной гистологической процедурой [42].

В последних работах описаны примеры успешного применения сканирующей лазерной конфокальной эндомикроскопии в ходе нейрохирургических операций *in vivo*. Sanaï и соавт. вводили пациентам с опухолями головного мозга (глиомами, менингиомами, астроцитомами и др.) индоцианин зеленый и получали интраоперационные изображения исследуемой области, не удаляя ткань. Точность диагностики была сопоставимой с данными привычного патологоанатомического анализа. Разрабатываются более специфичные флуоресцентные метки, накапливающиеся преимущественно в опухолевых клетках. Для глиом на IIIa фазе исследования находится

5-ALA (5-аминолевулиновая кислота). Интересно, что, даже в отсутствие макрофлуоресценции, флуоресценция опухолевых клеток на микроскопическом уровне наблюдалась авторами во всех случаях [43]. Не исключено, что в скором времени КМ станет рутинным методом в арсенале нейрохирургов, в том числе при опухолях гипофиза.

В ходе расширенных хирургических вмешательств в области шеи зачастую возникает риск удаления здоровых околощитовидных желез с развитием послеоперационного гипопаратиреоза. Традиционно для оценки операционного материала используется экстренная гистология, однако эти же задачи может решить и отражательная КМ. F. Palmer и соавт. была продемонстрирована 100% точность КМ в выделении тканей щитовидной железы (папиллярной карциномы и различных вариантов аденом), околощитовидных желез, лимфоузлов и перитиреоидной жировой клетчатки [44]. M. Ragazzi и соавт. отмечают, что несмотря на разграничение здоровых фолликулов щитовидной железы и папиллярных структур, КМ не позволяет оценивать детали строения ядра тиреоцитов, а следовательно, не может быть инструментом для диагностики фолликулярного варианта папиллярной карциномы [45].

Важным аспектом хирургии околощитовидных желез является отсутствие у хирурга рутинной возможности визуально отличить здоровую и пораженную железистую ткань. Отражательная КМ позволяет отличать здоровую ткань от аденомы и карциномы и, следовательно, принимать решение о необходимом объеме операции [46]. Точность такой диагностики не уступает точности традиционных гистологических *sito*-исследований; сопоставимо и время, требующееся для проведения этих анализов. К плюсам методики относится отсутствие артефактов, обусловленных гистологической проводкой образцов, а к минусам — менее детализированное изображение [47].

Важна и интраоперационная оценка жизнеспособности околощитовидной железы и возможности ее аутотрансплантации. Простая визуальная оценка по цвету ткани недостаточно надежна. Для этих целей предложено интраоперационно использовать конфокальную эндомикроскопию [48]. При паратиреоидэктомии по поводу первичного гиперпаратиреоза внутривенно вводили флуоресцеин и с помощью стерильного минизонда проводили КМ выделенных околощитовидных желез до и после клипирования питающих их сосудов. Полученные микрофотографии оценивались двумя независимыми экспертами. Было показано, что кровоснабжение жизнеспособных околощитовидных желез в отличие от нежизнеспособных характеризуется однонаправленностью и высокой скоростью. Чувствительность и специфичность метода были высоки — 74 и 96%, соответственно. Значение этих данных, однако, ограничено небольшой выборкой (10 пациентов).

Ограничения клинического применения конфокальной микроскопии

Как любая другая процедура, КМ имеет определенные ограничения при использовании в клинической практике. Во-первых, на данный момент глубина изображения (в случае исследования кожи *in vivo*) ограничена глубиной эпидермиса и сосочкового слоя дермы, что может искажать реальную картину. Более того, на акральных участках со склонностью к гиперкератозу можно визуализировать только эпидермис. Во-вторых, интерпретатор изображения сталкивается с проблемой поиска различий клеток с аналогичными показателями отражения и формой, например, клеток Лангерганса и дендритных меланоцитов у остистого слоя. В-третьих, важными ограничениями являются высокая стоимость существующих устройств (розничная цена широкополосного конфокального микроскопа (VivaScore 1500) составляет \$ 98 500, а карманного конфокального микроскопа (VivaScore 3000) — \$ 69 500. Использование телемедицины, возможно, позволит решить проблему обучения интерпретаторов конфокальных изображений, однако это не снимает остальных ограничений [49, 50].

