

# Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в биологии и медицине

И.А. Волков, Н.В. Фриго, Л.Ф. Знаменская, О.Р. Катунина

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России  
107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

Методы флуоресцентной и отражательной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии являются современными высокотехнологичными методами исследования. Конфокальная микроскопия находит практическое применение в клеточной биологии и медицине. С помощью конфокальной микроскопии возможно осуществить изучение клеточных органелл и локализации молекул белков и других соединений относительно структур клетки или ткани, а также провести наблюдение за динамическими процессами в клетке. Конфокальные микроскопы позволяют проводить послойное сканирование исследуемых препаратов. Это дает возможность создавать наглядные объемные 3D модели. По сравнению с обычными флуоресцентными микроскопами конфокальные микроскопы обладают повышенной контрастностью и четкостью изображения.

Ключевые слова: **конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, клетка, иммуногистохимия.**

Контактная информация: ivolkov@cnikvi.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2014; (1): 17—24.

# Application of confocal laser scanning microscopy in biology and medicine

I.A. Volkov, N.V. Frigo, L.F. Znamenskaya, O.R. Katunina

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation  
Korolenko str., 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

Fluorescence confocal laser scanning microscopy and reflectance confocal laser scanning microscopy are up-to-date high-end study methods. Confocal microscopy is used in cell biology and medicine. By using confocal microscopy, it is possible to study bioplasts and localization of protein molecules and other compounds relative to cell or tissue structures, and to monitor dynamic cell processes. Confocal microscopes enable layer-by-layer scanning of test items to create demonstrable 3D models. As compared to usual fluorescent microscopes, confocal microscopes are characterized by a higher contrast ratio and image definition.

Key words: **confocal laser scanning microscopy, cell, immunohistochemistry**

Corresponding author: ivolkov@cnikvi.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2014; 1: 17—24.

■ С момента изобретения микроскоп играет важную роль в медицине. За более чем четырехсотлетнюю историю микроскопия прошла бурное развитие от простого оптического монокуляра до сложнейшего атомно-силового микроскопа. В клинических и лабораторных исследованиях используется анализ окрашенных срезов тканей и клеток в проходящем белом свете. Это наиболее простой и в то же время весьма информативный вид оптической микроскопии. Более сложной разновидностью световой микроскопии являются методы темного поля, фазового и дифференциально-интерференционного контраста, позволяющие наблюдать микроструктуры в неокрашенных и слабоконтрастных биологических объектах, таких как живые клетки. Изобретение флуоресцентной микроскопии позволило исследовать отдельные флуоресцирующие молекулы на уровне клеточных структур. Наконец, конфокальная микроскопия дала возможность получать флуоресцентные сигналы с трехмерным субклеточным разрешением, что значительно расширило возможности анализа прозрачных образцов [1].

На сегодняшний день конфокальная микроскопия находит практическое применение в клеточной биологии, медицине, а также в криминалистике и материаловедении [2—4]. В биологии и медицине конфокальная микроскопия используется для получения изображений тонких оптических срезов живых и фиксированных биологических тканей и клеток толщиной до 100 мкм [1, 2, 5]. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия является важным инструментом для исследований и диагностики, требующим проведения предварительных работ. При проведении научных исследований в области клеточной биологии, цитологии и медицины конфокальная микроскопия используется, как правило, на завершающей стадии эксперимента. Работе на конфокальном микроскопе в зависимости от поставленных задач обычно предшествует получение гистохимических срезов, работа с патогенными штаммами микроорганизмов, вызывающими инфекционные заболевания, фиксация и окраска препарата флуоресцентными красителями либо окраска нефиксированных препаратов при экспериментах *in vivo*, создание систем экспрессии рекомбинантных белков, постановка экспериментов по трансфекции культур клеток исследования [6—11].

Объектами исследования методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в медицине и биологии являются живые клетки (включая культуры клеток человека и животных, а также отдельные микроорганизмы) и фиксированные препараты (как отдельные клетки, полученные из соскобов слизистых покровов или проб крови, так и фрагменты тканей из биопатов) [6, 10—15].

Предмет исследования методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в биологии и медицине представляют крупные биомолекулы и органел-

лы клетки, их структурная организация, внутриклеточный транспорт и межклеточные взаимодействия, позволяющие изучить особенности течения заболеваний на молекулярном уровне.

Наиболее частой задачей конфокальной микроскопии является изучение структуры цитоскелета, ядра, хромосом, митохондрий и т. д. Исследуется также колокализация двух и более веществ, например белков, и их локализация относительно структур клетки или ткани. С помощью конфокальной микроскопии возможно осуществить изучение динамических процессов, протекающих в живых клетках, например клеточного транспорта биологически активных соединений. Метод конфокальной микроскопии позволяет регистрировать изменения физиологических параметров живых клеток, например измерять значения pH, концентрацию и распределение ионов кальция, натрия и хлоридов. Для проведения исследований клеточных культур или других живых объектов *in vivo* предусмотрена возможность дополнительной установки на микроскоп термокамер и CO<sub>2</sub>-инкубаторов [1, 14—17].

