РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА Том 106, № 4, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

От редактора		
Михаилу Аркадьевичу Островскому – 85 лет	399	
Обзорные и проблемные статьи		
Молекулярная физиология зрительного пигмента родопсина: актуальные направления		
М. А. Островский	401	
Spectral and Thermal Properties of Rhodopsins: Closely Related but not Tightly Coupled		
K. Donner	421	
Что такое "хороший слух"? Показатели частотной разрешающей способности слуха		
А. Я. Супин	436	
Экспериментальные статьи		
Особенности и АМФ-гарисимой регулировки каскала фотогранстукник		
в колбочках		
В. С. Ситникова, Л. А. Астахова, М. Л. Фирсов	448	
Световая адаптация палочек сетчатки, адаптационная память и последовательные образы		
А. Ю. Ротов, Л. А. Астахова, М. Л. Фирсов, В. И. Говардовский	462	
Разнообразие и адаптивные свойства зрительных пигментов рыб с изменяемой окраской роговицы		
С. Л. Кондрашев	474	
Ганглиозные клетки с фоновой активностью сетчатки рыб и их возможная функция в оценке зрительной сцены		
Е. М. Максимова, А. Т. Алипер, И. З. Дамянович, А. А. Зайчикова, П. В. Максимов	486	
Перестройка активности нейронных сетей головного мозга человека при достижении порога распознавании фрагментированных изображений		
К. Ю. Шелепин, Ю. Е. Шелепин	504	
Математическая модель секреции АТР вкусовыми клетками типа II		
С. С. Колесников	521	

CONTENTS

Editorials

Mikhail Arkadievich Ostrovsky is 85	399
Reviews and Topical Articles	
The Molecular Physiology of the Visual Pigment Rhodopsin: Current Trends M. A. Ostrovsky	401
Spectral and Thermal Properties of Rhodopsins: Closely Related but not Tightly Coupled <i>K. Donner</i>	421
Acute Hearing: What is It? Indicators of Frequency Resolving Power of Hearing <i>A. Ya. Supin</i>	436
Experimental Articles	
Specificity of cAMP-Dependent Regulation of the Phototransduction Cascade in Cone Photoreceptors V. S. Sitnikova, L. A. Astakhova, and M. L. Firsov	448
Light Adaptation of Retinal Rods, Adaptation Memory and Afterimages A. Yu. Rotov, L. A. Astakhova, M. L. Firsov, and V. I. Govardovskii	462
Diversity and Adaptive Properties of the Visual Pigments in Fish with Changeable Corneal Colouration <i>S. L. Kondrashev</i>	474
Ganglion Cells with Sustained Activity of the Fish Retina and Their Putative Function in Comprehension of the Visual Surround <i>E. M. Maximova, A. T. Aliper, I. Z. Damjanović, A. A. Zaichikova, and P. V. Maximov</i>	486
Reorganization of the Human Brain Neural Networks Activity at the Uncompleted Images Recognition Threshold	504
Mathematical Model of ATP Secretion in Taste Cells of the Type II S. S. Kolesnikov	521

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 399-400

——— ОТ РЕДАКТОРА —

МИХАИЛУ АРКАДЬЕВИЧУ ОСТРОВСКОМУ – 85 ЛЕТ



22 февраля 2020 года исполнилось 85 лет академику РАН Михаилу Аркадьевичу Островскому — советскому и российскому физиологу, крупному ученому, признанному мировым научным сообществом, специалисту в области физико-химической биологии, одному из авторов научного направления "молекулярная физиология зрения", доктору биологических наук, заслуженному профессору МГУ.

В настоящее время Михаил Аркадьевич продолжает активную и плодотворную научную работу: он является руководителем секции отделения физиологических наук РАН, Президентом Российского физиологического общества имени И.П. Павлова, главным редактором журнала РАН "Сенсорные системы", работает в Институте биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН), заведует кафедрой молекулярной физиологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Михаил Аркадьевич лидер отечественной научной школы молекулярной физиологии и патологии зрения, основоположник научного направления фундаментальных исследований молекулярных механизмов зрительной рецепции. Основные направления его исследований: фотохимия зрительного пигмента родопсина, механизмы фототрансдукции, механизмы повреждающего действия света на сетчатку и ретинальный пигментный эпителий, системы защиты от опасности такого повреждения, механизмы поддержания прозрачности хрусталика и его помутнения (катарактогенеза).