В настоящее время разрабатываются устройства для КМ с использованием лазерных сканирующих линий (а не сканирующих точек), что делает оборудование более компактным и дешевым. Внедрение искусственного интеллекта должно способствовать автоматизации анализа снимков. Для улучшения контрастности изображения в условиях *in vivo* возможна интрадермальная инъекция красителей, таких как индоцианин-зеленый. Наконец, в одном исследовании [49] показана возможность использования цифровой конфокальной мозаики, которая имитирует окрашивание гематоксилином и эозином; эффект был достигнут путем комбинирования отражения и флуоресцентного режима и присвоения псевдоцветов тканевым структурам на основе их дифференциального усиления.

Заключение

КМ — современный метод визуализации *in vitro* и *in vivo* с широким спектром использования в экс-

периментальных и клинических исследованиях. На данный момент основными отраслями медицины, где применяется КМ в диагностике, являются дерматология и офтальмология. Однако этот метод может найти применение и в практике эндокринолога.

Дополнительная информация

Дополнительные материалы к статье

Рис. 1. Результаты исследования L. Chen и соавт. [8]. Пример изменения во времени концентрации внутриклеточного кальция при добавлении в среду 80 мМ раствора KCl в нейронах дорсальных ганглиев. Окраска Fluo-4AM.



Доступен на цветной вклейке и в сети Интернет:
<https://doi.org/10.14341/probl10140-3743>

Рис. 2. Результаты исследования Y. Chen и соавт. [8]. Пример изменения концентрации внутриклеточного кальция при добавлении в среду 80 мМ раствора KCl в нейронах дорсальных ганглиев. Окраска Oregon Green-488. Con — контрольный снимок, High KCl — снимок в условиях 80 мМ KCl.



Доступен на цветной вклейке и в сети Интернет:
<https://doi.org/10.14341/probl10140-3744>

Рис. 3. Результаты исследования L. Mercurio и соавт. [16]. Флуоресцентная конфокальная микроскопия: окрашены CXCR4 (зеленая метка), PLC (красная метка), ядра клеток (DAPI — синяя метка).



Доступен на цветной вклейке и в сети Интернет:
<https://doi.org/10.14341/probl10140-37445>

Рис. 4. Результаты исследования J. Walczak и соавт. [18]. Внутриклеточное распределение митохондриальной (красная флуоресценция) и экспрессия белка митохондриального стресса Drp 1 (зеленая флуоресценция) в клетках линии NARP.



Доступен на цветной вклейке и в сети Интернет:
<https://doi.org/10.14341/probl10140-3746>

Источник финансирования. Поисково-аналитическая работа и публикация статьи осуществлены на личные средства авторского коллектива.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация о вкладе каждого автора. Все авторы внесли равный и значимый вклад в поиск информации, написание и редактирование текста рукописи, подготовку статьи к публикации, прочли и одобрили финальную версию.

ЛИТЕРАТУРА | REFERENCES

1. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, et al. Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol.* 2012;132(12):e3. doi: <https://doi.org/10.1038/jid.2012.429>
2. Bhutani J, Chakinala RC, Bhutani S, Sachdeva S. Endocrine and metabolic disease: confocal microscopy as a diagnostic aid. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015;19(1):171–173. doi: <https://doi.org/10.4103/2230-8210.146877>
3. Katoh R, Hemmi A, Komiyama A, Kawaoi A. Confocal laser scanning microscopic observation of angioarchitectures in human thyroid neoplasms. *Hum Pathol.* 1999;30(10):1226–1231. doi: [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(99\)90042-4](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(99)90042-4)
4. Pang Y, Tsigkou O, Spencer JA, et al. Analyzing structure and function of vascularization in engineered bone tissue by video-rate in-

