

УДК 57.086.8

Исследование распределения и механических свойств цитоскелета астроцитов в среде культивирования методом атомно-силовой микроскопии

Ю. М. Ефремов^{1*}, Е. В. Дзюбенко^{1,2}, Д. В. Багров¹, Г. В. Максимов¹, С. И. Шрам²,
К. В. Шайтан¹

¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

²Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 2

*E-mail: yu.efremov@gmail.com

Поступила в редакцию 23.05.2011 г.

РЕФЕРАТ Изучение морфологии и структуры цитоскелета астроцитов представляет огромный интерес в связи с их участием в развитии различных нейродегенеративных заболеваний. В представленной работе морфологию астроцитов анализировали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) на близкой к условиям организма системе – органотипической культуре спинномозговых ганглиев (СМГ) эмбриона курицы. Показана возможность визуализации цитоскелета астроцитов, выращенных на желатиновой подложке, непосредственно в среде культивирования. Наблюдаемые с помощью АСМ структуры цитоскелета соответствуют актиновым филаментам и сети микротрубочек, что подтверждается конфокальной микроскопией при иммунофлуоресцентном окрашивании на α -тубулин и фибриллярный актин. Проведено картирование модуля Юнга живого астроцита, при этом более высокие значения модуля Юнга соответствуют местонахождению фибрилл цитоскелета. Применение АСМ позволит изучить динамические изменения структуры и упругих свойств цитоскелета культивируемых астроцитов, представляющие особый интерес при моделировании нейродегенеративных заболеваний с использованием клеточных культур.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА атомно-силовая микроскопия, спинномозговые ганглии, силовая спектроскопия, конфокальная микроскопия, цитоскелет.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АСМ – атомно-силовая микроскопия; СМГ – спинномозговой ганглий; ГФКБ – глиальный фибриллярный кислый белок.

ВВЕДЕНИЕ

Астроциты – один из основных типов клеток в центральной нервной системе, где они выполняют несколько функций: направляют и стимулируют миграцию нейронов в ходе развития, поддерживают микроокружение нейронов, модулируют иммунный ответ за счет презентации антигенов [1]. Исследование морфологии астроцитов представляет огромный интерес в связи с их важной ролью в патогенезе ряда распространенных заболеваний центральной и периферической нервных систем, таких, как ишемический инфаркт мозга, болезнь Альцгеймера, СПИД-ассоциированные деменции [2], диабетическая ретинопатия [3] и др. Для появления названных патологий необходимы серьезные морфологические и физиологические перестройки в клетках нервной системы, изменения в экспрессии генов [2,

4]. Как правило, при этом изменяется и строение цитоскелета [5].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) уже продолжительное время успешно используется в биологических исследованиях для визуализации биомолекул [6, 7], клеток [8–10] и измерения их механических характеристик [11, 12]. Метод АСМ позволяет одновременно получать трехмерное изображение живой клетки в среде роста и проводить с ней физические микро- и наноманипуляции. На изображениях клеток, полученных в контактном режиме, часто можно наблюдать цитоскелет [9, 13]. Измерение модуля Юнга также позволяет получать важную информацию о физиологическом и функциональном состоянии клеток [14, 15]. В нашей работе использовали прямой метод анализа морфологии астроцитов с помощью АСМ на близкой к условиям организма си-

стеме – органотипической культуре спинномозговых ганглиев (СМГ) эмбриона курицы. Показана возможность изучения цитоскелета астроцитов и измерения локального модуля Юнга клеток в культуре, выявлено влияние цитоскелета на локальный модуль Юнга. Данные о структуре цитоскелета, полученные методом АСМ, сопоставлены с данными конфокальной микроскопии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток

Органотипическую культуру СМГ эмбриона курицы получали по стандартной методике, описанной, например, в [16]. Вначале дно 35-мм чашки Петри покрывали желатином. Для этого в стерильные чашки наливали по 2 мл 0.5% раствора желатина и инкубировали в течение 1 ч в термостате при 37°C, затем раствор сливали. В результате на дне чашки формировался тонкий слой желатина. Из 11–12-дневного куриного эмбриона с помощью двух скальпелей под биноклем выделяли дорсальные ганглии, затем помещали их в подготовленные чашки, подсушивали и добавляли 2 мл среды культивирования. Использовали жидкую минимальную среду F12 («Биолот», Россия) с пируватом, глутамином, пенициллином, стрептомицином и 10% сыворотки крови лошади.

Для улучшения адгезии клеток и продления времени жизни первичной культуры добавляли фактор роста нервов (NGF 7s) до конечной концентрации 5 нг/мл. Получаемые таким образом препараты представляют собой смешанную первичную культуру нейронов и астроцитов. Эти два типа клеток различаются морфологически – веретенообразная форма и наличие отростков позволяют легко отличить нейрон от звездообразного астроцита [1]. Для идентификации астроцитов проводили иммуноцитохимическое окрашивание на глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) (маркерный белок астроцитов) по методике, аналогичной [17].