Под руководством М.А. Островского получены приоритетные данные о фотохимических реакциях и конформационных перестройках в молекуле зрительного пигмента родопсина, создано новое поколение фотопротекторных искусственных хрусталиков "Спектр" с естественной спектральной характеристикой, разработан и внедрен в клинику новый метод ранней диагностики аутоиммунных заболеваний сетчатки глаза (диабетическая ретинопатия), а в последние годы — метод аутофлуресценции глазного дна, позволяющий диагностировать дегенеративные заболевания сетчатки на самых ранних стадиях их возникновения. Работы М.А. Островского представляют исключительную важность как для понимания фундаментальных основ физикохимии и молекулярной физиологии зрения, так и патогенеза ряда тяжелых и распространенных глазных заболеваний (возрастная макулярная дегенерация сетчатки и катаракта). В 2009–2019 годах М.А. Островским успешно развита новая научная концепция о "фотобиологическом парадоксе зрения и его практических последствиях", создано принципиально новое научное направление — "оптогенетика зрения", направленное на протезирование дегенеративной (слепой) сетчатки и возвращение зрения слепым людям.

Заслуги М.А. Островского перед отечественной наукой отмечены орденами Дружбы и Почета. Он дважды лауреат премии Правительства РФ. Михаил Аркадьевич удостоен Золотой медали им. И.М. Сеченова РАН — за цикл работ по механизмам фоторецепции, премии им. Ю.А. Овчинникова РАН — за цикл работ "Сверхбыстрые фотопревращения зрительного пигмента родопсина".

Редколлегия Российского физиологического журнала им. И.М. Сеченова сердечно поздравляет академика М.А. Островского с юбилеем и посвящает этот номер Журнала современным проблемам физиологии сенсорных систем.

Редколлегия

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 401-420

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ ЗРИТЕЛЬНОГО ПИГМЕНТА РОДОПСИНА: АКТУАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ

© 2020 г. М.А. Островский*

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия ²Кафедра молекулярной физиологии, Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия *E-mail: ostrovsky3535@mail.ru

> Поступила в редакцию 24.02.2020 г. После доработки 26.02.2020 г. Принята к публикации 26.02.2020 г.

На протяжении почти 150 лет родопсин привлекает внимание исследователей, остается "горячей точкой" современной биологии. В механизме зрительной рецепции родопсин обеспечивает несколько ключевых физиологических функций: спектральную чувствительность, фототрансдукцию, световую и темновую адаптации. С родопсином и зрительным (ретиноидным) циклом родопсина связан патогенез целого ряда форм дегенеративных заболеваний сетчатки. В последнее время родопсин рассматривается как перспективный оптогенетический "инструмент" для протезирования дегенеративной сетчатки. В статье рассмотрены наиболее актуальные и активно обсуждаемые проблемы молекулярной физиологии родопсина.

Ключевые слова: родопсин, эволюция родопсинов, спектральная настройка зрительных пигментов, фотохимия родопсина, фототрансдукция, зрительный (ретиноидный) цикл, оптогенетическое протезирование дегенеративной сетчатки

DOI: 10.31857/S0869813920040056

ЗРИТЕЛЬНЫЙ РОДОПСИН В СЕМЕЙСТВЕ РЕТИНАЛЬ-СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

Название "родопсин" происходит от двух греческих слов: "*rhodo*" – розовый и "*opsis*" – видеть. До конца 50-х – начала 60-х годов он назывался "зрительным пурпуром", а еще ранее, после его открытия в 1876 г. Ференцем Боллем, *Sehestoff* – "зрительным веществом". В настоящее время название родопсины распространилось на большое семейство ретиналь-содержащих белков – и на родопсины многоклеточных, включая зрительные родопсины (родопсины II типа по современной классификации), и на микробиальные родопсины (родопсины I типа). Родопсины обнаружены во всех трех царствах – архея, эубактерии и эукариоты.