Принцип устройства конфокального микроскопа был разработан аспирантом Гарвардского университета Марвином Мински в 1957 г., однако широкое применение в практике он нашел лишь в 80-е годы прошлого века, когда компьютерные и лазерные технологии достигли достаточного уровня развития [2, 5, 18—20].

Устройство конфокального микроскопа можно представить себе на примере пленочного фотоаппарата. Для контроля величины пучка проходящего света фотограф использует диафрагму. Уменьшая или увеличивая диаметр диафрагмы, он добивается оптимальной яркости изображения и глубины резкости. Подобная диафрагма помещена внутри микроскопа в плоскости, где фокусируется исходящий от объекта свет (флуоресценция), собранный из фокуса объектива. Лишний свет, который исходит не из наблюдаемой точки, а излучается ее окружением, отсекается диафрагмой. Уникальные возможности конфокального микроскопа обусловлены тем, что в качестве источника света в современных конфокальных микроскопах используются лазеры, а чрезвычайная точность регистрации сигнала лазера усиливается эффектом диафрагмы, устраняющей посторонние сигналы. По сравнению с обычными флуоресцентными микроскопами конфокальные системы обладают повышенной контрастностью и четкостью изображения. Кроме этого, они позволяют проводить послойное сканирование исследуемых препаратов. Именно возможность получать четкие изображения слоев внутри препарата позволяет создавать объемные 3D модели. С этой целью проводят послойное сканирование объекта и обрабатывают полученные данные с помощью специальной программы, которая самостоятельно создает объемную реконструкцию. Это позволяет не использовать трудоемкую

методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов [1, 5, 20].

Исходя из принципа использования лазера в качестве источника света, лазерную сканирующую конфокальную микроскопию разделяют на отражательную и флуоресцентную (рис. 1) [7, 21—23].

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия нашла практическое применение в производстве приборов, предназначенных для осуществления диагностики и научных исследований. При этом прослеживается четкое соответствие между видом конфокальной микроскопии и способом ее применения: отражательная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия оказалась весьма удобной для использования в диагностике, тогда как флуоресцентная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия прочно заняла свое место в фундаментальных и прикладных научных исследованиях [11, 23—26].

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

Флуоресцентная конфокальная микроскопия ввиду ряда причин не используется для диагностики, но имеет большое значение в научных исследованиях. В дерматологии флуоресцентная конфокальная микроскопия находит применение в изучении причин и особенностей течения заболеваний на молекулярном уровне, а также в описании структуры кожи и ее компонентов [14, 27] (рис. 2).

Так, после флуоресцентного окрашивания клеток Ларгенганса А. Scheynius и R. Fink-Puches было про-

