



Получено: 3.07.2025 г. | Принято: 10.07.2025 г. | <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2025.18.5.286.295>

Научная статья

# СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ НАСЕКОМЫХ: ПЕРСПЕКТИВЫ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ

И.В.Яминский<sup>1, 2</sup>, д.ф.-м.н., проф., ген. дир., ORCID: 0000-0001-8731-3947 / [yaminsky@nanoscopy.ru](mailto:yaminsky@nanoscopy.ru)

**Аннотация.** В статье рассматриваются возможности применения сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) для исследования нейронной активности насекомых, включая регистрацию потенциалов действия и визуализацию морфологических особенностей нервной системы. Особое внимание уделено преимуществам использования насекомых, таких как комары, в качестве модельных объектов для нейрофизиологических исследований. Обсуждаются современные методики регистрации нейронных импульсов, включая внутриклеточную и внеклеточную запись, метод локальной фиксации потенциала (патч-кламп), а также сравнение параметров потенциала действия у насекомых и человека. Представлены перспективы интеграции СЗМ с оптогенетикой и кальциевой визуализацией для получения комплексного представления о функциональной активности нейронов *in vivo*.

**Ключевые слова:** функционирование и активность мозга, экспериментальные исследования, потенциал действия, нейроны, атомно-силовая микроскопия, сканирующая капиллярная микроскопия

**Для цитирования:** И.В. Яминский. Сканирующая зондовая микроскопия в исследовании нейронной активности насекомых: перспективы и методические подходы. НАНОИНДУСТРИЯ. 2025. Т. 18. № 5. С. 286–295. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2025.18.5.286.295>.

Received: 3.07.2025 | Accepted: 10.07.2025 | <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2025.18.5.286.295>

Original paper

## SCANNING PROBE MICROSCOPY IN THE STUDY OF INSECT NEURONAL ACTIVITY: PROSPECTS AND METHODOLOGICAL APPROACHES

I.V.Yaminsky<sup>1, 2</sup>, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof., Director General, ORCID: 0000-0001-8731-3947 / [yaminsky@nanoscopy.ru](mailto:yaminsky@nanoscopy.ru)

**Abstract.** The paper discusses the possibilities of using scanning probe microscopy (SPM) to study the neural activity of insects, including recording action potentials and visualizing the morphological features of the nervous system. Particular attention is paid to the advantages of using insects such as mosquitoes as model objects for neurophysiological research. Modern methods of recording neural impulses are discussed, including intracellular and extracellular recording, the local potential fixation method (patch clamp), as well as a comparison of action potential parameters in insects and humans. The prospects for integrating SPM with optogenetics and calcium imaging to obtain a comprehensive understanding of the functional activity of neurons *in vivo* are presented.

<sup>1</sup> МГУ имени М.В.Ломоносова, Физический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical Department, Moscow, Russia  
<sup>2</sup> ООО НПП "Центр перспективных технологий", Москва, Россия / Advanced Technologies Center, Moscow, Russia



**Keywords:** brain functioning and activity, experimental studies, action potential, neurons, atomic force microscopy, scanning capillary microscopy

**For citation:** I.V. Yaminsky. Scanning probe microscopy in the study of insect neuronal activity: prospects and methodological approaches. NANOINDUSTRY. 2025. Vol. 18. No. 5. PP. 286-295. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2025.18.5.286.295>.

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение функциональной активности нервной системы является одной из важнейших задач современной нейробиологии. Развитие методов нейрофизиологии и сканирующей зондовой микроскопии открывает новые возможности для анализа электрической активности отдельных нейронов, нейронных сетей и мозга в целом. Однако исследования нейронной активности высших организмов сталкиваются с рядом ограничений, связанных как с техническими сложностями, так и с этическими аспектами. Это делает особенно привлекательным использование в экспериментальных работах класса беспозвоночных членистоногих животных – насекомых – в качестве модельных систем (рис.1).

Насекомые обладают компактной, но функционально эффективной нервной системой, что позволяет проводить эксперименты с высоким разрешением, обеспечиваемым зондовой микроскопией, и минимальными этическими ограничениями.



Рис.1. Оптическая фотография представителя класса беспозвоночных членистоногих животных – мухи. Объекта для исследования методами сканирующей зондовой микроскопии. Размер изображения  $5 \times 3,8 \text{ мм}^2$ . Диаметр глаза мухи – около  $0,28 \text{ мм}$

Fig.1. Optical photograph of a representative of the class of invertebrate arthropods – fly. Object for research by scanning probe microscopy. Image size  $5 \times 3.8 \text{ mm}^2$ . The diameter of the fly's eye is about  $0.28 \text{ mm}$

## INTRODUCTION

The study of nervous system functional activity is one of the most important tasks in modern neurobiology. Development of neurophysiology methods and scanning probe microscopy opens new opportunities for analyzing electrical activity of individual neurons, neural networks, and the brain as a whole. However, studies of neural activity in higher organisms face a number of limitations related to both technical challenges and ethical aspects. This makes the use of invertebrate arthropods – insects – particularly attractive in experimental work as model systems (Fig.1).

