

میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال: مروری بر اصول و کاربردها در علوم زیستی و پزشکی بازساختی

فاطمه بهرامعلی^۱، حسین اسدی^۱، پگاه خسرویان دهکردی^۲، الهام صفاریه^۳، اکرم علیزاده^{۳*}

^۱ گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

^۲ مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

^۳ مرکز تحقیقات خونریزی های غیرطبیعی رحمی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

*نویسنده مسئول: گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. ایمیل: alizadehbio@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۰۱

چکیده

مقدمه: تصویربرداری و مطالعه بافت های زنده یا سه بعدی در علوم زیستی به ویژه پزشکی بازساختی و مهندسی بافت که به دنبال ساخت یک بافت سه بعدی و عملکردی جهت ترمیم یا جایگزینی بخش های آسیب دیده بدن هستند اهمیت زیادی دارد. از زمان تجاری سازی میکروسکوپ کانفوکال در اواخر دهه ۱۹۸۰، این میکروسکوپ به یکی از رایج ترین تکنیک های میکروسکوپی برای مطالعات ساختار سه بعدی سلول ها و بافت ها تبدیل شده است. انعطاف پذیری این رویکرد، کاربرد آن را در مطالعاتی از تصویربرداری سریع فرآیندها در سلول های زنده گرفته تا تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی بافت ها و هم مکان سازی الگوهای بیان پروتئین، امکان پذیر کرده است.

مواد و روش ها: در این مقاله مروری روایی مطالعات منتشر شده در پایگاه های داده PubMed، google scholar، Scopus و Web of Science از سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۲۵ مورد استفاده قرار گرفته است. معیارهای انتخاب شامل مطالعاتی بود که از میکروسکوپ کانفوکال در علوم زیستی استفاده کرده و مزایای استفاده از آن در علوم زیستی و پزشکی بازساختی را ارزیابی می کردند.

نتایج: میکروسکوپ هم کانون یا کانفوکال مزیت عمده ای نسبت به میکروسکوپ معمولی دارد زیرا نوری را که از صفحه کانونی نمی آید، را حذف می کند و امکان برش نوری و ساخت تصاویر سه بعدی را فراهم می کند. همچنین، وضوح محوری بالا، کیفیت تصویر واضح و تجزیه و تحلیل کمی تصویر مرتبط، اطلاعات ساختاری حیاتی را در برد متوسط برای تحقق کامل سه بعدی ریزساختار فراهم می کند. با توجه به این ویژگی، میکروسکوپ هم کانون علاوه بر کاربردهای متنوع در سایر علوم، در پزشکی بازساختی، در تجزیه و تحلیل دینامیک سلول، برهمکنش های سلولی در داربست ها و اندازه گیری خواص بافت ها، کاربردهای مهمی دارد و می تواند به بهبود فرآیندهای بازسازی و ترمیم بافت و پیشرفت در مهندسی بافت کمک کند.

نتیجه گیری: این مقاله به بررسی میکروسکوپ کانفوکال و مزایای استفاده از آن در علوم زیستی و پزشکی بازساختی می پردازد. در این مقاله، ما همچنین اصول میکروسکوپ کانفوکال را معرفی می کنیم و در مورد چگونگی تبدیل شدن این رویکرد به یک رویکرد اصلی در علوم زیستی بحث می کنیم.

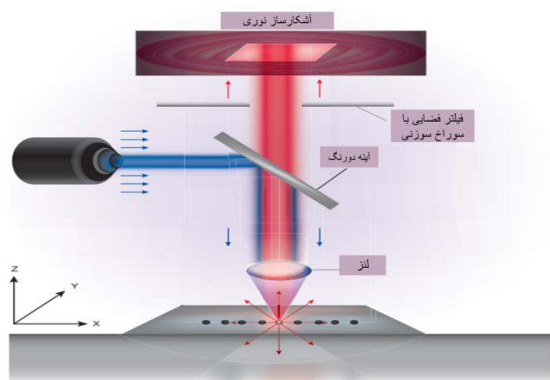
کلمات کلیدی: میکروسکوپی کانفوکال، ساختار سه بعدی، میکروسکوپی اسکن لیزری، علوم زیستی، پزشکی بازساختی

۱. مقدمه

دو بعدی از اعماق مختلف یک نمونه سه بعدی، این امکان وجود دارد با بازسازی عکس ها بتوان ساختارهای سه بعدی را بررسی کرد. این روش به طور گسترده در تحقیقات علمی می تواند مورد استفاده قرار گیرد و اساس کار میکروسکوپ هم کانون یا کانفوکال است. نور در میکروسکوپ معمولی تا آن جا که می تواند به داخل نمونه نفوذ کند عبور می کند، در حالی که یک میکروسکوپ هم کانونی فقط یکبار یک

در بسیاری از علوم زیستی به ویژه در پزشکی بازساختی و مهندسی بافت به عنوان یکی از بخش ها و زیرمجموعه های پزشکی بازساختی که به دنبال ترمیم یا ساخت جایگزینی بافت های بدن است، تصویربرداری و مطالعه بافت های زنده و یا سه بعدی اهمیت زیادی دارد (۱). چرا که در این علوم مطالعه سلول ها در ساختارهای بافتی یا داربست ها به عنوان یک ساختار سه بعدی مد نظر است. با گرفتن چندین عکس

در حالی که میکروسکوپ‌های کانفوکال در ابتدا فقط قادر به تصویربرداری یک یا دو رنگ با سرعت نسبتاً کم بودند، میکروسکوپ کانفوکال مدرن قادر به جمع‌آوری تصاویر چندطیفی با کیفیت بالا در محدوده قابل مشاهده است (۶) و هدف آن غلبه بر برخی از محدودیت‌های میکروسکوپ‌های فلورسانس دید وسیع معمولی است (۳). در یک میکروسکوپ کانفوکال، تابش و تشخیص روی یک نقطه محدود پراش در نمونه متمرکز می‌شوند، که تنها نقطه‌ای است که توسط آشکارساز در طول اسکن کانفوکال تصویر می‌شود. برای ایجاد یک تصویر کامل، نقطه باید روی نمونه جابه‌جا شود و داده‌ها نقطه به نقطه جمع‌آوری شوند (تصویر ۲). مزیت قابل توجه میکروسکوپ کانفوکال، برش نوری ارائه شده است که امکان بازسازی سه‌بعدی نمونه را از تصاویر با وضوح بالا فراهم می‌کند. انواع مختلفی از میکروسکوپ کانفوکال برای این منظور ساخته شده است که هر کدام مزایا و معایب متفاوتی دارند (۷).

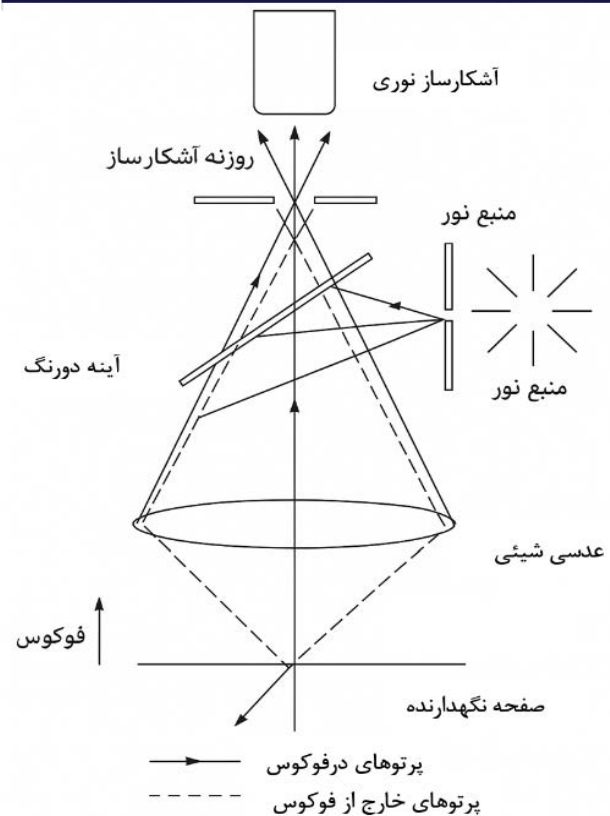


تصویر ۲. نمای ساده شده میکروسکوپ کانفوکال (۸)