Атомно-силовая микроскопия

Эксперименты по атомно-силовой микроскопии проводили на АСМ Solver BIO Olympus (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия) с полем сканирования 100 x 100 x 7 мкм³ и системой емкостных датчиков. Как правило, морфология, присущая живым клеткам, сохраняется в течение нескольких часов. АСМ-исследования проводили только на клетках с такой морфологией. Сканируемую область выбирали с помощью оптического микроскопа, совмещенного с АСМ. Измерения проводили в среде культивирования в контактном и полуконтактном режимах

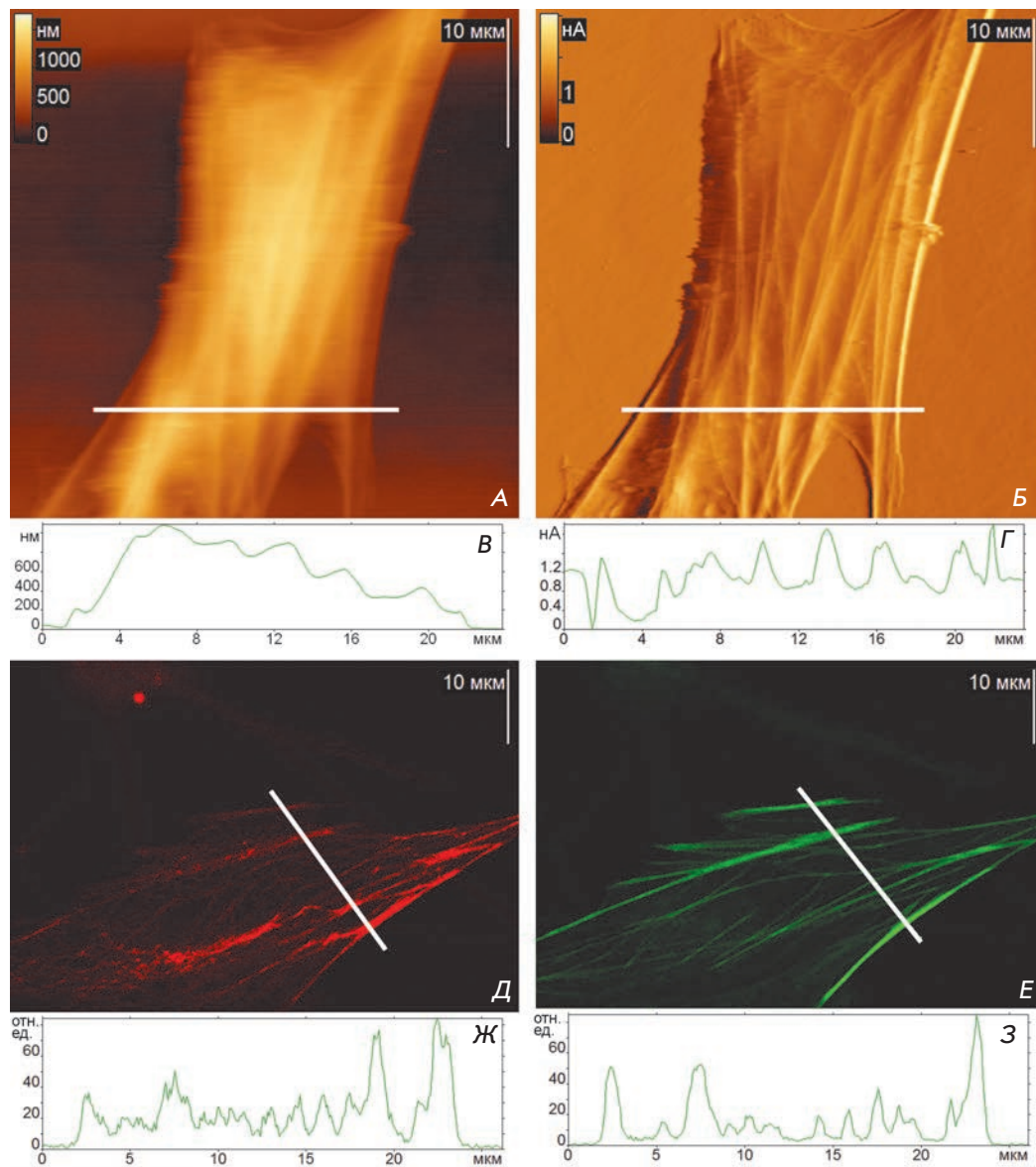
(полуконтактный режим не улучшал качество и информативность изображений, терялась информация о цитоскелете, поэтому приведены только изображения, полученные в контактном режиме) с использованием кантилеверов Veeco MSCT-AUHW («Veeco Instruments», США) из нитрида кремния. В контактном режиме одновременно записывали топографию в двух проходах кантилевера (прямой и обратный) и сигнал ошибки обратной связи. Силу воздействия на образец, измеренную по кривым сила–расстояние, по возможности выбирали минимальной (обычно она составляла 1–4 нН) [18]. Сопоставление сечений, полученных на прямом и обратном проходах, служило критерием правильности настройки обратной связи и корректности получаемых данных. После подбора оптимальных параметров сечения хорошо совпадали, что говорит об отсутствии существенных искажений структуры под действием кантилевера. Сигнал ошибки обратной связи помогает лучше выявить мелкие неоднородности рельефа поверхности [19]. Изображения обрабатывали с использованием программ ImageAnalysis (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия) и FemtoScan Online (ЗАО «Центр перспективных технологий», Россия).