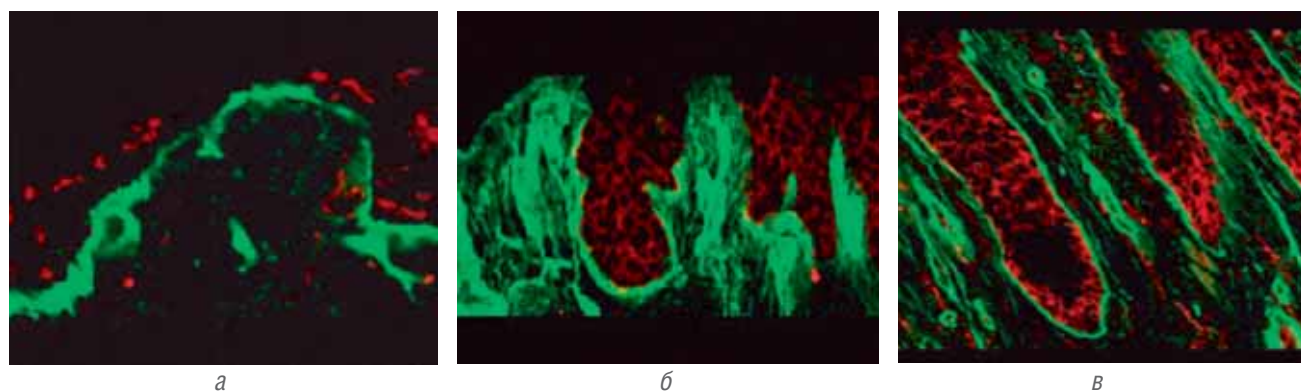
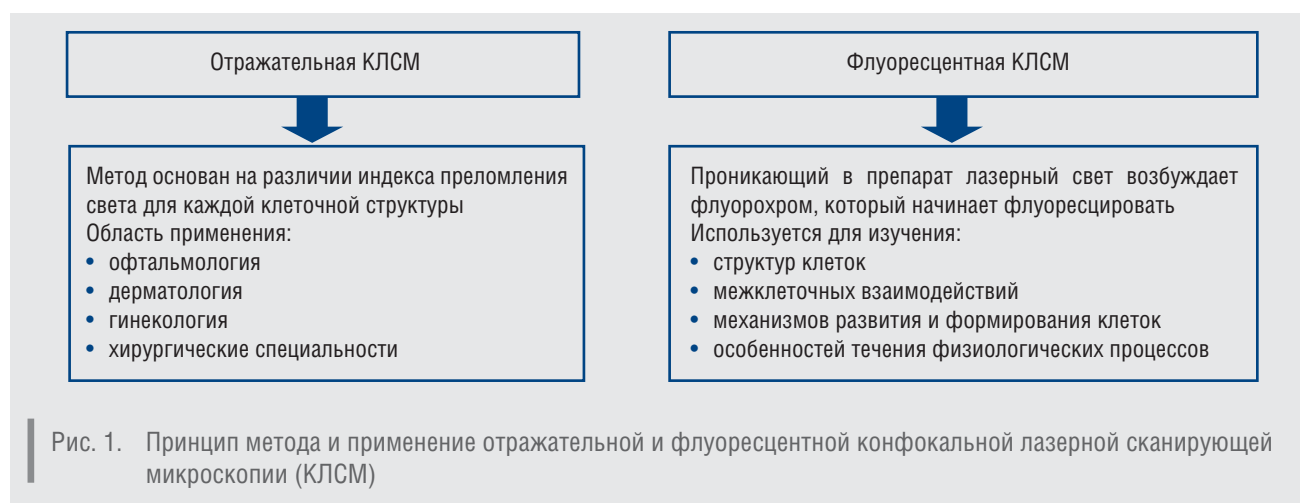


Рис. 2. Определение роли нейропептидов при псориатическом зуде [34]: а — здоровый контроль; б, в — гиперпролиферация нервных окончаний в образцах кожи больных псориазом. Двойное окрашивание против коллагена (зеленый цвет) и маркера белка 9,5 (красный цвет)

ведено их послойное сканирование, а затем восстановлена 3D структура клеток. В результате были получены точные данные о размерах дендритных клеток, глубине их расположения и пространственных взаимодействиях между клетками разных типов [6, 7].

При исследовании распределения иммуноглобулина А у пациентов с герпетиформным дерматитом S. Kawana и A. Segawa при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии наблюдали отложения иммуноглобулина А на глубине 50—110 мкм от поверхности кожи и определили, что эти отложения анатомически имеют фибриллярную структуру, а не глобулярную, как считалось ранее [8].

При изучении белка  $\alpha_1$ -ламинарина у больных псориазом методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [9, 28, 29] были выявлены различия в распределении белка в коже пациентов, больных псориазом, и здоровых людей. В норме данный белок имеет высокоупорядоченное распределение, поскольку участвует в прикреплении кератиноцитов к базальной мембране и отвечает за межклеточные контакты. Отмечено, что в образцах кожи больных псориазом белок  $\alpha_1$ -ламинин окрашивается бессистемно и по базальной мембране распределяется неструктурированно на участках как здоровой, так и пораженной кожи.

Возможности конфокальной микроскопии используют также при изучении морфологии и особенностей жизнедеятельности патогенных микроорганизмов [15]. *Trichophyton mentagrophytes* является патогенным дерматофитом, вызывающим эпидермофитию стоп. G. Kaufman и соавт. был получен штамм *T. mentagrophytes*, экспрессирующий зеленый флуоресцирующий белок (GFP). Белок GFP являлся маркером для наблюдения за жизнедеятельностью патогена при помощи конфокальной микроскопии. Штамм был помещен на кожный эксплантат, после чего осуществлялось наблюдение за изменением морфологии дерматофита на стадиях прикрепления к поверхности кожи и проникновения внутрь. Установлено, что в целях адаптации к среде обитания дерматофит образует длинные фибриллы в случае, если находится на поверхности кожного покрова, и короткие тонкие фибриллы, если он находится на более глубоком уровне. В результате проведенных исследований обнаружено, что рост клеток патогена осуществляется во всех направлениях и сопровождается образованием гиф [10].

С использованием метода флуоресцентной конфокальной микроскопии проводится изучение морфологии структур кожи, в частности структуры ламеллярных гранул эпидермиса [16]. Осуществляется изучение функций и распределения белков, имеющих отношение к псориазу, например белка  $\beta$ -катенина в клетках эпидермиса, который участвует в клеточной дифференцировке и формировании межклеточных контактов, играет роль в передаче

межклеточных сигналов и может стимулировать пролиферацию клеток [30].