- travital microscopy and 3D image processing. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(10):1025–1031. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2015.0091>
5. Tovey SC, Brighton PJ, Willars GB. Confocal microscopy: theory and applications for cellular signaling. *Methods Mol Biol*. 2005; 312:57–85. doi: <https://doi.org/10.1385/1-59259-949-4:057>
6. Bögeholz N, Schulte JS, Kaese S, et al. The effects of SEA0400 on Ca²⁺ transient amplitude and proarrhythmia depend on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger expression level in murine models. *Front Pharmacol*. 2017;8:649. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00649>
7. Remington SJ. Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Sci*. 2011;20(9):1509–1519. doi: <https://doi.org/10.1002/pro.684>
8. Chen Y, Huang LM. A simple and fast method to image calcium activity of neurons from intact dorsal root ganglia using fluorescent chemical Ca²⁺ indicators. *Mol Pain*. 2017;13:1744806917748051. doi: <https://doi.org/10.1177/1744806917748051>
9. Koh J, Hogue JA, Sosa JA. A novel ex vivo method for visualizing live-cell calcium response behavior in intact human tumors. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161134. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161134>
10. Pérez Koldenkova V, Nagai T. Genetically encoded Ca(2+) indicators: properties and evaluation. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(7):1787–1797. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.011>
11. Pahlavan S, Morad M. Total internal reflectance fluorescence imaging of genetically engineered ryanodine receptor-targeted Ca²⁺ probes in rat ventricular myocytes. *Cell Calcium*. 2017;66:98–110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.07.003>
12. Liu C, Deb S, Ferreira VS, et al. Kinetics of PTEN-mediated PI(3,4,5)P₃ hydrolysis on solid supported membranes. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192667. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192667>
13. Zhang Q, Xiao K, Liu H, et al. Site-specific polyubiquitination differentially regulates parathyroid hormone receptor-initiated MAPK signaling and cell proliferation. *J Biol Chem*. 2018;293(15):5556–5571. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001737>
14. Miyashita T. Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins. *Methods Mol Biol*. 2015;1278:515–526. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7_34
15. Stancu C, Coculescu M. Colocalization methods in pituitary tumorigenesis aged-related in MEN1 KO and wild type mice. *J Med Life*. 2014;7 (Spec Iss 3):87–94.
16. Mercurio L, Cecchetti S, Ricci A, et al. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibition down-regulates CXCR4 expression and interferes with proliferation, invasion and glycolysis in glioma cells. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176108. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176108>
17. Cagalinec M, Liiv M, Hodurova Z, et al. Role of mitochondrial dynamics in neuronal development: mechanism for wolfram syndrome. *PLoS Biol*. 2016;14(7):e1002511. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002511>
18. Walczak J, Partyka M, Duszyński J, Szczepanowska J. Implications of mitochondrial network organization in mitochondrial stress signalling in NARP cybrid and Rho0 cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):14864. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14964-y>
19. Okuthe GE. DNA and RNA pattern of staining during oogenesis in zebrafish (*Danio rerio*): a confocal microscopy study. *Acta Histochem*. 2013;115(2):178–184. doi: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.06.006>
20. Legartova S, Suchankova J, Krejci J, et al. Advanced confocal microscopy techniques to study protein-protein interactions and kinetics at DNA lesions. *J Vis Exp*. 2017;(Iss 129). doi: <https://doi.org/10.3791/55999>
21. Tavakoli M, Petropoulos IN, Malik RA. Corneal confocal microscopy to assess diabetic neuropathy: an eye on the foot. *J Diabetes Sci Technol*. 2013;7(5):1179–1189. doi: <https://doi.org/10.1177/193229681300700509>
22. Hyndiuk RA, Kazarian EL, Schultz RO, Seideman S. Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol*. 1977; 95(12):2193–2196. doi: <https://doi.org/10.1001/archophth.1977.04450120099012>
23. Ziegler D, Papanas N, Zhivov A, et al. Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(7):2454–2463. doi: <https://doi.org/10.2337/db13-1819>
24. Asghar O, Petropoulos IN, Alam U, et al. Corneal confocal microscopy detects neuropathy in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*. 2014;37(9):2643–2646. doi: <https://doi.org/10.2337/dc14-0279>
25. Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, et al. Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2007;56(8):2148–2154. doi: <https://doi.org/10.2337/db07-0285>
26. Sivaskandarajah GA, Halpern EM, Lovblom LE, et al. Structure-function relationship between corneal nerves and conventional small-fiber tests in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(9):2748–2755. doi: <https://doi.org/10.2337/dc12-2075>
27. Tavakoli M, Mitu-Pretorian M, Petropoulos IN, et al. Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration in diabetic neuropathy after simultaneous pancreas and kidney transplantation. *Diabetes*. 2013;62(1):254–260. doi: <https://doi.org/10.2337/db12-0574>
28. Артемова Е.В., Галстян Г.Р., Атаршиков Д.С., и др. Конфокальная микроскопия роговицы – новый неинвазивный метод диагностики начальных проявлений повреждения периферической нервной системы при сахарном диабете // *Проблемы эндокринологии*. – 2015. – Т.61. – №2. – С. 32–38. [Artemova EV, Galstyan GR, Atarshchikov DS, et al. Confocal retinal microscopy – the new non-invasive method of the early manifestation of the lesions in the peripheral nervous system associated with diabetes mellitus. *Problems of endocrinology*. 2015;61(2):32–38. (In Russ).] doi: <https://doi.org/10.14341/probl201561232-38>
29. Smith AG, Russell J, Feldman EL, et al. Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes care*. 2006;29(6):1294–1299. doi: <https://doi.org/10.2337/dc06-0224>
30. Tavakoli M, Kallinikos P, Iqbal A, et al. Corneal confocal microscopy detects improvement in corneal nerve morphology with an improvement in risk factors for diabetic neuropathy. *Diabet Med*. 2011;28(10):1261–1267. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03372.x>
31. Davidson EP1, Coppey LJ, Holmes A, Yorek MA. Changes in corneal innervation and sensitivity and acetylcholine-mediated vascular relaxation of the posterior ciliary artery in a type 2 diabetic rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(3):1182–1187. doi: <https://doi.org/10.1167/jovs.11-8806>
32. Wang EF, Misra SL, Patel D V. In vivo confocal microscopy of the human cornea in the assessment of peripheral neuropathy and systemic diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:951081. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/951081>
33. Mukherjee R, Tewary S, Routray A. Diagnostic and prognostic utility of non-invasive multimodal imaging in chronic wound monitoring: a systematic review. *J Med Syst*. 2017;41(3):46. doi: <https://doi.org/10.1007/s10916-016-0679-y>
34. Vardaxis NJ, Brans TA, Boon ME, et al. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. *J Anat*. 1997;190 (Pt 4):601–611. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19040601.x>
35. Stumpp OF, Bedi VP, Wyatt D, et al. In vivo confocal imaging of epidermal cell migration and dermal changes post nonablative frac-