اهمیت میکروسکوپ کانفوکال در علوم زیستی و پزشکی بازسازی به دلیل توانایی آن در پایش رفتار سلول‌های بنیادی، بررسی زیست‌سازگاری داربست‌ها، ارزیابی تمایز سلولی و مطالعه برهم‌کنش سلول میکرو محیط است که در یک ساختار سه‌بعدی اتفاق می‌افتد. به عنوان نمونه، در یک مطالعه اخیر، از تصویربرداری کانفوکال برای بررسی سه‌بعدی شدن ماتریکس کلاژنی تولید شده توسط سلول‌های بنیادی چربی استفاده شده است و مشخص گردید که داربست‌های ترکیب شده با ماتریکس خارج سلولی، توانایی بیشتری در تسهیل تولید کلاژن نسبت به دیگر شرایط کنترل دارند (۹). با این حال، محدودیت‌هایی فیزیکی همچنان بر استفاده مؤثر از این تکنولوژی در بافت‌های ضخیم تأثیر می‌گذارد، از جمله پراکندگی نور، جذب فوتون‌ها، عدم تطابق ضریب شکست اپتیکی و تضعیف سیگنال در عمق. برای مثال، یک مطالعه مروری جدید به چالش‌های نفوذ در عمق در

پرتوی نور کوچکتر را در یک سطح با عمق مشخص متمرکز می‌کند و به یک عمق تمرکز کنترل شده و بسیار محدود دست می‌یابد. سپس تصاویر حاصل بازسازی شده و کنار هم قرار می‌گیرد (۲).

میکروسکوپ هم‌کانون یا کانفوکال توسط ماروین مینسکی در سال ۱۹۵۵ اختراع شد (۳). اختراع مینسکی با متمرکز کردن یک نقطه نور به صورت متوالی در یک نمونه و سپس جمع‌آوری برخی از پرتوهای برگشتی، ساخت تصویر نقطه به نقطه را انجام می‌داد (تصویر ۱). مینسکی بیشتر نور پراکنده ناخواسته‌ای که بازتاب می‌شد و تصویر را مبهم می‌کرد، حذف کرد. همچنین نور برگشتی از نمونه از طریق دیافراگم کنترل شده و پرتوهایی که مستقیماً از نقطه کانونی نبودند را نیز حذف می‌کرد. سپس پرتوهای نوری «مطلوب» باقی‌مانده جمع‌آوری شده و تصویر به تدریج با استفاده از یک صفحه بازسازی می‌شد. در واقع برای ساخت تصویر، مینسکی نمونه را با حرکت دادن صحنه به جای پرتوهای نور اسکن کرد. این کار برای جلوگیری از چالش تلاش برای حفظ تراز حساس اپتیک متحرک بود. با استفاده از دریچه الکتریکی ۶۰ هرتز برای حرکت عمودی سکو و دریچه الکتریکی با فرکانس پایین برای حرکت در حالت افقی، مینسکی موفق شد نرخ فریم تقریباً یک تصویر را در هر ۱۰ ثانیه به دست آورد (۴).



تصویر ۱. مسیر نور در یک مرحله اسکن میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (۵)

تصویربرداری کانفوکال و تکفوتونی پرداخته است و نشان داده که با انتخاب طول موج‌های بلندتر (مثلاً در بازه نزدیک مادون قرمز) و استفاده از آشکارسازهای حساس، می‌توان عمق تصویربرداری را افزایش داد (۱۰).

۲. اهداف

هدف این مقاله مروری، بررسی پیشرفت‌ها، کاربردها، و محدودیت‌های میکروسکوپ کانفوکال در علوم زیستی و پزشکی بازساختی است، با تمرکز ویژه بر مطالعاتی که داده کمی در مورد نفوذ عمقی، کیفیت تصویر در عمق، و راهکارهای فنی برای غلبه بر چالش‌ها ارائه کرده‌اند. از این طریق، قصد داریم چشم‌اندازی برای پژوهش‌های آینده ارائه کنیم.

۳. کاربردهای میکروسکوپ کانفوکال در پزشکی

میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (CLSM) در بالین به‌عنوان ابزاری معرفی شده است که امکان مشاهده شبه بافت‌شناسی یک بافت معین را بدون انجام بیوپسی فراهم می‌کند. این رویکرد در بسیاری از زمینه‌های پزشکی عمده برای پوست و تجزیه و تحلیل سرطان‌های پوست برای هر دو روش *in vivo* و *ex vivo* CLSM استفاده شده است (۱۱).

CLSM در زمینه‌های مختلف پزشکی، مانند پوست، به‌عنوان یک تکنیک غیر تهاجمی برای تجسم لایه‌های مختلف پوست با وضوح بالا به کار گرفته شده است و به‌عنوان یک ابزار اضافی برای شناسایی سرطان‌های پوست معرفی شده است، اگرچه هیستوپاتولوژی استاندارد طلایی برای تشخیص تومورهای پوستی است (۱۲، ۱۳).

میکروسکوپ کانفوکال را می‌توان با دو حالت مختلف استفاده کرد: *in vivo* و *ex vivo*. اولین مورد برای اکتشاف *in vivo* بافت‌هایی است که می‌توان به‌طور مستقیم مانند چشم، پوست و مخاط یا به‌طور غیرمستقیم، از طریق اندومیکروسکوپی، مانند دستگاه گوارش و دستگاه ادراری تناسلی، برای ریه و در تصویربرداری تومور مغزی حین عمل، تشخیص با وضوح شبه بافت‌شناسی بدون بیوپسی به آن‌ها دست یافت (۱۴، ۱۵).

میکروسکوپ کانفوکال در مطالعات *ex vivo* کاربردهای بسیار مهمی دارد، چون امکان تصویربرداری با وضوح بالا

از بافت‌ها و نمونه‌های زنده یا تازه جدا شده را بدون نیاز به برش‌های بسیار نازک فراهم می‌کند (۱۱). میکروسکوپ کانفوکال امکان تصویربرداری نوری بخش به بخش (optical sectioning) نمونه‌های *ex vivo* را می‌دهد؛ با این روش می‌توان سه‌بعدی‌سازی سلول‌هایی که درون داربست رشد کرده‌اند را بدون نیاز به برش فیزیکی نمونه انجام داد (۱۶). که برای تصویربرداری با CLSM، آماده‌سازی شامل برش دقیق بافت، حفظ شرایط فیزیولوژیک (دما، اکسیژن، محیط مغذی)، نشانه‌گذاری با رنگ‌های فلورسانس، و کنترل شدت نور لیزر است. رعایت این اصول امکان تصویربرداری طولانی‌مدت و با حداقل آسیب به نمونه را فراهم می‌سازد (۱۷).

همچنین میکروسکوپ کانفوکال در طیف وسیعی از زمینه‌ها از جمله علوم زیست پزشکی، زیست‌شناسی سلولی، ژنتیک، میکروبیولوژی، مهندسی بافت، زیست‌شناسی رشد، طیف سنجی، علوم نانو (نانو تصویربرداری) و اپتیک کوانتومی استفاده می‌شود.