Обзор современной научной литературы показал, что к настоящему времени флуоресцентная конфокальная микроскопия нашла применение в дерматологии при изучении:

- липидного транспорта, в частности белка ABCA12, что имеет большое значение в патогенезе ихтиоза и некоторых генодерматозов [31];
- внутриклеточного транспорта (роль белка ламеллярных гранул Rab11 [32]);
- влияния УФ-излучения на кожу (деградация рецептора Fas при апоптозе, вызванном УФ-излучением [33]);
- роли рецепторов нейропептидов при псориазическом зуде [17, 34];
- участия опиоидных систем эпидермиса в возникновении зуда при атопическом дерматите [35].

В Российской Федерации исследования в области дерматологии с применением метода флуоресцентной конфокальной микроскопии носят индивидуальный характер.

Метод отражательной конфокальной микроскопии основан на различии индекса преломления света для каждой клеточной структуры и не требует предварительной подготовки препарата [4, 21].

Приборы, принцип работы которых основан на методе отражательной конфокальной микроскопии, отвечают основным требованиям диагностики: простота и удобство в использовании, ценовая доступность, быстрое получение результата. Ключевым моментом в изобретении прибора стало применение оптического волокна для передачи сигнала от источника лазера на исследуемую область и обратно к детектору сигнала. Внедрение оптического волокна позволило сделать оборудование более компактным и приспособленным к непосредственному контакту с поверхностью кожи, глаза или внутренних полостей организма. Поэтому конфокальные микроскопы нашли свое применение в дерматологии, офтальмологии и эндоскопии [36—40]. Поскольку оборудование является наукоемким и высокоспециализированным, в мире существует всего несколько фирм-производителей. Так, в офтальмологии практически монополистом является фирма NIDEK (Япония), производящая оборудование под торговой маркой ConfoScan [39]. Приборы ConfoScan позволяют неинвазивным методом в режиме реального времени изучать структуру тканей и сосудов глаза. Оборудование для эндоскопии производит фирма OptiScan. Широко известна линия ее оборудования под названием PENTAX [38].

В дерматологии используются так называемые *in vivo* конфокальные микроскопы, которые производит компания Lucid Inc. (товары под маркой VivaScore, США) и OptiScan (микроскопы The Stratum, Австралия) [36, 38]. Начиная с 1997 г. производитель уникально-

го медицинского оборудования для исследований кожи — фирма Lucid Inc. — значительно улучшила характеристики проникающей способности конфокальных микроскопов для исследований *in vivo* — от проникающей способности в 50—100 нм конфокального микроскопа VivaScope 1000 в 1997 г. до способности прибора последнего поколения VivaScope 2500 проникать в кожу на глубину 300—400 нм. Длина волны лазера в таких микроскопах составляет 1064 нм [36] (рис. 3).

Конфокальная микроскопия для исследований *in vivo* предоставляет ряд уникальных возможностей для диагностики различных заболеваний кожи (рис. 4).

Отражательная конфокальная микроскопия является прижизненным неинвазивным методом диагностики, позволяющим получить изображения эпидермиса и поверхностной части дермы с разрешением, приближенным к обычной световой микроскопии. Данный метод не требует сложных манипуляций при подготовке к работе. Ткани исследуются в физиологическом состоянии, что может быть особенно важным при оценке эффективности проводимой терапии. Толщина оптического среза составляет менее 5 нм, что позволяет с высокой четкостью изучать морфологию различных слоев кожи. Кроме наблюдений в пространстве можно также проводить наблюдения во времени (в динамике), это может быть существенным при анализе результатов выбранного вида терапии. Необходимо учитывать, что в отличие от изображения ткани и клеток, полученного при проведении гистологического исследования, изображение, полученное *in vivo* с помощью конфокального микроскопа, будет выглядеть иначе, поскольку сканируемые слои располагаются параллельно поверхности кожи. На экране монитора компьютера, на который передается информация с манипулятора, контактирующего с кожей, изображение будет черно-белым [10, 41—43]. Пример такого изображения приведен на рис. 5.

Отражательная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия позволяет проводить диагностику различных заболеваний кожи. В работе М. Ulrich и соавт. при сравнении диагностической эффективности метода отражательной конфокальной микроскопии и метода гистологических срезов у больных кератозами по трем параметрам (наличие паракератоза, архитектурной дезорганизации и полиморфизма кератиноцитов) было показано, что специфичность и чувствительность метода отражательной конфокальной микроскопии варьирует от 80 до 98,6%. Метод был рекомендован для осуществления неинвазивной диагностики, а также в качестве дополнительного инструмента при мониторинге эффективности терапии [43].

