

УДК 57.086.2; 57.085.23

А. О. Дурнова, Ю. С. Крылова, Л. Н. Пантелеев, С. Ф. Мусихин

КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ — ПРИМЕНЕНИЕ В ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Ключевые слова: лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, иммуногистохимия, патоморфология, диагностика опухолей.

Keywords: laser scanning confocal microscopy, immunohistochemistry, pathomorphology, cancer diagnosis.

*Использование методов флуоресцентной и отражательной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) в патоморфологии позволяет получать данные на новом уровне: изображения более контрастные и с большим разрешением, с помощью флуоресцентных меток можно выявить локализацию определенных белковых молекул и извлечь больше информации от одного образца при применении многоцветного окрашивания. Применяя КЛСМ, можно исследовать нефиксированные и минимально окрашенные образцы, что облегчит экспресс-диагностику. Также широко применение находят *in vivo* конфокальные микроскопы. В данной статье описаны основные способы использования КЛСМ в патоморфологии.*

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) [1–3] является оптическим методом получения изображения, идея которого была выдвинута Марвином Мински в 1957 г. Основное развитие метод получил в связи с разработкой компьютеров и особое применение нашел в различных областях медицины и техники. Конфокальная микроскопия позволяет получать изображения с высоким разрешением [X , Y (латеральное): 200 нм и Z (аксиальное): 500 нм]. Особенностью метода является наличие точечной диафрагмы в плоскости изображения, которая пропускает только флуоресценцию из фокальной области, отсекая любую другую флуоресценцию и рассеянный свет. В эндоскопических КЛСМ роль точечной диафрагмы выполняет торец оптического волокна, через которое собирают флуоресценцию [6, 7]. Исходная КЛСМ получила дальнейшее развитие [2, 3], когда появилась микроскопия с разрешением по спектру флуоресцен-

ции, с временным разрешением затухания флуоресценции, конфокальная рамановская спектроскопия и микроскопия с использованием нелинейно-оптических эффектов, и в частности, многофотонной флуоресценции. В последнем случае конфокальная диафрагма не применяется, поскольку возбуждение происходит только в фокальной области. Принципы конфокальной микроскопии используют также для детектирования единичных молекул.

В лазерном сканирующем конфокальном микроскопе изображение формируется последовательно, точка за точкой, путем сканирования заданной области в заданной плоскости. Яркость флуоресценции регистрируется в каждой точке образца и затем сохраняется в цифровой базе данных в виде пикселей различной яркости, которые формируют изображение, и в результате создается оптический срез. После записи всех пикселей данного оптического среза объектив фокусируется на следующую оптическую плоскость, и процесс повторяется. В результате создается набор «объемных» пикселей (вокселей), в котором в дальнейшем можно рассматривать отдельные оптические срезы, а также, складывая пиксели из разных срезов, получать и рассматривать под разными углами оптические проекции, в которых вся флуоресценция выбранного объема образца собирается из фокальной области. Все полученные результаты анализируются с использованием программного обеспечения. В результате анализа исследователь получает как плоскостное, так и объемное трехмерное изображение по осям x , y , z на экране монитора компьютера. Современное программное обеспечение позволяет обрабатывать полученные изображения, проводить измерения различных величин, исследовать взаиморасположение, отслеживать процессы во времени [1].

В патоморфологических исследованиях применяются два вида КЛСМ — отражательная и флуоресцентная. Отражательная конфокальная микроскопия основана на естественных различиях показателей преломления субклеточных структур в тканях. Флуоресцентная конфокальная микроскопия основана на использовании флуорохромов — эндогенных красителей — для увеличения контраста эпителий — строма, что позволяет визуализировать ткани на клеточном уровне.

Метод флуоресцентной конфокальной микроскопии основан на детектировании сигнала, исходящего от возбужденного лазером флуоресцентного красителя. Флуоресцентный краситель поглощает свет одной длины волны λ_1 (один цвет) и спустя некоторое время (от наносекунд до микросекунд) испускает свет другой длины волны λ_2 (другой цвет), $\lambda_1 < \lambda_2$ (испускаемый свет ближе к красному цвету, чем поглощаемый свет), что позволяет визуализировать распределение такого красителя с высоким уровнем контраста.