Insects have a compact yet functionally efficient nervous system, which allows for high-resolution experiments provided by probe microscopy and minimal ethical constraints. Due to the ease of fixing insect neurons, they serve as a convenient subject for studying the generation mechanisms and nerve impulses transmission. Combination of traditional electrophysiological methods with the capabilities of scanning probe microscopy, which allows for obtaining high-precision topographic data without damaging the sample, appears particularly promising.

Scanning probe microscopy allows for obtaining three-dimensional images with nanometer resolution, which is particularly important for studying various morphological structures of insects, for example: cuticles (chitinous coverings) [1], sensilla (sensory hairs), nanostructures affecting hydrophobicity and aerodynamics of wings, and adhesion devices of legs. A series of works was carried out to study the faceted eye of insects and its structural unit – the ommatidium using atomic force microscopy methods [2].

In 2024, the results of mapping the brain of the fruit fly, obtained through electron microscopy, were published [3]. Researchers completely mapped the connections between neurons throughout the brain of the adult fruit fly. The work presented a complete picture of the structure of the adult female *Drosophila melanogaster* brain, containing  $5 \cdot 10^7$  chemical synapses between 139,255 neurons. With the significant capabilities achieved in electron microscopy, there remains no possibility of working with live specimens.

The only methods that allow us to study living objects with nanometer resolution in air or in liquids are the tools of scanning probe microscopy. However, to date,



Благодаря простоте фиксации нейронов насекомых, они являются удобным объектом для изучения механизмов генерации и передачи нервных импульсов. Особенно перспективным представляется сочетание традиционных электрофизиологических методов с возможностями сканирующей зондовой микроскопии, позволяющей получать высокоточные топографические данные без повреждения образца.

Сканирующая зондовая микроскопия позволяет получать трехмерные изображения с нанометровым разрешением, что особенно важно для исследования различных морфологических структур насекомых, например: кутикулы (хитинового покрова) [1], сенсилл (чувствительных волосков), наноструктур, влияющих на гидрофобность и аэродинамику крыльев, приспособлений для адгезии лапок. Совокупность работ была проведена по изучению фасеточного глаза насекомых и его структурной единицы – омматидия методами атомно-силовой микроскопии [2].

В 2024 году были опубликованы результаты картирования мозга дрозофилы, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии [3]. Исследователи полностью составили карту связей между нейронами всего мозга взрослой плодовой мушки. В работе была представлена полная картина структуры мозга взрослой самки *Drosophila melanogaster*, содержащая  $5 \cdot 10^7$  химических синапсов между 139 255 нейронами. При существующих достигнутых возможностях электронной микроскопии у нее не остается возможности работы с живыми объектами.

Единственным методом, который позволяет изучать живые объекты с нанометровым разрешением на воздухе или в жидкости, – это инструментальный сканирующий зондовый микроскоп. Однако, до настоящего времени нами не найдены экспериментальные результаты зондовой микроскопии по исследованию функциональной активности мозга живого существа.

Перед тем как мы рассмотрим подробнее возможности по проведению таких исследований насекомых на примере комара, сравним сходные черты и различия мозга человека и комара.

У человека максимальная частота нейронных импульсов – около 200–500 Гц (в некоторых сенсорных нейронах), но в среднем 10–100 Гц.

У насекомых нервные клетки часто крупнее и быстрее, чем у млекопитающих, что компенсирует их малое количество.

Общее количество сигналов в мозгу насекомого можно оценить следующим образом.

Если учесть, что у комара около 200 000–400 000 нейронов (для сравнения: у мухи – ~200 000,

we have not found experimental results from probe microscopy regarding the study of the functional activity of the brain of a living being).

Before we take a closer look at the possibilities for conducting such insect studies using the mosquito as an example, we try to examine the similarities and differences between a human brain and a mosquito's brain.

In humans, the maximum frequency of neural impulses is about 200–500 Hz (in some sensory neurons), but on average it is 10–100 Hz.

In insects, nerve cells are often larger and faster than in mammals, which compensates for their small number.

The total number of signals in an insect's brain can be estimated as follows. Taking into account that a mosquito has about 200,000 to 400,000 neurons (for comparison: a fly has about 200,000, a bee has about 1 million), and each can generate dozens of impulses per second, then the total number of nerve signals in its brain can reach millions per second. The nervous system of insects is optimized for quick reactions, and although their brains are small, they process information very efficiently. On average: a single neuron fires 50–200 impulses/second. The entire brain processes millions of signals per second.

How do the nervous impulses of a mosquito's brain differ from those of a human? Nervous impulses (action potentials) in mosquitoes and humans operate on similar biophysical principles, but there are key differences in speed, organization, and functionality.

Main differences:

The impulse transmission speed in mosquitoes and insects is slower.