*In vivo* конфокальная лазерная сканирующая микроскопия позволяет, не нарушая кожного покрова,



Рис. 3. FluoView FV1000 микроскоп для флуоресцентной конфокальной микроскопии. Производство фирмы Olympus, Япония (фотография с официального сайта производителя)



Рис. 4. VivaScope 1500 микроскоп для отражательной микроскопии. Производство фирмы Lucid Inc., США (фотография с официального сайта производителя)

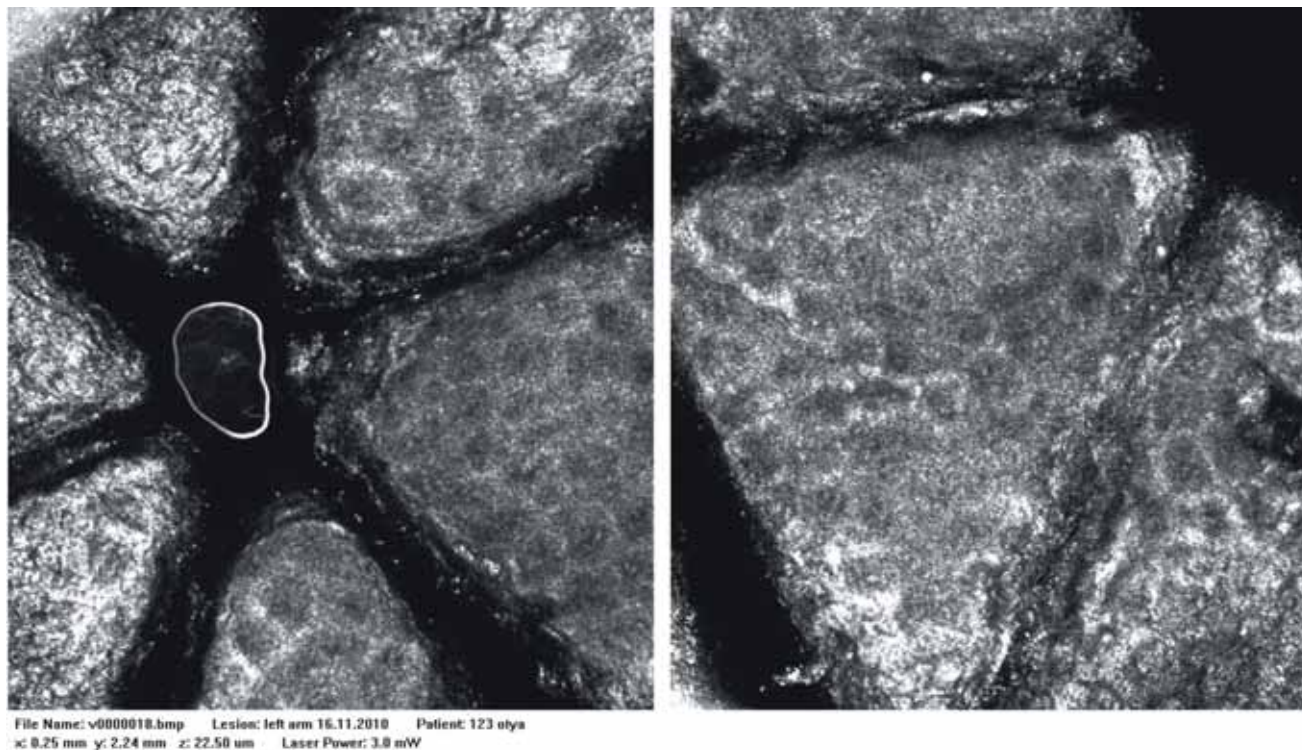


Рис. 5. *In vivo* конфокальное изображение фрагментов зернистого слоя здоровой кожи предплечья человека. Темные ядра клеток расположены в центре клеток, границы цитоплазмы яркие, имеют зернистую структуру (фотография выполнена на приборе VivaScope 1500 в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России)

оценивать размеры и ряд морфологических характеристик при диагностике опухолей кожи [44, 45]. При проведении I. Оно и соавт. трехмерного *in vivo* анализа структуры доброкачественных и злокачественных опухолей кожи в результате многократного послойного горизонтального сканирования с помощью отражательной конфокальной микроскопии были созданы 3D реконструкции опухолей и в режиме реального времени определены размер опухоли и глубина поражения [22].

*In vivo* конфокальные микроскопы применяются при диагностике грибковидного микоза. Известно, что грибковидный микоз представляет собой труднодиагностируемое на ранних стадиях заболевание. Для подтверждения диагноза часто требуется многократное гистологическое исследование. Однако при сравнении патологических изменений, выявленных у пациентов с грибковидным микозом гистологическим методом и методом отражательной конфокальной микроскопии, было установлено, что данные, полученные при помощи этих методов, демонстрировали высокую корреляцию между собой. Это указывает на возможность применения у данной группы пациентов конфокальной

микроскопии вместо трудоемкого гистологического исследования [12].