در علوم زیست‌پزشکی نیز، از آن در تجزیه و تحلیل عفونت‌های قریه چشم و آنالیز کمی و کیفی سلول‌های اندوتلیال قریه استفاده می‌شود. برای شناسایی وجود عناصر قارچی در استرومای قریه، در هنگام عفونت کراتومیکوزیس، یا تشخیص سریع و پاسخ درمانی سریع استفاده می‌شود (۱۸). همچنین در صنایع داروسازی و کنترل کیفیت و یکنواختی توزیع دارو استفاده می‌شود (۱۹).

هنگامی که یک میکروسکوپ فلورسانس کانفوکال به‌طور مناسب استفاده می‌شود، یک ابزار عالی برای انجام اندازه‌گیری‌های کمی در سلول‌ها و بافت‌ها است. توانایی میکروسکوپ کانفوکال برای مسدود کردن نور خارج از فوکوس و در نتیجه انجام برش نوری از طریق یک نمونه به محقق اجازه می‌دهد تا فلورسانس را با دقت فضایی بسیار بالا اندازه‌گیری کند. با این حال، تولید داده‌های معنی‌دار با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال نیاز به برنامه‌ریزی دقیق و درک کامل این تکنیک دارد (۲۰). این تکنیک امکان مشاهده و تحلیل ساختارهای میکروسکوپی با دقت بالا را فراهم می‌کند. با استفاده از لیزرهای فوتونی، CLSM نور را روی نمونه انداخته و سپس تصاویر با کیفیت فوق‌العاده بالا و عمق تا حدودی از نمونه را ثبت می‌کند. این تکنیک به تحلیل سلول‌ها، بافت‌ها و حتی مواد نانومتری کمک می‌کند و در تحقیقات بسیاری از زمینه‌های علوم زندگی و پزشکی کاربرد دارد (جدول ۱).

جدول ۱. تفاوت‌های میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ کانفوکال و چند فوتونی

ویژگی	میکروسکوپ نوری	میکروسکوپ چند فوتونی	میکروسکوپ کانفوکال
منبع نور	نور سفید یا نور مرئی	از لیزرهای پالسی فوق‌سریع فمتوثانیه‌ای مانند (Ti:Sapphire) با طول موج نزدیک به فروسرخ (NIR) استفاده می‌کند.	نور لیزر متمرکز
وضوح تصویر	محدود به پراکندگی نور، وضوح کمتر	وضوح جانبی و محوری مشابه کانفوکال است، اما در عمق‌های بیشتر کیفیت بهتری حفظ می‌شود.	وضوح بالا به دلیل حذف نور خارج از فوکوس
تصاویر سه‌بعدی	قادر به ارائه تصاویر دوبعدی است	به دلیل تمرکز تحریر در یک نقطه و جمع‌آوری سیگنال‌های عمقی، برای اسکن حجمی سه‌بعدی ایده‌آل است. تا صدها میکرومتر تا چند میلی‌متر در بافت نفوذ می‌کند.	امکان بازسازی تصاویر سه‌بعدی
کانونی بودن تصویر	تمام تصویر به‌طور هم‌زمان دیده می‌شود	تحریر فقط در نقطه فوکوس رخ می‌دهد، بنابراین به‌طور ذاتی برش نوری (optical sectioning) دارد و نیاز به پین‌هول مانند کانفوکال ندارد.	تصویر به‌صورت نقطه‌به‌نقطه اسکن می‌شود
فیلتر نور	ندارد یا ساده است	از فیلترهای دایکریک و باندپس برای جمع‌آوری فلورسانس استفاده می‌شود.	فیلترهای دقیق برای حذف نور پراکنده
کیفیت تصویر	معمولی، با نویز بالا به دلیل نور خارج از فوکوس	کیفیت به‌ویژه در نمونه‌های عمقی بالاست. نسبت سیگنال به نویز عالی	تصاویر شفاف و با کنتراست بالا
کاربرد	مشاهده عمومی سلول‌ها و بافت‌ها	تصویربرداری از بافت‌های زنده (in vivo imaging) علوم اعصاب (مشاهده نورون‌ها در مغز زنده) مهندسی بافت و پزشکی بازساختی	تحقیق‌های تخصصی مانند زیست‌شناسی مولکولی و مطالعه ساختارهای کوچک
هزینه و پیچیدگی	ارزان‌تر و ساده‌تر	بسیار پرهزینه و پیچیده.	گران‌تر و پیچیده‌تر
نیاز به رنگ آمیزی	معمولاً با رنگ آمیزی ساده استفاده می‌شود	اغلب نیاز به فلوروفور دارد	اغلب از رنگ‌های فلورسانس یا پروب‌های ویژه استفاده می‌شود
نمونه‌های زنده	محدودیت در مشاهده نمونه‌های زنده	به دلیل انرژی فوتون کمتر، فوتوتوکسیسیته و فوتوبلیچینگ کمتر از کانفوکال است. بنابراین برای نمونه‌های زنده (in vivo) و (in vitro) بسیار مناسب است.	امکان مشاهده نمونه‌های زنده با تکنیک‌های پیشرفته

۴. کاربردهای میکروسکوپ کانفوکال در نانو تکنولوژی

آنالیز کانفوکال (CLSM) برای مطالعه تعاملات نانوساختارها با سلول‌ها و بافت‌ها در سطح نانو به‌کار می‌رود. نانو داربست‌های سه‌بعدی با ایجاد ساختاری سه‌بعدی مشابه بافت‌های بدن، دیدگاه جدیدی در کشت سلول و ترمیم بافت ایجاد کرده‌اند (۲۱). در تحلیل ساختار منافذ سه‌بعدی داربست‌های نانو/میکرولیفی با استفاده از میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال پس از تجزیه و تحلیل سه معماری داربست مختلف تهیه شده با پارامترهای الکتروریسی مختلف، براساس غلظت‌های مختلف پلیمر استفاده از رویکرد CLSM به‌عنوان روشی آسان و قابل اعتماد برای مطالعه ساختار منافذ و اتصال داخلی داربست‌های فیبری پشتیبانی می‌کند (تصویر ۳).

آنالیز کانفوکال در تحقیقات مواد نانومتری و نانوبیوتکنولوژی دارای کاربردهای متنوعی است که به پیشرفت این حوزه‌ها کمک می‌کند: نظارت بر خواص نانومتریال‌ها: آنالیز کانفوکال امکان تصویربرداری با دقت بالا از ساختارهای نانومتری را فراهم می‌کند و به محققان این امکان را می‌دهد تا خواص مختلف نانومتریال‌ها را بررسی کنند. بررسی توزیع نانوذرات: این تکنیک به محققان اجازه می‌دهد تا توزیع و موقعیت نانوذرات در سطح مواد را با دقت بررسی کنند. تحلیل تعاملات نانوساختارها با سلول‌ها: در نانوبیوتکنولوژی،

Reflectance Confocal Microscopy (RCM) به دلیل غیرتهاجمی بودن، در ارزیابی ضایعات بدون نیاز به بیوپسی فیزیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تصاویر حاصل از RCM از نظر جزئیات ساختاری با یافته‌های هیستوپاتولوژیک مطابقت بالایی دارند (۱۱). محدودیت اصلی این روش، عمق نفوذ نسبتاً پایین (حدود ۲۰۰ - ۳۰۰ میکرومتر) است که مشاهده‌ی لایه‌های عمیق‌تر را دشوار می‌سازد.

۲.۵. قلب

در مطالعات قلبی، CLSM برای ارزیابی تغییرات ساختاری و مولکولی در سلول‌های میوکارد و ماتریکس خارج‌سلولی به کار می‌رود. این روش امکان مشاهده هم‌زمان پروتئین‌های کانال یونی و اجزای اسکلت سلولی را فراهم می‌کند (۲۴). از CLSM همچنین برای بررسی آرایش فیبری و بازسازی سه‌بعدی ساختارهای میوکارد استفاده می‌شود (۲۵). با این حال، ماهیت متراکم بافت قلب و ضخامت بالای آن مانع تصویربرداری عمیق می‌شود و نیاز به برش‌های نازک یا استفاده از روش‌های چندفوتونی وجود دارد.