Микробиальные родопсины — одни из самых древних белков биосферы. Бактериородопсин — первый из обнаруженных микробиальных родопсинов и ответственный за бескислородный фотосинтез — возник в прокариотах около 3.5 млрд лет назад. К микробиальным родопсинам относятся протеородопсин — бактериальная версия родопсина, обнаруженная у протистов динофлагеллят, сенсорные родопсины, канальные родопсины одноклеточных водорослей, галородопсин и бактериородопсин галофильных архебактерий. Функциями микробиальных родопсинов являются эволюционно древняя форма фотосинтеза (бактериородопсин) и фототаксис (сенсорные родопсины). Эти функции обеспечиваются свето-индуцированным переносом протонов, катионов или анионов (хлора).

Родопсины II типа, в том числе зрительные, — одни из древнейших белков животного царства. Они появились у эукариот около миллиарда лет назад (для обзора см. [1–3]). Подавляющее большинство родопсинов II типа функционируют как G-белок связывающие рецепторы. В основном, они несут фоторецепторную функцию. Однако, это необязательно. Идентифицировано несколько подгрупп незрительных опсинов. К ним, в частности, относятся *меланопсин*, найденный в ганглиозных клетках сетчатки, а также в клетках мозга, и ответственный за циркадные ритмы и зрачковый рефлекс; *нейропсин* (Opn5), найденный в нервных клетках; *энцефалопсин*, обнаруженный в клетках мозга и висцеральных органов; *перопсин*, найденный в клетках ретинального пигментного эпителия (для обзора см. [4]).

Общим для всего класса ретиналь-содержащих белков являются структура апобелка — опсина с его семью трансмембранными альфа-спиральными сегментами и кофактор (хромофор) — ретиналь, поглощающий квант света. В молекуле ретиналь-содержащих белков ретиналь ковалентно связан всегда с лизиновым остатком опсина в седьмом альфа-спиральном сегменте. Наиболее консервативным доменом ретиналь-содержащих белков является хромофорный центр. Белковое окружение ретиналя в хромофорном центре принципиально важно и для спектральной настройки, и для осуществления сверхбыстрой фотоизомеризации — одной из самых быстрых в природе фотохимических реакций (для обзора см. [5]).

Следует признать, что вопрос об эволюционной связи между микробиальными родопсинами I типа и родопсинами многоклеточных II типа, по-существу, остается открытым. Их несомненная похожесть может быть результатом конвергентной эволюции [4]. С другой стороны, нельзя исключить, что их похожесть может быть следствием существования общего и утерянного предшественника [6].

Наряду с вопросом об эволюционной связи между микробиальными родопсинами І типа и родопсинами многоклеточных II типа, активнейшим образом обсуждается вопрос об эволюции G-белок-связывающих рецепторов и зрительном родопсине как их типичном представителе (или предшественнике). Именно зрительный родопсин служит в настоящее время самой адекватной моделью для исследования структур и механизмов активации всего класса G-белок-связывающих рецепторов. Несомненно, эволюция ретиналь-содержащих белков, как и эволюция G-белоксвязывающих рецепторов, остаются одним из актуальных направлений современной биологии (для обзора см. [7]).

СПЕКТРАЛЬНАЯ НАСТРОЙКА ЗРИТЕЛЬНЫХ ПИГМЕНТОВ: ЭВОЛЮЦИОННАЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ВРЕМЕННЫЕ ШКАЛЫ

Во всех разнообразных типах органов зрения, во всех типах фоторецепторных клеток, начиная со светочувствительных клеток простейших многоклеточных организмов и кончая фоторецепторными клетками рабдомерного или реснитчатого (палочки и колбочки) типа высокоорганизованных беспозвоночных и позвоночных животных, светочувствительной молекулой является G-белок-связывающий зрительный пигмент родопсин с 11-*цис* изомером ретиналя или 11-*цис*-дегидроретиналя в качестве хромофорной группы. Спектральное и фотохимическое разнообразие зрительных пигментов обеспечивается аминокислотными заменами белковой части молекулы, главным образом в хромофорном центре опсина. В принципе, спектральная настройка возможна в двух временных шкалах: длительной эволюционной и сравнительно краткосрочной, адаптационной (физиологической).

