

Диагностика живых клеток в атомно-силовом микроскопе, используя субмикронный сферический зонд калиброванного радиуса кривизны

© И.А. Няпшаев,¹ А.В. Анкудинов,^{1,2} А.В. Стовпяга,² Е.Ю. Трофимова,¹ М.Ю. Еропкин³

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН,
104021 Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики,
197101 Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-исследовательский институт гриппа Министерства
здравоохранения и социального развития РФ,
197376 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: Alexander.ankudinov@mail.ioffe.ru

(Поступило в Редакцию 12 декабря 2011 г.)

Исследованы рельеф и механическая упругость живых клеток линий A549 и L41. Для минимизации разрушающего воздействия атомно-силового микроскопа на клетку и повышения точности измерений модуля упругости использованы специальные зонды, на кончике которых зафиксирована одиночная коллоидная наногранула аморфного SiO₂. Продемонстрирован способ изготовления таких зондов.

Введение

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) [1] расширяет доступ к информации о разнообразных локальных свойствах поверхности образца [2]. По пространственному разрешению методики АСМ сопоставимы с электронной микроскопией, но в отличие от нее проведение исследований в вакууме не является обязательным условием. Более того, образец может находиться даже в жидкости в условиях, например, близких к физиологическим. Последнее обстоятельство мотивирует создание на базе АСМ инструмента для клеточной биологии, обеспечивающего исследование мягких, живых клеток эукариот с субмикронным и нанометровым разрешением. Пионерами этого направления были группы Пауля Хансмы из Калифорнийского университета в Санта-Барбаре [3] и нобелевского лауреата Герда Биннига из ИВМ в Мюнхене [4]. Последующее развитие исследований отражено, например, в обзорах [5,6]. Современная картина в области, однако, все еще далека от состояния рутинных методов.

Изучать в АСМ рельеф биообъекта, подвешенного в растворе, не удастся, так как требуется закрепить образец на подложке. Улучшенную адгезию клеток к поверхности дает обработка подложек полилизинном [7]. Живые клетки можно ограничить в движении, поместив в поры трековой мембраны [8,9]. Очень элегантен вариант зафиксировать индивидуальную клетку на кончике микропипетки [5]. В АСМ датчик силы взаимодействия, кантилевер, несет очень острый пирамидальный зонд, и необходимо позаботиться сохранить целостность мягкого биообъекта при зондировании. Среднеквадратичная амплитуда тепловых вибраций у кантилеверов пониженной жесткости (0.01–0.03 N/m) [10] составляет примерно 0.5 nm [11]. Отклонение такого кантилевера

от равновесия надежно регистрируется на фоне шумов, если клетка будет отталкивать зонд с силой более 10 pN. У живой клетки эукариот характерный модуль Юнга 1 kPa [12], и необходимая противодействующая сила возникает при внедрении пирамиды зонда в материал клетки на глубину порядка 100 nm [13]. АСМ-измерение, таким образом, довольно сильно возмущает форму клетки. Было показано [13], что в рельефе АСМ-изображений живых клеток (кардиомиоцитов [14], глиальных клеток [15], фибробластов [16]) отображаются особенности распределений актиновых или тубулиновых полимерных сетей, которые могут играть роль своеобразного каркаса (цитоскелета) клетки, ее двигательного аппарата или, например, системы коммуникаций между органеллами [17]. В работе [18] отмечалось, что глиальные клетки XR1 после АСМ-исследования остаются жизнеспособными, но происходит накопление фрагментов мембраны на зондирующем острие и даже кантилевере.

Считается, что существенно меньшие возмущения клетки достигаются при измерении рельефа с помощью метода ионной сканирующей микроскопии (Scanning ion conductance microscopy) [19–21], в котором расстояние зонд–объект регулируется не по силовому взаимодействию, а по величине ионного тока. В АСМ значительное уменьшение деформаций клетки дает замена острия на так называемый микроколлоидный зонд, в котором микронная сферическая коллоидная частичка калиброванных размеров приклеена к кантилеверу. Микроколлоидные зонды успешно применяются в исследованиях живых клеток [22,23], их можно приобрести или изготовить самостоятельно по процедуре, описанной в ряде работ [23,25]. При использовании таких зондов пространственное разрешение АСМ ухудшается до уровня в несколько микрон.

В настоящей работе рассмотрен способ фиксации одиночной сферической коллоидной частицы диаметром несколько сотен нанометров на самом кончике пирамидальной иглы АСМ-кантилевера. Такие специальные зонды сохраняют разрешение АСМ на субмикронном уровне. Представлены результаты применения зондов для исследования рельефа и локальных механических свойств живых клеток.

Методы и материалы

Исследовались живые клетки двух линий: 1) L41 — лимфобластоидная клеточная линия лейкомиического происхождения, 2) А549 — эпителиальные клетки карциномы легкого человека. Клетки культивировались по стандартной методике для монослойных культур, описанной в [26], в пластиковых чашках Петри диаметром 40 мм. Использовались стандартная ростовая среда и среда, в которую добавлялся растворимый в воде комплекс С₆₀/ПВП (фуллерен/поливинилпироллидол) с целью выявить влияние фуллерена на механические свойства клеток. Ранее было показано, что в малых концентрациях С₆₀/ПВП не токсичен для клеток в культуре, и даже обладает защитным действием против вызванной УФ-облучением фототоксичности клеток [27,28]. Зрелые клетки транспортировались из НИИ гриппа в ФТИ в герметичном термостатируемом контейнере. Непосредственно перед АСМ-исследованиями питательный раствор из пластиковой чашки Петри с образцами клеток замещался физиологическим раствором при комнатной температуре. Все АСМ-эксперименты с клетками выполнялись в течение 8 h после замены питательного раствора.

АСМ-исследования клеток велись в сканирующей зондовой лаборатории Интегра Аура производства НТМДТ (Москва) с помощью промышленных кантилеверов [10,29], на кончик зонда которых крепилась одиночная гранула аморфного SiO₂ (a-SiO₂). Водные коллоиды микро- и наносфер различных материалов коммерчески доступны [30], возможно выбор величины диаметра в диапазоне от 20 nm до 5 μm. Авторы использовали два типа a-SiO₂ гранул, диаметром 250 и 650 nm и с дисперсией размеров менее 5%, водные коллоиды которых были изготовлены в ФТИ им. А.Ф. Иоффе по методике, описанной в работах [31,32]. С помощью аэрографа Evolution [33] коллоиды распылялись на очищенные от органических загрязнений кремниевые подложки с естественным окислом. Для закрепления гранулы на зонде использовался клей повышенной вязкости, твердеющий при УФ-облучении [34]. Наличие гранулы на самом кончике проверялось в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) CrossBeam Neon40ESB производства Carl Zeiss.

Рельеф клеток измерялся в жидкостной ячейке в полуконтактном режиме, когда осциллирующий на частоте свободного резонанса зонд периодически постукивает

по поверхности. Данные систематизировались по параметру средней за период силы постукивания $\langle F_{ts} \rangle$. Она вычислялась, считая время упругого контакта много меньше периода осцилляций по выражению, следующему из теории работы [35]:

$$\langle F_{ts} \rangle = k_C (2Q)^{-1} \sqrt{A_0^2 - A^2}.$$

Все переменные, входящие в выражение для силы, можно определить экспериментально: A_0 и A — свободная и соответственно рабочая амплитуды осцилляций, Q — добротность теплового пика в жидкости, k_C — жесткость кантилевера, которая измерялась по алгоритму Садера [36].

Локальные механические свойства клетки определялись по зависимостям силы F давления зонда на образец от вертикальной z координаты образца, которые измерялись, не переключаясь в контактный АСМ-режим. Контактная жесткость, k_S , вычислялась как

$$k_S = k_C \cdot S / (S_0 - S), \quad (1)$$

где S и S_0 — тангенс угла наклона $F(x)$ кривых на клетке и соответственно на твердой подложке. Если привести кантилевер в контакт с мягким образцом и переместить образец на высоту Δz , то кантилевер отогнется от поверхности на величину, меньшую Δz , так как происходит еще и индентация (продавливание, деформация) поверхности образца на глубину h_1 . Выражение (1) следует из равенства сил прижима кантилевера к поверхности образца ($F_C = k_C \cdot \Delta z \cdot S / S_0$) и упругой реакции образца на деформацию ($F_S = k_S \cdot \Delta z \cdot (S_0 - S) / S_0 = k_S \cdot h_1$).

Индентор был сферическим зондом известного радиуса кривизны R , и для оценки локального модуля Юнга клетки E_S использовались соотношения теории Герца упругого контакта сфера–плоскость [37] (коэффициент Пуассона брался $\nu = 1/2$):

$$F = 4E_S \sqrt{R \cdot h_1^3 / 3(1 - \nu^2)} = 1.7 E_S \sqrt{R \cdot h_1^3},$$

$$E_S = ((1 - \nu^2) / 2) \cdot (k_S / \sqrt{R \cdot h_1}) = 0.375 k_S / \sqrt{R \cdot h_1}. \quad (2)$$

Способ изготовления субмикронных коллоидных зондов калиброванного радиуса кривизны

На рис. 1 показаны АСМ-изображения агломератов монодисперсных сферических гранул из a-SiO₂ диаметром 250 nm, осажденных распылением их 5%-го водного коллоида на Si-подложку с естественным окислом. Сначала в полуконтактном режиме было получено изображение на рис. 1, а. Затем для перемещения зонда вдоль стрелки, наложенной на изображение, АСМ был временно переведен в контактный режим. После манипуляции было обнаружено другое расположение гранул (рис. 1, б). Рассмотрим, что произошло с цепочкой

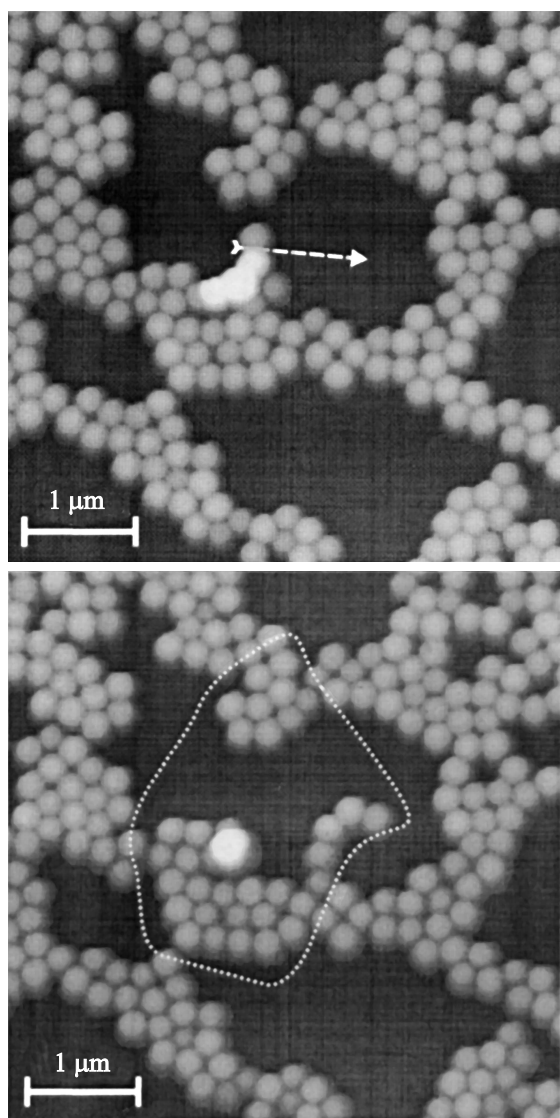


Рис. 1. Манипуляция α -SiO₂ наногранулами на поверхности Si. Полуконтактные АСМ-изображения участка поверхности с агломератами гранул до (a) и после (b) манипуляций. Траектория движения зонда во время манипуляции в контактном режиме задана стрелкой на (a). Использован кантилевер NSG01.

из трех гранул второго слоя, отличающихся на рис. 1, a по самому светлому контрасту. Правая гранула теперь замыкает цепочку из пяти гранул первого слоя и стала самой правой в обведенной на рис. 1, b области. Левая гранула осталась во втором слое и сместилась вправо примерно на половину диаметра. Средняя гранула перешла в первый слой. Этот пример, а также обсуждаемые ниже данные на рис. 2 демонстрируют контролируемые перемещения отдельных гранул с помощью АСМ. Такая возможность реализуется благодаря тому, что 250 nm α -SiO₂ гранулы сцеплены друг с другом и подложкой достаточно сильно, чтобы при визуализации в полуконтактном режиме не нарушалось расположение гранул. Одновременно силы сцепления достаточно низки, чтобы

a

позволить двигать выбранную гранулу в контактном режиме. Если считать, что гранула держится на естественно окисленном кремнии за счет капиллярных сил, то уровень сил сцепления можно оценить по известной формуле: $F_{ADH} = 4\pi \cdot \sigma \cdot R$ [37,38]. Для коэффициента поверхностного натяжения воды $\sigma = 0.073$ N/m и ради-

b

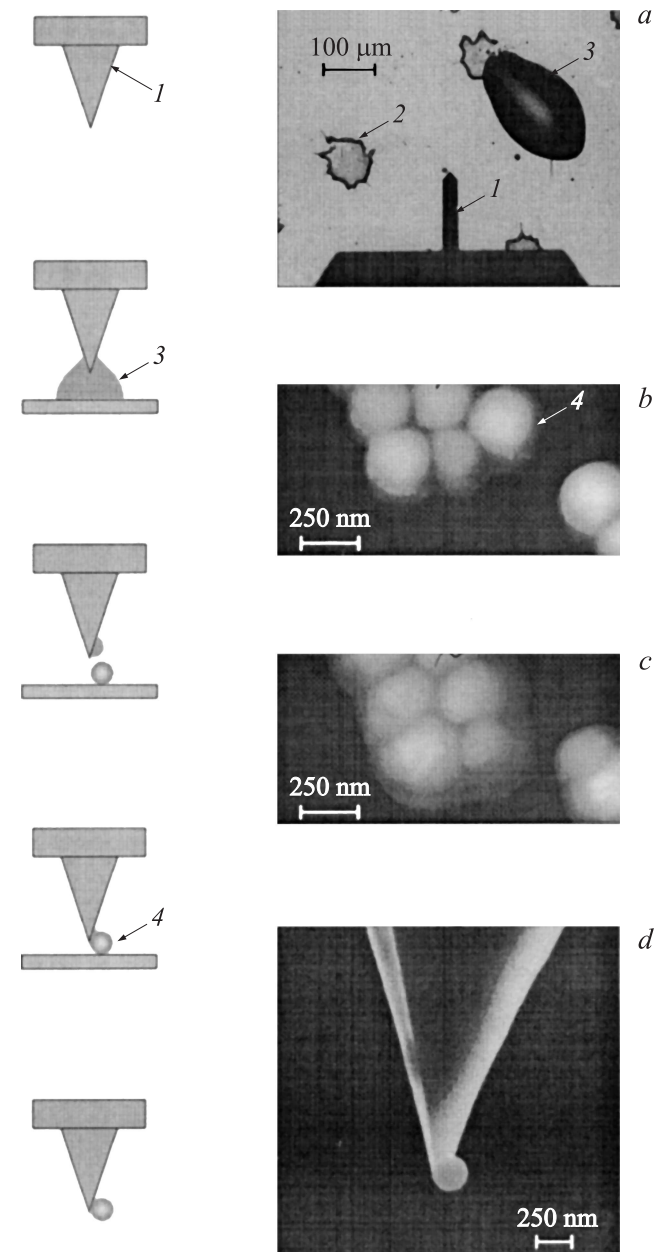


Рис. 2. Метод изготовления субмикронного сферического зонда с калиброванным радиусом кривизны. Оптическая фотография рабочего места (a). Полуконтактные АСМ-изображения участка поверхности с агломератами гранул до (b) и после (c) манипуляций. СЭМ-фотография зонда с коллоидной α -SiO₂ гранулой диаметром 250 nm. 1 — кантилевер, 2 — жидкая капля клея, 3 — агломерат гранул, 4 — гранула, выбранная для закрепления на зонде. В левой колонке рисунка приведена схема основных стадий изготовления зонда. Использован кантилевер CSG30.

уса гранулы $R = 125 \text{ nm}$ формула дает $F_{ADH} \approx 100 \text{ nN}$. Полученный уровень сил сцепления существенно больше типичной силы взаимодействия в полуконтактном режиме [35]. Одновременно он с запасом попадает в диапазон сил взаимодействия, достижимых в контактом режиме [2], и, значит, может быть преодолен.

В левой колонке рис. 2 приведена схема основных стадий изготовления субмикронного коллоидного зонда с калиброванным радиусом кривизны: нанесение клея на кончик работоспособного АСМ-зонда, визуализация с помощью этого зонда агломерата монодисперсных коллоидных гранул, захват выбранной гранулы на кончик зонда, задубливание клея и проверка наличия гранулы на кончике.

На оптической фотографии на рис. 2, а стрелкой 3 отмечена жидкая капля клея UV 50, по размерам сопоставимая с длиной кантилевера, около двухсот микрон. Как показали АСМ-измерения, затвердевшие на окисленной поверхности Si капли клея оказываются очень пологими, с углом смачивания менее 10° . Если для простоты считать каплю сферическим сегментом, то его высота h выражается через угол смачивания θ и радиус основания r как: $h = r \cdot \text{tg}(\theta/2)$. Для $\theta \leq 10^\circ$ и $r \approx 100 \mu\text{m}$ получаем $h < 8 \mu\text{m}$. Согласно информации производителя [10], высота пирамидального зонда составляет $15\text{--}20 \mu\text{m}$, и капля на рис. 2, а удобно подходит для клеевой обработки его самого кончика.

Полуконтактное изображение рельефа участка сканирования подложки с 250 nm гранулами на рис. 2, б получено, используя зонд с капельками клея вблизи кончика. В середине изображения наблюдается агломерат из пяти гранул, стрелка указывает на гранулу, выбранную для закрепления на зонде. Кончик зонда в полуконтактном режиме помещался на нижнюю часть этой гранулы, а затем на несколько секунд АСМ переводился в контактный режим с уровнем силы прижима более 100 nN . Изображение того же участка сканирования, полученное после манипуляции, позволяет предположить, что выбранная гранула приклеилась к передней грани пирамиды зонда (рис. 2, в). Есть, в частности, три свидетельства: во-первых, в агломерате стало на одну гранулу меньше; во-вторых, заметно увеличилось размеры гранулы в изображении; в-третьих, на рис. 2, в агломерат гранул кажется смещенным вниз. СЭМ-изображение кончика зонда на рис. 2, д подтверждает, что 250 nm гранула действительно прикреплена к передней части пирамиды. Паспортизацию зонда не обязательно осуществлять в СЭМ. Используя калибровочную решетку TGT1 для проверки качества игл [39], можно обойтись только возможностями АСМ.

СЭМ-изображение на рис. 3 представляет вид сверху на вершину пирамидального зонда, на передней правой грани которого закреплена 650 nm сферическая гранула. Непосредственно за гранулой обнаруживается капля клея микронных размеров, стрелки на рисунке указывают на некоторые капли меньших размеров на оставшихся передних и задних гранях пирамиды. К одной из

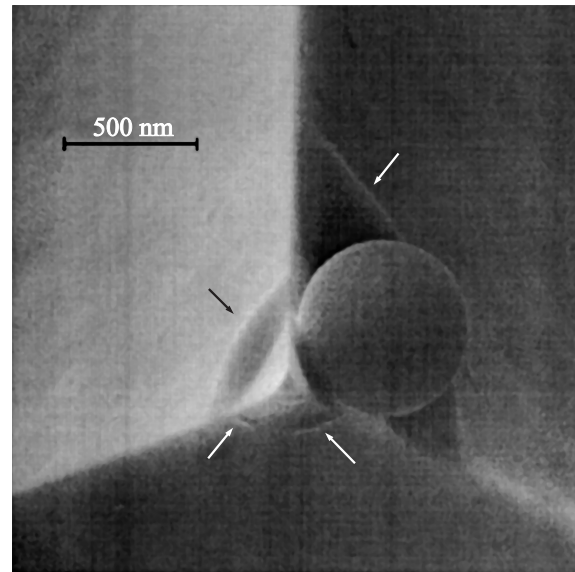


Рис. 3. СЭМ-фотография зонда с коллоидной $\alpha\text{-SiO}_2$ гранулой диаметром 650 nm . Стрелками отмечены капли клея на разных гранях пирамидального зонда. Использован кантилевер FMG01.

таких меньших капель и приклеена гранула. Если при использовании зонда жидкие следы клея контактируют с поверхностью образца, то это может вносить нестабильность в процесс сканирования. При изготовлении зонда, показанного на рисунке, в контакт с образцом вступала либо свободная от клея вершина острия, либо чистая сферическая поверхность гранулы. Поэтому клей не мешал процессу сканирования.

Клеевое соединение 650 nm гранулы с гранью наблюдается как область темного контраста на периферии проекции гранулы слева и внизу (рис. 3) и простирается примерно на $D \approx 350 \text{ nm}$. Согласно информации производителя, после задубливания клей UV 50 демонстрирует прочность на разрыв $E \approx 10^7 \text{ Pa}$ [34]. Исходя из этих данных, можно прогнозировать, что клеевое соединение выдержит нагрузку порядка $1 \mu\text{N}$. Сохранение позиции гранулы на острие после нескольких десятков индетационных тестов с таким уровнем нагрузки было недавно продемонстрировано [40].

Экспериментальные результаты и обсуждение

При АСМ-исследовании живой клетки желательнее, чтобы контактное давление со стороны нанометрового острия стандартного зонда поддерживалось ниже уровня прочности объекта, иначе такие измерения могут стать разрушающими. Коллоидные зонды субмикронного радиуса кривизны дают возможность понизить уровень контактного давления и сохранить целостность клетки за счет ухудшения разрешения в плоскости до

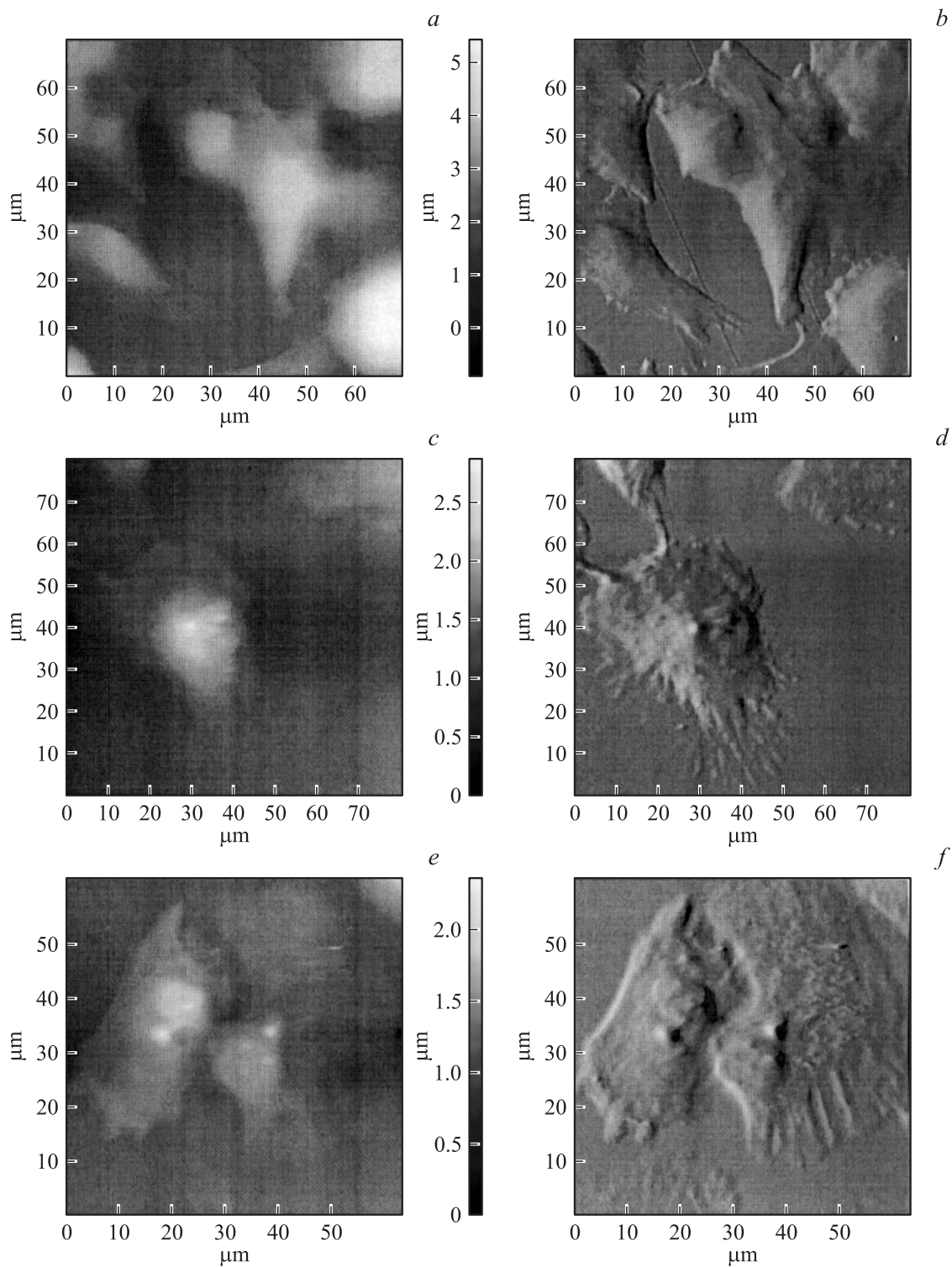


Рис. 4. АСМ-изображения рельефа живых клеток. Клетки L41 (a) и (b), а также клетки A549 (c) и (d), выращенные в стандартной среде; клетки A549 (e) и (f) выращены в среде с добавкой C_{60} /ПВП. Тоновым топографиям (a), (c) и (e) соответствуют градиентные изображения (b), (d) и (f), полученные подсветкой слева. Изображения регистрировались в полуконтактном режиме с помощью зонда с $a\text{-SiO}_2$ гранулой $D = 650$ nm, $\langle F_{ts} \rangle = 0.55$ nN. Использован кантилевер CSC12_C.

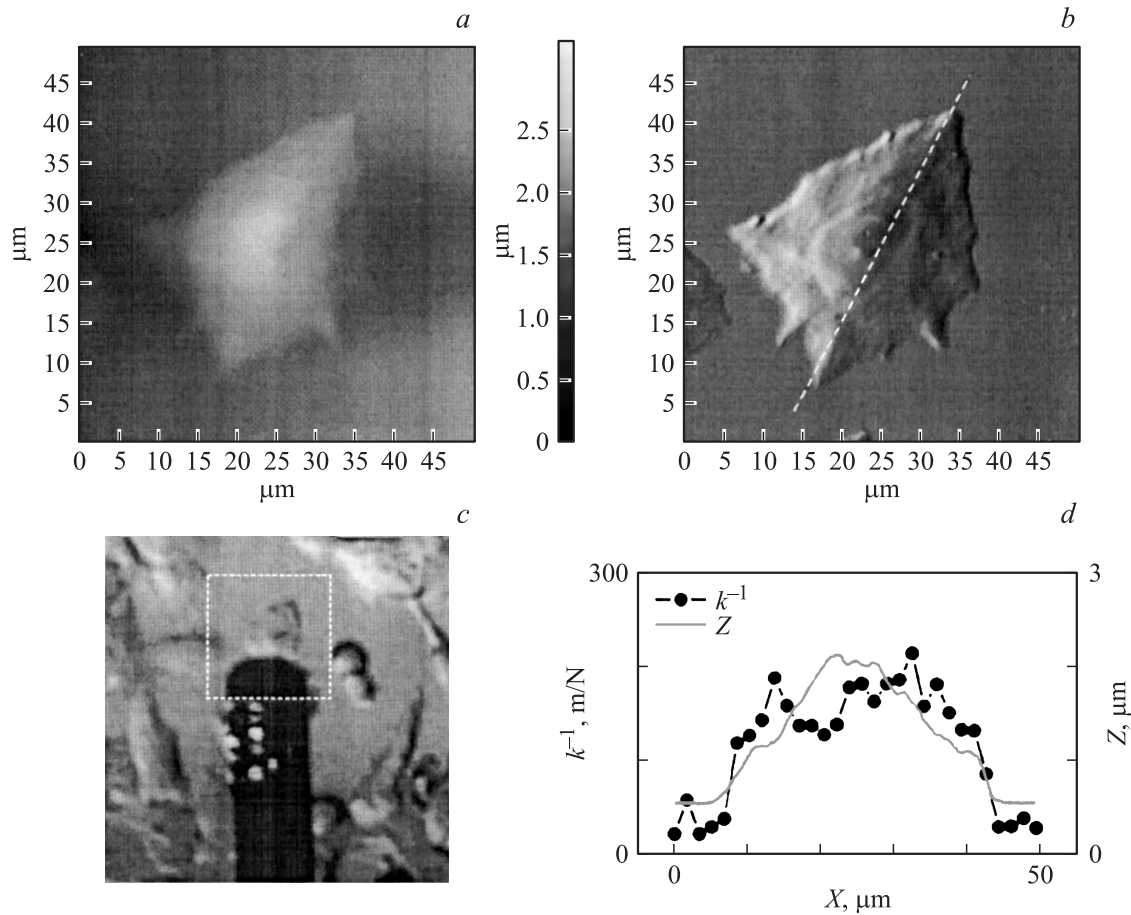


Рис. 5. Исследование механических свойств живых клеток L41, выращенных в среде с добавкой C_{60} /ПВП. Тоновая АСМ-топография (a) и соответствующее градиентное изображение (b), полученное подсветкой слева. Оптическая фотография АСМ-кантилевера над колонией клеток (c). Профили высоты (Z) и податливости (k^{-1}) клетки, снятые вдоль линии (b), (d). Изображения регистрировались в полуконтактном режиме с помощью зонда с α -SiO₂ гранулой $D = 650$ nm, $\langle F_{ts} \rangle = 0.6$ nN. АСМ-кадр указан на оптическом изображении пунктирным квадратом. Использован кантилевер CSC12_C.

известного уровня, который определяется диаметром прикрепленной гранулы. Полученные с помощью таких зондов полуконтактные АСМ-изображения живых клеток двух различных линий представлены на рис. 4 и 5.

На рис. 4, a и b приведены АСМ-изображения рельефа группы (около десяти) живых клеток L41, культивируемых в стандартной ростовой среде, использовался зонд со сферической α -SiO₂ гранулой диаметром $D = 650$ nm, средняя сила взаимодействия $\langle F_{ts} \rangle = 0.55$ nN. У клеток L41 выявляется плавный рельеф. Наиболее высокие области, по-видимому, сформированы ядрами, более жестким образованиям по сравнению с остальными частями клетки. Соответствующие ядрам области определяются, однако не всегда однозначно.

Использование зонда с 650 nm гранулой также позволяло исследовать клетки линии A549. Одиночная клетка A549 выглядит в АСМ-изображении на рис. 4, c и d распластанной, в самой высокой части ее рельефа можно выделить ядро диаметром 3–5 μ m. На периферии клетки наблюдаются вытянутые особенности, соответствующие, как можно предположить, активным псевдоподиям [17].

Псевдоподии отвечают за движение и образуются преимущественно в направлении перемещения клетки. На рис. 4, f и e приведены АСМ-изображения пары клеток A549, выращенных в среде, содержащей C_{60} /ПВП. В рельефе обеих клеток четко выражены ядерные области. По сравнению с одиночной клеткой псевдоподии располагаются по периферии клеток несимметрично. Как можно видеть на рис. 4, f, клетки соприкасаются вдоль плавной границы. Выпячивание отростков псевдоподий, вызываемое полимеризацией актина под мембраной, может быть подавлено близостью к другой клетке, что известно как эффект так называемого контактного торможения [17]. Завершая анализ, стоит подчеркнуть, что в данных на рис. 4, c–e, а также не представленных в настоящей работе изображениях клеток A549, каких-либо специфических особенностей рельефа, проявляющих разные условия культивирования клеток, замечено не было.

Рассмотрим на рис. 5 результаты исследования механических свойств живых клеток L41, культивировавшихся в среде C_{60} /ПВП. Наблюдается хорошее соответствие

Данные АСМ-измерений модуля Юнга живых клеток

Образец	Число проанализированных клеток	E_S , модуль Юнга, кПа
L41 контроль	4	17.9 ± 1.3
L41 + C ₆₀ /ПВП	2	17.5 ± 1
A549 контроль	3	3.8 ± 1.9
A549 + C ₆₀ /ПВП	4	7.7 ± 2.8

контуров клетки в АСМ-изображениях на рис. 5, *a* и *b* с контурами клетки в области АСМ-сканирования, выделенной на оптической фотографии на рис. 5, *c*. Оптическая фотография была получена после АСМ-измерений и дополнительно свидетельствует в пользу того, что АСМ-воздействие использованного 650 нм зонда сохраняет целостность клетки и не открепляет ее от поверхности подложки. Открепившиеся клетки легко опознать в оптическом изображении, так как в подвешенном состоянии они имеют сферическую форму, см., например, на рис. 5, *c* два пузырька, примыкающие справа к области АСМ-сканирования. При анализе механических свойств профиль обратной жесткости (податливости, котангенса угла наклона $F(z)$ кривых) можно сопоставить с соответствующим профилем высоты рельефа клетки (рис. 5, *d*). При измерении силовых кривых глубина индентации задавалась меньше радиуса гранулы (325 нм). Поскольку высота клетки $\sim 2 \mu\text{m}$, паразитный вклад в измеряемые значения жесткости от твердой подложки мал [41], и на воздействие откликается сравнительно тонкий поверхностный слой. Можно отметить, что максимум высоты рельефа приходится на область несколько пониженной податливости — повышенной жесткости. Это согласуется с предположением, что наиболее высокие области содержат более жесткие по сравнению с остальными частями клетки образования, например ядро.

Такого рода измерения на других образцах были использованы для определения средних значений модуля Юнга клеток (см. таблицу). Полученные данные по порядку величины согласуются с результатами других исследователей [22,42]. Данные по модулю Юнга помогают анализу изображений на рис. 4 и 5. Используя значение средней силы взаимодействия $\langle F_{ts} \rangle = 0.55 \text{ nN}$, можно оценить среднее давление зонда на клетку во время сканирования: $\langle P_{ts} \rangle \approx \langle F_{ts} \rangle / \pi R^2 \approx 2 \text{ kPa}$. Среднее давление на клетку А549 и ее модуль Юнга близки по порядку величины. Это совпадение помогает прояснить отличия в рельефе клеток А549 и L41. Действительно, чем мягче клетка, тем глубже деформируется при сканировании. В результате в АСМ-изображении рельеф клеток А549 в значительно большей степени сформирован механическим ответом на воздействие зонда разнообразных внутриклеточных структур, чем рельеф клеток L41.

Согласно данным таблицы, присутствие фуллеренов в ростовой среде действует только на клетки А549. Они упрочняются почти в 2 раза. Можно предположить, например, координационную роль фуллерена [40], приводящую к возникновению дополнительных связей в актиновых или микротубулиновых полимерных сетях. Это подразумевает, что фуллерен проникает внутрь клетки. В силу известной гидрофобности фуллерена представляется вероятным ожидать обнаружить его следы в липидном слое межклеточной мембраны, механические свойства которой он может модифицировать. Но гидрофильный комплекс C₆₀/ПВП, скорее, мог накапливаться внутри клетки [43]. Поэтому вполне возможно, что изменение механических свойств клетки в присутствии C₆₀/ПВП в ростовой среде проявляет разную проницаемость межклеточных мембран у двух изученных линий. Достаточных оснований для такого вывода, однако, пока нет, так как L41 почти на порядок жестче, чем А549, и эффект упрочнения в L41 может нивелироваться на фоне ошибки измерений. Для уточнения результатов наиболее важно исключить воздействие на живые клетки условий транспортировки. Для этого требуется проводить АСМ-исследования в непосредственной близости от места культивирования клеток.

Выводы

Проанализированы факторы, сдерживающие развитие на базе АСМ-диагностики тактильных исследований мягких, живых клеток млекопитающих с субмикронным и нанометровым разрешением.

Рассмотрен способ надежного закрепления на самом кончике зонда АСМ-кантилевера одиночной субмикронной сферической частицы $\alpha\text{-SiO}_2$ калиброванного радиуса кривизны. Этот способ можно также применять для изготовления специальных зондов с одиночными коллоидными частицами других материалов.

Специальные зонды использованы для неразрушающего исследования живых клеток линий А549 и L41. Выявлены четырехкратная разница в величине модуля Юнга и отличия в устройстве рельефа клеток. Отличия частично объясняются тем, что поверхность мягких клеток А549 сильнее деформируется АСМ-зондом, и в наблюдаемом рельефе проявляются внутриклеточные структуры. Вместе с тем поверхность жестких клеток L41 возмущена меньше, а наблюдаемый рельеф ближе к естественной, плавной форме поверхности клетки, контактирующей с жидкостью.

Авторы благодарны В.В. Исаеву-Иванову за возбуждение интереса к тактильным исследованиям живых клеток и М.В. Филатову за сделанные замечания, ПИЯФ им. Б.П. Константинова (Гатчина), а также О.В. Сафроновой и А.Б. Шубину, НТ МДТ (Зеленоград) за помощь в изготовлении специальных зондов.

Работа поддержана грантами РФФИ 12-01-00815-а и 12-08-00389-а, грантом CARL ZEISS, грантом президента РФФИ-3008.2012.2 и проектом „Умник“ (контракт № р/10263).

Список литературы

- [1] *Binnig G., Quate C.F., Gerber C.* // Phys. Rev. Lett. 1968. Vol. 56. P. 930–933.
- [2] *Миронов В.Л.* Основы сканирующей зондовой микроскопии. Нижний Новгород: ИФМ РАН, 2004. 114 с.
- [3] *Butt H.-J., Wolff E.K., Gould S.A.C., Dixon Northern B., Peterson C.M., Hansma P.K.* // J. of Structural Biology. 1990. Vol. 105. N 1–3. P. 54–61.
- [4] *Häberle W., Hörber J.K.H., Binnig G.* // JVST. B. 1991. Vol. 9. P. 1210–1213.
- [5] *Ohnesorge F.M., Horber J.K.H., Haberle W., Czerny C.-P., Smith D.P.E., Binnig G.* // Biophys. J. 1997. Vol. 73. P. 2183–2194.
- [6] *Edited by Wang Y.L., Discher D.E.* Cell Mechanics Book Series: Methods in Cell Biology San Diego: Elsevier Academic Press Inc. 2007. Vol. 83. P. 347–372.
- [7] *Mazia D., Schatten G., Sale W.* // Cell Biology. 1975. Vol. 66. N 9. P. 198–200.
- [8] *Kasas S., Ikai A.* // Biophys. J. 1995. Vol. 68. P. 1678–1680.
- [9] *Alsteens D., Dupres V., McEvoy K., Wildling L., Gruber H.J., Dufrene Y.F.* // Nanotechnology. 2008. Vol. 19. P. 384 005 (9 p.)
- [10] <http://www.ntmdt-tips.com/products/view/esg01>;
<http://probe.olympus-global.com/en/product/biolever.cfm>
- [11] *Butt H.-J., Jaschke M.* // Nanotechnology. 1995. Vol. 6. P. 1–7.
- [12] *Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I.* // Micron. 2007. Vol. 38. P. 824–833.
- [13] *Edited by Jena P., Horber J.K.H.* Atomic Force Microscopy in Cell Biology Book Series: Methods in Cell Biology. San Diego: Elsevier Academic Press Inc. 2002. Vol. 68. P. 67–90.
- [14] *Domke J., Parak W.J., George M., Gaub H.E., Radmacher M.* // Eur. Biophys. J. 1999. Vol. 28. P. 179–186.
- [15] *Henderson E., Haydon P.G., Sakaguchi D.S.* // Science. 1992. Vol. 257. P. 1944–1946.
- [16] *Rotsch C., Radmacher M.* // Biophys. J. 2000. Vol. 78. P. 520–535.
- [17] *Васильев Ю.А.* // Соросовский образовательный журн. 1996. Вып. 4. С. 4–10.
- [18] *Schaus S., Henderson E.* // Biophys. J. 1997. Vol. 73. P. 1205–1214.
- [19] *Hansma P.K., Drake B., Marti O., Gould S.A., Prater C.B.* // Science. 1989. Vol. 243(4891). P. 641–643.
- [20] *Korchev Y.E., Bashford C.L., Milovanovic M., Vodyanoy I., Lab M.J.* // Biophys. J. 1997. Vol. 73(2). P. 653–658.
- [21] *Rheinlaender J., Geisse N.A., Proksch R., Schaffer T.E.* // Langmuir. 2011. Vol. 27(2). P. 697–704.
- [22] *Sokolov I.* Atomic Force Microscopy in Cancer Cell Research. Cancer Nanotechnology / Ed. by Nalwa H.S., Webster T. Valencia, CA: American Scientific Publishers Inc. 2007. P. 1–17.
- [23] *Spagnoli C., Beyder A., Besch S., Sachs F.* // Phys. Rev. E. 2008. Vol. 78. P. 031 916. (6p).
- [24] *Mak L.H., Knoll M., Weiner D., Gorschluter A., Schirmeisen A., Fuchs H.* // Rev. Sci. Instr. 2006. Vol. 77. P. 046 104 (3p).
- [25] *Yang Gan.* // Rev. Sci. Instrum. 2007. Vol. 78. P. 081 101 (8p).
- [26] *Соминина А.А.* Методические рекомендации по работе с клеточными культурами и средами. Изд-во ВНИИ гриппа МЗ СССР, 1975. 43 с.
- [27] *Пиотровский Л.Б., Еропкин М.Ю., Еропкин Е.М., Думлис М.А., Киселев О.И.* // Психофармакол. биол. наркол. 2007. Вып. 7 (2). С. 1548–1554.
- [28] *Еропкин М.Ю., Пиотровский Л.Б., Еропкина Е.М., Думлис М.А., Литасова Е.В., Киселев О.И.* // Эксп. клинич. фармакол. 2011. Т. 74. № 1. С. 28–31.
- [29] <http://www.spmtips.com/main/>
- [30] <http://microspheres-nanospheres.com>
- [31] *Stöber W., Fink A., Bohm E.* // J. Colloid Interface Sci. 1968. Vol. 26. P. 62–69.
- [32] *Трофимова Е.Ю., Алексенский А.Е., Грудинкин С.А., Коркин И.В., Курдюков Д.А., Голубев В.Г.* // Коллоид. журн. 2011. Вып. 73. С. 535–539.
- [33] <http://www.germanairbruch.com/>
- [34] <http://www.fixme.ru/products/ritelok/uv.html>
- [35] *San Paulo A., Garci'a R.* // Phys. Rev. B. 2001. Vol. 64. P. 193 411 (4p).
- [36] *Sader J.E.* // J. Appl. Phys. 1998. Vol. 84. P. 64–76.
- [37] *Bhushan B.* Handbook of Micro/Nanotribology 2nd ed. / Boca Raton etc.: CRC Press. 1999. 859 p.
- [38] *Рехвиашвили С.Ш., Розенберг Б.А., Дремов В.В.* // Письма в ЖЭТФ. 2008. Вып. 88(11). С. 887–891.
- [39] <http://www.ntmdt-tips.com/products/view/tgt1>.
- [40] *Няпшаев И.А., Анкудинов А.В., Возняковский А.П.* // ФТТ. 2011. Вып. 53. N 9. С. 1783–1791.
- [41] *Dimitriadis E.K., Horkay F., Maresca J., Kachar B., Chadwick R.S.* // Biophys. J. 2002. Vol. 82. P. 2798–2810.
- [42] *Rico F., Roca-Cusachs P., Gavara N., Farré R., Rotger M., Navajas D.* // Phys. Rev. E. 2005. Vol. 72. P. 921 914 (10p).
- [43] *Chen R., Ratnikova T.A., Stone M.B., Lin S., Lard M., Huang G., Hudson J.S., Ke P.C.* // Small. 2010. Vol. 6. N 5. P. 612–617.