

УДК 57.085.23+577.353.2

DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-2-115-122

Колхицин изменяет структуру цитоскелета фибробластов: количественное исследование адаптивной клеточной реакции методами атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

М. М. Халисов¹, В. А. Пеннийнен¹, С. А. Подзорова¹, К. И. Тимошук¹, А. Д. Розенблит¹,
Б. В. Крылов^{✉1}

¹ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

Сведения об авторах

Максим Миндигалеевич Халисов,
SPIN-код: 5815-3655,
Scopus AuthorID: 56771519000,
e-mail: hamax@list.ru

Валентина Альбертовна
Пеннийнен,
SPIN-код: 6610-3718,
Scopus AuthorID: 26535039500,
e-mail: pvalentina2@yandex.ru

Светлана Александровна
Подзорова,
SPIN-код: 3974-3430,
Scopus AuthorID: 6602224180,
e-mail: sveap@yandex.ru

Кирилл Игоревич Тимошук,
SPIN-код: 8075-1157,
Scopus AuthorID: 57193425814,
e-mail: kirill_timoshhuk@rambler.ru

Алина Дмитриевна Розенблит,
SPIN-код: 3294-6891,
e-mail: roz.alina.dm@mail.ru

Борис Владимирович Крылов,
SPIN-код: 3946-6408,
Scopus AuthorID: 7004655760,
e-mail: krylov@infran.ru

Для цитирования:

Халисов, М. М.,
Пеннийнен, В. А.,
Подзорова, С. А.,
Тимошук, К. И.,
Розенблит, А. Д.,
Крылов, Б. В. (2020) Колхицин
изменяет структуру цитоскелета
фибробластов: количественное
исследование адаптивной
клеточной реакции методами
атомно-силовой и конфокальной
лазерной сканирующей
микроскопии. *Интегративная
физиология*, т. 1, № 2, с. 115–122.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-
2-115-122

Аннотация. Исследовано действие колхицина на примере первичной культуры фибробластов сердца новорожденных крысят методами атомно-силовой и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Хорошо известно, что действие колхицина приводит к разрушению микротрубочек клеток. С другой стороны, этот агент используется в качестве лекарственной субстанции в терапии ряда патологий. Однако молекулярные механизмы его действия остаются малоизученными. Данные атомно-силовой микроскопии показали, что колхицин в концентрации 1 мкг/мл приводит к увеличению жесткости фибробластов, причем более выраженная реакция наблюдается у фибробластов со стресс-фибриллами: их средний модуль Юнга был на 60 % выше, чем у контрольных клеток. Применение конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показало, что колхицин вызывает у фибробластов увеличение интенсивности флуоресценции F-актина в среднем на 40 % относительно контрольного уровня. Полученные результаты позволяют заключить, что колхицин, ингибирующий полимеризацию тубулиновых микротрубочек, запускает компенсаторную реакцию клетки, увеличивающую жесткость фибробластов благодаря запуску полимеризации актина. Подход, использованный в настоящей работе, может быть применен для количественного анализа молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов на этапе их доклинических исследований.

Ключевые слова: фибробласты, колхицин, атомно-силовая микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, стресс-фибриллы.

Получена 29 августа 2019;
прошла рецензирование
15 сентября 2019;
принята 18 сентября 2019.

Финансирование: Работа
поддержана Программой
фундаментальных научных
исследований государственных
академий наук на 2013–2020 гг.
(ГП-14, раздел 64) и РФФИ (грант
№ 18-015-00079).

Права: © Авторы (2020).
Опубликовано Российским
государственным педагогическим
университетом им. А. И. Герцена.
Открытый доступ на условиях
лицензии CC BY-NC 4.0.