Внутримолекулярные механизмы эволюционной спектральной настройки зрительных пигментов позвоночных в настоящее время достаточно хорошо изучены. Например, сдвиг спектра поглощения коротковолнового "ультрафиолетового" пигмента в фиолетово-синюю область видимого спектра требует всего одной аминокислотной замены в хромофорном центре опсина [8]. Спектральная настройка длинноволновых пигментов в "красных" колбочках рептилий, птиц и млекопитающих требует нескольких аминокислотных замен, включая анион (хлор)-связывающие центры в хромофорном центре. Впервые ионохромные свойства этих пигментов были показаны у геккона [9]. Нами было показано, что удаление ионов хлора не только смещает в коротковолновую область (примерно на 30 нм) максимум спектра поглощения йодопсина цыпленка в дигитониновом экстракте [10] и в колбочках изолированной сетчатки лягушки [11], но и подавляет функциональную активность (падение или даже исчезновению позднего рецепторного потенциала в ответ на красную вспышку света) красно-чувствительных колбочек изолированной сетчатки золотой рыбки [12]. Что касается спектральной настройки палочкового зрительного пигмента (родопсина), то ее, практически, не существует: почти у всех наземных позвоночных максимум спектра поглощения родопсина находится в области 500 нм. Хотя палочковый родопсин и колбочковые зрительные пигменты содержат один и тот же хромофор – 11-*цис* ретиналь, существенным образом отличаются не только их спектры поглощения, но и их фотохимические, биохимические и физиологические свойства [13]. Это связано с различным белковым окружением хромофора в хромофорном центре палочкового и колбочковых опсинов. Так, например, недавно удалось показать, используя аналоги 11-иис ретиналя, что структура хромофор-связывающего центра опсина синих колбочек человека существенно отличается от структуры хромофор-связывающего центра опсина зеленых и красных колбочек [14]. Такое различие еще раз подтверждает их различное филогенетическое происхождение [15].

Выяснение детальной молекулярной организации хромофор-связывающего центра колбочковых пигментов принципиально важно для понимания особенностей фотохимии, биохимии и физиологии колбочкового зрения. Актуальной задачей в этой связи является кристаллизация колбочковых пигментов и их рентгеноструктурное исследование. До настоящего времени ни один из них, в отличие от родопсина, не кристаллизован.