Необходимость применения флуоресцентных красителей для визуализации разных структур тканей и клеток обусловлена тем, что сам по себе биологический материал, как правило, флуоресцирует крайне слабо.

Метод отражательной конфокальной микроскопии основан на различии индекса преломления света и не требует предварительной подготовки препарата [5]. На основе этого метода работает множество эндоскопов или так называемых *in vivo* конфокальных микроскопов.

В статье D. Robertson и соавт. [8] показано, что метод окраски флуоресцентными красителями парафиновых срезов является информативным для многих видов тканей (почки, молочная железа), также можно использовать тканевые матрицы. Установлено, что окрашенные срезы могут короткое время храниться при $+4^\circ\text{C}$ и длительное время при -20°C , не теряя качества. Для патоморфологов этот метод может стать большим подспорьем в работе, специалист сможет с помощью многоцветного мечения охарактеризовать отдельную клеточную популяцию или исследовать множество белков на ограниченном материале.

Для исследования образцов с помощью КЛСМ обычно используют криосрезы, однако в последнее время распространение получил метод окрашивания фиксированных в формалине и залитых в парафин тканей. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с обычной иммуногистохимией. Так, можно получать изображения локализации антигенов с более высоким разрешением (высокого качества) и одновременно выявлять несколько антигенов на одном образце.

В настоящее время для постановки диагноза в патоморфологической лаборатории «золотым стандартом» является окрашивание клеток четырьмя различными антителами. Это потребует четырех

отдельных стекол, что затратно по расходным материалам и времени окрашивания. Также проблематично изготовление серии срезов, если образец очень мал. В настоящее время обычно берут маленькие диагностические образцы (биопсии), чтобы причинить меньшее неудобство пациенту. Поэтому применение КЛСМ для патоморфологической диагностики весьма перспективно.

Еще одним направлением для использования КЛСМ является патогистологическое исследование тканей, полученных в ходе операции (интраоперационно). M. Ragazzi и соавт. [9] показали применение КЛСМ для экспресс-анализа хирургических образцов. Так, в качестве объектов ими были выбраны биопсии молочной железы, лимфатических узлов, щитовидной железы и толстой кишки. Препараты не требовали предварительной подготовки, максимальные размеры образцов $1,2 \times 1,2 \times 0,3$ см. Ткани докрасивали погружением в акридиновый оранжевый на 20 с. В результате опухолевые ткани были легко отличимы от обычных структур и реактивных процессов, например фиброза. Использование флуоресцентных красителей усиливает контрастность и улучшает качество изображения конфокальной микроскопии без ущерба для гистологической оценки.

КЛСМ является точным методом и не уступает классической гистологии, а в некоторых случаях имеет ряд преимуществ. КЛСМ лишена артефактов, связанных с замораживанием интраоперационного материала, которые могут поставить под угрозу правильность интраоперационного диагноза.

КЛСМ имеет и некоторые ограничения, в основном связанные с черно-белым изображением, что требует определенной подготовки специалиста для правильной интерпретации изображений. Возможность получения надежного гистопатологического диагноза в течение короткого времени представляет собой важное клиническое преимущество особенно для хирургической онкологии.

Свое место КЛСМ нашла и при проведении судебно-медицинских экспертиз, связанных с диагностикой смерти в результате наркотической интоксикации. При внутривенном введении наркотических средств, содержащих инородные частицы (ИЧ), данные вещества адсорбируются на эндотелии сосудов и в тканях внутренних органов. Как правило, обнаруживаемые ИЧ бывают единичными, мелкими, что значительно затрудняет их нахождение среди содержимого сосудов: плазмы, фибрина, микротромбов, форменных элементов крови. Все это послужило предпосылками для использования КЛСМ в целях выявления ИЧ в тканях [10].

В исследовании D. N. Krag и соавт. [11] показано, что КЛСМ для обнаружения единичных опухолевых клеток в костном мозге при раке молочной железы (РМЖ) более информативна по сравнению с обычной иммуногистохимией. Исследование аспирата костного мозга проводится для выявления

метастазирования РМЖ ранней и потенциально излечимой стадии и позволяет предсказывать выживаемость. Многоцветное окрашивание с антителами к цитokerатину позволяет снизить процент ложно-положительных результатов, что повышает качество патоморфологических заключений.