- In invertebrates, there are no myelinated fibers (like in vertebrates), so the transmission speed is approximately 1–5 m/s (in thick axons). The frequency of impulses in individual neurons can reach up to 200–500 Hz (in sensory neurons at peak activity);
- In humans, the speed of nerve signal transmission occurs faster. Myelinated fibers transmit signals at speeds of up to 120 m/s. The frequency of impulses can reach 500–1000 Hz (in some neurons), but on average it is 10–200 Hz.

### Organization of the nervous system

Mosquito:

The decentralized system consists of the brain (supraesophageal ganglion) + the ventral nerve cord with ganglia. The mosquito's brain is made up of several divisions:

Protocerebrum – is responsible for processing visual information (coming from the compound eyes) and complex behavioral responses;

Deitocerabrum – processes signals from the antennae (organs of smell, touch, and thermoception);





у пчелы – ~1 млн), и каждый может генерировать десятки импульсов в секунду, то общее количество нервных сигналов в его мозгу может достигать миллионов в секунду.

Нервная система насекомых оптимизирована для быстрой реакции, и, хотя их мозг мал, он обрабатывает информацию очень эффективно. В среднем: отдельный нейрон – 50–200 импульсов/с. Весь мозг – миллионы сигналов в секунду.

Чем нервные импульсы мозга комара отличаются от нервных импульсов человека? Нервные импульсы (потенциалы действия) у комаров и людей работают на схожих биофизических принципах, но есть ключевые различия в скорости, организации и функциональности.

Основные отличия:

- скорость передачи импульсов у комаров и насекомых медленнее;
- у беспозвоночных нет миелинизированных волокон (как у позвоночных), поэтому скорость передачи составляет ~1–5 м/с (у толстых аксонов). Частота импульсов в отдельных нейронах – до 200–500 Гц (в сенсорных при пиковой активности);
- у человека скорость передачи нервных сигналов происходит быстрее. Миелинизированные волокна передают сигналы со скоростью до 120 м/с. Частота импульсов – до 500–1000 Гц (в некоторых нейронах), но в среднем 10–200 Гц.

### Организация нервной системы

У комаров.

- Децентрализованная система – мозг (надглоточный ганглий) + брюшная нервная цепочка с ганглиями. Мозг комара состоит из нескольких отделов:

протоцеребрум – отвечает за обработку зрительной информации (поступающей от фасеточных глаз) и сложные поведенческие реакции;

дейтоцеребрум – обрабатывает сигналы от антенн (органы обоняния, осязания и терморецепции);

tritocerebрум – связан с подглоточным ганглием и управляет ротовыми аппаратами.

Кроме того, у комаров есть брюшная нервная цепочка с ганглиями, контролирующими движения конечностей и крыльев.

У насекомых меньше нейронов (~200 000–400 000), но проявляется высокая эффективность в простых реакциях (поиск жертвы, избегание угроз).

У человека.

Централизованный мозг (86 млрд нейронов) с иерархической структурой (кора, подкорковые ядра и т. д.). Сложные когнитивные функции (память, обучение, абстрактное мышление).

The tritocerebрум is connected to the subesophageal ganglion and controls the mouthparts.

In addition, mosquitoes have an abdominal nerve chain with ganglia that control the movements of their limbs and wings.

In insects, there are fewer neurons (~200,000–400,000), but a high efficiency is manifested in simple reactions (searching for prey, avoiding threats).

In a human:

A centralized brain (86 billion neurons) with a hierarchical structure (cortex, subcortical nuclei, etc.). Complex cognitive functions (memory, learning, abstract thinking).

### Types of neurons and synaptic transmission

Mosquitoes: Neurotransmitters: acetylcholine, glutamate, GABA (as in humans, but receptors may differ). Less synaptic plasticity – learning is limited (e.g. mosquitoes can remember dangerous odours but not complex associations).

Human: More complex neurotransmitter systems (dopamine, serotonin, noradrenaline – regulate emotions, motivation). High synaptic plasticity – formation of long-term memory, complex neural networks.

### Energy efficiency

Mosquitoes: Nervous system consumes minimal energy as it is optimised for survival. Rapid response to key stimuli (CO<sub>2</sub>, heat, blood odour).

Human: Brain consumes ~20% of body energy as it supports complex computations.

### Sensitivity to neurotoxins

Mosquitoes: Their neurons are more resistant to some poisons (e.g. nicotine) but sensitive to insecticides (pyrethroids block sodium channels).

Humans: Neurons are more vulnerable to neurotoxins (mercury, lead, botulinum toxin).

### DISCUSSION

Mosquito and human nerve impulses are similar at the cellular level, but differ in speed, organisation and complexity of information processing. Mosquitoes are fast, energy efficient, but primitive reactions. Humans are slower in individual neurons, but have complex thinking and adaptive behaviour.

In brief: a mosquito is a "microcomputer" for finding blood, while a human is a "supercomputer" with advanced intelligence.