- tional resurfacing: study of the wound healing process with corroborated histopathologic evidence. *J Biomed Opt.* 2009;14(2):24018. doi: <https://doi.org/10.1117/1.3103316>
36. Longo C, Galimberti M, De Pace B, et al. Laser skin rejuvenation: epidermal changes and collagen remodeling evaluated by in vivo confocal microscopy. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):769–776. doi: <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1145-9>
 37. Lange-Asschenfeldt S, Bob A, Terhorst D, et al. Applicability of confocal laser scanning microscopy for evaluation and monitoring of cutaneous wound healing. *J Biomed Opt.* 2012;17(7):76016. doi: <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.7.076016>
 38. Sattler EC, Poloczek K, Kästle R, Welzel J. Confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography for the evaluation of the kinetics and quantification of wound healing after fractional laser therapy. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(4):e165–173. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.04.052>
 39. Wei Y-H, Chen W-L, Hu F-R, Liao SL. In vivo confocal microscopy of bulbar conjunctiva in patients with Graves' ophthalmopathy. *J Formos Med Assoc.* 2015;114(10):965–972. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2013.10.003>
 40. Villani E, Viola F, Sala R, et al. Corneal involvement in Graves' orbitopathy: an in vivo confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(9):4574–4578. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5380>
 41. Kocabeyoglu S, Mocan MC, Cevik Y, Irkeç M. Ocular Surface Alterations and In Vivo Confocal Microscopic Features of Corneas in Patients With Newly Diagnosed Graves' Disease. *Cornea.* 2015;34(7):745–749. doi: <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000426>
 42. Wirth D, Smith TW, Moser R, Yaroslavsky AN. Demeclocycline as a contrast agent for detecting brain neoplasms using confocal microscopy. *Phys Med Biol.* 2015;60(7):3003–3011. doi: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/60/7/3003>
 43. Mooney MA, Zehri AH, Georges JF, Nakaji P. Laser scanning confocal endomicroscopy in the neurosurgical operating room: a review and discussion of future applications. *Neurosurg Focus.* 2014;36(2):E9. doi: <https://doi.org/10.3171/2013.11.FOCUS13484>
 44. Palmer F, Larson B, Moreira A, et al. Identification of parathyroid glands during thyroidectomy using reflectance confocal microscopy: a feasibility study [Internet]. In: World Congress on Thyroid Cancer – 2013, Abstract Book. 2013. [cited 2019 March 12]; [About 1p.] Available from: https://thyroidworldcongress.com/wp-content/uploads/2013/07/O067_Palmer.pdf
 45. Ragazzi M, Piana S, Longo C, et al. Fluorescence confocal microscopy for pathologists. *Mod Pathol.* 2014;27(3):460–471. doi: <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.158>
 46. White WM, Tearney GJ, Pilch BZ, et al. A novel, noninvasive imaging technique for intraoperative assessment of parathyroid glands: confocal reflectance microscopy. *Surgery.* 2000;128(6):1088–1100; discussion 1100–1101. doi: <https://doi.org/10.1067/msy.2000.111190>
 47. White WM, Baldassano M, Rajadhyaksha M, et al. Confocal reflectance imaging of head and neck surgical specimens. A comparison with histologic analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(8):923–928. doi: <https://doi.org/10.1001/archotol.130.8.923>
 48. Chang T-P, Palazzo F, Tolley N, et al. Vascularity assessment of parathyroid glands using confocal endomicroscopy: towards an intraoperative imaging tool for real-time in situ viability assessment. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(1):S3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2014.07.008>
 49. Que SK, Fraga-Braghiroli N, Grant-Kels JM, et al. Through the looking glass: Basics and principles of reflectance confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73(2):276–284. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.04.047>
 50. Jonkman J, Brown CM. Any way you slice it—a comparison of confocal microscopy techniques. *J Biomol Tech.* 2015;26(2):54–65. doi: <https://doi.org/10.1717/jbt.15-2602-003>