Что касается адаптационной, физиологической спектральной настройки зрительных пигментов - сезонной или зависящей от условий освещения, то, как правило, речь идет о замене хромофорной группы – 11-*цис*-ретиналя (ретиналь₁ – альдегид витамина A₁), поглощающего в более коротковолновой области спектра, на 11-цис-дегидроретиналь (ретиналь₂ – альдегид витамина А₂), который за счет добавочной двойной связи в бета-иононовом кольце молекулы ретиналя поглощает в более длинноволновой области спектра. Однако, этот общепринятый механизм не всегда работает, во всяком случае, в отношении беспозвоночных [16]. Совместно с финскими коллегами нами было предпринято подробное сравнительно-физиологическое исследование механизмов адаптационных изменений спектральной чувствительности глаза и спектральной настройки родопсина ракообразных, а именно креветок рода мизид (genus Mysis; Mysida, Crustacea), в зависимости от среды обитания [17, 18]. Род ракообразных Mysis можно рассматривать как исключительно удобную модель для исследования их эпигенетического и "быстрого", физиологического адаптационного ответа на изменение условий световой среды обитания и других экологических факторов (солености и т.д.). Мизиды неоднократно меняли среду обитания как на межвидовом, так и внутривидовом уровнях, причем за разные периоды времени — от миллионов лет до всего нескольких тысячелетий. Морская и озерная популяции вида Mysis relicta разделились сравнительно недавно – в конце ледникового периода, около 10000 лет назад. В отличие от морской, в пресных водах, содержащих различного рода взвеси, уже на сравнительно небольшой глубине света доходит мало, и он смещен в длинноволновую область спектра. Поэтому спектры поглощения родопсинов, обеспечивающих "сумеречное" зрение в пресных и малопрозрачных водах, как правило, смещены в длинноволновую область спектра. Именно такая, отвечающая этому правилу спектральная настройка зрительного пигмента был обнаружена нами у морской и озерной популяций креветок *Mysis relicta*. Максимум поглощения родопсина у морских креветок находится в области 530 нм, а у обитающей на большой глубине озерных — в области 560 нм [17]. Спектральная чувствительность глаза озерной популяции также смещена примерно на 30 нм в "красную" область спектра по сравнению с морской [19]. Важно при этом подчеркнуть, что спектральная чувствительность глаза креветок существенно смещена по отношению к спектрам поглощения их зрительных пигментов в длинноволновую область. Действительно, максимум поглощения родопсина у морских креветок находится в области 530 нм, а спектральная чувствительность их глаза имеет максимум около 570 нм; у озерных максимум поглощения родопсина в области 560 нм, а максимум спектральной чувствительности глаза около 600 нм. Как известно, в длинноволновом смещении спектральной чувствительности глаза принимают участие желтые, частично отфильтровывающие синий свет экранирующие пигменты — это входящие в состав оммохромных гранул ксантомматины и каротиноиды [20]. Нами было показано, что именно ксантомматины в составе оммохромных гранул в качестве внутриглазных светофильтров формируют длинноволновое смещение спектральной чувствительности глаза обеих популяций креветок M. relicta [21]. Поскольку до глубины озера, на которой обитают озерные креветки, в области 680 нм доходит ничтожное количество света, а свет короче 550 нм полностью отсекается, то длинноволновая спектральная настройка и зрительного пигмента, и спектральной чувствительности глаза принципиально важны для адаптации их зрения к световой среде обитания. Подобный (на 20-30 нм) длинноволновый спектральный сдвиг у озерных популяций по сравнению с морскими был найден еще у трех северных видов мизид, претерпевших более чем двухмиллионный период эволюции и дивергенции опсинового гена [22].

Каковы механизмы спектральной настройки зрительного пигмента? Естественно было предположить, что в зрительных пигментах морской и озерной популяций *М. relicta* содержатся разные формы 11-*цис* ретиналя – у морской 11-*цис* ретиналь₁ (А1), а у озерной 11-цис ретиналь, (А2). Как давно известно, замена хромофора А1 на А2 в том же самом опсине приводит к длинноволновому смещение максимума спектра поглощения примерно на 30 нм [23]. Такая замена А1 ↔ А2 (родопсин ↔ порфиропсин) обеспечивает "быструю", физиологическую, например, сезонную, настройку спектральной чувствительности глаза у рыб и амфибий [24, 25], а также, по крайней мере, у одного вида ракообразных – у пресноводных крабов, у которых баланс между двумя формами хромофоров зависит от факторов окружающей среды, в первую очередь света и температуры [26]. Однако, вопреки ожиданиям, нами было четко показано, что различия в спектрах поглощения зрительных пигментов в рабдомах озерной и морской популяций одного и то же вида Mysis relicta не связаны с использованием различных форм хромофоров – и у тех, и у других хромофором является один и тоже 11-цис изомер ретиналя₁ (A1), в то время как хромофор A2 в зрительных пигментах этих популяций отсутствовал [27]. Скорее всего, зрительные пигменты и других видов мизид содержат только хромофор А1. Мизиды принципиально отличаются от пресноводных ракообразных, обладающих $A1 \leftrightarrow A2$ системой, тем, что мизиды – это исходно морские ракообразные, а не пресноводные. Поэтому у них как морских ракообразных $A1 \leftrightarrow A2$ система отсутствует. И хотя мизиды меняли, притом неоднократно, среду обитания с морской на пресноводную, биохимическая система обмена A1 \leftrightarrow A2 у них так и не появилась. Иными словами, будучи исходно морскими ракообразными, мизиды не использовали A1 \leftrightarrow A2 обмен для изменения спектральной чувствительности глаза.