В ходе экспериментов по силовой спектроскопии с помощью АСМ снимали силовые кривые – графики зависимости силы упругости, действующей на кантилевер со стороны образца, от вертикального смещения сканера [20, 21]. В ходе снятия силовой кривой кантилевер в выбранной точке опускается вниз, продавливая образец на некоторую глубину (при этом получают кривую подвода), до достижения установленной пороговой силы (2–3 нН), затем происходит его поднятие (получают кривую отвода). Для спектроскопии использовали прямоугольные кантилеверы PNP-DB («NanoWorld», Швейцария) и треугольные Veeco MSCT-AUHW («Veeco Instruments», США) из нитрида кремния. Перед проведением спектроскопии жесткость прямоугольных кантилеверов определяли по методу Садера [22, 23], для треугольных использовали значения жесткости, указанные производителем. Калибровку отклонения выполняли по силовой кривой, полученной над поверхностью чистой чашки Петри. Модуль Юнга рассчитывали по кривым подвода с использованием программы EF3 и ImageAnalysis (ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия), в которых реализована расчетная модель Герца в модификации Снеддона [9, 24].

Конфокальная микроскопия и флуоресцентное окрашивание

Препараты фиксировали и иммуноцитохимически окрашивали антителами на α -тубулин (DM1 α , «Santa Cruz Biotechnology», США) с последующим

Рис. 1. Визуализация цитоскелета астроцита с помощью АСМ и конфокальной микроскопии. Представлены типичные изображения. А – Топографическое изображение живого астроцита в жидкости. Б – Соответствующее изображение сигнала ошибки обратной связи. В – Профиль высоты астроцита, измеренный с помощью АСМ вдоль белой линии на топографическом изображении. Г – Профиль сигнала ошибки обратной связи вдоль той же линии. Д – Иммуноцитохимическое окрашивание на α -тубулин микротрубочек (DM1 α + Alexa 594). Е – Окрашивание актиновых филаментов флуоресцентно меченным фаллоидином. Ж, З – Профили интенсивности флуоресценции, измеренные вдоль белых линий на соответствующих флуоресцентных изображениях.



присоединением вторичных антител – конъюгатов с Alexa 594 (Alexa594 anti-mouse polyclone, «Invitrogen», США). Аналогичным образом проводили окрашивание на маркер астроцитов ГФКБ: после инкубации с первичными антителами (GFAP, «Abcam», Англия) добавляли вторичные – конъюгаты с Alexa 546 (Alexa546 anti-rabbit polyclone, «Invitrogen», США). При окрашивании на актин использовали флуоресцентный конъюгат родамин-фаллоидин. Фиксацию и окрашивание проводили согласно [17].

Эксперименты по сканирующей конфокальной микроскопии проводили на микроскопе LSM 510 META («Carl Zeiss», Германия). Распределение актина анализировали с использованием масляного иммерсионного объектива Plan-Apochromat 100x «Carl Zeiss» (апертура 1.4), длины волны возбуж-

дения 514 нм, спектрального диапазона детекции 530–600 нм, конфокальной диафрагмы диаметром 164 μm . Размер изображений – 1024 × 1024 пикселей (85 нм/пиксель).

Распределение тубулина изучали с использованием масляного иммерсионного объектива Plan-Apochromat 100x «Carl Zeiss» (апертура 1.4), длины волны возбуждения 543 нм, спектрального диапазона детекции 615–700 нм, конфокальной диафрагмы диаметром 184 μm . Размер изображений – 1024 × 1024 пикселей (85 нм/пиксель).