Рукопись получена: 12.03.2019

Одобрена к публикации: 13.05.2019

Опубликована online: 20.06.2019

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

*Горбачева Анна Максимовна [Anna M. Gorbacheva, MD]; адрес: Россия, 117036, Москва, улица Дм.Ульянова, д.11 [address: 11 Dm. Ulyanova street, Moscow, 117036, Russia]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2669-9457>; eLibrary SPIN: 9815-7509; e-mail: ann.gorbachewa@yandex.ru

Мокрышева Наталья Георгиевна, д.м.н., профессор [Natalya G. Mokrysheva, MD, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9717-9742>; eLibrary SPIN: 5624-3875; e-mail: nm70@mail.ru

Киселев Сергей Львович, д.б.н., профессор [Sergey L. Kiselev, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7921-6987>; eLibrary SPIN: 9311-3403; e-mail: sl_kiselev@yahoo.com

Клементьева Наталия Владимировна, к.б.н. [Natalia V. Klementieva, PhD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2742-372X>; eLibrary SPIN: 5318-3774; e-mail: nvklementieva@gmail.com

Дедов Иван Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН [Ivan I. Dedov, MD, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8175-7886>; eLibrary SPIN: 5873-2280; e-mail: dedov@endocrincentr.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

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. doi: <https://doi.org/10.14341/probl10140>

TO CITE THIS ARTICLE:

Mokrysheva NG, Kiselev SL, Klementieva NV, Gorbacheva AM, Dedov II. The use of confocal microscopy in experimental studies and clinical practice of an endocrinologist: modern opportunities. *Problems of Endocrinology.* 2019;65(3):174–183. doi: <https://doi.org/10.14341/probl10140>