Что касается белковой части молекулы – опсина, аминокислотные замены в хромофорном центре которого определяют эволюционную спектральную настройку зрительных пигментов, то попытки найти различия между опсинами морской и озерной популяциями пока не увенчались успехом. Конкретно, не было найдено разницы в гене опсина, кодирующего аминокислотную последовательность родопсина в рабдомах озерной и морской популяций Mysis relicta [22]. Вместе с тем, в этой же работе при сравнении трех видов мизид -M. relicta, M. salemaai u M. segerstralei — различия между видами в аминокислотной последовательности их опсинов на основе анализа генов найдены были. Интересно, что в рабдомах каждой из популяций *M. relicta* присутствуют оба зрительных пигмента – и средневолновый (зеленый) – 525–530 нм, и длинноволновый (красный) – 565–570 нм, но в существенно разных пропорциях; при этом экспрессируются они в разных рабдомах [28]. Можно полагать, и это требует дальнейших исследований, что различия в спектрах поглощения зрительных пигментов каждой из популяций Mysis relicta, их экспрессия и соотношение в разных рабдомах определяются в ходе развития некими эпигенетическими факторами, которые для морской и озерной популяций, судя по всему, различны.

Еще одним важным физиологическим отличием морской и озерной популяций является их разная чувствительность к повреждающему действию света: озерная гораздо более чувствительна, нежели морская [29]. Нами были подробно исследованы механизмы, лежащие в основе повреждающего действия света и защиты от него у обеих популяций [30, 31]. Как выяснилось, биохимическая система антиоксидантной защиты у них существенным образом не отличается. Единственное четкое различие, которое было обнаружено, — это содержание в структурах глаза экранирующих пигментов оммохромов, а также каротиноидов, обладающих как светофильтующими, так и выраженными антиоксидантными свойствами (для обзора см. [32, 33]). В глазах морской популяции оммохромов оказалось существенно больше, чем у озерной. Этот факт может объяснять намного большую устойчивость глаза к повреждающему действию света у морской популяции креветок *Mysis relicta*, чем озерной [34].

Нет сомнения, что сравнительная физиология зрительных пигментов — чрезвычайно увлекательная область биологии зрения, обещающая новые, подчас неожиданные находки.

ФОТОХИМИЯ РОДОПСИНА: ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ СВЕРХБЫСТРОЙ ФОТОИЗОМЕРИЗАЦИИ РЕТИНАЛЯ

Фототрансдукция запускается реакцией фотоизомеризации хромофорной группы родопсина — 11-*цис*-ретиналя. Переход 11-*цис*-ретиналевого хромофора в его полностью-*транс*-форму в качестве фотохимической реакции зрения был установлен Дж. Уолдом еще в 50-х годах (Нобелевская премия 1967 года). Выяснение детального механизма этой важнейшей реакции родопсина и других ретиналь-содержащих белков особенно активизировался в последнее время в связи с развитием техники фемтосекундной лазерной спектроскопии (для подробного обзора см. [5]).

Уникально организованный хромофорный центр ретиналь-содержащих белков обеспечивает исключительно высокую скорость и эффективность реакции фотоизомеризации. Квантовый выход реакции зрительного родопсина — 0.67; в ходе реакции в молекуле запасается 58% поглощенной энергии кванта. Сама изомеризация происходит в суб-пикосекундной временной шкале. Во времена Дж Уолда такую скорость фотоизомеризации ретиналя не могли себе даже представить. Как теперь стало ясно, реакция изомеризации 11-иис ретиналя в хромофорном центре родопсина происходит через коническое пересечение поверхностей потенциальной энергии, которое связывает электронно-возбужденное состояние ретиналя в опсине с основным состоянием первого продукта реакции – фотородопсина, в котором хромофор находится в искаженной, но уже полностью-*трансоидной* форме. По последним данным переход из цис- в транс-конфигурацию совершается за фантастически короткое время – в пределах 50 фемтосекунд [35, 36]. Это самая быстрая реакции в фотохимии, известная на сегодняшнее время. Родопсин в этом отношении становится парадигмой не только для фотобиологии, но и для фотохимии. Тепловой барьер изомеризации ретиналевого хромофора исключительно высок (45 ккал/моль) [37]. Физиологический смысл столь высокого теплового барьера изомеризации 11-цис ретиналя и столь высокой скорости и эффективности его фотоизомеризации состоит в том, чтобы, с одной стороны, исключить ложное срабатывание родопсина в темноте и, с другой стороны, чтобы использовать энергию поглощенного кванта именно для фотохимической реакции изомеризации с минимальной возможностью ее рассеяния в виде тепла или высвечивания в виде флуоресценции (квантовый выход флуоресценции родопсина исключительно мал — 5×10^{-3}). В отличие от изомеризации ретиналя в газовой фазе, т.е. в свободном, ничем не ограниченном пространстве, фотоизомеризация ретиналя как хромофорной группы совершается в теснейшем белковом окружении хромофорного центра, объем которого составляет всего 660 Å³, а поверхность взаимодействия 11-цис ретиналя с белковым окружением равна, примерно, 230 Å² [38]. И это означает, что тесное белковое окружение 11-цис-ретиналя не только не препятствует, а наоборот активно способствует сверхбыстрому и эффективному процессу фотоиндуцированного изменения геометрии хромофорной группы. Задача дальнейших исследований — выяснить, каким именно образом белковое окружение способствует ускорению и повышению эффективности первой и единственно фотохимической реакции в зрении.

