



Получено: 24.01.2024 г. | Принято: 29.01.2024 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.1.26.31>

Научная статья

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ SUBSTANTIA NIGRA

А.И.Ахметова^{1, 2}, к.ф.-м.н., мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-5115-8030

Т.О.Советников^{1, 2}, магистр, вед. инж., ORCID: 0000-0001-6541-8932

Е.О.Зорикова³, асп., биофизик, ORCID: 0009-0001-1086-6399

И.В.Яминский^{1, 2}, д.ф.-м.н., проф., ген. дир., ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Аннотация. Реакция клеток на механические сигналы играет ключевую роль в жизненно важных биологических процессах, таких как развитие органов, регенерация тканей, старение и развитие рака. Механические свойства, такие как упругость, мягкость, шероховатость, вязкость, показывают, как клетки и ткани реагируют на воздействие и как от этого зависят их биологические функции. Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) является универсальным инструментом для количественной характеристики механических свойств тканей и клеток в естественных условиях. Данные о механических свойствах биологических объектов, полученные с помощью атомно-силовой и капиллярной микроскопии, могут быть связаны с биологическими процессами и патологиями в тканях.

Ключевые слова: сканирующая капиллярная микроскопия, живые системы, биомеханика, *Substantia nigra*

Для цитирования: А.И. Ахметова, Т.О. Советников, Е.О. Зорикова, И.В. Яминский. Сканирующая зондовая микроскопия *Substantia nigra*. НАНОИНДУСТРИЯ. 2024. Т. 17. № 1. С. 26–31. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.1.26.31>.

Received: 24.01.2024 | Accepted: 29.01.2024 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.1.26.31>

Original paper

SCANNING PROBE MICROSCOPY OF SUBSTANTIA NIGRA

А.И.Akhmetova^{1, 2}, Cand. of Sci. (Physics and Mathematics), Junior Researcher, ORCID: 0000-0002-5115-8030

Т.О.Sovetnikov^{1, 2}, Master, Leading Engineer, ORCID: 0000-0001-6541-8932

Е.О.Zorikova³, Post Graduate, Biophysicist, ORCID: 0009-0001-1086-6399

И.В.Yaminsky^{1, 2}, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof., Director, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / yaminsky@nanoscopy.ru

Abstract. The response of cells to mechanical signals plays a key role in biological processes such as organ development, tissue regeneration, aging and cancer development. Changes in mechanical properties, including stiffness and viscosity, show how cells and tissues react to stress and how their biological functions depend on it. Scanning probe microscopy (SPM) is a versatile tool for quantitative characterization of the mechanical properties of tissues and cells *in vivo*. Data on the mechanical properties of biological objects obtained using atomic force and capillary microscopy can be associated with biological processes and pathologies in tissues.

¹ МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical department, Moscow, Russia

² ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia

³ Институт имени Вейцмана, Реховот, Израиль / Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel



Keywords: scanning capillary microscopy, living systems, biomechanics, *Substantia nigra*

For citation: A.I. Akhmetova, T.O. Sovetnikov, E.O. Zorikova, I.V. Yaminsky. Scanning probe microscopy of *Substantia Nigra*. NANOINDUSTRY. 2023. V. 17. No. 1. PP. 26–31. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.17.1.26.31>.

ВВЕДЕНИЕ

Сканирующая зондовая микроскопия включает в себя все семейство методик, в которых профиль поверхности регистрируется с помощью зонда: это не только атомно-силовая, но и другие разновидности микроскопии: туннельная, капиллярная, резистивная и др.

В атомно-силовой микроскопии (АСМ) топография и механическая информация образца определяются путем измерения взаимодействия между поверхностью образца и зондом кантileвера в процессе построчного сканирования образца. Субнанометровое разрешение в АСМ позволяет определять механические свойства биологических объектов: жесткость, вязкость и адгезию, благодаря чему можно провести соответствие между свойствами и изображениями поверхностных и субклеточных структур разных видов тканей от больных и здоровых доноров. Сканирующая капиллярная микроскопия является уникальным инструментом, который позволяет строить 3D-морфологию живых клеток и тканей в жидкости с нанометровой точностью.