How do nerve impulses in the mosquito brain differ from human nerve impulses? Nerve impulses (action potentials) in mosquitoes and humans operate on similar biophysical principles, but there are key differences in speed, organisation and functionality. The key differences are:



### Типы нейронов и синаптическая передача

**Комары.** Нейромедиаторы: ацетилхолин, глутамат, ГАМК (как у человека, но рецепторы могут отличаться). Меньше синаптической пластичности – обучение ограничено (например, комары могут запоминать опасные запахи, но не сложные ассоциации).

**Человек.** Более сложные нейромедиаторные системы (дофамин, серотонин, норадреналин – регулируют эмоции, мотивацию). Высокая синаптическая пластичность – формирование долговременной памяти, сложные нейросети.

### Энергоэффективность

**Комары.** Нервная система потребляет минимальную энергию, так как оптимизирована для выживания. Быстрая реакция на ключевые стимулы ( $\text{CO}_2$ , тепло, запах крови).

**Человек.** Мозг потребляет ~20% энергии тела, так как поддерживает сложные вычисления.

### Чувствительность к нейротоксинам

**Комары.** Их нейроны более устойчивы к некоторым ядам (например, никотину), но чувствительны к инсектицидам (пиретроиды блокируют натриевые каналы).

**Человек.** Нейроны более уязвимы к нейротоксинам (ртуть, свинец, ботулотоксин).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Нервные импульсы комара и человека похожи на клеточном уровне, но различаются скоростью, организацией и сложностью обработки информации. Комары – быстрые, энергоэффективные, но примитивные реакции. Человек – медленнее в отдельных нейронах, но зато обладает сложным мышлением и адаптивным поведением.

Если говорить кратко: комар – это "микрокомпьютер" для поиска крови, а человек – "суперкомпьютер" с развитым интеллектом.

Чем нервные импульсы мозга комара отличаются от нервных импульсов человека? Нервные импульсы (потенциалы действия) у комаров и людей работают на схожих биофизических принципах, но есть ключевые различия в скорости, организации и функциональности.

Основные отличия – потенциал действия (ПД) у комаров и людей основан на одних и тех же фундаментальных принципах (изменение ионной проницаемости мембраны нейрона), но есть ключевые различия в параметрах (детальное сравнение показано в табл.).<sup>1</sup>

Ключевые различия:

Ионные каналы.

The action potential (AP) in mosquitoes and humans is based on the same fundamental principles (changes in the ionic permeability of the neuron membrane), but there are key differences in the parameters. A detailed comparison is shown in Table 1.

Key Differences:

Ionuc crystals

**Mosquitoes:** Sodium ( $\text{Na}^+$ ) and potassium ( $\text{K}^+$ ) channels are less selective than in mammals. Some channels are resistant to tetrodotoxin (TTX), which blocks AP in vertebrates.

**Human:** Channels are more specialised (e.g. fast  $\text{Nav}1.1$ - $\text{Nav}1.9$ ). Sensitive to TTX and other neurotoxins.

Action potential transit velocity

**Mosquitoes:** No myelination, so, speed 1–5 m/s (up to 10 m/s in thick axons, e.g. in giant cockroach neurons).

**Human:** Myelinated fibres, so, speed up to 120 m/s (e.g. motor neurons).

Energy assumption

**Mosquitoes:** AP requires less energy (ATP) because ionic gradients are recovered more slowly.

**Human:** Up to 60% of neuronal energy is spent to maintain  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

Temperature dependence

**Mosquitoes:** AP is possible at lower temperatures (some insects are active at +5 °C).

**Humans:** When cooling below +20 °C, pulse conduction is impaired.

What accounts for these differences? In insects, as a result of evolutionary adaptation, the AP is optimised to minimise energy for a small body size. In humans, it is optimised for speed and precision in a complex nervous system.

**Neuronal size:** Mosquito axons are shorter, hence no myelination is needed. Note that some insects (e.g. grasshoppers) have giant axons (up to 50  $\mu\text{m}$  in diameter) that conduct signals at speeds of up to 25 m/s – a record among invertebrates!

The following conclusions can be drawn:

The action potential in mosquito and human is similar in mechanism but different in mosquito:

- Smaller amplitude (by 10–20 mV);
- Longer PD (1.5–2 times);
- Resistance to toxins (e.g., TTX);
- Slower conduction due to lack of myelin.

These features reflect a general principle: the insect nervous system sacrifices "precision" for energy efficiency and compactness.

### REGISTRATION METHODS

How to experimentally record the nerve impulse potential of the mosquito brain? Experimental recording of action potentials (APs) in the mosquito nervous system is a difficult task due to the small size of neurons (often less than 5  $\mu\text{m}$  in diameter).