Распределение ГФКБ анализировали при помощи масляного иммерсионного объектива 63x «Carl Zeiss» (апертура 1.4), длины волны возбуждения 514 нм, спектрального диапазона детекции 530–600 нм, конфокальной диафрагмы диаметром 124 μm . Размер

изображений – 1024 × 1024 пикселей (127 нм/пиксель).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Визуализация цитоскелета астроцита с помощью конфокальной и атомно-силовой микроскопии

Изучение живых клеток на АСМ представляет собой технически и методически сложное направление, поскольку живые клетки – очень мягкие объекты, которые деформируются под действием силы со стороны кантилевера, а также требуют особых условий для поддержания жизнеспособности и должны быть прочно связаны с подложкой [10]. Тщательный выбор способа приготовления образца и параметров сканирования – необходимое условие получения качественных результатов.

Для сканирования на АСМ были выбраны хорошо адгезированные клетки, культивируемые в течение 10 дней. На полученных в контактном режиме топографических изображениях живых астроцитов можно видеть (рис. 1А), что клетки имеют неровную поверхность с протяженными (фибриллярными) структурами. При использовании контактного режима кантилевер проминает мембрану, делая видимыми элементы подмембранного цитоскелета. Наиболее четко они видны при записи сигнала ошибки обратной связи (рис. 1Б), который в каждой точке определяется отклонением кантилевера от положения равновесия. В полуконтактном режиме эти элементы не различимы из-за слабого воздействия со стороны кантилевера. Подобный результат получен в работах [8, 25].

Наиболее выраженными и жесткими структурами внутри клетки являются сети актиновых филаментов и микротрубочек [26]. Мы предполагаем, что при сканировании в контактном режиме живых астроцитов в жидкости удастся визуализировать структуру одной или обеих сетей.

Для подтверждения этого предположения мы сравнили изображения, полученные с помощью АСМ, с изображениями, полученными методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии при иммуофлуоресцентном окрашивании на α -тубулин и F-актин аналогичного астроцита (рис. 1Д,Е). Актиновый цитоскелет клетки, видимый при окрашивании на фибриллярный актин, организован в длинные параллельные фибриллы (рис. 1Е). Окрашивание на α -тубулин (рис. 1Д) отражает распределение микротрубочек в астроците, формирующих сложноорганизованную сеть. Схожую сеть мы видим и на АСМ-изображении микрорельефа живого астроцита (рис. 1А,Б).

Промежуточные филаменты, представленные в астроците ГФКБ, в данной культуре не формиру-

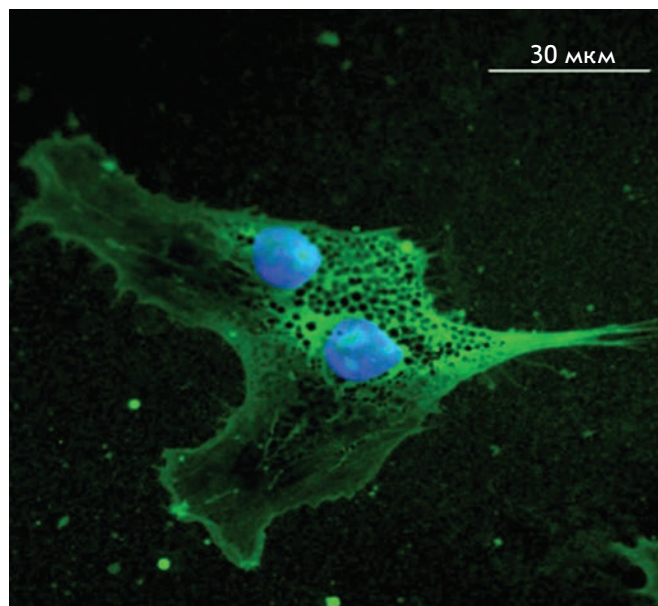


Рис. 2. Иммуоцитохимическое окрашивание на ГФКБ астроцитов органотипической культуры СМГ эмбрионов курицы. Зеленый цвет – Anti-GFAP + Alexa 546, синий – ядра, окрашенные DAPI.

ют регулярных фибриллярных структур либо разрушаются при фиксации (рис. 2). Из сопоставления имеющихся изображений и на основании опубликованных данных [13, 27] мы делаем вывод, что, в отличие от актина и микротрубочек, промежуточные филаменты в данном случае не визуализируются методом АСМ.

Были измерены профили интенсивности флуоресценции вдоль линий, выбранных на изображениях с конфокального микроскопа (рис. 1Ж,З). При расчете профиля происходит усреднение сигнала от нескольких линий, соседствующих с выбранной. Таким образом, наличие четко выделяемых пиков на приведенных профилях отражает присутствие протяженных структур внутри клетки – фибрилл. Поскольку схожие фибриллярные структуры обнаружены во всех трех случаях (рис. 1А,Д,Е), то на основе полученных данных нельзя сказать, какие элементы цитоскелета были нами выявлены при сканировании астроцита в контактном режиме АСМ – микротрубочки или актиновые филаменты. Возможно, обе системы вносят вклад в формирование микрорельефа поверхности (рис. 1А), однако некоторые исследователи [13, 27] считают определяющей роль именно актинового цитоскелета.