Количественная визуализация в АСМ и измерение механических свойств тканей и клеток представляют особый интерес для оценки биологических объектов *in vivo* и, таким образом, требуют неразрушающей подготовки для их сохранения в лабораторных условиях для сбора данных в норме и при заболеваниях [1].

АСМ использовалась при исследовании тканей сердца и аорты с целью выявления макробиологических изменений, связанных с физиологическими и патологическими процессами, такими как регенерация, развитие сердца, сахарный диабет и ишемическая болезнь сердца [2]. Однако, пока подготовка тканей для измерения на микроскопе остается довольно трудной задачей из-за наличия топографических неоднородностей, уникальности методики подготовки образцов для определенного типа тканей.

В сканирующей капиллярной микроскопии (СКМ) в качестве зонда выступает капилляр, заполненный электролитом. Позиционирование капилляра осуществляется по измерению величины ионного тока, проходящего через кончик капилляра. Уникальность капиллярной

INTRODUCTION

Scanning probe microscopy includes the whole family of techniques where surface profile is recorded using a probe: it is not only atomic force microscopy, but also other types of microscopy: tunnelling, capillary, resistive, and others.

In AFM, topography and mechanical information of a sample are determined by measuring interaction between the sample surface and the cantilever probe during line-by-line scanning of the sample. The sub-nanometre resolution in AFM allows measuring the mechanical properties of biological objects: stiffness, viscosity and adhesion, so that it is possible to match the properties images of surface and subcellular structures of different types of tissue from diseased and healthy donors. Scanning capillary microscopy is a unique tool that allows studying 3D morphology of living cells and tissues in liquid with nanometre precision.

Quantitative visualisation in AFM and measurement of mechanical properties of tissues and cells are of particular interest for *in vivo* assessment of biological objects and thus require non-destructive preparation to preserve them *in vitro* for data collection in normality and disease [1].

AFM has been used in study of heart and aortic tissues to detect mechanobiological changes associated with physiological and pathological processes such as regeneration, cardiac development, diabetes mellitus, and coronary heart disease [2]. However, so far preparation of tissues for microscope measurement remains a rather difficult task due to presence of topographic heterogeneities, uniqueness of sample preparation techniques for a particular tissue type.

In scanning capillary microscopy (SCM), a capillary filled with electrolyte acts as a probe. The capillary is positioned by measuring the magnitude of the ionic current flowing through the tip of the capillary. The uniqueness of capillary microscopy lies in the non-contact nature of scanning – the capillary stops above the sample surface when the current drops by ~0.5% of the specified value [3].

Using SCM we determined changes in morphometric characteristics of endothelial cells during experimental septicopaemia: endothelial cells decreased the adhesion area to substrate, which was determined by a decrease in the area of cell projection, and the cell membrane was smoothed. However, endothelial cell stiffness was paradoxically unchanged compared with controls. Over time, neutrophil migration led to more significant changes in