Конфокальная лазерная микроскопия в сочетании с окрашиванием квантовыми точками (КТ) дала новые возможности исследователям и врачам [12]. КТ обладают свойствами, дающими им преимущества перед органическими флуорофорами. Они устойчивы к фотообесцвечиванию, не выгорают в течение длительного времени (годы), что позволяет хранить образцы и передавать их в другие лаборатории для экспертизы. Благодаря малым размерам КТ легко проникают в ткани при окрашивании на большую глубину; могут быть конъюгированы с широким спектром биологических молекул, в том числе с белками, антителами, нуклеиновыми кислотами [13]. КТ могут применяться для картирования молекулярной гетерогенности биопсийных образцов опухолей, с помощью определенного набора антител против ассоциированных с раком белков можно в пределах одного образца выявлять гетерогенные участки, в том числе по чувствительности к лекарствам, а также зоны структурных изменений, характерные для перехода здоровой ткани в злокачественную [14].

Перспективно использование КЛСМ в эндоскопической диагностике благодаря минимальной инвазивности, позволяющей в естественных условиях получать конфокальные изображения клеток и тканевых структур как на поверхности, так и в глубоких слоях тканей [15, 16]. КЛСМ также активно используется в научных исследованиях, а в последнее время нашла применение в практической патогистологии.

Конфокальная лазерная эндомикроскопия (КЛЭ) является интеграцией конфокальной микроскопии в эндоскопию [17]. Системы, предназначенные для исследования в естественных условиях, используют в качестве источника лазера с длиной возбуждения 488 нм. В портативном жестком зонде находятся компоненты конфокального микроскопа, в том числе механизм сканирования $x-y$. Изображение получают с полем зрения 475×475 мкм и разрешением в плоскости $x-y$ 0,7 мкм. Контроль глубины изображения от поверхности образца на глубину около 250 мкм зависит от интенсивности сигнала и оптических свойств ткани. Расстояние между последовательными конфокальными срезами составляет около 4 мкм с осевым разрешением 7 мкм.

В клинической эндоскопии конфокальная микроскопия используется для решения вопроса о необходимости взятия биопсии, определения зоны и глубины прицельной биопсии, что обеспечивает ранний скрининг заболевания, уменьшает потребность в патогистологическом анализе, а в случае

необходимости такового обеспечивает получение информативного материала. Также данные методики применяются для навигации биопсии [18], поскольку помогают определить оптимальное направление ввода биопсийных щипцов к патологически измененной зоне, выполнить архивирование изображения и в реальном времени сделать предварительное заключение о патоморфологии патологического очага. КЛЭ применяют при проведении эндоскопических исследований в гастроэнтерологии, гинекологии, офтальмологии, дерматологии, урологии и онкологии [19–23].

Использование КЛСМ *in vivo* для эндоскопии позволяет получить при микроскопии неокрашенной ткани изображение, дающее информацию, соотносимую с традиционным гистологическим исследованием биоптатов (окрашиванием гематоксилин-эозином).

Одним из недостатков флуоресцентной микроскопии является необходимость экзогенного введения контрастного вещества. Например, краситель флуоресцеин натрия безопасен для человека [24], спектрально согласован с лазером возбуждения 488 нм и дает сильный сигнал флуоресценции, тем не менее он неспецифически абсорбируется на всех клетках, что может привести к фоновому свечению во время диагностической визуализации. Люминесцентный предшественник 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК), который метаболизируется в флуоресцентное соединение протопорфирин IX, используют в качестве фотосенсибилизирующего агента для фотодинамической терапии (PDT) и флуоресцентной визуализации. Первое клиническое испытание 5-ALA было связано с лечением повреждения кожи с помощью PDT, и с тех пор соединение применяется как для лечения, так и для флуоресцентной диагностики (FD) широкого спектра заболеваний, в частности мочевого пузыря и рака ротовой полости [25, 26].

Фотосенсибилизатор гиперидин, который экстрагируют из растения, известного как зверобой (зверобой продырявленный), используется также для регистрации флуоресценции при диагностике рака мочевого пузыря [27]. Гиперидин и 5-ALA более избирательно поглощаются измененными клетками, следовательно, обладают большей специфичностью [28, 29].