Таблица 1. Основные параметры потенциала действия

Table 1. Основные параметры потенциала действия

| Характеристика<br>Characteristics            | Комары (насекомые)<br>Mosquitoes (insects)                                                                                                                                          | Человек<br>Human                                                                               |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Амплитуда<br>Amplitude                       | ~70–90 мВ   mV                                                                                                                                                                      | ~100–110 мВ   mV                                                                               |
| Длительность<br>Duration                     | 1–2 мс   ms                                                                                                                                                                         | 0,5–1 мс   ms                                                                                  |
| Порог возбуждения<br>Threshold of excitation | –40 мВ (от уровня покоя)<br>–40 mV (from the rest level)                                                                                                                            | –55 мВ (от уровня покоя)<br>–55 mV (from the rest level)                                       |
| Фазы<br>Phases                               | Деполаризация (Na <sup>+</sup> ), реполяризация (K <sup>+</sup> ),<br>гиперполяризация<br>Depolarization (Na <sup>+</sup> ), repolarization (K <sup>+</sup> ),<br>hyperpolarization | Аналогично, но с более быстрыми<br>ионными каналами<br>Similarly, but with faster ion channels |

**Комары.** Натриевые (Na<sup>+</sup>) и калиевые (K<sup>+</sup>) каналы менее селективные, чем у млекопитающих. Некоторые каналы устойчивы к тетродотоксину (ТТХ), который блокирует ПД у позвоночных.

**Человек.** Каналы более специализированы (например, быстрые Nav1.1–Nav1.9). Чувствительны к ТТХ и другим нейротоксинам.

Скорость прохождения потенциала действия.

**Комары.** Нет миелинизации → скорость 1–5 м/с (у толстых аксонов, например, в гигантских нейронах тараканов – до 10 м/с).

**Человек.** Миелинизированные волокна → до 120 м/с (например, двигательные нейроны).

Энергозатраты.

**Комары.** ПД требует меньше энергии (АТФ), так как ионные градиенты восстанавливаются медленнее.

**Человек.** На поддержание Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы тратится до 60% энергии нейрона.

Температурная зависимость.

**Комары.** ПД возможен при более низких температурах (некоторые насекомые активны при +5 °С).

**Человек.** При охлаждении ниже +20 °С проведение импульса нарушается.

Чем обусловлены эти различия? У насекомых в результате эволюционной адаптации ПД оптимизирован для минимизации энергии при небольшом размере тела. У человека – для скорости и точности в сложной нервной системе

Размер нейронов.

Аксоны комара короче, следовательно, не нужна миелинизация. Отметим, что у некоторых насекомых (например, кузнечиков) есть гигантские аксоны (до 50 мкм в диаметре), проводящие

However, modern neurophysiological methods make it possible.

The main approaches are:

#### 1. Intracellular recording

How it works. Uses a glass microelectrode (tip diameter <1 μm) filled with electrolyte (KCl) that is injected directly into the neuron.

Measures changes in membrane potential with high accuracy (down to 0.1 mV).

Application to mosquito: Suitable for large neurons (e.g. in the abdominal nerve chain or optic ganglia).

Difficulties:

The mosquito's neurons are easily damaged.

Requires fixation of the insect (often with wax or special glue).

#### 2. Extracellular recording

How it works. An electrode is placed next to a neuron or axon, recording extracellular currents.

Methods: Succinylcholine electrodes – for recording antennal nerve activity.

Microcontact arrays – for simultaneous recording from multiple neurons.

Examples: Recording the response of olfactory neurons to CO<sub>2</sub> and blood odours.

Study of neuronal activity in ganglia of the ventral nerve chain.

Advantages: Less invasive method. Allows for long-term recordings.

#### 3. Patch-clamp

How it works. A microelectrode is tightly adhered to the membrane of a neuron, recording ionic currents through individual channels.

Options: Cell-attached is recording without damaging the cell. Whole-cell means full access to intracellular environment.



сигналы со скоростью до 25 м/с – рекорд среди беспозвоночных!

Можно сделать следующие выводы.

Потенциал действия у комара и человека похож по механизму, но отличается у комара:

- меньшей амплитудой (на 10–20 мВ);
- более длительным ПД (в 1,5–2 раза);
- устойчивостью к токсинам (например, ТТХ);
- медленной проводимостью из-за отсутствия миелина.

Эти особенности отражают общий принцип: нервная система насекомых жертвует "точностью" ради энергоэффективности и компактности.

## МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ

Как экспериментально регистрировать потенциал нервного импульса мозга комара? Экспериментальная регистрация потенциалов действия (ПД) в нервной системе комара – сложная задача из-за малых размеров нейронов (диаметр часто менее 5 мкм). Однако современные нейрофизиологические методы позволяют это сделать.

Основные подходы:

### 1. Внутриклеточная запись (Intracellular recording)

Как работает? Используется стеклянный микроэлектрод (диаметр кончика <1 мкм), заполненный электролитом (KCl), который вводится прямо в нейрон.

Измеряет изменения мембранного потенциала с высокой точностью (до 0,1 мВ).

Применение к комару: подходит для крупных нейронов (например, в брюшной нервной цепочке или зрительных ганглиях).

Сложности: нейроны комара легко повреждаются.

Требуется фиксации насекомого (часто с помощью воска или специального клея).

### 2. Внеклеточная запись (Extracellular recording)

Как работает? Электрод размещается рядом с нейроном или аксоном, регистрируя внеклеточные токи.