Следует также отметить, что ни на одном из измеренных профилей ширина пика не соответствует диаметрам индивидуальной микротрубочки или актинового филамента. Как известно [5], микротрубочки представляют собой протяженные сополимеры

α - и β -тубулина диаметром 10 нм, а актиновые филаменты имеют диаметр 7–8 нм. Следовательно, видимые структуры представляют собой пучки собранных вместе компонентов цитоскелета. Несмотря на трудность четкого разграничения различных сетей цитоскелета, его визуализация с помощью АСМ выгодно отличается от иммуноцитохимического окрашивания тем, что измерения проводятся на живых клетках в среде культивирования.

Таким образом, выращенные на желатиновой подложке астроциты органотипической культуры спинномозговых ганглиев эмбрионов курицы хорошо адгезируются, не сдвигаются в процессе сканирования и обладают высокой жизнеспособностью. Желатиновая подложка может эффективно заменить более дорогостоящие и сложные в приготовлении подложки из полиорнитина с ламинином, коллагена и др. [28].

Силовая спектроскопия и измерение локальных значений модуля Юнга живых астроцитов

С целью получения более полной информации о цитоскелете использовали силовую спектроскопию и измерение локальных значений модуля Юнга живых астроцитов. Силовые кривые снимали в точках, расположенных вдоль выбранных линий (10 или 20 точек на линию) или по сетке (от 4×4 до 7×7 точек). Чтобы показать, что выбранный метод расчета модуля Юнга корректен, измерения проводили двумя кантилеверами (их жесткости отличались на порядок и составляли $k_1 = 0.02$ Н/м и $k_2 = 0.18$ Н/м). Каждым кантилевером измеряли значения модуля Юнга двух-трех клеток. Получены хорошо совпадающие гистограммы (рис. 3) и средние значения модуля Юнга $E_1 = 2.2 \pm 1.6$ кПа и $E_2 = 2.1 \pm 1.6$ кПа, что доказывает корректность проведенных измерений.

Определенный нами на живых астроцитах диапазон значений модуля Юнга имеет большой разброс (0.36–9.6 кПа), что характерно для эукариотических клеток. Известно, что значения модуля Юнга у различных эукариотических клеток лежат в интервале от 0.02 до 400 кПа [14], в том числе у астроцитов из головного мозга крысы – от 1 до 40 кПа [13]. Известно также, что среднее значение модуля упругости нейронов диссоциированной культуры СМГ, адгезированной на полиорнитине/ламинионе [29], составляет 60 кПа. Это согласуется с данными [11, 30], согласно которым астроциты менее жесткие, чем нейроны.

Было проведено картирование модуля Юнга, для чего силовые кривые снимали в точках, расположенных в узлах сетки (рис. 4). На карте со значениями модуля Юнга более светлые квадраты соответствуют значениям с большей жесткостью, темные – с меньшей (рис. 4Б). Также приведен вид силовых кривых в разных точках (рис. 4В,Г,Д). Над подложкой кривая имеет резкий наклон, над краем клетки – плавный изгиб, пока кантилевер не упирается в подложку, над ядром – просто плавный изгиб, и над фибриллами цитоскелета – более резкий изгиб. При снятии силовых кривых вдоль линии было отмечено, что их вид и значения получаемого модуля Юнга зависят от наличия или отсутствия цитоскелета под мембраной в точке снятия. При наличии элементов цитоскелета, которые видны на топографических изображениях, рассчитанные значения модуля Юнга имеют большую величину (рис. 5), что подтверждает данные [13]. Необходимо отметить, что при снятии силовых кривых получается значение модуля Юнга, усредненное по величине контактной площадки между иглой кантилевера и поверхностью клетки. Величина контактной площадки зависит от геометрии зонда и глубины