Альтернативные методы, не требующие экзогенного контраста, используют методы автофлуоресценции, т. е. детекции экзогенных флуорофоров при стимуляции их светом. К основным эндогенным флуорофорам биологических тканей относятся флавины, протеины и порфирины. Каждый флуорофор имеет характерные спектры поглощения и эмиссии [30, 31]. При использовании монохроматического света с длиной волны 488 нм возникает свечение биологических субстанций, богатых НАДН, липо пигментами, а также коллагена и эластина [32].

В ряде работ продемонстрировано совместное использование методов автофлуоресценции и традиционной методики с эндогенными красителями для диагностики неопластических поражений [33].

Колоректальный рак

Колоректальный рак — наиболее распространенная форма злокачественных новообразований [34]. Впервые методы КЛЭ применили для визуализации неоплазии эпителия, выстилающего толстый кишечник. Сейчас КЛЭ применяют в клинической практике для рутинного скрининга, наблюдения и диагностики заболеваний [35–37]. Этот метод показал чувствительность 100 % и специфичность 84,6 % как при обнаружении неоплазии, так и при различии аденом и гиперпластических полипов [38].

Пищевод Барретта

Пищевод Барретта — это заболевание, при котором повреждается эпителий абдоминального сегмента пищевода, развивается метаплазия, что повышает риск развития аденокарциномы пищевода. Постоянное наблюдение является основной стратегией в лечении этого заболевания. КЛЭ в данном случае используется для определения различных эпителиальных слоев и дифференцировки специализированного цилиндрического эпителия пищевода от эпителия желудка. Метод может быть использован в сочетании с другими эндоскопическими методами, такими как световая и узкоспектральная эндоскопия. В источник света встроен оптический фильтр, выделяющий длины волн 415 и 540 нм, что соответствует длинам волн синего и зеленого света. Глубина проникновения синего света ограничена структурами слизистой оболочки, в то время как зеленый свет проникает до подслизистого слоя. Обе световые волны хорошо поглощаются гемоглобином, благодаря чему можно оценить структуру и капиллярный рисунок слизистой оболочки, а также сосуды подслизистого слоя [39]. Совместное использование этих методик для наблюдения и обнаружения пищевода Барретта позволяет точно определить наличие метаплазии, что исключает необходимость биопсий [40, 41].

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)

ВЗК — это группа хронических воспалительных заболеваний толстой кишки, куда входят болезнь Крона и язвенный колит. Язвенный колит связан с высоким риском колоректального рака, что требует ежегодного проведения колоноскопии и биопсии. Результатом комбинированного использования хромоэндоскопии с метиленовым синим [42, 43] и КЛЭ стала значительно более высокая степень

обнаружения интраэпителиальной неоплазии по сравнению со стандартной колоноскопией, опухолевые изменения были выявлены с чувствительностью 94,7 %, специфичностью 98,3 % и точностью 97,8 % [44, 45].

Рак желудка

Рак желудка является одной из ведущих причин онкологической смертности [46]. Некоторые воспалительные состояния, такие как атрофический гастрит и кишечная метаплазия, связаны с высоким риском развития рака желудка. Гастрит, обусловленный инфекцией *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), удваивает риск развития рака желудка. В последнее время КЛЭ используется и для выявления гиперпластических полипов желудка и желудочной интраэпителиальной неоплазии (GIN) [47]. Этот метод показал чувствительность 77,8 % и специфичность 81,8 % по сравнению с результатами патогистологии, а для выявления полной GIN от низкодифференцированной GIN — чувствительность 66,7 % и специфичность 88,0 %.

Области применения КЛЭ не ограничиваются приведенными, этот метод широко используется в дерматологии, офтальмологии и других дисциплинах.

Обобщая вышеизложенное, можно сделать вывод, что методы флуоресцентной и отражательной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии широко применяются в патоморфологических исследованиях и открывают новые возможности для диагностики и проведения исследований *in vivo*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №14-15-00324).