Методы: сукцинилхолин-электроды – для записи активности антеннальных нервов.

Микроконтактные массивы – для одновременной записи с нескольких нейронов.

Примеры: регистрация реакции обонятельных нейронов на CO<sub>2</sub> и запахи крови.

Изучение активности нейронов в ганглиях брюшной нервной цепочки.

Преимущества: менее инвазивный метод. Позволяет долгосрочные записи.

### 3. Патч-кламп (Patch-clamp)

Как работает? Микроэлектрод плотно присасывается к мембране нейрона, фиксируя ионные токи через отдельные каналы.

Application: Study of properties of sodium and potassium channels in mosquito neurons.

Example: Study of resistance to insecticides (e.g. pyrethroids).

Limitations: Requires isolation of individual neurons (e.g. from cultured larval brain cells).

### 4. Optogenetics and calcium imaging

How it works. Calcium dyes (e.g. GCaMP) – fluoresce when bound to Ca<sup>2+</sup>, which enters the neuron during AP.

Optogenetics – introduction of light-sensitive ion channels (Channelrhodopsin) to activate neurons by light. Examples: Real-time visualisation of olfactory neuron activity. Control of wing motor neurons in genetically modified mosquitoes. Pros: Does not require mechanical contact with the neuron. Allows for the study of neural networks.

### 5. Scanning probe microscopy

Scanning probe microscopy (SPM) is a unique tool for studying structure and functional activity of biological objects at the nanoscale. Unlike electron microscopy, which allows obtaining high-resolution images but requires harsh conditions (vacuum, metallisation), SPM works under ambient conditions – in air or in liquid, which makes it particularly useful when working with living samples.

One of the most well-known representatives of SPM is atomic force microscopy (AFM). It allows not only to obtain three-dimensional images of cell and tissue surfaces with nanometre resolution, but also to record mechanical properties of the surface, such as stiffness, adhesion and viscoelasticity. These parameters can be related to changes in state of the neuron membrane during the action potential.

SPM opportunities:

- obtaining topographic maps of neurons and axons;
- studying morphological changes during neuron excitation;
- registration of local mechanical oscillations associated with pulse generation;
- combination with optical methods (e.g. fluorescence microscopy);
- study of dynamic processes in real time.

Sample preparation for scanning probe microscopy: Immobilisation of the insect: Chilling or CO<sub>2</sub>-narcosis. Fixation in a special holder (e.g. wax substrate);

Access to the nervous system:

For recording from the brain, opening the head capsule. For peripheral neurons – exposure of nerves (e.g. antennal nerve).

Example of an experiment (AP registration in the antennal nerve):

Fix the mosquito, open the antennal segment. Bring the extracellular electrode to the nerve. Apply a stimulus (blood odour or heat). Record bursts of activity.





Варианты: Cell-attached – запись без повреждения клетки. Whole-cell – полный доступ к внутриклеточной среде.

Применение: исследование свойств натриевых и калиевых каналов в нейронах комара.

Пример: изучение устойчивости к инсектицидам (например, к пиретроидам).

Ограничения: требует выделения отдельных нейронов (например, из культивируемых клеток мозга личинки).

#### 4. Оптогенетика и кальциевая визуализация

Как работает? Кальциевые красители (например, GCaMP) – флуоресцируют при связывании с  $\text{Ca}^{2+}$ , который поступает в нейрон при ПД.

Оптогенетика – введение светочувствительных ионных каналов (Channelrhodopsin) для активации нейронов светом. Примеры: визуализация активности обонятельных нейронов в реальном времени. Контроль двигательных нейронов крыльев у генетически модифицированных комаров. Плюсы: не требует механического контакта с нейроном. Позволяет изучать нейросети.

#### 5. Сканирующая зондовая микроскопия

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) представляет собой уникальный инструмент для исследования структуры и функциональной активности биологических объектов на наноуровне. В отличие от электронной микроскопии, позволяющей получать изображения с высоким разрешением, но требующей жестких условий (вакуум, металлизация), СЗМ работает в условиях окружающей среды – на воздухе или в жидкости – что делает ее особенно полезной при работе с живыми образцами.

Одним из наиболее известных представителей СЗМ является атомно-силовая микроскопия (АСМ). Она позволяет не только получать трехмерные изображения поверхности клеток и тканей с нанометровым разрешением, но и регистрировать механические свойства поверхности, такие как жесткость, адгезия и вязкоупругость. Эти параметры могут быть связаны с изменением состояния мембраны нейрона во время потенциала действия.

Возможности СЗМ:

- получение топографических карт нейронов и аксонов;
- изучение морфологических изменений при возбуждении нейрона;
- регистрация локальных механических колебаний, связанных с генерацией импульсов;
- комбинирование с оптическими методами (например, флуоресцентной микроскопией);
- исследование динамических процессов в реальном времени.

Подготовка образца для сканирующей зондовой микроскопии:

Such methods help to study how mosquitoes find prey by smell and why insecticides stop working, as well as how the insects' "brain" works.