Обзор изученной современной научной литературы показал, что основными направлениями использования *in vivo* конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в дерматологии в настоящее время являются:

- изучение здоровой кожи [46—49];
- изучение воспалительных и инфекционных заболеваний кожи (псориаз, аллергический контактный дерматит, ирритантный контактный дерматит, онихомироз, дерматофитии) [50—54];
- изучение новообразований кожи (доброкачественные новообразования, базально-клеточная карцинома, меланома) [55—60].

Таким образом, как следует из приведенных данных научной литературы, методы флуоресцентной и отражательной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии являются современными высокотехнологичными методами исследования, применение которых в научно-исследовательских и диагностических целях, безусловно, расширит возможности современной отечественной дерматологии. ■

## Литература

1. Фефанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. Успехи биологической химии 2007; 47: 371—410. [Feofanov A.V. Spektral'naya lazernaya skaniruyushchaya konfokal'naya mikroskopiya v biologicheskikh issledovaniyakh. Uspekhi biologicheskoy khimii 2007; 47: 371—410.]
2. Amos W.B., White J.G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol Cell* 2003; 95(6): 335—42.
3. Halbhuger K.-J., Konig K. Modern Laser Scanning Microscopy in Biology, Biotechnology and Medicine. *Ann Anat* 2003; 185: 1—20.
4. Fink-Puches R., Hofmann-Wellenhof R., Smolle J., Kerl H. Confocal laser scanning microscopy: a new optical microscopic technique for applications in pathology and dermatology. *Cutaneous Pathology* 1995; 22: 252—259.
5. Semwogerere D., Weeks E.R. *Confocal Microscopy*. Atlanta, Georgia, U.S.A.: Emory University; 1997.
6. Scheynius A., Lundahl P. Three-dimensional visualization of human Langerhans' cells using confocal scanning laser microscopy. *Arch Dermatol Res* 1990; 281(8): 521—5.
7. Fink-Puches R., Hofmann-Wellenhof R., Smolle J., Kerl H. Confocal laser scanning microscopy: a new optical microscopic technique for applications in pathology and dermatology. *Cutaneous Pathology* 1995; 22: 252—259.
8. Kawana S., Segawa A. Confocal laser scanning microscopic and immunoelectron microscopic studies of the anatomical distribution of fibrillar IgA deposits in dermatitis herpetiformis. *Arch Dermatol* 1993; 129(4): 456—9.
9. Vaccaro M., Magaudda L., Cutroneo G. et al. Changes In The Distribution Of Laminin A1 Chain In Psoriatic Skin: Immunohistochemical Study Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Br J Dermatol* 2002; 146: 392—398.
10. Kaufman G., Horwitz B.A., Duek L. et al. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Medical Mycology: Official Publication Of The International Society For Human And Animal Mycology* 2007; 45 (2): 149—55.
11. Becker B.E., Gard D.L. Visualization of the cytoskeleton in *Xenopus* oocytes and eggs by confocal immunofluorescence microscopy. *Methods Mol Biol* 2006; 322: 69—86.
12. Agero A.L., Gill M., Ardigo M. et al. In vivo reflectance confocal microscopy of mycosis fungoides: a preliminary study. *J Amer Acad Dermatol* 2007; 57 (3): 435—41.
13. Santoro L., Nolano M., Faraso S. et al. Perioral skin biopsy to study skeletal muscle protein expression. *Muscle Nerve* 2010; 41(3): 392—8.
14. Roediger B., Ng L.G., Smith A.L. et al. Visualizing dendritic cell migration within the skin. *Histochem Cell Biol* 2008; 130(6): 1131—46.
15. Johansson L., Thulin P., Sendi P. et al. Cathelicidin LL-37 in severe *Streptococcus pyogenes* soft tissue infections in humans. *Infect And Immun* 2008; 76 (8).
16. Ishida-Yamamoto A., Simon M. Epidermal Lamellar Granules Transport Different Cargoes as Distinct Aggregates. *J Invest Dermatol* 2004; 122(5): 1137—44.
17. Chang S-E., Han S-S., Jung H-J., and Choi J-H. Neuropeptides and their receptors in psoriatic skin in relation to pruritus. *Br J Dermatol* 2007; 156(6): 1272—1277.
18. Minsky M., *Microscopy Apparatus*, US Pat. 3,013,467, 1961.
19. Minsky M., *Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscopy*, *Scanning* 1988; 10: 4: 128—138.