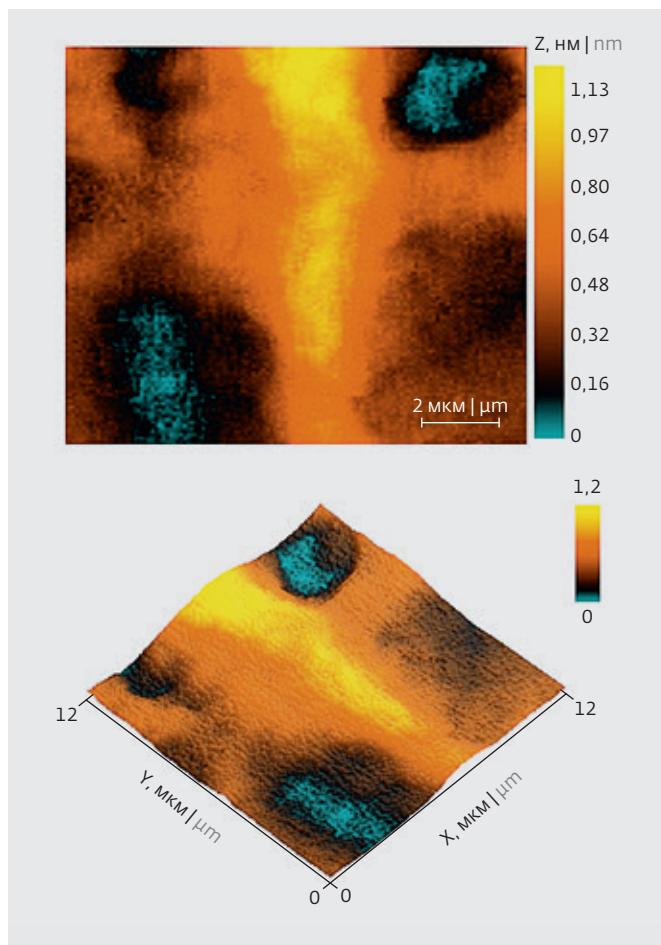


Рис.1. Характерная морфология контрольных образцов срезов ткани *Substantia nigra* донора без неврологической патологии, ярко выражены кратеры с диаметром около 2–3 $\mu\text{м}$

Fig.1. Characteristic morphology of control samples of *Substantia nigra* tissue slices from donor without neurological pathology, craters with a diameter of about 2–3 μm are pronounced

микроскопии заключается в бесконтактной природе сканирования – капилляр останавливается над поверхностью образца при падении тока на ~0,5% от заданной величины [3].

С помощью СКМ определили изменения морфометрических характеристик эндотелиальных клеток в ходе экспериментальной септикопии: эндотелиальные клетки уменьшали площадь адгезии к субстрату, что определялось уменьшением площади проекции клеток, а клеточная мембрана стягивалась. Однако жесткость эндотелиальных клеток парадоксальным образом не изменилась по сравнению с контролем. С течением времени миграция нейтрофилов приводила к более существенному изменению эндотелиальных клеток: сначала образовывались неглубокие перфорации в мемbrane, которые достаточно

ендотелиальных клеток: first, shallow perforations in membranes were formed, which healed rather quickly, then stress fibrils were formed and, finally, endothelial cells died and multiple perforations were formed on their surface [4].

However, despite the advances in SPM [5], the obtained data are still difficult to use in clinical diagnosis and medicine.

MATERIALS AND METHODS

Tissue slices of *Substantia nigra* from donor without neurological pathology and Parkinson's patients were examined using a developed scanning capillary microscopy unit.

The excised biomaterial fragments were placed in 10% neutral formalin solution for fixation, with the volume of fixing liquid exceeding the volume of biomaterial fragments 10 times. Fixation in formalin was carried out at room temperature for 24–48 hours. After one day the fixing liquid solution was changed.

After fixation, the biomaterial fragments removed from the fixing fluid were washed in running water for 2 hours. Next, histological wiring of the biomaterial through alcohols of ascending concentration, xylene-paraffin and liquid paraffin was performed by automated isopropyl wiring using an automatic processor Leica TP 1020. The paraffin-impregnated biomaterial fragments were embedded in special warmed casting moulds and poured with commercial paraffin melted at 60 °C on a Leica EG 1160 casting station to form paraffin blocks. A plastic histological cassette was used as a base for the paraffin block. The finished blocks were cooled.

Histological sections 3–4 μm thick were made from paraffin blocks on a Leica RM 2235 rotary microtome.

Prepared slices (two from each tissue fragment) for light microscopy after spreading on a water bath were placed on slides and dried on a heating table.

Before staining, these samples were freed from paraffin by running them through a battery of solvents (xylene, alcohol). The specimens were stained with haematoxylin and eosin in strict accordance with the instructions of the dye sets and according to the standard procedure. For the conclusion of histological preparations, a transparent preserving medium (e.g., Canada or fir balsam) was applied to the stained section, not covered with cover glass.

The study was performed on a FemtoScan Xi scanning capillary microscope [6], and data processing was performed in FemtoScan Online software [7].

Capillary microscopy was used to obtain 3D morphology of the tissue surface and to detect visual differences in the samples.