With scanning probe microscopy, you can start with extracellular recording – this is the easiest way to "hear" the mosquito's nerve impulses! When measuring an action potential, one electrode (atomic force microscope probe) touches the neuron, but where is the second electrode placed? In action potential (AP) recording, the second electrode plays a critical role – it serves as a reference (ground) electrode and closes the electrical circuit. It is placed outside the cell but close to the neuron (e.g., in insect haemolymph or physiological solution). Chlorinated silver electrode ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) is often used to minimise interference. Important: Both electrodes must be in the same ionic environment to avoid diffusion potentials.

**Control experiments.** To exclude artefacts check that the signal disappears when the active electrode is removed from the neuron, then make sure that the reference electrode does not create noise (e.g. using low impedance electrodes).

Why is this important? Without a reference electrode it is not possible to measure the potential difference – the circuit will remain open. Incorrect placement of the reference adds noise (e.g. due to differences in the ionic composition of the media). The analogue is as in a voltmeter – one probe is connected to the measuring point, the other to the ground potential. The right choice of reference electrode is the key to clear AP registration in microscopic mosquito neurons!

To maintain cells viability and tissues of insects outside the body, a modified Ringer's solution adapted to their haemolymph is used. Approximate composition (in mM):

- NaCl – 120–150 (main osmotic component);
- KCl – 3–5 (membrane potential maintenance);
- $\text{CaCl}_2$  – 1–2 (for membrane stabilisation and synaptic transmission);
- $\text{MgCl}_2$  – 1–4 (enzyme cofactor);
- Glucose – 5–10 (energy source);
- Buffer (HEPES or Tris) – 5–10 (sustaining pH on 7.0–7.4 level).

The use of Ringer's solution is essential for scanning capillary microscopy when surface imaging is performed in an electrolyte that conducts an electric current.

Observation of the *Drosophila* eye using scanning capillary microscopy was carried out in the group of Yu. Korchev [4]. It was shown that capillary microscopy allows obtaining topographic data without damaging the specimen, but with lower resolution than electron microscopy. Electron microscopy gives clearer images of nanostructures (e.g. ommatidia of the eye), but requires vacuum and metallisation. Capillary microscopy is better suited for dynamic studies of living cells.





Иммобилизация насекомого: охлаждение или CO<sub>2</sub>-наркоз. Фиксация в специальном держателе (например, восковой подложке).

Доступ к нервной системе: для записи с мозга – вскрытие головной капсулы. Для периферических нейронов – обнажение нервов (например, антеннального).

Пример эксперимента (регистрация ПД в антеннальном нерве).

Фиксируют комара, вскрывают антеннальный сегмент. Подводят внеклеточный электрод к нерву. Подают стимул (запах крови или тепло). Записывают всплески активности.

Такие методы помогают изучать как комары находят жертву по запаху и почему инсектициды перестают действовать, а также как работает "мозг" насекомых.

С помощью сканирующей зондовой микроскопии можно начать с внеклеточной записи – это самый простой способ "услышать" нервные импульсы комара! При измерении потенциала действия одним электродом (зондом атомно-силового микроскопа) касаются нейрона, а где располагают второй электрод? При регистрации потенциала действия (ПД) второй электрод играет критическую роль – он служит референсным (земляным) электродом и замыкает электрическую цепь. Размещается вне клетки, но вблизи нейрона (например, в гемолимфе насекомого или физиологическом растворе). Часто используется хлорированный серебряный провод (Ag/AgCl) для минимизации помех. Важно: оба электрода должны находиться в одной ионной среде, чтобы избежать диффузионных потенциалов.

**Контрольные эксперименты.** Чтобы исключить артефакты проверяют, что сигнал исчезает при удалении активного электрода от нейрона, затем убеждаются, что референсный электрод не создает шумов (например, используя электроды с низким импедансом).

Почему это важно? Без референсного электрода невозможно измерить разность потенциалов – цепь останется разомкнутой. Неправильное размещение референса добавляет шум (например, из-за разницы ионных составов сред). Аналог – как в вольтметре – один щуп подключают к точке измерения, второй к потенциалу "земли". Правильный выбор референсного электрода – ключ к четкой регистрации ПД у микроскопических нейронов комара!

Для поддержания жизнеспособности клеток и тканей насекомых вне организма используют модифицированный раствор Рингера, адаптированный к их гемолимфе. Примерный состав (в mM):

NaCl – 120-150 (основной осмотический компонент);

KCl – 3-5 (поддержание мембранного потенциала);

Significantly, scanning capillary microscopy allows obtaining three-dimensional images of neurons and maps of local stiffness distribution of their membrane. Additionally, the aforementioned patch-clamp, extracellular and intracellular recordings of nerve signals can be performed with the capillary microscope.