20. Claxton N.S., Fellers T.J., Davidson M.W. *Laser Scanning Confocal Microscopy* <http://www.olympusconfocal.com/theory/>.
21. Потекаев Н.Н., Ткаченко С.Б., Овчинникова А.Ю., Лукашева Н.Н. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия на примере Vivascope 1500: принцип работы и возможности применения в дерматологии. Российский медицинский форум 2008; 2: 38—44. [Potekaev N.N., Tkachenko S.B., Ovchinnikova A.Yu., Lukasheva N.N. Konfokal'naya lazernaya skaniruyushchaya mikroskopiya na primere Vivascope 1500: printsip raboty i vozmozhnosti primeneniya v dermatologii. Rossiyskiy meditsinskiy forum 2008; 2: 38—44.]
22. Ono I., Sakemoto A., Ogino J. et al. The real-time, three-dimensional analyses of benign and malignant skin tumors by confocal laser scanning microscopy. *J Dermatol Science* 2006; 43 (2): 135—141.
23. Branzan A.L., Landthaler M., Szeimies R-M. In vivo confocal scanning laser microscopy in dermatology. *Lasers Med Sci* 2007; 22(2): 73—82.
24. Wertheim M.S., Mathers W.D., Suhler E.B. et al. Histopathological features of conjunctival sarcoid nodules using noninvasive in vivo confocal microscopy. *Arch Ophthalmol* 2005; 123: 274—276.
25. Suihko C., Serup J. Fluorescence confocal laser scanning microscopy for in vivo imaging of epidermal reactions to two experimental irritants. *Skin Res Technol* 2008; 14(4): 498—503.
26. Halder G., Paddock S.W. Presentation of confocal images. *Methods Mol Biol* 1999; 122: 373—384.
27. Transidico P., Bianchi M., Capra M. et al. From cells to tissues: fluorescence confocal microscopy in the study of histological samples. *Microsc Res Tech* 2004; 64(2): 89—95.
28. Toti P., Pellegrino M., Villanova M. et al. Altered Expression Of The  $\alpha 2$  Laminin Chain In Psoriatic Skin: The Effect Of Treatment With Cyclosporine. *British Journal of Dermatology* 1998; 139: 375—379.
29. Mondello M.R., Magaudda L., Pergolizzi S. et al. Behaviour of laminin 1 and type IV collagen in uninvolved psoriatic skin. *Immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy*. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 527—531.
30. Hampton P.J., Ross O.K. and Reynolds N.J. Increased nuclear  $\beta$ -catenin in suprabasal involved psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* 2007; 157: 1168—1177.
31. Sakai K., Akiyama M., Sugiyama-Nakagiri Y. et al. Localization of ABCA12 from Golgi apparatus to lamellar granules in human upper epidermal keratinocytes. *Blackwell Munksgaard, Experim Dermatol* 2007; 16: 920—926.
32. Ishida-Yamamoto A., Kishibe M., Takahashi H., Iizuka H. Rab11 is associated with epidermal lamellar granules. *J Invest Dermatol* 2007; 127(9): 2166—2170.
33. Bang B., Gniadecki R., Larsen J.K. et al. In vivo UVB irradiation induces clustering of Fas (CD95) on human epidermal cells. *Exp Dermatol* 2003; 12(6): 791—798.
34. Chang S-E., Han S-S., Jung H-J., Choi J-H. Neuropeptides and their receptors in psoriatic skin in relation to pruritus. *Br J Dermatol* 2007; 156: 1272—1277.
35. Tominaga M., Ogawa H., Takamori K. Possible roles of epidermal opioid systems in pruritus of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007; 127(9): 2228—2235.
36. Данные официального сайта фирмы «Lucid Inc.». [Dannye ofitsial'nogo sayta firmy «Lucid Inc.».]
37. Chikama T., Takahashi N., Wakuta M., Nishida T. Noninvasive direct detection of ocular mucositis by in vivo confocal microscopy in patients treated with S-1. *Mol Vis* 2009; 15: 2896—2904.
38. Данные официального дистрибьютора фирмы Pentax (Япония) в России фирмы Дельрус <http://endotechnika.ru>. [Dannye ofitsial'nogo distrib'yutora firmy Pentax (Yaponiya) v Rossii firmy Del'rus <http://endotechnika.ru>.]
39. Аветисов С.Э., Егорова Г.Б. Возможности конфокальной микроскопии (Предварительное сообщение). *Рус мед журн* 2009. [Avetisov S.Ae., Egorova G.B. Possibilities of confocal microscopy (Preliminary report). *Russ med J* 2009.]
40. Leeson D.T., Lynn Meyers C., Subramanyan K. In vivo confocal fluorescence imaging of skin surface cellular morphology: a pilot study of its potential as a clinical tool in skin research. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28(1): 9—20.