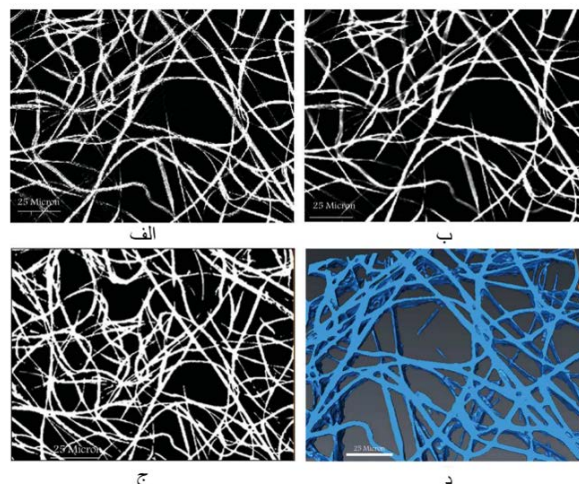
۳.۵. بافت‌های توموری

در پاتولوژی تومورها، CLSM و FCM کاربرد گسترده‌ای در ارزیابی سریع نمونه‌های جراحی و تعیین حاشیه‌های تومور دارند. این روش می‌تواند در زمان عمل جراحی به‌عنوان ابزار تشخیصی سریع (rapid on-site evaluation) به کار رود (۲۶). در برخی سرطان‌ها مانند پستان، پوست و حفره دهان، این روش دقت بالایی در تشخیص سلول‌های نوپلاستیک دارد (۲۷).

۴.۵. استخوان

در بافت‌های سخت مانند استخوان، CLSM برای بررسی ماتریکس استخوانی، فضاهای لاکونا و فرآیند بازسازی استخوانی پس از کاشت یا آسیب استفاده می‌شود. آماده‌سازی نمونه‌ها معمولاً شامل برش و رنگ‌آمیزی فلورسانت خاص است تا نفوذ نور و کیفیت تصویر افزایش یابد (۲۸).

میکروسکوپ کانفوکال به‌عنوان ابزاری قدرتمند در مطالعات زیستی و تشخیص بالینی، امکان مشاهده ساختارهای سلولی در حالت تقریباً زنده را فراهم ساخته است. استفاده از آن در طیف گسترده‌ای از بافت‌ها از پوست تا استخوان (جدول ۲)، نشان‌دهنده‌ی توانایی بالای این فناوری در تحلیل میکروساختارهای بافتی است.



تصویر ۳. تصاویر معمول CLSM از داربست‌های نانومیکروفایبر (الف) فیلتر شده با میانه سه‌بعدی (ب)، باینری شده (ج) و سه‌بعدی بازسازی شده با Avizo Fire (د). [شکل رنگی که در wileyonlinelibrary.com موجود است.] (۲۲)

تصویربرداری سه‌بعدی اجسام نانویی: بافت‌ها و سلول‌ها می‌توانند به‌صورت سه‌بعدی تحت تأثیر نانومتریال‌ها قرار گیرند، و آنالیز کانفوکال این امکان را فراهم می‌کند تا تصاویر سه‌بعدی دقیق از این تعاملات را به‌دست آورد. بررسی نانوساختارها در محیط‌های زنده: با استفاده از این تکنیک، محققان می‌توانند به‌طور زمان‌دار و زنده نانوساختارها را در محیط‌های زیستی بررسی کنند. برچسب‌گذاری فلورسانت نانوذرات: با استفاده از فلورسانت‌ها، می‌توان نانوذرات را به خوبی تشخیص داد و تحلیل کرد. این امر به محققان این امکان را می‌دهد تا تغییرات نانوساختارها را در طول زمان مشاهده کنند. از این رو، آنالیز کانفوکال در تحقیقات مواد نانومتری و نانوبیوتکنولوژی به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای بررسی و شناخت بهتر ویژگی‌ها و رفتارهای نانومتریال‌ها به کار می‌رود (۲۰).

۵. کاربردهای میکروسکوپ کانفوکال در بافت‌شناسی

۱.۵. پوست

کاربرد میکروسکوپ کانفوکال در پوست بیشتر در حوزه درمان‌پاتولوژی تشخیصی و پژوهشی است. این روش با ایجاد تصاویر با وضوح سلولی از اپیدرم و درم سطحی، امکان تشخیص زودهنگام ملانوما، کارسینوم سلول بازال و سایر ضایعات پوستی را فراهم می‌کند (۲۳). روش in vivo

جدول ۲. بررسی میکروسکوپ کانفوکال در بافت‌های مختلف

نوع بافت	نوع روش کانفوکال	کاربرد اصلی	مزایا	معایب	منبع
پوست	Reflectance Confocal Microscopy (RCM) – in vivo CLSM	تشخیص و مانیتورینگ ضایعات پوستی (ملانوما، کارسینوم)، ارزیابی التهاب و زخم‌ها	غیرتهاجمی، مشاهده مستقیم لایه‌های اپیدرم و درم، وضوح بالا	عمق نفوذ محدود (۲۰۰-۳۰۰ μm) تفسیر وابسته به تجربه اپراتور	(۲۳، ۱۱)
قلب	Fluorescence CLSM	بررسی آرایش میوفیبری، ساختار سلولی و مولکولی میوکارد، بازسازی سه‌بعدی بافت قلب	تفکیک بالا، هم‌مکانی پروتئین‌های سلولی، تحلیل تغییرات ساختاری	ضخامت و تراکم بالای بافت قلب، نیاز به برش‌های نازک یا clearing	(۲۵، ۲۴)
تومور	Ex vivo Fluorescence Confocal Microscopy (FCM)	ارزیابی حاشیه‌ی جراحی، تشخیص سریع سلول‌های نئوپلاستیک، کمک به پاتولوژی حین عمل	سرعت بالا، تشخیص زنده تومور، کاهش نیاز به رنگ‌آمیزی سنتی	استانداردسازی تفسیر تصاویر، عمق نفوذ محدود	(۲۷، ۲۶)
استخوان	Fluorescence CLSM	مطالعه ساختار ماتریکس استخوانی، بررسی بازسازی و معدنی‌سازی استخوان	وضوح زیرمیکرونی، مشاهده مستقیم لاکونا و کانال‌های استخوانی	نفوذ کم در بافت معدنی، نیاز به آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی خاص	(۲۸)

۶. کاربرد میکروسکوپ کانفوکال در پزشکی بازساختی و مهندسی بافت

مهندسی‌شده برای ساخت اندام‌های مصنوعی. این رشته بر توسعه و استفاده از درمان‌های جدید برای بهبود بافت‌ها و اندام‌ها و همچنین عملکردهای ترمیم از دست‌رفته به دلیل آسیب، نقص، بیماری یا پیری تمرکز دارد (۳۱). رویکردهای پزشکی بازساختی شامل تحریک فرآیندهای ترمیم پزشکی بدن، پیوند سلول‌های پیش‌ساز، سلول‌های بنیادی یا بافت‌های مهندسی‌شده و همچنین استفاده از سلول‌ها یا آگروم‌ها به عنوان حامل‌های سیتوکین‌ها، ژن‌ها یا سایر عوامل درمانی است (۳۲).

استفاده از میکروسکوپ کانفوکال در پزشکی بازساختی و مهندسی بافت مزایای بسیاری دارد و به پیشرفت‌های قابل توجهی در این حوزه کمک کرده است. میکروسکوپ کانفوکال با توانایی تصویربرداری دقیق و سه‌بعدی از ساختارهای زیستی، امکان مطالعه و تحلیل دقیق‌تر ساختارهای سلولی و ماتریکس خارج سلولی را فراهم می‌آورد. این تکنیک می‌تواند در شبیه‌سازی بافت‌ها و مطالعه دینامیک رفتار سلول‌ها در داربست‌های سه‌بعدی به کار گرفته شود. همچنین، میکروسکوپ کانفوکال به پژوهشگران این امکان را می‌دهد که تغییرات زمانی در سلول‌ها را با دقت بالا دنبال کنند، که این ویژگی در بررسی چگونگی تعامل سلول‌ها با داربست‌ها و نحوه تکثیر، تمایز، و مرگ سلولی اهمیت دارد (۳۳).