С точки зрения эволюции ретиналь-содержащих белков представляет интерес сравнение параметров их фотохимических реакций. Так, сравнение времени достижения конического пересечения потенциальных поверхностей энергии показывает, что как для бычьего родопсина [39], так и родопсина осьминога [40] это время почти втрое короче, чем у родопсина архебактерий – бактериородопсина [41]. Это различие может быть связано как различными *цис-транс* и *транс-цис* переходами из 11-*цис* в полностью-*транс* конфигурацию в зрительном родопсине и из полностью-*транс* в 13-*цис* конфигурацию в бактериальном родопсине), так и с различной структурой их хромофор-связывающего центра. В любом случае, большую скорость фотоизомеризации 11-*цис* ретиналя в молекулы зрительного родопсина по сравнению с бактериальным родопсином можно рассматривать как свидетельство большего совершенства его хромофор-связывающего центра. Дальнейшее сравнение динамики фотоизомеризации ретиналевого хромофора в ретиналь-содержащих белках животного и микробиального родопсинов и родопсинов простейших представляет существенный интерес.

В этой связи можно назвать, по крайней мере, два перспективных направления: первое — это сравнение прямой и обратной (фотохромной) реакций родопсинов, второе — получение генетически модифицированного в области хромофорного центра родопсина и изучение особенностей его фотореакций. Что касается первого направления, то исследования прямой и обратной (фотохромной) реакций зрительного родопсина были начаты еще в начале 60-х годов в лаборатории Дж. Уолда. В классической работе Иошизавы и Уолда было показано, что при температуре жидкого азота возможен фотопереход батородопсина (трансоидная форма ретиналя) обратно в родопсин (11-*цис*-ретиналь) с незначительной примесью изородопсина (9-*цис*-ретиналь) [42].

Продукты фотопревращения родопсина фотоактивны. Обратные фотореакции ранних продуктов, естественно, эффективнее, чем более поздних. Так, батородопсин регенерирует практически полностью [42], а метародопсин II в палочке сетчатки лягушки — лишь на 45% [43]. Существенно, что при обратной фотореакции никаких промежуточных продуктов не образуется, о чем свидетельствует наличие изобестической точки в спектрах поглощения, записанных в различные моменты времени [42, 44]. Именно в опытах по изучению прямых и обратных реакций зрительного пигмента было открыто явление изохромии родопсина и продуктов его фотолиза. Было показано, что в ходе процесса обесцвечивания образуются две спектрально неотличимые формы метародопсина I, одна из которых способна к фоторегенерации, а другая — нет [45]. При подробном исследовании фотохромных реакций родопсина при низких температурах нами было показано, что со стадии метародопсина I, образуется две спектрально идентичные изохромные формы родопсина, одна из которых является стабильной при комнатной температуре, а другая нестабильна [44, 46].