Tissue samples from donor without neurological pathology are characterised by a more structured surface, presence of characteristic depressions with craters and pronounced edges. Morphology of slices from Parkinson's patients is visually more homogeneous, has



быстро заживлялись, затем формировались стрес-совые фибрillы и, наконец, эндотелиальные клетки погибали, и на их поверхности образовывались множественные перфорации [4].

Однако, несмотря на достижения СЗМ [5], полученные данные пока еще сложно использовать в клинической диагностике и медицине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С помощью разработанной установки для сканирующей капиллярной микроскопии были исследованы срезы тканей *Substantia nigra* донора без неврологической патологии и больных Паркинсоном.

Вырезанные фрагменты биоматериала для фиксации помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина, при этом объем фиксирующей жидкости превышал объем фрагментов биоматериала в 10 раз. Фиксацию в формалине проводили при комнатной температуре в течение 24–48 ч. Через одни сутки раствор фиксирующей жидкости меняли.

После фиксации фрагменты биоматериала, извлеченного из фиксирующей жидкости, промывали в проточной воде в течение 2 ч. Далее выполняли гистологическую проводку биоматериала через спирты восходящей концентрации, ксилол-парафин и жидкий парафин автоматизированным способом изопропиловой проводки с использованием автоматического процессора Leica TP 1020. Пропитанные парафином фрагменты биоматериала закладывали в специальные прогретые заливочные формы и заливали на заливочной станции Leica EG 1160 расплавленным при 60 °C коммерческим парафином для формирования парафиновых блоков. В качестве основания для парафинового блока использовали пластиковую гистологическую кассету. Готовые блоки охлаждали.

Из парафиновых блоков на ротационном микротоме Leica RM 2235 изготавливали гистологические срезы толщиной 3–4 мкм.

Готовые срезы (по два с каждого фрагмента ткани) для световой микроскопии после расправления на водяной бане помещали на предметные стекла и высушивали их на нагревательном столике.

Перед окрашиванием образцы освобождали от парафина, проводя по батарее растворителей (ксилол, спирт). Окрашивали гематоксилином и эозином в строгом соответствии с инструкциями наборов красителей и по стандартной процедуре. Для заключения гистологических препаратов на окрашенный срез наносили прозрачную консервирующую среду (например, канадский или пихтовый бальзам), не покрывали покровным стеклом.