41. Кузьмина Т.С., Варданян К.Л., Василевская Е.А. и др. Сравнительная оценка световой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии как методов для изучения морфофункционального состояния кожи. *Клин дерматол и венерол* 2009; 1: 23—27. [Kuz'mina T.S., Vardanian K.L., Vasilevskaia E.A. et al. Comparative evaluation of light and confocal microscopy as methods for the study of morphofunctional skin conditions. *Clin Dermatol and Venerol* 2009; 1: 23—27.]
42. Лукашева Н.Н., Ткаченко С.Б., Потекаев Н.Н. и др. Прижизненная отражательная конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: история создания, принцип работы, возможности применения в дерматологии. *Клиническая дерматология и венерология* 2008; 5: 10—15. [Lukasheva N.N., Tkachenko S.B., Potekaev N.N. et al. Lifetime-period reflecting confocal laser scan microscopy: the history of foundation, the principle of functioning, possibilities of using in dermatology *Clin Dermatol and Venerol* 2008; 5: 10—15.]
43. Ulrich M., Maltusch A., Rius-Diaz F. et al. Clinical applicability of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnosis of actinic keratoses. *Dermatologic Surgery: Official Publication For American Society For Dermatologic Surgery* 2008; 34 (5): 610—9.
44. Gerger A., Koller S., Weger W. et al. Sensitivity and specificity of confocal laser-scanning microscopy for in vivo diagnosis of malignant skin tumors. *Cancer* 2006; 107 (1): 193—200.
45. Gerger A., Hofmann-Wellenhof R., Langsenlehner U. et al. In vivo confocal laser scanning microscopy of melanocytic skin tumours: diagnostic applicability using unselected tumour images. *Br J Dermatol* 2008; 158 (2): 329—333.
46. Huzaira M., Rius F., Rajadhyaksha M. et al. Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 864—852.
47. Sauermann K., Clemann S., Jaspers S. et al. Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res Technol* 2002; 8: 52—56.
48. Swindle L.D., Thomas S.G., Freeman M., Delaney P.M. View of normal human skin in vivo as observed using fluorescent fiber-optic confocal microscopic imaging. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 706—712.
49. Gambichler T., Sauermann K., Altintas M.A. et al. Effects of repeated sunbed exposures on the human skin. In vivo measurements with confocal microscopy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004; 20: 27—32.
50. Hongcharu W., Dwyer P., Gonzalez S., Anderson R.R. Confirmation of onychomycosis by in vivo confocal microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 214—216.
51. Hicks S.P., Swindells K.J., Middelkamp-Hup M.A. et al. Confocal histopathology of irritant contact dermatitis in vivo and the impact of skin color (black vs white). *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 727—734.
52. Curiel-Lewandrowski C., Williams C.M., Swindells K.J. et al. Use of in vivo confocal microscopy in malignant melanoma: an aid in diagnosis and assessment of surgical and nonsurgical therapeutic approaches. *Arch Dermatol* 2004; 140: 1127—1132.
53. Astner S., Burnett N., Rius-Diaz F. et al. Irritant contact dermatitis induced by a common household irritant: a noninvasive evaluation of ethnic variability in skin response. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54: 458—465.
54. Astner S., Gonzalez E., Cheung A.C. et al. Noninvasive evaluation of the kinetics of allergic and irritant contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 351—359.
55. Gerger A., Horn M., Koller S. et al. Confocal examination of untreated fresh specimens from basal cell carcinoma: implications for microscopically guided surgery. *Arch Dermatol* 2005; 141: 1269—1274.
56. Agero A.L., Busam K.J., Benvenuto-Andrade C. et al. Reflectance confocal microscopy of pigmented basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54: 638—643.
57. Menzies S.W. Cutaneous melanoma: making a clinical diagnosis, present and future. *Dermatol Ther* 2006; 19: 32—39.
58. Pellacani G., Cesinaro A.M., Seidenari S. Reflectance-mode confocal microscopy of pigmented skin lesions — Improvement in melanoma diagnostic specificity. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 979—985.
59. Gerger A., Koller S., Weger W., Richtig E., Kerl H., Samonigg H., Krippel P., Smolle J. Sensitivity and specificity of confocal laser-scanning microscopy for in vivo diagnosis of malignant skin tumors. *Cancer* 2006; 107: 193—200.
60. Tachihara R., Choi C., Langley R.G. et al. In vivo confocal imaging of pigmented eccrine poroma. *Dermatology* 2002; 204: 185—189.

#### об авторах:

И.А. Волков — к.б.н., научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Н.В. Фриго — д.м.н., главный научный сотрудник, и. о. зав. отделом лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Л.Ф. Знаменская — к.м.н., зав. отделом дерматологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

О.Р. Катунина — к.м.н., доцент, зав. лабораторией патоморфологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье