

Н.П.Коннов, Ю.П.Волков, О.С.Кузнецов

### СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИЗУЧЕНИЯ ТРЕХМЕРНОЙ (3D) УЛЬТРАТОНКОЙ СТРУКТУРЫ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Представлен обобщенный обзор литературных данных по современным приборным подходам изучения пространственной (3D) субмикроскопической организации биологических объектов с высоким пространственным разрешением.

Возможности приборной визуализации и анализа трехмерного биообъекта в значительной мере способствуют более полной характеристике его структурно-функциональных свойств.

*Ключевые слова:* трансмиссионная, растровая электронная микроскопия, сканирующая зондовая, конфокальная микроскопия, рентгеновская, цифровая голографическая микроскопия.

N.P.Konnov, Yu.P.Volkov, O.S.Kuznetsov

### Modern Technologies for Examination of Three-Dimensional (3-D) Ultra-Fine Structure and Visualization of Microorganisms

*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Outlined is a review of the literature data on the modern technologies for examination of the spatial (3-D) submicroscopic structural arrangement of biological objects with a high spatial resolution.

Capacities of the instrumental visualization and analysis of a three-dimensional biological object significantly facilitate the overall characterization of its structural-functional properties.

*Key words:* transmission, raster electronic microscopy, scanning probe, confocal microscopy, X-ray, digital holographic microscopy.

Развитие микроскопии уже произвело революцию в мире клеточной и молекулярной биологии и остается важнейшей предпосылкой ее будущих открытий.

Применение электронной микроскопии в биологии существенно изменило и углубило прежние представления о тонкой структуре клетки и ее внеклеточных компонентов, что способствовало дополнительному пониманию ее функциональных особенностей.

Визуализация биологических объектов является, по-видимому, наиболее сложной задачей для микроскопии любого типа. Это связано со специфическими особенностями биообъекта: малыми размерами, сложным рельефом поверхности, прозрачностью, мягкостью и легкой повреждаемостью при исследованиях. Возможность проведения структурно-функционального анализа клеток неразрывно связана с изобретением и дальнейшим усовершенствованием световых, электронных и зондовых микроскопов [1, 3–5, 15, 16]. Такая необходимость вызвана стремлением ученых в более полном понимании механизмов сложных пространственных процессов и происходящих в клетке на ультраструктурном уровне (менее 100 нм). Более того, появилась возможность изучения биообъектов в трехмерном – 3D изображении с высоким пространственным разрешением (0,2–0,5 нм).

Получение объемной информации на ультраструктурном уровне существенно расширяет воз-

можность традиционных подходов при изучении микромира, а именно:

- позволяет получать новую информацию об объекте исследования – анализировать и хранить информацию о форме, рельефе поверхности и пространственных параметрах клетки в ее трехмерной субмикроскопической морфологии [2, 3, 6];
- осуществлять моделирование микрообъектов с сохранением их истинных размеров и форм [2, 10];
- проводить компьютерную видовую диагностику в трехмерном режиме [6, 12, 22, 29];
- накапливать информацию об их нативной архитектонике и биоразнообразии [8, 9, 14, 16].

Наиболее часто применяются следующие типы микроскопии, которые позволяют изучать и визуализировать ультраструктуру биологических объектов в трехмерном изображении с высоким пространственным разрешением:

- трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия – ТЭМ;
- растровая (сканирующая) электронная микроскопия – РЭМ;
- сканирующая зондовая микроскопия – СЗМ, включающая сканирующую туннельную микроскопию – СТМ, атомно-силовую микроскопию – АСМ, сканирующую оптическую микроскопию ближнего поля – СОМБП;
- лазерная сканирующая конфокальная микроскопия – ЛСКМ;

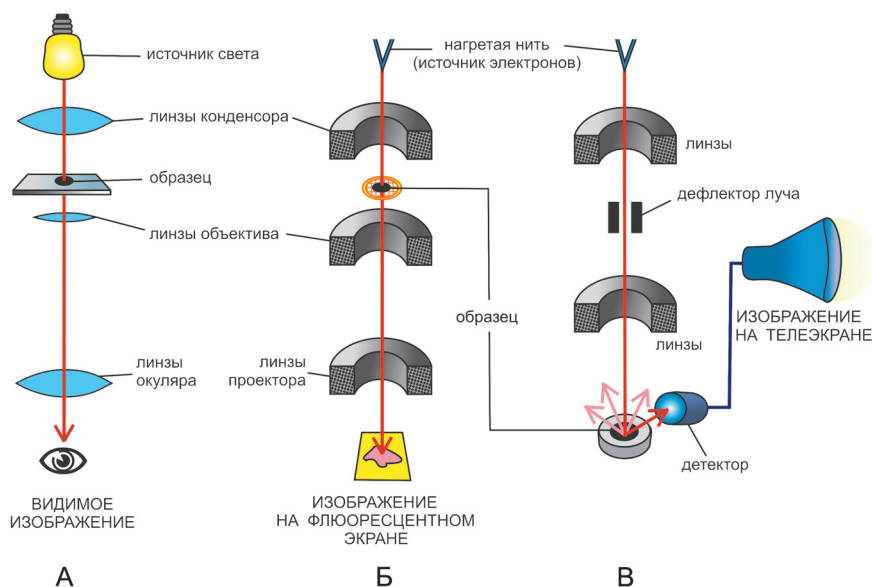


Рис. 1. Схема основных узлов светового микроскопа (А) и электронных микроскопов: просвечивающего (Б) и сканирующего (В)

- рентгеновская микроскопия – РМ;
- цифровая голографическая микроскопия – ЦГМ.

Каждый из указанных выше микроскопов имеет как преимущества, так и определенные недостатки.

#### **Трансмиссионная электронная микроскопия**

Этот вид микроскопии более известен, чем другие. В общих чертах ТЭМ очень напоминает световой микроскоп (рис. 1, А).

Источником освещения в ТЭМ является нить катода, излучающего электроны. Для формирования когерентного пучка электронов между катодом и анодом прикладывается ускоряющее напряжение (порядка 50–150 кВ) в условиях высокого вакуума. В качестве линз используются электромагниты, которые фокусируют электронный луч. Изучаемый объект через воздушный шлюз помещают в вакуум, где он попадает под сфокусированный пучок электронов. Часть электронов, которые проходят через образец, рассеиваются (в зависимости от плотности вещества в данном месте), а остальные фокусируются и образуют изображения, которые просматриваются на флуоресцентном экране и фиксируются на фотопленке (рис. 1, Б).

С помощью ТЭМ можно получать сведения о трехмерной структуре клеток. Известно, что в ТЭМ изображения представляют собой проекцию на плоскость структуры заметной толщины. Проекция и сечения этих структур описываются двумерными функциями оптической плотности. Дальнейший путь исследования может состоять в анализе изображения, ограничиваемом плоскими представлениями о пространственной структуре, либо в определении некоторых количественных характеристик трехмерной структуры по имеющемуся в наличии набору плоских картин [2, 3, 22, 32, 34]. Набрав достаточное количество таких изображений клеточной структуры, строят ее объемную пространственную модель с помощью компьютерных программ [6, 20, 22, 32].

Разрешающая способность ТЭМ для биологиче-

ских объектов составляет 0,5–1 нм. Основной недостаток – наличие высокого вакуума и тепловое воздействие пучка электронов на объект.

#### **Растровая (сканирующая) электронная микроскопия**

РЭМ является прибором, позволяющим получать обширную информацию от изображения, создаваемого взаимодействием между исследуемым образцом и электронным зондом [9, 12, 21, 30]. Растровый электронный микроскоп основан на использовании предварительно сформированного тонкого электронного луча (зонда), положением которого управляют с помощью электромагнитных полей. Это управление (сканирование) во многом аналогично процессу развертки в телевизионных кинескопах. Исследуемый образец, в условиях высокого вакуума, сканируется сфокусированным электронным пучком средних энергий (рис. 1, В). В зависимости от механизма регистрации сигнала различают несколько режимов работы РЭМ: отраженных электронов, вторичных электронов, катодолуминесценции, рентгеновского излучения и др. Разработанные методики позволяют исследовать не только свойства поверхности образца, но получать и визуализировать информацию о поверхностных структурах и, по мере надобности, проводить элементный анализ на микроучастке исследуемого объекта [5, 7, 12].

Одним из основных преимуществ растрового электронного микроскопа является большая глубина резкости.

При подготовке биологических препаратов для РЭМ требуются определенные методические приемы – образец должен быть токопроводящим. Для этого в условиях высокого вакуума (в вакуумном посту) образец оттеняется (напыляется) высокоочищенными тяжелыми металлами (золото, платина, палладий и их сплавы). В результате изучаемые объекты, показанные с помощью РЭМ, выглядят трехмерными. При этом разрешающая способность для биологических объектов составляет от 10 до 20 нм.

Растровая электронная микроскопия признана классическим методом изучения пространственных объектов биологической природы и прекрасно себя зарекомендовала на практике.

**Сканирующая зондовая (туннельная, атомно-силовая, оптическая ближнего поля) микроскопия**

Принципиально новые возможности открылись благодаря созданию в начале 1980-х годов различных сканирующих зондовых микроскопов, к основным типам которых относятся: сканирующий туннельный микроскоп (СТМ), позволяющий исследовать проводящие объекты [11, 13, 18], сканирующий силовой микроскоп (ССМ или АСМ), исследующий как проводящие, так и диэлектрические объекты [1], и сканирующий оптический микроскоп ближнего поля (СОМБП), исследующий тонкие и преимущественно прозрачные объекты [1, 11, 13]. Зондовые микроскопы являются уникальными нанoeлектронными приборами, сочетающими свойства микроскопа атомарного разрешения (около 0,2 нм в плоскости исследуемого объекта) и технологического устройства, с помощью которого могут создаваться наноразмерные элементы с программируемыми свойствами, например, микрочипы.

С возникновением и развитием СЗМ связаны значительные надежды на существенное повышение разрешения структур биологических объектов и возможность проведения исследования живых клеток в условиях, близких к нативным. В настоящее время биологические приложения СЗМ находятся в начальной стадии: отрабатываются методики приготовления объектов, учитывающие специфику зондовой микроскопии, устанавливаются особенности артефактов, свойственных СЗМ, совершенствуются алгоритмы отслеживания рельефа поверхности биологических объектов и др. В настоящее время наиболее широкое

применение в медико-биологических исследованиях нашла атомно-силовая микроскопия [28].

В АСМ в качестве чувствительного элемента служит микрозонд, представляющий собой тонкую пластинку-консоль (кантилевер, от английского слова «cantilever» – консоль, балка).

На конце кантилевера расположен острый шип (радиус закругления от 1 до 10 нм). При перемещении микрозонда вдоль поверхности образца острие шипа приподнимается и опускается, очерчивая микрорельеф поверхности подобно тому, как скользит по грампластинке патефонная игла. На выступающем конце кантилевера (над шипом) расположена зеркальная площадка, на которую падает и от которой отражается луч лазера. Когда шип опускается или поднимается на неровностях поверхности, отраженный луч отклоняется, и это отклонение регистрируется фотодетектором. Данные фотодетектора используются в системе обратной связи, которая обеспечивает постоянную силу давления острия на образец. Пьезоэлектрический преобразователь может регистрировать изменение рельефа образца в режиме реального времени (рис. 2, А).

Разрешающая способность метода составляет примерно 0,1–1 нм по горизонтали и 0,01 нм по вертикали. Однако при исследовании биологических объектов разрешающая способность АСМ ограничивается 10–20 нм, что обусловлено углублением острия кантилевера в биообъект, в результате чего рельеф исследуемой поверхности усредняется по площади контакта. Современные АСМ воздействуют на исследуемый объект с силой около  $10^{-9}$  Н в контактном режиме и примерно на порядок, меньший в полуконтактном. Дальнейшему снижению силы взаимодействия в полуконтактных режимах препятствуют силы поверхностного натяжения пленки воды

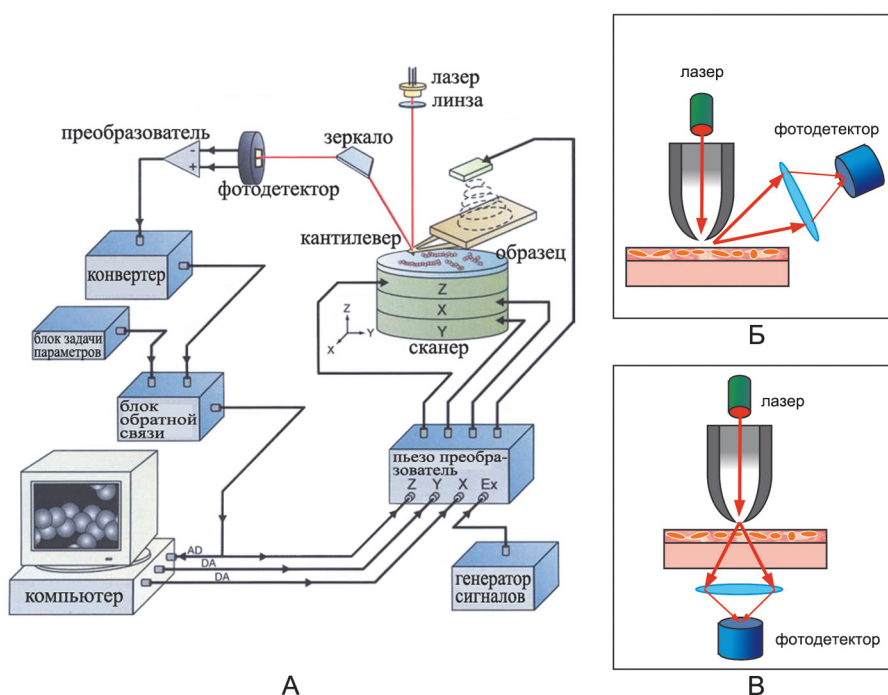


Рис. 2. Схема работы атомно-силового микроскопа [29] (А); возможные конфигурации ближнепольного оптического микроскопа [11]: исследование образцов на отражение (Б) и на просвет (В)

(образующейся на исследуемых объектах при их изучении на воздухе), которое прижимает острие кантилевера к исследуемому объекту. Переход на бесконтактную (резонансную) силовую микроскопию, в которой острие отделено от поверхности расстоянием в несколько десятков нанометров позволяет снизить силу взаимодействия до  $10^{-15}$  Н, при этом снижается локальность исследования поверхности до 10–20 нм. Таким образом, для дальнейшего повышения разрешения необходимо либо уменьшить силу взаимодействия острия с поверхностью путем перехода на другие схемы устройств кантилеверов (например, использование крутильных кантилеверов [10, 11]), либо повысить жесткость исследуемого объекта (например, путем его заморозки в глубоком вакууме для препятствия образования пленок льда) [15].

Что касается сканирующего оптического микроскопа ближнего поля, то на практике используются несколько конструктивных схем (рис. 2, Б, В). Наиболее часто реализуется схема, в которой оптическое излучение лазера локализуется в пространстве с помощью волоконного зонда. Такая схема позволяет получить максимальную мощность излучения в области субволнового отверстия и проводить исследование образцов как на отражение (рис. 2, Б), так и на просвет (рис. 2, В). Для увеличения чувствительности излучение, отраженное от образца или прошедшее сквозь образец, собирается на фотоприемнике с помощью фокусирующего зеркала или линзы.

#### Конфокальная лазерная микроскопия

Оптическая микроскопия уже более 300 лет находит все более разнообразное и широкое применение. Наиболее простым, но весьма информативным, является метод изучения окрашенных срезов тканей и клеток в проходящем белом свете. Применение оптической микроскопии и сегодня остается неотъемлемой частью клинических и медико-лабораторных исследований. Данный подход основан на использовании различий в интенсивности и цвете естественной или искусственной окраски определенных веществ в клетках и тканях, в комбинации с анализом морфологических признаков [14, 31]. Разработка оптических систем для реализации методов темного поля, фазового и дифференциального интерференционного контраста открыла исследователям возможность наблюдения и исследования микроструктур в неокрашенных и слабоконтрастных биологических объектах, таких как живые клетки. Создание флуоресцентных микроскопов позволило на фоне огромного числа разнообразных молекул избирательно наблюдать флуоресцирующие объекты и стимулировало развитие новых методов для изучения структуры и функции клеток [16].

Изобретение конфокальной системы регистрации сигнала обеспечило измерение флуоресцентных сигналов с трехмерным субмикронным разрешением и существенно расширило возможности неразрушающего анализа прозрачных образцов.

В настоящее время наибольшее распространение

получила лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ). Объемное изображение в ЛСКМ получается при помощи регистрации флуоресценции в фокусе лазерного луча (рис. 3). Излучаемые фотоны фокусируются объективом на небольшом («pinhole»,  $\sim 50 \mu\text{m}$ ) отверстии, которое ослабляет флуоресцентный сигнал от участков, находящихся не в фокусе. Получаемые с их помощью трехмерные изображения позволяют заглянуть в микромир, по информативности они несопоставимы с обычными двумерными картинками. Благодаря своему высокому разрешению и контрасту наиболее часто встречающейся задачей в изучении структуры клеток и их органоидов является исследование цитоскелета клеток, ядра, хромосом, или даже локализации в них отдельных генов [15, 31].

Исследуется также колокализация в клетке двух и более веществ, например белков [31]. Предварительно белки метятся антителами разными флуорохромами. При обычной микроскопии трудно разобрать, находятся они рядом или один под другим. Конфокальная микроскопия позволяет определить их местонахождение. Записав в памяти компьютера серию срезов, можно провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение, не используя трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов.

Еще одна задача решается этими приборами – исследование динамических процессов, происходящих в живых клетках [31]. Например, движение через клеточные мембраны ионов кальция или других веществ. Однако для этого нужен высокоскоростной конфокальный микроскоп.

Новыми перспективными направлениями конфо-

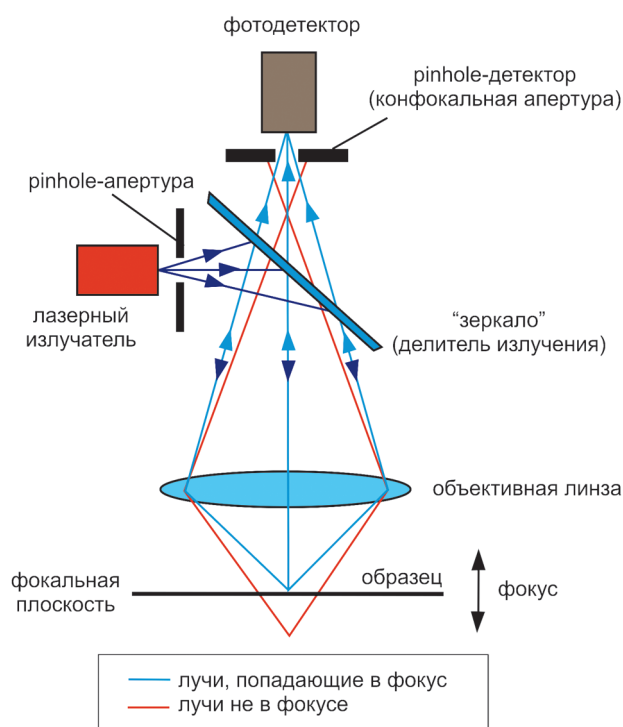


Рис. 3. Оптическая схема конфокальной сканирующей системы [31]

кальной микроскопии являются методики FRAP – Fluorescence Recovery After Photobleaching (Восстановление флуоресценции после фотовыжигания) и FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer (передача энергии посредством флуоресцентного резонанса).

FRAP применяется для исследования подвижности биоорганических молекул посредством инициации фотохимического разложения флуорохрома в зоне облучения и последующего его рассоединения с молекулами. После выжигания молекулы с флуорохромом из необлученной зоны движутся (вследствие диффузии) в облученную зону образца. По времени нарастания в ней флуоресценции можно судить о подвижности молекул.

FRET используется при определении расположения, взаимодействия и расстояния между молекулами разных типов. В этом случае молекулы метятся двумя флуорохромами, один со спектром испускания (донор), второй со спектром поглощения (акцептор). В результате резонанса между энергетическими уровнями молекул, энергия от донора передается к акцептору. Далее энергия, излучаемая акцептором в видимой области спектра, регистрируется микроскопом.

Как и у любого метода, у ЛКСМ имеется ряд недостатков, одним из которых является относительно невысокое разрешение, по сравнению с другими видами трехмерной микроскопии (см. выше). Предел разрешающей способности конфокальной микроскопии составляет 150–300 нм. Тем не менее, конфокальный микроскоп дает две неопределимые возможности: он позволяет исследовать ткани на клеточном уровне в состоянии физиологической жизнедеятельности, а также оценивать результаты исследования (т.е. клеточной активности) в четырех измерениях – высота, ширина, глубина и время.

#### **Рентгеновская микроскопия**

Известно, что рентгеновское излучение, имея малую длину волны (менее 10 нм), потенциально способно создавать 3D изображения объекта с высоким разрешением (до половины длины волны). В настоящее время в силу многих технических причин разрешение, получаемое с помощью лабораторных рентгеновских микроскопов, не превышает 200 нм. Исключения составляют микроскопы на основе синхротронного излучения или рентгеновских лазеров, дающие атомарное разрешение [26]. Однако имея большие технические сложности и высокую стоимость, данные приборы не нашли широкого применения в медико-биологических приложениях.

#### **Цифровая голографическая микроскопия**

Еще одним способом получения трехмерного изображения биологических объектов является лазерная голографическая микроскопия. Это интенсивно развивающаяся методика позволяет проводить исследование неокрашенных живых клеток в реальном масштабе времени, получая при этом данные о внутренней структуре с глубиной резкости несколько

миллиметров [27]. Принцип работы голографического микроскопа основан на регистрации исследуемого объекта, в котором лазерное излучение, проходя по двум путям (через объект и минуя его), объединяется, строя его голограмму. С помощью фотоматрицы высокого разрешения голограмма регистрируется компьютером. Для последующего восстановления изображения используются различные алгоритмы математической обработки. Микроскопы подобного рода серийно не выпускаются, разработаны только прототипы нескольких вариантов конструкций, имеющих различные ограничения по скорости и разрешению.

В заключение следует отметить, что представленные выше материалы следует рассматривать как предельно сжатое обобщение о возможности изучения биологического микромира, где важным условием развития работ по использованию вышеприведенных приборов является особое внимание к подготовке объекта для изучения, от которой в значительной мере зависят возможности метода. В соответствии с целями и задачами исследования методика такой подготовки может быть различной.

В настоящее время в РосНИПЧИ «Микроб» проводятся работы по изучению тонкой структуры и визуализации в трехмерном измерении с высоким пространственным разрешением бактерий чумы, холеры и сибирской язвы, применяя при этом три типа микроскопии: ТЭМ, СЭМ, АСМ [1, 8, 9]. Такие исследования способствуют получению более полной информации по ультраструктурно-функциональной организации вышеуказанных возбудителей и тонкому пониманию взаимодействия макро- и микроорганизмов.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Байбурин В.Б., Волков Ю.П., Коннов Н.П. Многофункциональный комплекс сканирующей зондовой микроскопии и его применение. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та; 1998. 120 с.
2. Вайнштейн Б.К., Орлов С.С. К теории восстановления функций по их проекциям. Кристаллография. 1972; 17:253–6.
3. Вайнштейн Б.К. Трехмерная электронная микроскопия биологических макромолекул. Усп. физ. наук. 1973; 109:454–40.
4. Вайнштейн Б.К. Электронная микроскопия атомного разрешения. Усп. физ. наук. 1987; 152:75–122.
5. Володин А.П. Новое в сканирующей микроскопии. Приборы и техника эксперимента. 1998; 6:3–42.
6. Ивануцкий Г.Р., Кринский В.И., Сельков Е.Е. Математическая биофизика клетки. М.: Наука; 1978. 309 с.
7. Карулу В.Я. Электронная микроскопия. Киев: Вища школа; 1984. 137 с.
8. Коннов Н.П., Волков Ю.П., Кузнецов О.С., Якименко Р.Д., Новикова О.В., Микшис Н.И. Трехмерная микроскопия бактериальных клеток с высоким пространственным разрешением. Пробл. особо опасных инф. 2002; 1(13):86–90.
9. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М.: Медицина; 2007. 222 с.
10. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука; 1994. 400 с.
11. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. М.: Техносфера; 2005. 144 с.
12. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ. М.: Мир; 1984. Т. 1. 303 с.
13. Сулов А.А., Чижик С.А. Сканирующие зондовые микроскопы (обзор). Материалы, Технологии, Инструменты. 1997; 2(3):78–89.
14. Феофанов А.В. Конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. Усп. биол. химии. 2007; 47:371–410.
15. Чандлер Д., Робертсон Р. Оптическая и электронная микроскопия в медицине и биологии. М.: Интеллект; 2009. 234 с.
16. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. М.:

- МГУ; 2004. 495 с.
17. Baker T.S., Olson N.H., Fuller D. Adding the third dimension of virus life cycle: three-dimensional reconstruction of viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1999; 63(4):862–922.
  18. Binnig G., Rohrer H. Scanning tunneling microscopy IBM. *J. Res. Develop.* 1986; 30(9):930–3.
  19. Bron C., Gremillet P. 3D reconstruction by image-processing of serial section in electron microscopy. In: Kriete A., editor. *Visualisation in biomedical microscopies, 3D imaging and computer applications*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft; 1992. P. 75–104.
  20. Cabado R., Machado-Santelli G.M. Image Analysis and 3D Reconstruction: An Innovating Methodology in Microscopy. *Acta Microscopica*. 2003; 12:55–8.
  21. Engel A., Schonenberg C.A., Muller D.J. High resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biology*. 1997; 7:279–84.
  22. Fiala J.C. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J. Microscopy*. 2005; 218:52–61.
  23. Frank J., Radermacher M., Penczek P., Zhu J., Li Y., Ladjadj M., Leith A. SPIDER and WEB: Processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J. Structural Biology*. 1996; 116:190–9.
  24. Frank J. *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*. San Diego: Academic Press; 1996. 340 p.
  25. Giessibl F. Advances in Atomic Force Microscopy. *Reviews of Modern Physics*. 2003; 75(3):949–83.
  26. Guehrs E., Gunther C., Konnecke R., Pfau B., Elisebitt S. Holographic soft X-ray omni-microscopy of biological specimens. *Optics express*. 2009; 17(8):6710–20.
  27. Kemper B., Langehanenberg P., von Bally G. Digital Holographic Microscopy: A new Method for surface Analysis and Marker-Free Dynamic Life cell imaging. *Optik & Photonik*. 2007; 2(2):41–4.
  28. Morris V.J., Kirby A.R., Gunning A.P. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. USA: Imperial College Press; 1999. 220 p.
  29. Moss V.A. Acquisition and visualisation of serial section images. In: Kriete A., editor. *Visualisation in biomedical microscopies, 3D imaging and computer applications*. Weinheim: Verlagsgesellschaft; 1992. P. 19–44.
  30. Mullard A. Microscopy: Eukaryotic cell, now showing in 3D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8:272–3.
  31. Murray J.M. Confocal microscopy, deconvolution and structured illumination methods. In: Goldman R.D., Spector D.L., editors. *Live cell imaging. Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005. P. 239–79.
  32. Verbeek F.J., Huijsmans D.P., Baeten R.W.A.M., Schoutsen N.C.J., Lamers W.H. Design and Implementation of a database and a program for 3D-reconstruction from serial sections: A data driven approach. *Microscopy Res. Tech.* 1995; 30:1–17.
  33. Verbeek F.J. 3D reconstruction from serial sections, applications and limitations *Microscopy and Analysis (UK version)*. 1996; 56:33–5.
  34. Verbeek F.J. Theory and Practice of 3D-reconstructions from serial sections. In: Baldock R.A., Graham J., editors. *Image Processing, a Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press; 1999. P. 153–95.
- References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)**
1. Baiburin V.B., Volkov Yu.P., Konnov N.P. [Multifunctional Complex for Scanning Probe Microscopy and its Application]. *Saratov: Izd. Sar. Univ*; 1998. 120 p.
  2. Vainshtein B.K., Orlov S.S. [Regarding the theory of functions recovery based on their projections]. *Kristallografiya*. 1972; 17:253–6.
  3. Vainshtein B.K. [Three-dimensional electronic microscopy of biological molecules]. *Usp. Fiz. Nauk*. 1973; 109:454–60.
  4. Vainshtein B.K. [Atomic-resolution electronic microscopy]. *Usp. Fiz. Nauk*. 1987; 152:75–122.
  5. Volodin A.P. [New trends in the sphere of scanning microscopy. Equipment and experimental procedure]. 1998; 6:3–42.
  6. Ivanitsky G.R., Krinsky V.I., Sel'kov E.E. [Mathematical Biophysics of the Cell]. M.: Nauka; 1978. 309 p.
  7. Karupu V.Ya. [Electronic microscopy]. Kiev; 1984. 137 p.
  8. Konnov N.P., Volkov Yu.P., Kuznetsov O.S., Yakimenko R.D., Novikova O.V., Mikshis N.I. [Three-dimensional microscopy of bacterial cells with high spatial resolution]. *Probl. Osobo. Opasn. Infek.* 2002; 83:86–90.
  9. Kutyrev V.V., Konnov N.P., Volkov Yu.P. [Plague Agent: Ultra-Structure and Localization in the Vector]. M.: *Meditcina*; 2007. 222 p.
  10. Mironov A.A., Komissarchik Ya.Yu., Mironov V.A. [Methods of Electronic Microscopy in Biology and Medicine]. St. Petersburg: Nauka; 1994. 400 p.
  11. Mironov V.L. [Fundamentals of Scanning Probe Microscopy]. M.: *Tekhnosfera*; 2005. 144 p.
  12. [Raster Electronic Microscopy and X-ray Microanalysis]. M.: Mir; 1984. Vol. 1. 303 p.
  13. Suslov A.A., Chizhik S.A. [Scanning Probe Microscopes (Review)]. *Materialy Tekhnol. Instrum.* 1997; 2(3):78–89.
  14. Feofanov A.V. [Confocal microscopy in biological investigations]. *Usp. Biol. Khimii*. 2007; 47:371–410.
  15. Chandler D., Roberson R. [Visible-Light and Electronic Microscopy in Medicine and Biology]. M.: *Intellekt*; 2009. 234 p.
  16. Chentsov Yu.S. [Introduction to Cellular Biology]. M.: MSU; 2004. 495 p.
- Authors:**  
 Konnov N.P., Volkov Yu.P., Kuznetsov O.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru
- Об авторах:**  
 Коннов Н.П., Волков Ю.П., Кузнецов О.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 01.04.11.