در زمینه مهندسی بافت، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که استفاده از این میکروسکوپ به پژوهشگران اجازه می‌دهد تا توزیع سلول‌ها و چگونگی اتصال آن‌ها به داربست را به‌طور دقیق مشاهده کنند. این قابلیت به پژوهشگران کمک

در دنیای امروز، بشر در معرض طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها و آسیب‌های بافتی است که برخی از آن‌ها با رویکردهای پزشکی کنونی قابل درمان نیستند. بافت‌های آسیب‌دیده درمان‌نشده شامل بخش‌های تخریب‌شده با از دست رفتن عملکرد می‌شوند که مکانیسم‌های ترمیم بدن قادر به بازسازی آن‌ها نیستند. بنابراین درمان این ضایعات مربوط به شاخه‌ای از علوم پزشکی به نام پزشکی بازساختی است. یکی از ابزارهای پزشکی بازساختی، پیوند ساختارهای بافت مانند یا بافت ساخته‌ها از طریق مهندسی بافت است. بنابراین مهندسی بافت از بخش‌های مهم و زیرمجموعه بزرگی در پزشکی بازساختی است (۲۹).

همچنین با توجه به محدودیت جدی در تعداد بافت‌های اهدایی، مهندسی بافت که یک علم چندرشته‌ای است و علوم پایه مانند علوم زیست مواد، زیست شناسی، ژنتیک و علوم پزشکی را برای دستیابی به محصولات کاربردی مبتنی بر مهندسی بافت و پزشکی بازساختی برای بازسازی یا جایگزینی بافت‌ها یا اندام‌های آسیب‌دیده یا بیمار ترکیب می‌کند، به دنبال کمک به بازسازی، نگهداری و ارتقای عملکرد بافت آسیب دیده است (۳۰).

مهندسی بافت و پزشکی بازساختی می‌توانند فرآیندها یا محصولات را برای بازسازی، ترمیم یا جایگزینی سلول‌ها، بافت‌ها یا اندام‌های آسیب‌دیده یا بیمار طراحی کنند، مانند تولید و استفاده از سلول‌های بنیادی درمانی و داربست‌های

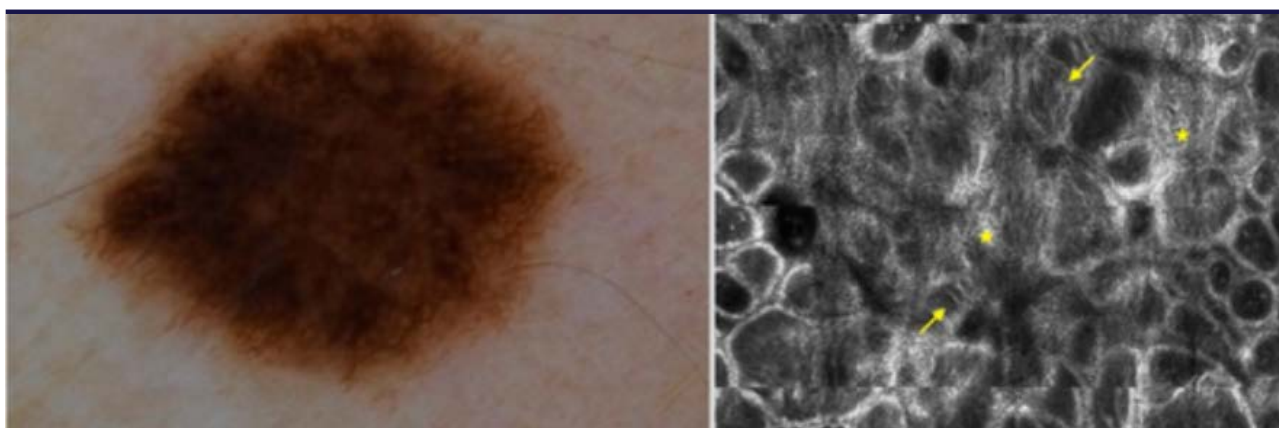
چندین بخش هم‌سطح در سراسر جسم ارائه می‌کند (۳۷). روح الله باقرزاده و همکارانش در سال ۲۰۱۲ تجزیه و تحلیل ساختار منافذ سه‌بعدی نانو/میکروالیاف داربست با استفاده از میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال را بررسی کردند که و رویکرد ارزیابی جامع مبتنی بر میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (CLSM) و تجزیه و تحلیل تصویر سه‌بعدی برای مطالعه ساختار منافذ و پارامترهای تخلخل داربست‌های نانو/میکروالیافی بود (۲۲).

میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال در بررسی بیماری‌های پوستی نیز کاربرد دارد (تصویر ۴) به این صورت که میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (CLSM) *in vivo* یک تکنیک تصویربرداری جدید است که خصوصیات مورفولوژیکی و غیرتهاجمی ساختارهای پوست را با وضوح بسیار نزدیک به میکروسکوپ نوری ارائه می‌کند. علاوه بر این، از آنجایی که امکان تصویربرداری مکرر از همان ناحیه پوست را در مقاطع زمانی مختلف فراهم می‌کند، روشی عالی برای نظارت بر روند بیماری، پاسخ به درمان یا محرک‌های خاص و مسیری برای مطالعه پدیده‌های پویا در زمان واقعی است (۳۸).

می‌کند تا مواد زیستی را از نظر سازگاری با سلول‌ها و پاسخ‌های التهابی بدن ارزیابی کنند. این ویژگی به‌خصوص در مواقعی که نیاز به بررسی رفتارهای درون سلولی و تنظیمات محیطی سلولی است، اهمیت دارد (۳۴).

امروزه، توسعه داربست‌های حاوی دارو برای کاربرد در مهندسی بافت، رویکردی جذاب است (۳۵). روش جدیدی برای تعیین کمیت فرآیندهای رهاسازی دارو در فرم‌های دوز رهش کنترل‌شده با استفاده از میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (CLSM) ابداع شده است که تغییر توزیع داخلی یک داروی نشانگر فلورسنت (مینوسیکلین HC۱) در یک گلوله رهش کنترل‌شده کروی که تحت رهاسازی دارو قرار می‌گیرد، با استفاده از CLSM دنبال شد، که به نقشه‌برداری داخلی دارو به صورت غیرتهاجمی و بدون آماده‌سازی نمونه قبلی اجازه می‌دهد (۳۶).

همچنین چندین مثال نشان داده شد، CLSM به تجسم ترکیب دیواره ذرات پلیمری و تشخیص توزیع ناهمگن پلیمر یا تغییرات در ترکیب ماتریکس پلیمری تحت تأثیر دارو اجازه داده است. علاوه بر این، CLSM روشی برای بازسازی سه‌بعدی و تجزیه و تحلیل تصویر ریزذرات با تصویربرداری



تصویر ۴. میکروسکوپ کانفوکال درون‌تنی که چندین سلول پانوتئید (ستاره‌های زرد) را در سطح اپیدرم و سلول‌های غیرمعمول را در محل اتصال درم-اپیدرم (فلش‌های زرد) نشان می‌دهد (۱۱).