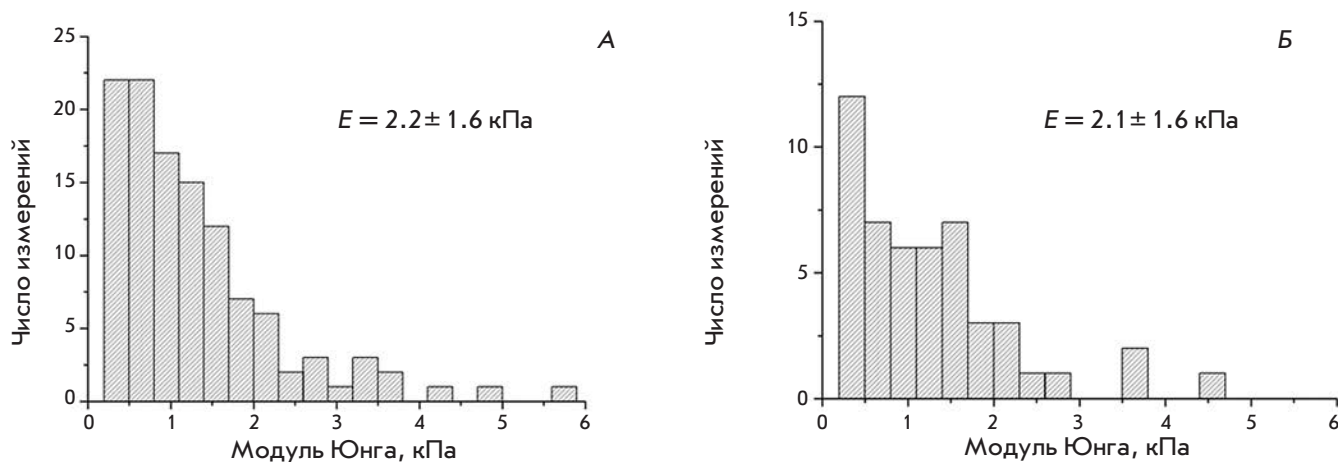


Рис. 3. Диаграммы для значений модуля Юнга астроцитов, полученные длинным кантилевером PNP-DB, $k = 0.02$ Н/м (А) и коротким кантилевером PNP-DB, $k = 0.179$ Н/м (Б).

Рис. 4. Картирование модуля Юнга астроцита. **А** – Изображение живого астроцита (сигнал ошибки обратной связи) и сетка, в точках которой снимались силовые кривые. **Б** – Карта значений модуля Юнга в точках сетки, значения цветовой шкалы в кПа. Более светлые квадраты соответствуют большим значениям жесткости. **В** – Силовая кривая, снятая в точке над краем клетки, часть кривой совпадает с кривой над подложкой. **Г** – Силовая кривая, снятая в точке над ядром клетки. **Д** – Силовая кривая, снятая в точке над подложкой. Зелеными стрелками отмечены точки контакта с поверхностью клетки, синей – точка упора в подложку. Диапазон смещения сканера на всех кривых составлял 2 мкм.

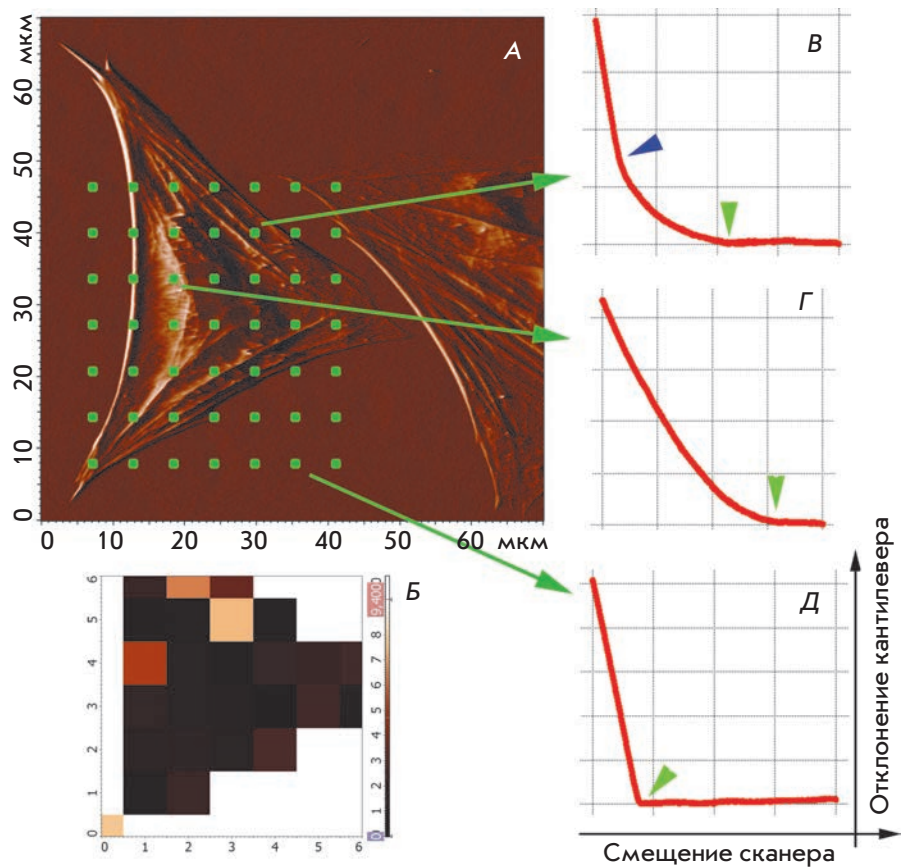
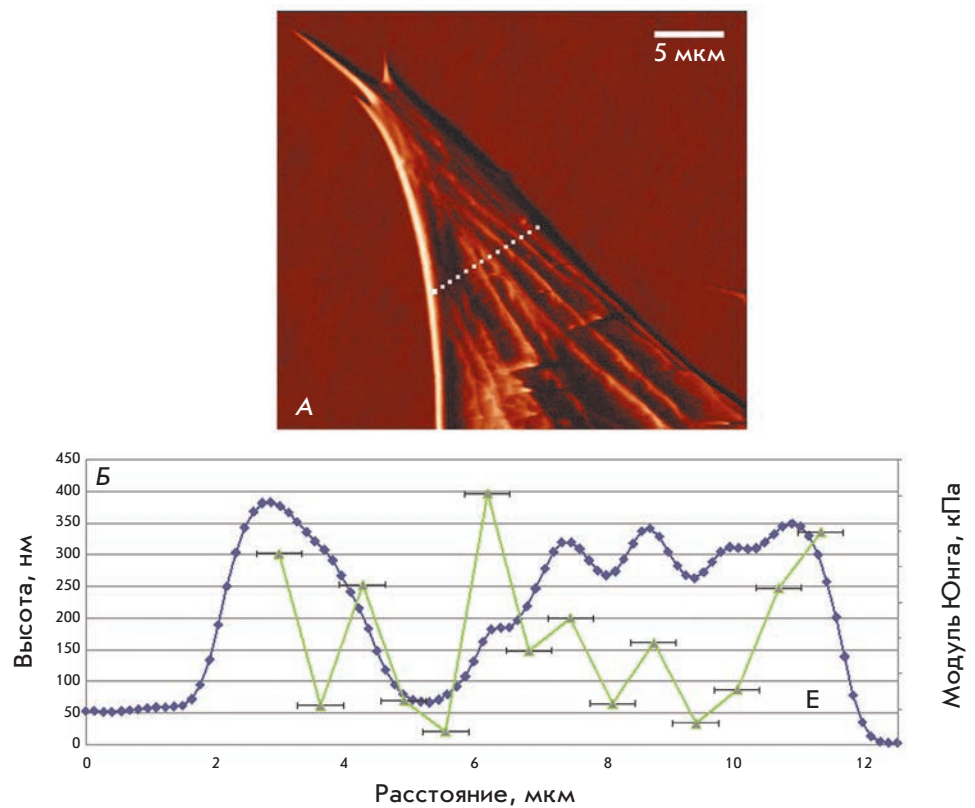