Литература

1. Штейн Г. И. Руководство по конфокальной микроскопии. СПб.: ИИЦ РАН, 2007. 77 с.
2. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* / Ed. J. B. Pawley. Springer, 2006. 988 p.
3. *Laser Scanning, Theory and Applications*. Ed. C.-C. Wang, InTech, 2011. 566 p.
4. Феофанов А. В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // Успехи биологической химии. 2007. Т.4. С. 371–410.
5. Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в биологии и медицине / И. А. Волков, Н. В. Фриго, Л. Ф. Знаменская, О. Р. Катгунина // Вестн. дерматологии и венерологии. 2014. № 1. С. 17–24.
6. Сайфитдинова А. Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. СПб., 2008.
7. *Confocal laser endomicroscopy: technical status and current indications* / A. Hoffman, M. Goetz, M. Vieth [et al.] // *Endoscopy*. 2006. Vol. 38. P. 1275–1283.
8. *Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue* / D. Robertson, K. Savage, J. S Reis-Filho and C. M Isacke // *BMC Cell Biology*. 2008. Vol. 9. P. 13.

9. **Fluorescence** confocal microscopy for Pathologists / M. Ragazzi, S. Piana, C. Longo [et al.] // *Modern Pathology* 2014. Vol. 27. P. 460–471.
10. An epidemic of illicit fentanyl deaths in Cook County, Illinois / J. S. Denton, E. R. Donoghue, J. McReynolds, M. B. Kallerkar // *J. Forens. Sci.* 2008. Vol. 53. N 2. P. 452–454.
11. **The detection** of isolated tumor cells in bone marrow comparing bright-field immunocytochemistry and multicolor immunofluorescence / D. N. Krag, R. Kusminsky, E. Manna [et al.] // *Ann. Surg. Oncol.* 2005. Vol. 12, N. 9. P. 753–760.
12. **Полупроводниковые** коллоидные наночастицы в биологии и медицине / С. Ф. Мусихин, О. А. Александрова, В. В. Лучинин [и др.] // *Биотехносфера*. 2012. № 5–6. С. 40–48.
13. **Quantum dots** light up pathology / E. Tholouli, E. Sweeney, E. Barrow [et al.] // *J. Pathol.* 2008. Vol. 216, N. 3. P. 275–285.
14. **True L. D., Gao X.** Quantum dots for molecular pathology: their time has arrived // *J. Mol. Diagn.* 2007. Vol. 9, N. 1. P. 7–11.
15. **Fiber-optic** fluorescence imaging / B. A. Flusberg, E. D. Cocker, W. Piyawattanametha [et al.] // *Nat. Methods*. 2005. Vol. 2. N 12. P. 941–950.
16. **Kiesslich R., Canto M. I.** Confocal laser endomicroscopy // *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 2009. Vol. 19. N 2. P. 261–272.
17. **Inoue S.** Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy // *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3-rd ed. / J. B. Pawley ed. New York: Springer Science + Business Media, 2006. P. 1–19.
18. **Towards** optical biopsies with an integrated fibered confocal fluorescence micro(scope) / Le Goualher, A. Perchant, M. Genet [et al.] // *Lecture Notes in Computer Science 3217(II) : 761(768)*, Springer (Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention), 2004.
19. **Dunbar K., Canto M.** Confocal endomicroscopy // *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008. Vol. 24. N 5. P. 631–637.
20. **Goetz M., Watson A., Kiesslich R.** Confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal diseases // *J. Biophotonics*. 2011. Vol. 4. N 7–8. P. 498–508.
21. **Near-infrared-excited** confocal Raman spectroscopy advances in vivo diagnosis of cervical precancer / S. Duraipandian, W. Zheng, J. Ng [et al.] // *Journal of Biomedical Optics*. 2013. Vol. 18, N 6. P. 1–7.
22. **In vivo** Confocal Microscopy Report after Lasik with Sequential Accelerated Corneal Collagen Cross-Linking Treatment Case / C. Mazzotta, A. Balestrazza, C. Traversia [et al.] // *Rep. Ophthalmol.* 2014. Vol. 5. P. 125–131.
23. **Gonzalez S., Gill M., Halpern A. C.** Reflectance confocal microscopy of cutaneous tumors. Informa UK Ltd. 2008. P. 275.
24. **The safety** of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract / M. B. Wallace, A. Meining, M. I. Canto [et al.] // *Aliment Pharmacol. Ther.* 2010. Vol. 31, N 5. P. 548–552.
25. **Kennedy J. C., Pottier R. H., Pross D. C.** Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: Basic principles and present clinical experience // *J. Photochem. Photobiol. B*. 1990. Vol. 6, N 1–2. P. 143–148.