The effect of colchicine on the structure of the fibroblast cytoskeleton: A quantitative study of an adaptive cell response by means of atomic force and confocal laser scanning microscopy methods

M. M. Khalisov¹, V. A. Penniyaynen¹, S. A. Podzorova¹, K. I. Timoshchuk¹, A. D. Rosenblit¹,
B. V. Krylov^{✉1}

¹ Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

Authors

Maksim M. Khalisov,
SPIN: 5815-3655,
Scopus AuthorID: 56771519000,
e-mail: hamax@list.ru

Valentina A. Penniyaynen,
SPIN: 6610-3718,
Scopus AuthorID: 26535039500,
e-mail: pvalentina2@yandex.ru

Svetlana A. Podzorova,
SPIN: 3974-3430,
Scopus AuthorID: 6602224180,
e-mail: sveap@yandex.ru

Kirill I. Timoshchuk,
SPIN: 8075-1157,
Scopus AuthorID: 57193425814,
e-mail: kirill_timoshchuk@rambler.ru

Alina D. Rosenblit,
SPIN: 3294-6891,
e-mail: roz.alina.dm@mail.ru

Boris V. Krylov,
SPIN: 3946-6408,
Scopus AuthorID: 7004655760,
e-mail: krylov@infran.ru

For citation: Khalisov, M. M.,
Penniyaynen, V. A.,
Podzorova, S. A., Timoshchuk, K. I.,
Rosenblit, A. D., Krylov, B. V. (2020)
The effect of colchicines
on the structure of the fibroblast
cytoskeleton: A quantitative study
of an adaptive cell response by
means of atomic force and confocal
laser scanning microscopy methods.

Abstract. The effect of colchicine was studied quantitatively in a primary culture of newborn rat cardiac fibroblasts by means of atomic force and confocal laser scanning microscopy. It is an established fact that colchicine has a destructive effect on cellular microtubules. On the other hand, this agent is used as a drug substance in the treatment of a number of pathologies, while the molecular mechanisms of its effect remain poorly understood. Atomic force microscopy data showed that colchicine introduced at the concentration of 1 µg/ml caused an increase in fibroblast stiffness, with a more pronounced reaction in fibroblasts with stress fibres: their average Young's modulus was 60% higher than in control cells. The use of confocal laser scanning microscopy showed that colchicine causes an increase in F-actin fluorescence intensity of fibroblasts by an average of 40% in comparison with the control level. The results suggest that colchicine (1 µg/ml), which inhibits the polymerisation of tubulin microtubules, launches a compensatory cell response that increases the rigidity of fibroblasts by triggering actin polymerisation. The approach used in this work can be used in quantitative analysis of the molecular mechanisms of drug substance effects during preclinical studies.

Keywords: fibroblasts, colchicine, atomic force microscopy, confocal laser scanning microscopy, stress fibres.

Integrative Physiology, vol. 1, no. 2,
pp. 115–122.
DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-
2-115-122

Received 29 August 2019;
reviewed 15 September 2019;
accepted 18 September 2019.

Funding: This research was supported by the Russian Academy of Sciences Fundamental Scientific Research Program for the years 2013–2020 (GP-14, Section 64) and by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 18-015-00079).

Copyright: © The Authors (2020).
Published by Herzen State
Pedagogical University of Russia.
Open access under
CC BY-NC License 4.0.

Введение

Живые клетки содержат систему волокон и микрофиламентов, которые образуют цитоскелет. Цитоскелет участвует в перемещении клеток, с его помощью поддерживается и изменяется их форма, осуществляются внутриклеточные движения органелл, происходит процесс митоза (Chang, Kious, Yorgancioglu et al. 1993). Широкое применение для изучения цитоскелета получил метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), позволяющий визуализировать и количественно исследовать его, в частности после воздействия ряда химических агентов, влияющих на различные компоненты цитоскелета (Timoshchuk, Khalisov, Penniyaynen et al. 2019; Henderson, Haydon, Sakaguchi 1992; Jung, Park, Joo et al. 2011; Liu, Zhang, Li et al. 2018; Rotsch, Radmacher 2000; Spedden, White, Naumova et al. 2012).

Колхицин связывается с субъединицами тубулина, образуя тубулин-колхициновый комплекс, за счет чего ингибирует полимеризацию тубулина в микротрубочки (Mareel, De Mets 1984; Rotsch, Radmacher 2000). Из-за этого ингибирующего эффекта клетки, культивируемые в присутствии колхицина, не могут образовывать веретена и вступать в митоз (Innoe 1981; Rieder, Palazzo 1992; Rotsch, Radmacher 2000; Salmon, McKeel, Haas 1984).