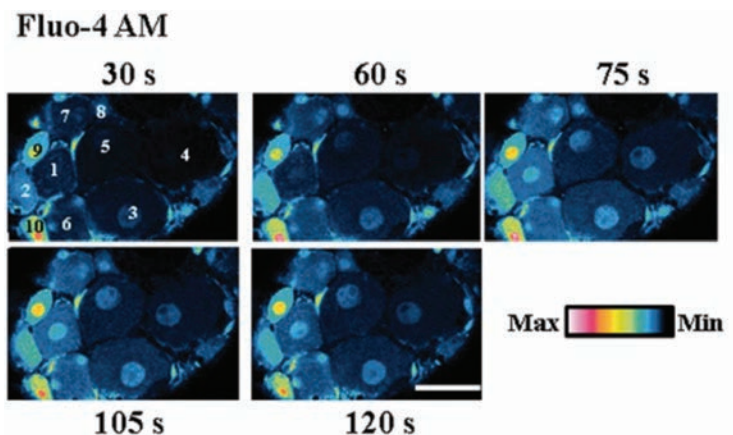


Рис. 1. Результаты исследования L. Chen и соавт. [8]. Пример изменения во времени концентрации внутриклеточного кальция при добавлении в среду 80 мМ раствора KCl в нейронах дорсальных ганглиев. Окраска Fluo-4AM.

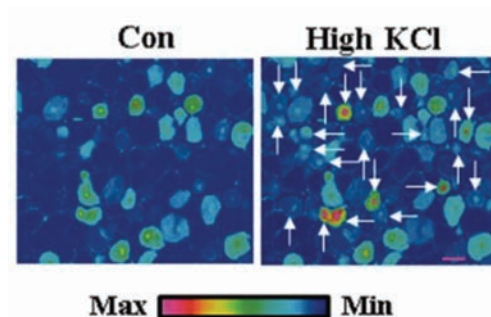


Рис. 2. Результаты исследования Y. Chen и соавт. [8]. Пример изменения концентрации внутриклеточного кальция при добавлении в среду 80 мМ раствора KCl в нейронах дорсальных ганглиев. Окраска Oregon Green-488. Con – контрольный снимок, High KCl – снимок в условиях 80 мМ KCl.

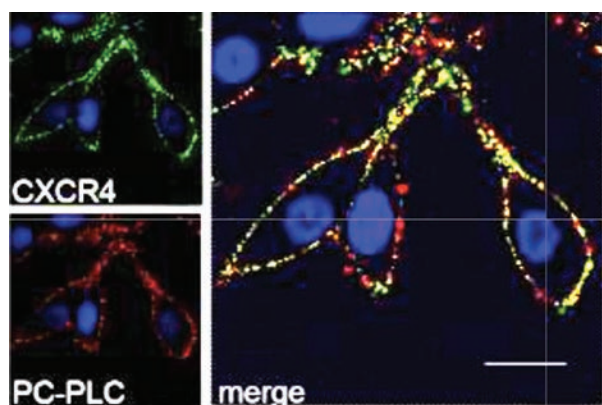


Рис. 3. Результаты исследования L. Mercurio и соавт. [16]. Флуоресцентная конфокальная микроскопия: окрашены CXCR4 (зеленая метка), PLC (красная метка), ядра клеток (DAPI – синяя метка).

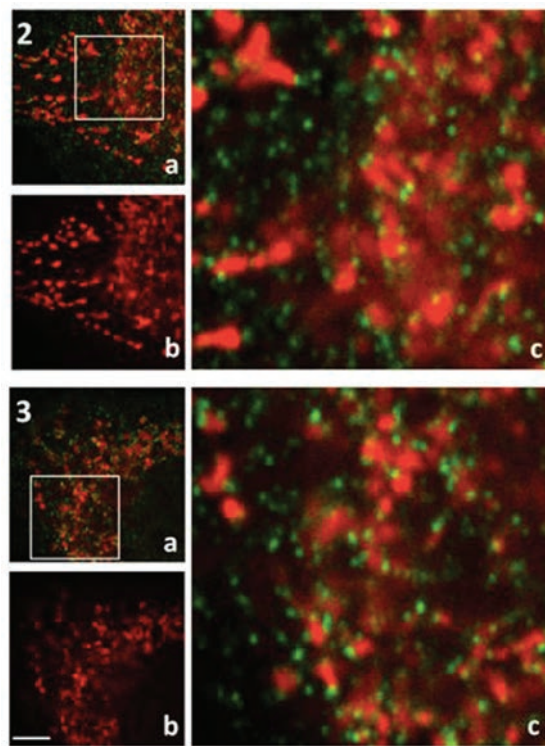


Рис. 4. Результаты исследования J. Walczak и соавт. [18]. Внутриклеточное распределение митохондрий (красная флуоресценция) и экспрессия белка митохондриального стресса Drp 1 (зеленая флуоресценция) в клетках линии NARP.