کانفوکال توپوگرافی تخلخل داربست‌ها بررسی شد (۴۰). به‌طور کلی، می‌توان نتایج حاصل از کاربرد میکروسکوپ کانفوکال در مهندسی بافت را در چند مورد زیر خلاصه کرد: ۱. افزایش دقت در طراحی داربست‌ها: میکروسکوپ کانفوکال به پژوهشگران کمک کرده تا ساختار داربست‌ها را به دقت ارزیابی کنند و در نتیجه، داربست‌هایی با ساختار مناسب‌تر و سازگاری بیشتر با سلول‌ها طراحی کنند. این ابزار با ارائه تصاویر سه‌بعدی از داربست‌ها، امکان بررسی دقیق و بهینه‌سازی ساختار داربست‌ها را فراهم کرده است. ۲. درک بهتر از توزیع سلولی: با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال، پژوهشگران قادر به مشاهده و بررسی نحوه توزیع

در پژوهشی در سال ۲۰۰۹ استفاده از میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال برای ارزیابی تناسب بالقوه داربست‌های سه‌بعدی برای بازسازی بافت، با نظارت بر رسوب ماتریکس خارج سلولی و با اندازه‌گیری و اندازه‌گیری کمی بررسی کردند که از میکروسکوپ کانفوکال برای بررسی ارزیابی کیفی پتانسیل مدل‌سازی مجدد داربست استفاده شد و همچنین تعیین کمیت نفوذ و تکثیر فیبروبلاست‌های پوستی اولیه انسانی در داربست بازسازی پوست انجام شد (۳۹).

همچنین Gabor و همکاران در سال ۲۰۲۲ داربست‌های سرمایی برای تقویت استخوان: طراحی و شناسایی با SEM و میکروسکوپ کانفوکال را انجام دادند که توسط میکروسکوپ

microscopy) بر محدودیت پراش برای آشکار کردن جزئیات در مقیاس نانو غلبه می‌کند، اگرچه همچنان با پیچیدگی ابزار دقیق و الزامات اکتساب محدود است (۴۵). در مقابل، توموگرافی انسجام نوری (OCT)، تصویربرداری مقطعی غیرتهاجمی با عمق نفوذ بالینی عملی، اما با وضوح مکانی پایین‌تر از روش‌های با وضوح فوق‌العاده مبتنی بر فلورسانس ارائه می‌دهد (۴۶).

در حوزه کاربردهای پزشکی بازساختی، CLSM نقش مهمی در مطالعه یکپارچگی بایومترال‌ها، زیست‌سازگاری، ردیابی رشد عروقی (angiogenesis) و بازسازی بافت ایفا می‌کند (۹). تحقیقات اخیر نیز به ترکیب CLSM با روش‌های دیگر مانند میکروسکوپ چند فوتونی و تکنیک‌های پاک‌سازی نوری برای افزایش عمق نفوذ و بهبود کیفیت تصویربرداری پرداخته‌اند. در کنار این پیشرفت‌ها، توسعه نرم‌افزارهای تحلیل تصویر و بهره‌گیری از هوش مصنوعی می‌تواند دقت و بازدهی داده‌ها را افزایش دهد (۴۷). بنابراین، CLSM ابزاری کلیدی برای پیشبرد تحقیقات پایه‌ای در علوم زیستی و پزشکی بازساختی است. با این حال، برای انتقال گسترده‌تر آن به عرصه بالینی، رفع چالش‌های فنی و استانداردسازی پروتکل‌های تصویربرداری ضروری به‌نظر می‌رسد.

۱.۷. نتیجه‌گیری

میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال با فراهم کردن امکان تصویربرداری سه‌بعدی و بررسی دقیق تعاملات سلولی و ماتریس‌های زیستی، جایگاه ویژه‌ای در تحقیقات علوم زیستی و پزشکی بازساختی یافته است. این فناوری توانسته است در مطالعه سلول‌های بنیادی، بایومترال‌ها و فرآیندهای بازسازی بافت ارزشمند باشد.

با وجود محدودیت‌هایی همچون عمق نفوذ پایین و هزینه بالا، پیشرفت‌های اخیر در ترکیب CLSM با فناوری‌های دیگر و توسعه روش‌های تحلیل داده، افق‌های امیدبخشی برای کاربردهای بالینی این فناوری ترسیم می‌کند. در مجموع، CLSM ابزاری بنیادین در تحقیقات بازساختی محسوب می‌شود که با رفع چالش‌های موجود می‌تواند نقش پررنگ‌تری در علوم زیستی و پزشکی بازساختی ایفا کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی سمنان صمیمانه تشکر می‌کنیم.

مشارکت نویسندگان:

مطالعه و طراحی پژوهش: الف. الف؛ گردآوری داده‌ها: ف. ب. و

سلول‌ها در داربست‌های سه‌بعدی شده‌اند، که این امر به افزایش یکنواختی توزیع سلول‌ها در بافت‌های مصنوعی منجر شده و کیفیت و کارایی بافت‌های مهندسی شده را بهبود بخشیده است (۴۱).

۴. افزایش دقت در ارزیابی پاسخ‌های ایمنی و التهابی: از آنجایی که میکروسکوپ کانفوکال امکان مشاهده دقیق پاسخ‌های ایمنی بدن به داربست‌ها را فراهم می‌کند، پژوهشگران می‌توانند مواد زیستی مناسبی را انتخاب کنند که کمترین واکنش‌های التهابی را ایجاد کند و از نظر ایمنی برای استفاده در بدن انسان مناسب باشد (۴۲).

۵. ایجاد نقشه‌های دقیق ساختار بافت: توانایی میکروسکوپ کانفوکال در ایجاد تصاویر سه‌بعدی از بافت‌های مصنوعی، پژوهشگران را قادر به ایجاد نقشه‌های دقیق از ساختار و نحوه قرارگیری سلول‌ها کرده است. این نقشه‌ها در مراحل پیش‌بالینی و ارزیابی نهایی محصولات مهندسی بافت به کار گرفته می‌شوند و به بهبود کیفیت و دقت در بازسازی بافت‌ها کمک می‌کنند (۳۴).

۷. بحث

مطالعات نشان داده‌اند که میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (CLSM) به‌عنوان یک ابزار قدرتمند در علوم زیستی و پزشکی بازساختی، امکان تصویربرداری سه‌بعدی و با وضوح بالا از سلول‌ها و بافت‌ها را فراهم می‌کند. این قابلیت به‌ویژه در بررسی سلول‌های بنیادی، تکثیر، تمایز و تعامل آن‌ها با بایومترال‌ها اهمیت دارد (۹، ۴۳). از دیگر مزیت‌های این روش می‌توان به قابلیت تصویربرداری زنده (live-cell imaging) و بازسازی سه‌بعدی ساختارهای پیچیده اشاره کرد که امکان تحلیل دقیق‌تر رفتار سلولی و ریزمحیط را فراهم می‌سازد (۴۴).

با وجود این مزایا، CLSM محدودیت‌هایی نیز دارد. عمق نفوذ پایین، پدیده‌های photo bleaching و photo toxicity، نیاز به رنگ‌های فلورسانس و هزینه بالای تجهیزات از جمله چالش‌های اصلی این روش هستند (۴، ۵). این محدودیت‌ها باعث شده که بخش زیادی از مطالعات موجود به محیط‌های in vitro یا ex vivo محدود باشند و شواهد in vivo همچنان اندک باقی بماند (۴۳). همچنین در مقایسه با میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال مرسوم (CLSM)، میکروسکوپ چند فوتونی (multiphoton microscopy) نفوذ عمیق‌تری به بافت و آسیب نوری کمتری ارائه می‌دهد، درحالی که میکروسکوپ صفحه نوری (light-sheet microscopy) امکان تصویربرداری حجمی سریع با کاهش سفیدشدگی نوری را فراهم می‌کند، اما برای نمونه‌های شفاف مناسب‌تر است. میکروسکوپ با وضوح فوق‌العاده (super-resolution)

References

1. Appel AA, Anastasio MA, Larson JC, Brey EM. Imaging challenges in biomaterials and tissue engineering. *Biomaterials*. 2013;**34**(28):6615–30. [PubMed ID:23768903]. [PubMed Central ID:PMC3799904]. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.033>.
2. Conchello JA, Lichtman JW. Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*. 2005;**2**(12):920–31. [PubMed ID:16299477]. <https://doi.org/10.1038/nmeth815>.
3. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*. 2011;**10**(4):128–38. <https://doi.org/10.1002/sca.4950100403>.
4. Semwogerere D, Weeks ER. Confocal Microscopy. In: Rédei GP, editor. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. Heidelberg, Germany: Springer Science & Business Media; 2005. p. 408–.
5. Paddock SW, Eliceiri KW. Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques. *Methods Mol Biol*. 2014;**1075**:9–47. [PubMed ID:24052346]. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-847-8_2.
6. St Croix CM, Shand SH, Watkins SC. Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems. *Biotechniques*. 2005;**39**(6 Suppl):S2–5. [PubMed ID:20158500]. <https://doi.org/10.2144/000112089>.
7. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom*. 2020;**92**(1):e68. [PubMed ID:31876974]. [PubMed Central ID:PMC6961134]. <https://doi.org/10.1002/cpcy.68>.
8. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol*. 2012;**132**(12):e3. [PubMed ID:23187113]. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.429>.
9. Paganelli A, Tarentini E, Benassi L, Scelfo D, Pisciotto A, Rossi E, et al. Use of confocal microscopy imaging for in vitro assessment of adipose-derived mesenchymal stromal cells seeding on acellular dermal matrices: 3D reconstruction based on collagen autofluorescence. *Skin Res Technol*. 2022;**28**(1):133–41. [PubMed ID:34555218]. [PubMed Central ID:PMC9292443]. <https://doi.org/10.1111/srt.13103>.
10. Gigan S, Katz O, de Aguiar HB, Andresen ER, Aubry A, Bertolotti J, et al. Roadmap on wavefront shaping and deep imaging in complex media. *Journal of Physics: Photonics*. 2022;**4**(4). <https://doi.org/10.1088/2515-7647/ac76f9>.
11. Guida S, Arginelli F, Farnetani F, Ciardo S, Bertoni L, Manfredini M, et al. Clinical Applications of In Vivo and Ex Vivo Confocal Microscopy. *Applied Sciences*. 2021;**11**(5). <https://doi.org/10.3390/app11051979>.
12. Pellacani G, Scope A, Gonzalez S, Guitera P, Farnetani F, Malvehy J, et al. Reflectance confocal microscopy made easy: The 4 must-know key features for the diagnosis of melanoma and nonmelanoma skin cancers. *J Am Acad Dermatol*. 2019;**81**(2):520–6. [PubMed ID:30954581]. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.03.085>.
13. Yelamos O, Manubens E, Jain M, Chavez-Bourgeois M, Pulijal SV, Dusza SW, et al. Improvement of diagnostic confidence and management of equivocal skin lesions

ح. الف؛ تحلیل و تفسیر داده‌ها: الف. الف، ف. ب. و. ح. الف؛ نگارش اولیه مقاله: ف. ب.؛ بازبینی انتقادی مقاله از نظر محتوای علمی و فکری: الف. الف؛ انجام تحلیل‌های آماری: الف. الف؛ تأمین حمایت‌های اداری، فنی و مادی: الف. الف و الف. س.؛ و نظارت بر اجرای مطالعه: الف. الف و پ. خ.

تضاد منافع:

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

بازیابی داده‌ها:

مجموعه داده ارائه شده در مطالعه با درخواست از نویسندگان مربوطه در حین ارسال یا پس از انتشار در دسترس است.

حمایت مالی/معنوی:

این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی از سوی سازمان‌ها، مؤسسات یا منابع مالی دولتی یا خصوصی دریافت نکرده است.

- by integration of reflectance confocal microscopy in daily practice: Prospective study in 2 referral skin cancer centers. *J Am Acad Dermatol*. 2020;**83**(4):1057–63. [PubMed ID:31202873]. [PubMed Central ID:PMC8285925]. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.05.101>.
14. Kiesslich R, Canto MI. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2009;**19**(2):261–72. [PubMed ID:19423023]. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2009.02.007>.
 15. Ragazzi M, Longo C, Piana S. Ex Vivo (Fluorescence) Confocal Microscopy in Surgical Pathology: State of the Art. *Adv Anat Pathol*. 2016;**23**(3):159–69. [PubMed ID:27058244]. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000114>.
 16. Woudberg R. Confocal Microscopy Applications with Integrative Techniques in Cell Mechanics and Tissue Engineering. *Bioimaging in Tissue Engineering and Regeneration*; 2025. p. 215–56.
 17. Silvestri L, Mascaro ALA, Lotti J, Sacconi L, Pavone FS. Advanced Optical Techniques to Explore Brain Structure and Function. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2013;**06**(01). <https://doi.org/10.1142/s1793545812300029>.
 18. Nosrati H, Abpeikar Z, Mahmoudian ZG, Zafari M, Majidi J, Alizadeh A, et al. Corneal epithelium tissue engineering: recent advances in regeneration and replacement of corneal surface. *Regen Med*. 2020;**15**(8):2029–44. [PubMed ID:33169642]. <https://doi.org/10.2217/rme-2019-0055>.
 19. Furrer P, Gurny R. Recent advances in confocal microscopy for studying drug delivery to the eye: concepts and pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;**74**(1):33–40. [PubMed ID:19755157]. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.09.002>.
 20. Jonkman J, Brown CM, Wright GD, Anderson KI, North AJ.

- Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nat Protoc.* 2020;**15**(5):1585–611. [PubMed ID:32235926]. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0313-9>.
21. Zafari FSM, Bakhtiyari M. [Teimourian S. Rapid repair of skin ulcers in diabetic rats using polycaprolactone /gelatin nanon-fiber scaffold]. *Koomesh.* 2019;**21**(3). Persian.
 22. Bagherzadeh R, Latifi M, Najar SS, Tehran MA, Kong L. Three-dimensional pore structure analysis of nano/microfibrous scaffolds using confocal laser scanning microscopy. *J Biomed Mater Res A.* 2013;**101**(3):765–74. [PubMed ID:22961915]. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34379>.
 23. Ilie MA, Caruntu C, Lupu M, Lixandru D, Tampa M, Georgescu SR, et al. Current and future applications of confocal laser scanning microscopy imaging in skin oncology. *Oncol Lett.* 2019;**17**(5):4102–11. [PubMed ID:30944603]. [PubMed Central ID:PMC6444326]. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10066>.
 24. Seidel T, Edelmann JC, Sachse FB. Analyzing Remodeling of Cardiac Tissue: A Comprehensive Approach Based on Confocal Microscopy and 3D Reconstructions. *Ann Biomed Eng.* 2016;**44**(5):1436–48. [PubMed ID:26399990]. [PubMed Central ID:PMC4805509]. <https://doi.org/10.1007/s10439-015-1465-6>.
 25. Buttner P, Galli R, Husser D, Bollmann A. Label-free Imaging of Myocardial Remodeling in Atrial Fibrillation Using Nonlinear Optical Microscopy: A Feasibility Study. *J Atr Fibrillation.* 2018;**10**(5):1644. [PubMed ID:29988238]. [PubMed Central ID:PMC6006967]. <https://doi.org/10.4022/jafib.1644>.
 26. Au M, Almeida-Magana R, Al-Hammouri T, Haider A, Shaw G. Accuracy of Ex-vivo Fluorescence Confocal Microscopy in Margin Assessment of Solid Tumors: A Systematic Review. *J Histochem Cytochem.* 2023;**71**(12):661–74. [PubMed ID:37968920]. [PubMed Central ID:PMC10691410]. <https://doi.org/10.1369/00221554231212948>.
 27. Marenco J, Calatrava A, Casanova J, Claps F, Mascaro J, Wong A, et al. Evaluation of Fluorescent Confocal Microscopy for Intraoperative Analysis of Prostate Biopsy Cores. *Eur Urol Focus.* 2021;**7**(6):1254–9. [PubMed ID:32912840]. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2020.08.013>.
 28. Blouin S, Roschger A, Varga F, Misof B, Spitzer S, Roschger P, et al. Confocal laser scanning microscopy-a powerful tool in bone research. *Wien Med Wochenschr.* 2018;**168**(11-12):314–21. [PubMed ID:29802493]. <https://doi.org/10.1007/s10354-018-0639-x>.
 29. Ghanbari E, Naseri L, Khazaei M, Akbari M, Elahian F, Mirzaei SA, et al. [An Introduction to Tissue Engineering and the Most Widely Used Scaffolds]. *Journal of Isfahan Medical School.* 2018;**36**(488):823–37. Persian. <https://doi.org/10.22122/jims.v36i488.10056>.
 30. Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Res.* 2004;**7**(1):15–31. [PubMed ID:15256042]. <https://doi.org/10.1089/154916804323105053>.
 31. Golchin A, Ranjbarvan P, Parviz S, Shokati A, Naderi R, Rasmi Y, et al. The role of probiotics in tissue engineering and regenerative medicine. *Regen Med.* 2023;**18**(8):635–57. [PubMed ID:37492007]. <https://doi.org/10.2217/rme-2022-0209>.
 32. Asgharzade S, Alizadeh A, Arab S. Regenerative Medicine Approaches in COVID-19 Pneumonia. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2021;**16**(6):647–55. [PubMed ID:33438550]. <https://doi.org/10.2174/1574888X16999210112205826>.
 33. Pawley JB. *Handbook Of Biological Confocal Microscopy.* 2006.
 34. Tsang VL, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;**56**(11):1635–47. [PubMed ID:15350293]. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.05.001>.
 35. Porgham Daryasari M, Dusti Telgerd M, Hossein Karami M, Zandi-Karimi A, Akbarijavar H, Khoobi M, et al. Poly-l-lactic acid scaffold incorporated chitosan-coated mesoporous silica nanoparticles as pH-sensitive composite for enhanced osteogenic differentiation of human adipose tissue stem cells by dexamethasone delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;**47**(1):4020–9. [PubMed ID:31595797]. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1658594>.
 36. Cutts LS, Hibberd S, Adler J, Davies MC, Melia CD. Characterising drug release processes within controlled release dosage forms using the confocal laser scanning microscope. *Journal of Controlled Release.* 1996;**42**(2):115–24. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(96\)01340-5](https://doi.org/10.1016/0168-3659(96)01340-5).
 37. Lamprecht A, Schafer U, Lehr CM. Structural analysis of microparticles by confocal laser scanning microscopy. *AAPS PharmSciTech.* 2000;**1**(3):E17. [PubMed ID:14727903]. [PubMed Central ID:PMC2750345]. <https://doi.org/10.1208/pt010317>.
 38. Ilie M, Caruntu C, Lixandru D, Tampa M, Georgescu SR, Constantin MM, et al. In vivo confocal laser scanning microscopy imaging of skin inflammation: Clinical applications and research directions (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2018. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6981>.
 39. Allan IU, Shevchenko RV, Rowshanravan B, Kara B, Jahoda CA, James SE. The Use of Confocal Laser Scanning Microscopy to Assess the Potential Suitability of 3d Scaffolds for Tissue Regeneration, by Monitoring Extra-Cellular Matrix Deposition and by Quantifying Cellular Infiltration and Proliferation. *Soft Materials.* 2009;**7**(4):319–41. <https://doi.org/10.1080/15394450903372679>.
 40. Gabor AG, Duma VF, Fabricky MMC, Marsavina L, Tudor A, Vancea C, et al. Ceramic Scaffolds for Bone Augmentation: Design and Characterization with SEM and Confocal Microscopy. *Materials (Basel).* 2022;**15**(14). [PubMed ID:35888366]. [PubMed Central ID:PMC9322854]. <https://doi.org/10.3390/ma15144899>.
 41. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;**7**(3):211–24. [PubMed ID:16496023]. <https://doi.org/10.1038/nrm1858>.
 42. Badylak SF, Gilbert TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol.* 2008;**20**(2):109–16. [PubMed ID:18083531]. [PubMed Central ID:PMC2605275].

- <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.003>.
43. Leahy M, Thompson K, Zafar H, Alexandrov S, Foley M, O'Flatharta C, et al. Functional imaging for regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):57. [PubMed ID:27095443]. [PubMed Central ID:PMC4837501]. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0315-2>.
 44. Klontzas ME, Protonotarios A. High-Resolution Imaging for the Analysis and Reconstruction of 3D Microenvironments for Regenerative Medicine: An Application-Focused Review. *Bioengineering (Basel)*. 2021;8(11). [PubMed ID:34821748]. [PubMed Central ID:PMC8614770]. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8110182>.
 45. Lambert TJ, Waters JC. Navigating challenges in the application of superresolution microscopy. *J Cell Biol*. 2017;216(1):53–63. [PubMed ID:27920217]. [PubMed Central ID:PMC5223610]. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610011>.
 46. Wan B, Ganier C, Du-Harpur X, Harun N, Watt FM, Patalay R, et al. Applications and future directions for optical coherence tomography in dermatology. *Br J Dermatol*. 2021;184(6):1014–22. [PubMed ID:32974943]. <https://doi.org/10.1111/bjd.19553>.
 47. Takbhate BP. A Narrative Review on Confocal Laser Scanning Microscopy: Principle, Applications, Advancements and Challenges. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2024. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2024/73869.20245>.

Research Article

Confocal Laser Scanning Microscope: A Review of Principles and Applications in Biological Sciences and Regenerative Medicine

Fatemeh Bahramali ¹, Hossein Asadi ¹, Pegah Khosravian Dehkordi ², Elham Saffarieh ³, Akram Alizadeh ^{1,*}

¹Department of Tissue Engineering and Applied Cellular Sciences, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

²Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

³Abnormal Uterine Bleeding Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

*Corresponding Author: Department of Tissue Engineering and Applied Cellular Sciences, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. Email: alizadehbio@gmail.com

Received: 03/07/2025; Accepted: 22/05/2026

Abstract

Background: Since the commercialization of confocal microscopy in the late 1980s, confocal laser scanning microscopy (CLSM) has become one of the most common fluorescence microscopy techniques for 3D structural studies of biological cells and tissues. The flexibility of this approach has enabled its application in studies ranging from rapid imaging of processes in living cells, to morphological analyses of tissues, and localization of protein expression patterns.

Methods: In this narrative study, the papers published in PubMed, google scholar, Scopus, and Web of Science databases from 2004 to 2025 was used. Selection criteria included studies used or evaluating confocal microscopy and its advantages in biological sciences and regenerative medicine.

Results: CLSM has a major advantage over conventional microscopy because it rejects light that does not come from the focal plane, enabling one to perform optical sectioning and construction of 3D images. Also, its high axial resolution, sharp image quality, and associated quantitative image analysis provide crucial structural information at medium range for full 3D realization of the microstructure. Due to this feature, CLSM is currently finding applications in the study of a variety of processes such as phase separation in polymer blends, fracture toughness in alloys, and in microfabrication. It also has applications in regenerative medicine, such as analyzing cell dynamics, cell interactions, and measuring tissue properties, and can help improve tissue regeneration and repair processes and make progress in this field.

Conclusion: This article reviews confocal microscopy and its advantages in biological sciences and regenerative medicine and biomaterials. In this article, we also introduce the principles of confocal microscopy and discuss how this approach has become a mainstay in the life sciences.

Keywords: Confocal Microscopy, 3D Structure, Laser Scanning Microscopy, Biological Sciences, Regenerative Medicine