26. **Fluorescence** imaging and spectroscopy of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX for the detection of neoplastic lesions in the oral cavity / A. Leunig, K. Rick, H. Stepp [et al.] // *Am. J. Surg.* 1996. Vol. 172, N 6. P. 674–677.
27. **D'Hallewin M. A., Bezdtnaya L., F. Guillemin.** Fluorescence detection of bladder cancer: A review // *Eur. Urol.* 2002. Vol. 42, N 5. P. 417–425.
28. **Endoscopic** image analysis of photosensitizer fluorescence as a promising noninvasive approach for pathological grading of bladder cancer in situ / J. C. Kah, W.K. Lau, P. H. Tan [et al.] // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, N 5. P. 054022.
29. **Clinical** application of fluorescence endoscopic imaging using hypericin for the diagnosis of human oral cavity lesions / P. S. Thong, M. Olivo, W. W. Chin [et al.] // *Br. J. Cancer*. 2009. Vol. 101, N 9. P. 1580–1584.
30. **Gabrecht T., Andrejevic-Blant S., Wagnières G.** Blue-violet excited autofluorescence spectroscopy and imaging of normal and cancerous human bronchial tissue after formalin fixation // *Photochem Photobiol.* 2007. Vol. 83, N 2. P. 450–458.
31. **Zellweger M.** Fluorescence spectroscopy of exogenous, exogenously — induced and endogenous fluorophores for the photodetection and photodynamic therapy of cancer. Lausanne, Fevrier. 2000.
32. **Toshima M., Ohtani Y., Ohtani O.** Three-dimensional architecture of elastin and collagen fiber networks in the human and rat lung // *Arch Histol. Cytol.* 2004. Vol. 67. N 31(40).
33. **A comparative** study of normal inspection, autofluorescence and 5-ALA-induced PPIX fluorescence for oral cancer diagnosis / C. S. Betz, H. Stepp, P. Janda [et al.] // *Int. J. Cancer*. 2002. Vol. 97, N 2. P. 245–252.
34. **Global** cancer statistics / A. Jemal, F. Bray, M. M. Center [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* 2011. Vol. 61, N 2. P. 69–90.
35. **Yeung T. M., Mortensen N. J.** Advances in endoscopic visualization of colorectal polyps // *Colorectal Dis.* 2011. Vol. 13, N 4. P. 352–359.
36. **Technology** insight: Confocal laser endoscopy for in vivo diagnosis of colorectal cancer / R. Kiesslich, M. Goetz, M. Vieth [et al.] // *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2007. Vol. 4, N 8. P. 480–490.
37. **Differentiation** of colonic polyps by confocal laser endomicroscopy / X. J. Xie, C. Q. Li, X. L. Zuo [et al.] // *Endoscopy*. 2011. Vol. 43, N 2. P. 87–93.
38. **In vivo** characterisation of superficial colorectal neoplastic lesions with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy in combination with video-mosaicing: A feasibility study to enhance routine endoscopy / G. D. De Palma, S. Staibano, S. Siciliano [et al.] // *Dig. Liver Dis.* 2010. Vol. 42, N 11. P. 791–797.
39. **Gono K.** An introduction to high-resolution endoscopy and narrowband imaging. In: Cohen J. (editor), *Advanced digestive endoscopy: comprehensive atlas of high resolution endoscopy and narrowband imaging*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. 2007. P. 9–22.
40. **Mannath J., Rangunath K.** Era of Barrett's surveillance: Does equipment matter? // *World J. Gastroenterol.* 2010. Vol. 16, N 37. P. 4640–4645.
41. **Endoscopic** evaluation and advanced imaging of Barrett's esophagus / K. K. Wang, N. Okoro, G. Prasad [et al.] // *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 2011. Vol. 21, N 1. P. 39–51.
42. **Ahmed T., Monti J., Lashner B.** Random versus targeted biopsies for colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease // *Gastroenterol. Hepatol. (NY)*. 2010. Vol. 6, N 7. P. 438–442.
43. **Efthymiou M., Taylor A. C., Kamm M. A.** Cancer surveillance strategies in ulcerative colitis: The need for modernization // *Inflamm. Bowel Dis.* 2011. Vol. 17, N 8. P. 1800–1813.
44. **Pilot** study of probebased confocal laser endomicroscopy during colonoscopic surveillance of patients with longstanding ulcerative colitis / F. J. van den Broek, J. A. van Es, S. van Eeden [et al.] // *Endoscopy*. 2011. Vol. 43, N 2. P. 116–122.
45. **Surveillance** colonoscopy in patients with inflammatory bowel disease: Comparison of random biopsy versus targeted biopsy protocols / U. Günther, D. Kusch, F. Heller [et al.] // *Int. J. Colorectal Dis.* 2011. Vol. 26, N 5. P. 667–672.