Рис. 5. Картирование модуля Юнга астроцита. **А** – Изображение участка астроцита и линия, вдоль которой снимались силовые кривые (14 точек) и был измерен профиль высоты. **Б** – Профиль сечения вдоль данной линии (синяя кривая) и значения модуля Юнга (зеленые точки) в соответствующих точках. Горизонтальные планки погрешностей отражают размер контактной площадки. Можно видеть, что в точках, попадающих на фибриллы цитоскелета (локальные максимумы на синей кривой), модуль Юнга имеет более высокие значения.



продавливания, в данном эксперименте она равна $\sim 700 \times 700$ нм [31]. Этим может объясняться разброс в значениях модуля упругости, получаемых на элементах цитоскелета. Кроме того, сами фибриллы могут представлять собой пучки собранных вместе филаментов различной плотности, что также может влиять на локальную жесткость клетки. Из диаграмм для значений модуля Юнга (рис. 3) видно, что большинство точек попадает на участки поверхности клеток, под которыми нет цитоскелета.

ВЫВОДЫ

Проведенные эксперименты показывают, что морфология астроцитов органотипической культуры СМГ эмбрионов курицы, культивируемых на желатиновой подложке, может успешно изучаться методом АСМ. Клетки хорошо адгезируются, практически не смещаются в процессе сканирования и обладают высокой жизнеспособностью, что позволяет использовать желатин в качестве дешевой, надежной и удобной подложки для используемой культуры. Высокое разрешение метода АСМ позволяет наблюдать организацию цитоскелета живой клетки в среде культивирования. Несмотря на то что при ви-

зуализации с помощью АСМ невозможно точно, как при конфокальной микроскопии фиксированных препаратов, определить, какую именно из сетей цитоскелета мы наблюдаем, метод АСМ весьма перспективен для изучения цитоскелета, поскольку позволяет работать на живых клетках. Кроме того, поскольку локальный модуль Юнга клетки значительно больше в местах нахождения фибрилл цитоскелета, проведение силовой спектроскопии позволит определять его целостность и степень деградации при повреждающих воздействиях. Особенно интересным представляется исследование изменений целостности цитоскелета культивируемых астроцитов и нейрональных клеток при нейродегенерации. Проведение силовой спектроскопии позволит в дальнейшем быстро, неинвазивно и с высокой точностью определять модуль Юнга живых клеток при изучении деградации цитоскелета – одного из ключевых процессов в развитии нейродегенерации [32]. ●

Работа поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Montgomery D. // Vet. Pathol. Online. 1994. V. 31. P. 145–167.
- Rodriguez J., Olabarria M., Chvatal A., Verkhratsky A. // Cell Death Differ. 2008. V. 16. P. 378–385.
- Goczalik I., Ulbricht E., Hollborn M., Raap M., Uhlmann S., Weick M., Pannicke T., Wiedemann P., Bringmann A., Reichenbach A., et al. // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008. V. 49. P. 4578–4589.
- Maragakis N.J., Rothstein J.D. // Nat. Clin. Pract. Neurol. 2006. V. 2. P. 679–689.
- Dent E.W., Gertler F.B. // Neuron. 2003. V. 40. P. 209–227.
- Engel A., Muller D.J. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2000. V. 7. P. 715–718.
- Graham H.K., Hodson N.W., Hoyland J.A., Millward-Sadler S.J., Garrod D., Scothern A., Griffiths C.E.M., Watson R.E.B., Cox T.R., Eler J.T. // Matrix Biol. 2010. V. 29. P. 254–260.
- Parpura V., Haydon P.G., Henderson E. // J. Cell Sci. 1993. V. 104. P. 427–432.
- Rotsch C., Radmacher M. // Biophys. J. 2000. V. 78. P. 520–535.
- Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Дубровин Е.В., Шайтан К.В., Яминский И.В. // Биофизика. 2011. Т. 56. С. 288–303.
- Lu Y.B., Franze K., Seifert G., Steinhäuser C., Kirchhoff F., Wolburg H., Guck J., Janmey P., Wei E., Käs J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 17759–17764.
- Butt H.J., Cappella B., Kappl M. // Surf. Sci. Rep. 2005. V. 59. P. 1–152.
- Yamane Y., Shiga H., Haga H., Kawabata K., Abe K., Ito E. // J. Electron Microsc. 2000. V. 49. P. 463–471.
- Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhike S.A., Zhdanov R.I. // Micron. 2007. V. 38. P. 824–833.
- Kirmizis D., Logothetidis S. // Int. J. Nanomed. 2010. V. 5. P. 137–145.
- Moore K., Macsween M., Shoichet M. // Tissue Eng. 2006. V. 12. P. 267–278.
- Cramer L., Desai A. // Fluorescence Procedures for the Actin and Tubulin Cytoskeleton in Fixed Cells. Protocol at <http://mitchison.med.harvard.edu/protocols/gen1.html>.
- Braet F., Wisse E. // Meth. Mol. Biol. 2004. V. 242. P. 201–217.
- Santacroce M., Orsini F., Perego C., Lenardi C., Castagna M., Mari S.A., Sacchi V.F., Poletti G. // J. Microsc. 2006. V. 223. P. 57–65.
- Costa K.D. // Meth. Mol. Biol. 2006. V. 319. P. 331–361.
- Лебедев Д.В., Чукланов А.П., Бухараев А.А., Дружинина О.С. // Письма в ЖТФ. 2009. Т. 35. С. 54–61.
- Burnham N., Chen X., Hodges C., Matei G.A., Thoreson E.J., Roberts C.J., Davies M.C., Tendler S.J.B. // Nanotechnol. 2003. V. 14. P. 1–6.
- Sader J.E., Chon J.W.M., Mulvaney P. // Rev. Sci. Instrum. 1999. V. 70. P. 3967–3970.
- Sneddon I.N. // Int. J. Eng. Sci. 1965. V. 3. P. 47–57.
- McNally H.A., Borgens R.B. // J. Neurocytol. 2004. V. 33. P. 251–258.
- Yamada K.M., Spooner B.S., Wessells N.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1970. V. 66. P. 1206–1212.
- Yamane Y., Hatakeyama D., Tojima T., Kawabata K., Ushiki T., Ogura S., Abe K., Ito E. // Jpn. J. Appl. Phys. 1998. V. 37. P. 3849–3854.
- Firouzi M., Sabouni F., Ziaee A.A., Taghikhani M. // Iran. Biomed. J. 2004. V. 8. P. 101–105.
- Mustata M., Ritchie K., McNally H.A. // J. Neurosci. Meth. 2010. V. 186. P. 35–41.
- Franze K., Reichenbach A., Kas J. // Mechanosensitivity of the Nervous System/ Ed. Kamkin A., Kiseleva I. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. V. 2. P. 173–213.
- Braet F., Rotsch C., Wisse E., Radmacher M. // Appl. Phys. A: Materials Sci. & Processing. 1998. V. 66. P. 575–578.
- George E.B., Glass J.D., Griffin J.W. // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 6445–6452.