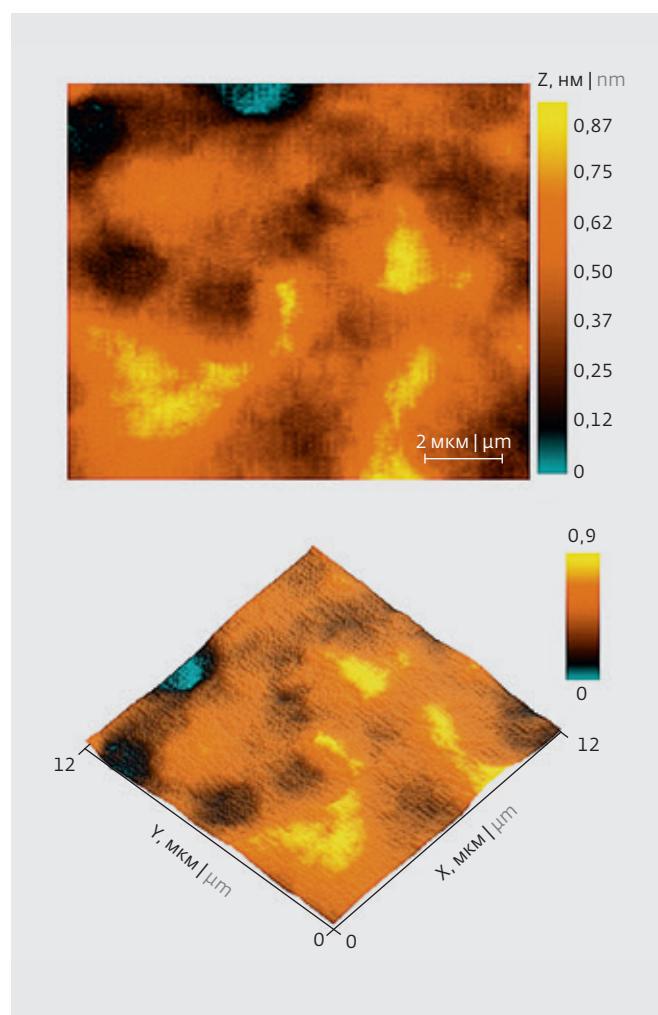


Рис.2. Образец срезов ткани *Substantia nigra* донора, больного Паркинсоном. Визуально заметно менее разнообразный рельеф среза по сравнению с контрольным образцом Fig.2. The sample of tissue slices from *Substantia nigra* of donors with Parkinson's disease. Visually noticeable less varied relief of the slice compared to the control sample

no characteristic drops with even edges. At the same time general roughness of healthy tissue samples was higher than in Parkinson's patients: the average value of roughness was $R_a 196 \pm 33$ nm, $R_q 250 \pm 48$ nm, similar parameters for samples from Parkinson's patients: $R_a 143 \pm 17$ nm, $R_q 181 \pm 19$ nm.

When comparing morphology of the two specimens, characteristic differences are noticeable, but more statistical data on the study of tissue slices, including those obtained with AFM, are required. An important indicator of this area of *Substantia nigra* is also specimens conductivity, which can be measured using AFM [8]. The question of the relationship between changes in tissue morphology of patients and direct signs of Parkinson's disease remains unresolved.



Исследование проводили на сканирующем капиллярном микроскопе "ФемтоСкан Хи" [6], обработку данных – в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн" [7].

С помощью капиллярной микроскопии удалось наблюдать 3D-морфологию поверхности ткани и обнаружить визуальные различия в образцах.

Образцы ткани от донора без неврологической патологии характеризуются большей структурированностью поверхности, наличием характерных впадин с кратерами и ярко выраженным краем. Морфология срезов от больных Паркинсоном визуально более однородная, не имеет характерных перепадов с ровными краями. При этом общая шероховатость образцов тканей без патологии оказалась выше, чем у больных Паркинсоном: среднее значение шероховатости составило $R_a 196 \pm 33$ нм, среднеквадратичное $R_q 250 \pm 48$ нм, аналогичные параметры для образцов срезов от больных Паркинсоном: $R_a 143 \pm 17$ нм, $R_q 181 \pm 19$ нм.

При сравнении морфологии двух образцов заметны характерные различия, но требуется больше статистических данных по исследованию срезов тканей, в том числе полученных с помощью

CONCLUSION

As part of the work, slices of *Substantia nigra* were obtained from a healthy donor and a Parkinson's patient. The samples were examined using scanning capillary microscopy. The 3D morphology of the slices was evaluated. It was visually shown that the tissue slices from a donor without neurological pathology have a more branched and rougher surface compared to samples from Parkinson's patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was performed under the state order with the financial support of Physical Department of Lomonosov Moscow State University (Registration subject 122091200048-7). FemtoScan Online software was provided by Advanced Technologies Center, www.nanoscopy.ru.

PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

Declaration of Competing Interest. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



**ТЕЛЕГРАММ КАНАЛ
НАУЧНОГО ИЗДАТЕЛЬСТВА
ТЕХНОСФЕРА:**



- ↗ Онлайн репортажи с крупнейших выставок отрасли
- ↗ Анонсы мероприятий с участием технических экспертов отрасли
- ↗ Скидки на журналы издательства до 25%
- ↗ Конкурсы и розыгрыши от ведущих компаний
- ↗ Книжные новинки и презентации новых выпусков журналов

Подписывайтесь и оставайтесь в курсе главных событий научно-технической сферы





ACM. Важным показателем данной области *Substantia nigra* является также проводимость образцов, которую можно измерить с помощью ACM [8]. Остается нерешенным вопрос связи изменения морфологии ткани больных с конкретными признаками болезни Паркинсона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках работы были получены срезы *Substantia nigra* от здорового донора и больного Паркинсоном. Исследованы образцы с помощью сканирующей капиллярной микроскопии. Была охарактеризована 3D-морфология срезов. Визуально показано, что срезы ткани донора без неврологической патологии имеют более разветвленную и более шероховатую поверхность по сравнению с образцами от больных Паркинсоном.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена по госзаданию при финансовой поддержке физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова (Регистрационная тема 122091200048-7). ПО "ФемтоСкан Онлайн" предоставлено ООО НПП "Центр перспективных технологий", www.nanoscopy.ru.

ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

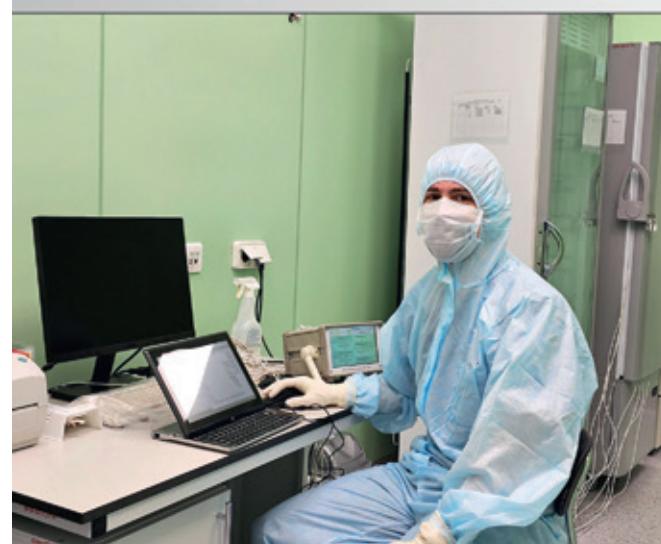
Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

Декларация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Cho D.H., Aguayo S., Cartagena-Rivera A.X. Atomic force microscopy-mediated mechanobiological profiling of complex human tissues. *Biomaterials*. Elsevier Ltd. *Biomaterials*, 303, (2023) P. 122389. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122389>
- Benech J.C., Romanelli G. Atomic force microscopy indentation for nanomechanical characterization of live pathological cardiovascular/heart tissue and cells, *Micron* 158 (2022), P. 103287. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2022.103287>
- Akhmetova A.I., Sovetnikov T.O., Maksimova N.E., Terentyev A.D., Uzhegov A.A., Yaminsky I.V. The heart of the capillary microscope. *NANOINDUSTRY*. Vol. 16. No. 7-8 (2023), PP. 444-448. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.444.448>
- Pleskova S.N., Bezrukov N.A., Gorshkova E.N., Bobyk S.Z., Lazarenko E.V. Exploring the Process of Neutrophil Transendothelial Migration Using Scanning Ion-Conductance Microscopy. *Cells*. (2023) 12(13):1806. <https://doi.org/10.3390/cells12131806>
- Solares S.D., Cartagena-Rivera A.X., Beilstein J. *Nanotechnol.* (2022) Vol. 13. PP. 1483-1489. <https://doi.org/10.3762/bjnano.13.122>
- Sovetnikov T.O., Akhmetova A.I., Maksimova N.E., Terent'ev A.D., Evtushenko G.S., Rybakov Y.L., Gukasov V.M., Yaminskii I.V. Characteristics of the use of scanning capillary microscopy in biomedical research. *Bio-Medical Engineering*. Vol. 57, 4 (2023). PP. 250-253. <https://doi.org/10.1007/s10527-023-10309-4>
- Akhmetova A.I., Yaminsky I.V., Sovetnikov T.O. FemtoScan Online: 3D visualization and processing of bionanoscopy data. *NANOINDUSTRY*. Vol. 16. No. 7-8 (2023). PP. 450-455. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.7-8.450.455>
- Rourk J.C. Indication of quantum mechanical electron transport in human *Substantia nigra* tissue from conductive atomic force microscopy analysis. *Biosystems*. Vol. 179 (2019). PP. 30-38. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2019.02.003>

**Квалификация
низкотемпературных
морозильных камер (до -100 С°)**



www.aseptica.biz

Tel.: (495) 585-88-15, (495) 274-01-02 E-mail: asep5858815@gmail.com