46. Global cancer statistics / A. Jernel, F. Bray, M. M. Center [et al.] // CA Cancer J. Clin. 2011. Vol. 61, N 2. P. 69–90.

47. Diagnostic value of confocal laser endomicroscopy for gastric superficial cancerous lesions / W.-B. Li, X.-L. Zuo, C.-Q. Li [et al.] // Gut. 2011. Vol. 60, N 3. P. 299–306.

УДК 504.064.3:574 (477.63/64)

И. С. Захаров, А. Н. Величко

Исследование токсичности вредных веществ, обусловленной термодиффузией в стратифицированной водной среде

Ключевые слова: термодиффузия, стратифицированная водная среда, антисептик, токсичность, инфузория.
Keywords: thermaldiffusion, stratified water environment, antiseptic, toxicity, ciliate.

Исследовано распространение токсиканта в среде с температурным градиентом, который создавался локальным нагревом участка кюветы со взвесью инфузорий. В нагретый слой вводили антисептические вещества $C_{29}H_{35}N_2O_4$ и $KMnO_4$ и наблюдали его распространение в условиях термодиффузии.

Стратифицированная среда состоит из слоев с различными плотностью, температурой, соленостью, вязкостью. Большинство природных водных сред представляет собой стратифицированную среду.

Кроме глобального кругооборота воды в океанах и озерах происходит много других процессов, связанных с циркуляцией и течениями. Течения переносят тепло и растворенные в воде вещества, которые очень важны для рыб и других представителей водной жизни. Океанские течения, которые берут свое начало в субтропических широтах, снабжают теплом широкие просторы Северной Атлантики и Тихого океана. Вертикальные течения поднимают прохладную воду и питательные вещества со дна океанов и озер к их поверхности.

При летней и зимней стратификации в озере располагаются два сравнительно стабильных массива воды с минимальным обменом воды между ними: поверхностный слой и донный слой, в котором не вырабатывается почти никаких питательных веществ из-за недостатка солнечного света. Эти зоны разделены термоклином — весьма стабильной

водной зоной, температура которой может различаться до 10 °С на протяжении нескольких метров в глубину. Такая летняя стратификация, или стагнация, воды может вызвать серьезную нехватку кислорода, особенно в высокопродуктивных озерах, которым требуется много кислорода для разложения органических веществ [1].

Из стратифицированной среды эти вещества диффундируют в другие слои и в таких случаях необходимо учитывать термодиффузию, которая уменьшает выделение вредных веществ во внешнюю среду. Типичным примером является опыт с нагревом воды с добавлением красителя, который не выходит из нее, но диффундирует в холодную [2]. Можно провести такой опыт для получения нескольких стратифицированных слоев. При этом изменяется и диффузия возможных токсикантов, что очень мало учитывается при контроле токсичности водных сред.

Целью исследования является создание модели стратифицированной среды с токсикантом, воздействующим на биологический тест-объект. Для этого необходимо выбрать тест-реакцию, которая реализует воздействие стратифицированной среды на тест-объект, биологический вид тест-объекта для контроля токсичности и метод контроля тест-реакции.

В качестве тест-объекта были применены инфузории *Paramecium caudatum*, которые характеризуются высокой чувствительностью к биоцидным веществам малыми размерами. Простота их культивации позволяет получить популяцию в несколь-