## CONCLUSIONS

Based on the presented data, it is possible to note significant methodological advantages of neurophysiological studies using insects. In particular, it is their high availability and compact size, which is important for scanning probe microscopy. Insects can be induced into an immobile state – anabiosis – by reducing the temperature or increasing the concentration of carbon dioxide. This also greatly simplifies the experiment. The percentage ratio of the number of neurons and other cells in insects is much higher than in humans, which gives certain advantages in studies with atomic force microscopy. Unlike other methods – patch-clamp, optogenetics, electron microscopy – probe microscopy makes it possible to visualise the insect brain in 3D with nanometre resolution in a natural environment. Thus, combining electrophysiological methods with the capabilities of scanning probe microscopy allows:

- obtain information on structure and function of neurons;
- study dynamics of action potentials;
- study the influence of external factors on the passage of nerve impulses (temperature, chemicals, insecticides);
- develop new approaches to insect population management and biosensors.

This research is not only of fundamental importance but also has practical applications, from gaining new insights to developing neural interfaces based on biological systems.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The study was conducted mainly on an initiative basis. This work was partially performed under the state order of the Lomonosov Moscow State University. FemtoScan Online software is provided by Advanced Technologies Center, [www.femtoscanner.ru](http://www.femtoscanner.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.



$\text{CaCl}_2$  – 1-2 (для стабилизации мембран и синаптической передачи);

$\text{MgCl}_2$  – 1-4 (кофактор ферментов);

Глюкоза – 5-10 (источник энергии);

Буфер (HEPES или Tris) – 5-10 (поддержание pH на уровне 7,0-7,4).

Использование раствора Рингера необходимо для сканирующей капиллярной микроскопии, когда визуализация поверхности проводится в электролите, проводящем электрический ток.

Наблюдение глаза *Drosophila* с помощью сканирующей капиллярной микроскопии провели в группе Ю. Корчева [4]. Показано, что капиллярная микроскопия позволяет получать топографические данные без повреждения образца, но с меньшим разрешением, чем электронная микроскопия. Электронная микроскопия дает более четкие изображения наноструктур (например, омматидиев глаза), но требует вакуума и металлизации. Капиллярная микроскопия лучше подходит для динамических исследований живых клеток. Существенно, что сканирующая капиллярная микроскопия позволяет получать трехмерные изображения нейронов и карты распределения локальной жесткости их мембраны. Дополнительно с помощью капиллярного микроскопа можно проводить упомянутые выше патч-кламп, внеклеточную и внутриклеточную записи нервных сигналов.

## ВЫВОДЫ

На основании представленных данных можно отметить существенные методологические преимущества нейрофизиологических исследований с использованием насекомых. В частности, это высокая их доступность и компактность размеров, что важно для сканирующей зондовой микроскопии. Насекомых можно вводить в неподвижное состояние – анабиоз – за счет снижения температуры или увеличения концентрации углекислого газа. Это также существенно упрощает проведение эксперимента. Процентное соотношение количества нейронов и остальных клеток у насекомых значительно выше, чем у человека, что дает определенные преимущества при исследованиях с помощью атомно-силовой микроскопии. В отличие от других методов – патч-клампа, оптогенетики, электронной микроскопии – в зондовой микроскопии появляется возможность визуализации мозга насекомого в 3D с нанометровым разрешением в естественной среде. Таким образом, комбинирование электрофизиологических методов с возможностями сканирующей зондовой микроскопии позволяет:

- получать информацию о структуре и функции нейронов;
- исследовать динамику потенциалов действия;
- изучать влияние внешних факторов на прохождение нервных импульсов (температура, химические вещества, инсектициды);
- разрабатывать новые подходы к управлению популяциями насекомых и созданию биосенсоров.

Эти исследования имеют не только фундаментальное значение, но и практическое применение – от получения новых знаний до разработки нейроинтерфейсов на основе биологических систем.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проведено в основном инициативным образом. Частично исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова. Оборудование зондовой микроскопии серии "ФемтоСкан" и программное обеспечение "ФемтоСкан Онлайн" предоставлено ООО НПП "Центр перспективных технологий", [www.femtoscans.ru](http://www.femtoscans.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

1. Yang R., Zaheri A., Gao W., Hayashi C., Espinosa H.D. AFM Identification of Beetle Exocuticle: Bouligand Structure and Nanofiber Anisotropic Elastic Properties. *Adv. Funct. Mater.* 2017. Vol. 27. P. 1603993. <https://doi.org/10.1002/adfm.201603993>
2. Stavenga D.G., Foletti S., Palasantzas G., Arikawa K. Light on the moth-eye corneal nipple array of butterflies. *Proc. R. Soc. B.* 2006. PP. 273661–273667. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3369>
3. Dorkenwald S., Matsliah A., Sterling A.R. *et al.* Neuronal wiring diagram of an adult brain. *Nature.* 2024. Vol. 634. PP. 124–138. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07558-y>
4. Novak P., Li C., Shevchuk A. *et al.* Nanoscale live-cell imaging using hopping probe ion conductance microscopy. *Nat Methods.* 2009. Vol. 6. PP. 279–281. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1306>