При исследовании фибробластов линии Swiss 3T3 было показано, что колхицин (5 мкМ) вызывает активацию полимеризации F-актина (Jung, Shin, Park et al. 1997). Цитируемые авторы установили, что ингибирующий полимеризацию микротрубочек агент колхицин значительно усиливает полимеризацию F-актина по сравне-

нию с контрольными клетками. Данный эффект, по их мнению, был полностью обусловлен увеличением содержания этого белка в стресс-фибриллах исследуемых клеток. Обнаруженный ими механизм объяснялся тем, что деполимеризация микротрубочек приводит к формированию стресс-фибрилл благодаря активации серин/треониновых фосфатаз в фибробластах. Метод АСМ был применен для исследования действия колхицина на фибробласты (Rotsch, Radmacher 2000; Wu, Kuhn, Moy 1998), однако первичные культуры фибробластов теплокровных животных ранее не были исследованы этим методом. Поэтому представляет интерес количественное исследование механизма действия этого агента с помощью методов атомно-силовой и конфокальной микроскопии.

Методы исследования

Культура клеток

Первичная культура фибробластов была получена из сердца новорожденного крысенка. Фибробласты изолировали путем ферментативной обработки в 0,125%-ном растворе трипсина (Sigma, США) с последующим механическим выделением клеток при 4 °С. Полученную клеточную суспензию помещали в питательную среду, содержащую 45 % раствора Хенкса, 40 % среды Игла и 10 % фетальной сыворотки коровы с добавлением инсулина (0,5 ед./мл), 0,6 % глюкозы, глутамина (2 мМ) и гентамицина (100 ед./мл). Изолированные фибробласты культивировали на дне 40 мм пластиковых чашек Петри, предварительно покрытых коллагеном, в CO₂-инкубаторе (Сапуо, Япония) в течение

5 суток при 36,5 °С и 5 % CO₂. В части экспериментов в культуральную среду добавляли колхицин в концентрации 1 мкг/мл. Контрольные фибробласты культивировали в условиях питательной среды стандартного содержания.

Атомно-силовая микроскопия

Изучение нативных фибробластов проводилось с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Catalyst (Bruker, США), встроенного в инвертированный оптический микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), который используется для визуального выбора клеток и контроля их состояния во время АСМ-сканирования. Индентирование (т. е. процесс продавливания АСМ-зондом) фибробластов осуществляли зондами CSG10 (НТ-МДТ СИ, Россия), константы жесткости которых были предварительно откалиброваны с помощью метода тепловых шумов (в среднем величина параметра составляла приблизительно 0,35 Н/м). Физиологически адекватные условия эксперимента обеспечивались путем поддержания температуры клеток на уровне 37 °С, что достигалось за счет подогрева содержащей культуру фибробластов чашки Петри нагревательным элементом под управлением термоконтроллера 335-й модели (Lake Shore Cryotronics, США).

Для изучения механических свойств фибробластов применяли режим АСМ PeakForce QNM, позволяющий картировать локальные механические характеристики нативных клеток с высоким пространственным разрешением. Фибробласты характеризовались «кажущимся» модулем Юнга (Timoshchuk, Khalisov, Penniyaynen et al. 2019), рассчитанным в соответствии с моделью Снеддона, которая предполагает аппроксимацию формы зонда конусом (Sneddon 1965). В рамках этой модели нахождение модуля Юнга производится на основе следующего выражения (Kuznetsova, Starodubtseva, Yegorenkov et al. 2007):

$$F = \frac{2}{\pi} \operatorname{tg} \alpha \frac{E_{\text{sample}}}{1 - \nu_{\text{sample}}^2} h^2,$$

где F — сила взаимодействия зонд-образец, α — половинный угол раствора конуса (зонда), E_{sample} , ν_{sample} и h — модуль Юнга, коэффициент Пуассона и величина деформации образца соответственно. В данной работе фибробласты подвергались АСМ-сканированию с пиковой силой 3 нН. Значения $\alpha = 18^\circ$, $\nu_{\text{sample}} = 0,5$ подставлялись для расчета модуля Юнга.

Размеры области сканирования подбирались индивидуально для каждого фибробласта и со-

ставляли от 40×40 мкм до 70×70 мкм. Как правило, область сканирования включала центральную часть клетки, содержащую ядро, и лишь фрагмент периферии, поскольку зачастую латеральная протяженность фибробласта на подложке превышала максимально допустимые размеры АСМ-кадра. Разрешение АСМ-кадра устанавливалось равным 128×128 точек. В каждой точке измерялась величина модуля Юнга, при дальнейшей обработке производилось усреднение этих величин. Остальные параметры сканирования были следующими: частота строчной развертки — 0,15 Гц, амплитуда и частота индентирования — соответственно 1000 нм и 0,25 кГц.

Обработку полученных АСМ-данных осуществляли с использованием программных пакетов NanoScope Analysis 1.40 и Gwyddion версий 2.50 и 2.53. Каждый фибробласт характеризовали средним значением модуля Юнга, который определяли по всей отсканированной области клетки за исключением края, где толщина клетки минимальна и при индентировании которого вклад в результаты измерения может вносить твердая подложка. Также из рассмотрения исключались участки АСМ-кадров, содержащие различные артефакты.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Прижизненное окрашивание фибробластов осуществляли фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Texas Red (Texas Red[®]-X phalloidin, Life Technologies, США). В работе использовали рабочий раствор Texas Red[®]-X phalloidin с концентрацией 3 мкл/мл. Время экспозиции составляло 60 минут. Фаллоидин высокоспецифично связывается с F-актином и позволяет визуализировать и количественно оценивать актиновый цитоскелет клеток. Texas Red возбуждали при $\lambda = 591$ нм, краситель флуоресцирует в красной области спектра ($\lambda = 608$ нм). Ядра клеток докрашивали 1%-ным раствором специфического флуоресцентного красителя DAPI (Life Technologies, США) в течение 10 минут. Флуоресценция обусловлена встраиванием красителя в малую бороздку двунитевой молекулы ДНК. Свечение возбуждали диодным лазером с длиной волны 405 нм, флуоресценцию регистрировали при $\lambda = 450$ –490 нм.

Для цитологического анализа использовали лазерный сканирующий микроскоп LSM 710 (Carl Zeiss, Германия), интегрированный с инвертированным микроскопом Axio Observer Z1

(Carl Zeiss, Германия) с объективом LD Plan-Neofluar 63x/0.75 Korr. Интенсивность флуоресценции актина определяли, используя для обработки изображений программное обеспечение ZEN_2012 (Carl Zeiss, Германия).

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

Статистическая обработка

Статистическая обработка полученных результатов выполнялась в программных пакетах STATISTICA 10.0 (StatSoft, США) с использованием U-критерия Манна — Уитни. Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Различия принимались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Атомно-силовая микроскопия

Изучение механических свойств фибробластов с помощью АСМ показало, что величины модуля Юнга сильно различаются в разных клетках. Часть фибробластов характеризовалась относительно равномерным распределением величин модуля Юнга по своей поверхности; остальные клетки, напротив, демонстрировали большой разброс значений данного параметра (рис. 1а, б). При этом последние, как правило, были существенно жестче первых. Большая неоднородность значений модуля Юнга у части фибробластов объясняется присутствием на АСМ-карте распределения параметра у таких клеток очень жестких фибриллярных структур (рис. 1б). Эти структуры представляют собой довольно толстые пучки актиновых микрофиламентов — стресс-фибриллы (Ченцов 2010; Rotsch, Radmacher 2000). Необходимо отметить, что стресс-фибриллы могут присутствовать в относительно небольшом количестве в контрольных клетках (рис. 1б). Они вносят определяющий вклад в средние значения модуля Юнга фибробластов. Анализ гистограмм значений модуля Юнга фибробластов показывает, что клетки, не имеющие жестких волокон цитоскелета, характеризуются распределением, по форме близким к нормальному, в то время как распределение значений модуля Юнга фибробластов со стресс-фибриллами отличается наличием «хвоста» в области больших величин параметра (рис. 1в, г). При изучении действия колхицина на фибробласты клетки были разделены на две группы: не содержащие (первая)

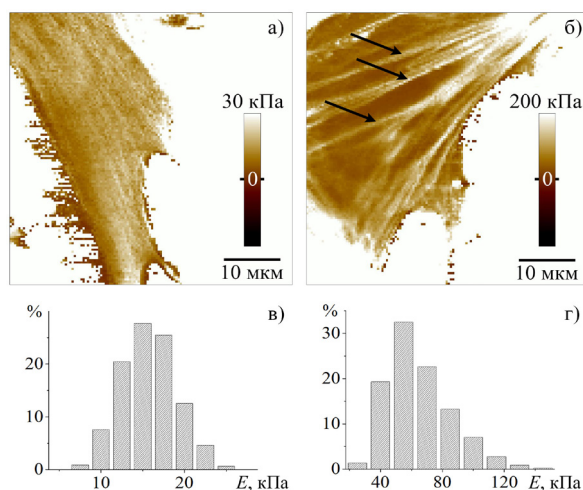


Рис. 1. АСМ-карты распределения модуля Юнга по поверхности нативных контрольных фибробластов: а) без стресс-фибрилл, б) со стресс-фибриллами (стрелками обозначены стресс-фибриллы);

в, г) гистограммы значений модуля Юнга клеток а и б соответственно.

По оси ординат — частота попаданий в интервал

Fig. 1. AFM maps of the distribution of Young's modulus values over the surface of living fibroblasts in control experiments: a) without stress fibres, b) with stress fibres (arrows indicate stress fibres); c, d) histograms of the Young's modulus values of the cells a, and b, respectively.

The Y-axis indicates the frequency of hits in the interval

и содержащие стресс-фибриллы (вторая). Это разделение основывалось на анализе АСМ-карт механических параметров и формы гистограмм модуля Юнга. Результаты действия колхицина на клетки из этих двух групп анализировались по отдельности.

Исследование первой группы фибробластов, не содержащих стресс-фибриллы, показало, что колхицин приводит к увеличению среднего значения модуля Юнга. Так, после воздействия колхицина величина модуля Юнга составляла 23 ± 7 кПа (число измеренных клеток $n = 21$), а значение этого параметра у контрольных клеток было равно 18 ± 4 кПа ($n = 21$). Применение статистического критерия Манна — Уитни показало, что разница между выборками значений модуля Юнга является статистически значимой ($p < 0,05$).

При сравнении результатов измерения модуля Юнга фибробластов из второй группы, имеющих стресс-фибриллы, оказалось, что, так же как и в случае с клетками без жестких во-

локон, под действием колхицина фибробласты становятся существенно жестче. Значения измеряемого параметра были 48 ± 18 кПа ($n = 28$) и 76 ± 38 кПа ($n = 29$) для контрольных и обработанных колхицином клеток соответственно. Полученная разница являлась статистически значимой по U-критерию Манна — Уитни ($p < 0,05$).

Механические характеристики фибробластов после воздействия колхицина значительно отличаются от данных контрольных опытов. Представляет интерес тот факт, что под воздействием колхицина часть фибробластов (7 из 29) демонстрировала очень высокие средние значения модуля Юнга (свыше 100 кПа), в то время как в контрольных опытах таких жестких клеток обнаружено не было. Таким образом, полученные здесь результаты свидетельствуют о том, что колхицин (1 мкг/мл), действие которого приводит к разрушению микротрубочек, запускает и компенсаторную реакцию клетки, которая проявляется в том, что она становится жестче за счет увеличения количества стресс-фибрилл.

Для ответа на вопрос о том, с чем связано увеличение жесткости фибробластов, был применен метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Интенсивность флуоресценции была измерена на фибробластах, как в контрольных опытах, так и после воздействия колхицина в концентрации 1 мкг/мл (три эксперимента). Площадь выбранного участка клетки в обоих случаях была одинаковой. Функция распределения интенсивности по выбранной области клетки характеризовалась нормальным распределением. В данном случае нам не удалось разделить исследуемые фибробласты на две группы, как это было сделано ранее при исследовании с помощью АСМ. Для каждой клетки было сделано по три измерения интенсивности. Уровень флуоресценции определяли, как усредненную интенсивность флуоресценции в условных единицах (у. е.), которые соответствуют значению в пикселях.

Используя методику прижизненной окраски актиновых структур клетки, мы наблюдали значительное увеличение внутриклеточного F-актина в фибробластах после воздействия колхицина (1 мкг/мл) (рис. 2а, б). Средняя интенсивность флуоресценции актиновых микрофиламентов клеток, обработанных колхицином,

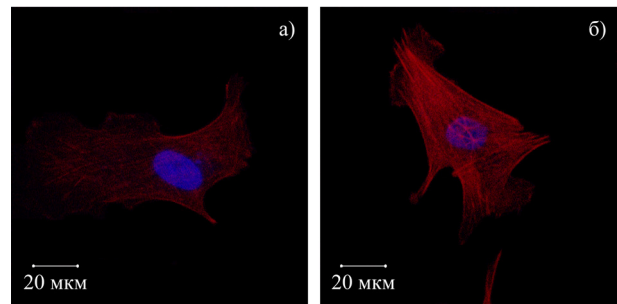


Рис. 2. Фибробласты сердца новорожденного крысенка.

Окраска: красным цветом — актиновые микрофиламенты (фаллоидин, конъюгированный с флуоресцентным красителем Texas Red); синим цветом — ядра клеток (DAPI); а) контроль, б) колхицин (1 мкг/мл)

Fig. 2. Fibroblasts of a newborn rat's heart. Colouring: red — actin microfilaments (phalloidin conjugated with the Texas Red fluorescent dye); blue — cell nuclei (DAPI); a) control; b) colchicine (1 μg/ml)

была достоверно выше ($25,6 \pm 1,6$ у. е., $p < 0,05$; $n = 45$), чем в контроле ($17,7 \pm 2,0$ у. е.; $n = 43$) (рис. 3).

Сравнительное исследование действия колхицина на первичные фибробласты новорожденных крысят с помощью методов АСМ и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показало следующее: возможный механизм компенсаторной реакции клеток

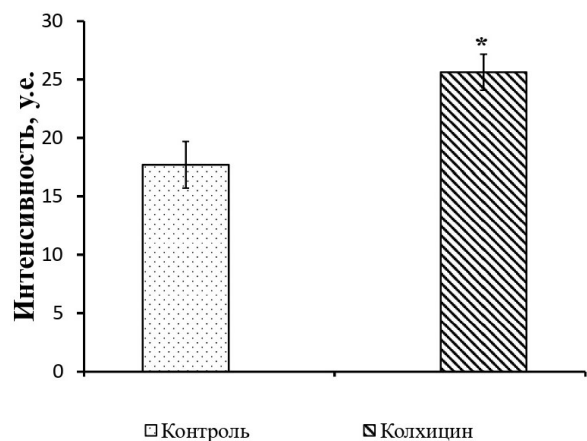


Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресцентных сигналов от актиновых волокон в фибробластах после воздействия колхицина (1 мкг/мл).

* — различия статистически значимы относительно контроля, $p < 0,05$

Fig. 3. Change in the intensity of fluorescent signals from actin fibres in fibroblasts after exposure to colchicine (1 μg/ml).

* — difference is statistically significant relative to the control, $p < 0,05$

на воздействие исследуемого агента обусловлен эффектом увеличения полимеризации F-актина (рис. 3) и, как следствие, повышением жесткости фибробластов в обеих группах клеток. Отличительная особенность данной работы заключается в том, что нами применен количественный подход, который показал, что наши данные не противоречат результатам других авторов, исследовавших клетки различных тканей с помощью разных методов (Jung, Shin, Park et al. 1997; Liu, Zhang, Li et al. 2018; Tsai, Waugh, Keng 1998). Подчеркнем, что впервые на первичной культуре фибробластов теплокровных животных нами было показано, что действие колхицина

приводит к одновременному увеличению жесткости клетки и интенсивности флуоресценции F-актина в среднем на $\approx 60\%$ и $\approx 40\%$ соответственно.

Известно, что колхицин как лекарственная субстанция широко применяется в медицине (Liu, Zhang, Li et al. 2018). Наши результаты позволяют детализировать молекулярные механизмы действия колхицина, что может быть использовано при разработке новых лекарственных препаратов, содержащих указанный агент в качестве лекарственной субстанции, на уровне доклинических исследований.

References

- Chang, L., Kious, T., Yorgancioglu, M. et al. (1993) Cytoskeleton of living, unstained cells imaged by scanning force microscopy. *Biophysical Journal*, vol. 64, no. 4, pp. 1282–1286. DOI: 10.1016/S0006-3495(93)81493-0 (In English)
- Chentsov, Yu. S. (2010) *Tsitologiya s elementami tsellyulyarnoj patologii [Cytology with elements of cellular pathology]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo Publ., 361 p. (In Russian)
- Henderson, E., Haydon, P. G., Sakaguchi, D. S. (1992) Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*, vol. 257 (5078), pp. 1944–1946. PMID: 1411511. DOI: 10.1126/science.1411511 (In English)
- Inoue, S. (1981) Cell division and the mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology*, vol. 91, no. 3, pp. 131–147. (In English)
- Jung, H. I., Shin, I., Park Y. M. et al. (1997) Colchicine activates actin polymerization by microtubule depolymerization. *Molecules and Cells*, vol. 7, no. 3, pp. 431–437. PMID: 9264034. (In English)
- Jung, S.-H., Park, J.-Y., Joo, J.-H. et al. (2011) Extracellular ultrathin fibers sensitive to intracellular reactive oxygen species: Formation of intercellular membrane bridges. *Experimental Cell Research*, vol. 317, no. 12, pp. 1763–1773. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.02.010 (In English)
- Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I. et al. (2007) Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, vol. 38, no. 8, pp. 824–833. PMID: 17709250. DOI: 10.1016/j.micron.2007.06.011 (In English)
- Liu, L., Zhang, W., Li, L. et al. (2018) Biomechanical measurement and analysis of colchicine-induced effects on cells by nanoindentation using an atomic force microscope. *Journal of Biomechanics*, vol. 67, pp. 84–90. PMID: 29249455. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2017.11.018 (In English)
- Mareel, M. M., De Mets, M. (1984) Effect of microtubule inhibitors on invasion and on related activities of tumor cells. *International Review of Cytology*, vol. 90, pp. 125–168. PMID: 6389412. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)61489-8 (In English)
- Rieder, C. L., Palazzo, R. E. (1992) Colcemid and the mitotic cycle. *Journal of Cell Science*, vol. 102, no. 3, pp. 387–392. PMID: 1506421. (In English)
- Rotsch, C., Radmacher, M. (2000) Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*, vol. 78, no. 1, pp. 520–535. PMID: 10620315. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76614-8 (In English)
- Salmon, E. D., McKeel, M., Hays, T. (1984) Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine. *The Journal of Cell Biology*, vol. 99, no. 3, pp. 1066–1075. PMID: 6470037. DOI: 10.1083/jcb.99.3.1066 (In English)
- Sneddon, I. N. (1965) The relation between load and penetration in the axi-symmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science*, vol. 3, no. 1, pp. 47–57. DOI: 10.1016/0020-7225(65)90019-4 (In English)
- Spedden, E., White, J. D., Naumova, E. N. et al. (2012) Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, vol. 103, no. 5, pp. 868–877. PMID: 23009836. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.08.005 (In English)
- Timoshchuk, K. I., Khalisov, M. M., Penniyaynen, V. A. et al. (2019) Mechanical characteristics of intact fibroblasts studied by atomic force microscopy. *Technical Physics Letters*, vol. 45, no. (9), pp. 947–950. DOI: 10.1134/S1063785019090293 (In English)

- Tsai, M. A., Waugh, R. E., Keng, P. C. (1998) Passive mechanical behavior of human neutrophils: Effects of colchicine and paclitaxel. *Biophysical Journal*, vol. 74, no. 6, pp. 3282–3291. PMID: 9635782. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)78035-X (In English)
- Wu, H. W., Kuhn, T., Moy, V. T. (1998) Mechanical properties of L929 cells measured by atomic force microscopy: Effects of anticytoskeletal drugs and membrane crosslinking. *Scanning*, vol. 20, no. 5, pp. 389–397. PMID: 9737018. DOI: 10.1002/sca.1998.4950200504 (In English)