Интерес к изучению фотообратимых реакций родопсина в последнее время возрос в связи с тем, что эти реакции могут рассматриваться в качестве прообраза молекулярных фотопереключателей, обладающих исключительно высокой скоростью, высоким квантовым выходом и спектрально различимыми темновой и светоиндуцированной формами. Например, естественная способность родопсина беспозвоночных к фотообратимости с поздней стадии (метародопсина) лежит в основе как физиологического механизма его фоторегенерации, так и попыток его использования в биотехнологии. Например, нами в ситуации *in vitro* был продемонстрирован при комнатной температуре многократный фотопереход родопсина осьминога в метародопсин и обратно [47].

Однако наиболее привлекательным с точки зрения прообраза молекулярных фотопереключателей являются ранние стадии фотопревращения родопсина: стадии фото- и батородопсина [48]. С помощью лазерной абсорбционной спектроскопии высокого разрешения нами совместно с физиками Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН были подробно исследованы прямые и обратные фотореакции бычьего родопсина в сравнении с таковыми реакциями бактериородопсина. С использованием двухимпульсной системы были исследованы прямые реакции [49–51], а с помощью трехимпульсной фемтосекундной лазерной системы, специально разработанной для исследования обратных фотореакций, — прямые и обратные реакции родопсина [52-54]. С помощью такой трехимпульсной лазерной системы нами впервые при комнатной температуре была зарегистрирована обратимая реакция зрительного родопсина в фемтосекундном диапазоне времени: сначала переход родопсина (ретиналь в 11-цис-изомерной форме) в первичный фотопродукт – фотородопсин (ретиналь в *транс*изомерной форме), а затем, в ответ на поглощение второго кванта света, фотопереход обратно из фотородопсина в родопсин. Сравнительный анализ динамики прямой и обратной фотохимической реакции бактериородопина и зрительного родопсина показал, что в случае бактериородопсина квантовый выход обратной реакции намного – примерно в шесть раз – выше, чем у зрительного родопсина, при том, что квантовые выходы прямой реакции у них близки [54]. Можно думать, что низкий квантовый выход обратной реакции эволюционно более "молодого" зрительного родопсина физиологически оправдан, а именно повышает надежность работы родопсина (прямая реакция с высоким квантовым выходом) как триггера процесса фототрансдукции.

ЗАПУСК МЕХАНИЗМА ФОТОТРАНСДУКЦИИ И СУПРАМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РОДОПСИНА В ФОТОРЕЦЕПТОРНОЙ МЕМБРАНЕ

Родопсин можно уподобить молекулярному переключателю: он полностью неактивен в темноте, и на стадии образования метародопсина II (Meta-II) становится активным, т.е. способным взаимодействовать с трансдуцином. Активация родопсина, согласно современным представлениям, происходит в результате разрушения т.н. "цитоплазматического ионного замка", расположенного между III и VI альфа-спиральными сегментами, и смещения III, V и VI альфа-спиральных сегментов (для обзора см. [55–57]). Что касается разрушения цитоплазматического ионного "замка", то нами еще в конце 60-х годов [58], а затем в середине 80-х годов [59] было показано, что образование метародопсина II сопровождается поглощением извне и связыванием, а не переносом протона через фоторецепторную мембрану, в отличие от бактериородопсина, функция которого – перенос протона через пурпурную мембрану. Много позже стало ясно, что связывание протона лежит в основе двухстадийного переключения родопсина из его темнового, неактивного состояния в физиологически активное, т.е. метародопсин II.

В середине 80-х годов, продолжая исследования внутримолекулярного механизма активации родопсина, мы, используя метод ЭПР-спектроскопии с переносом насыщения и спиновые метки, ковалентно связанные с доступными гидрофильными SH-группами цистеиновых остатков родопсина (Cys140 и Cys316), впервые наблюдали увеличение конформационной подвижности цитоплазматических "петель" при переходе родопсина в метародопсин II и уменьшение их подвижности при обратном фотопереходе из метародопсина II в смесь продуктов, включающую фоторегенерированный родопсин и метародопсин III [60, 61]. То, что именно эти два цистеина – Cys140 и Cys316, находятся в цитоплазматической "петле" и доступны для связывания со спиновыми метками, позже было подтверждено [62].

С помощью ЭПР методов были показаны не только внутримолекулярные перестройки в гидрофильных "петлях", но и смещения трансмембранных "тяжей" на стадии образования метародопсина II. Эти конформационные перестройки являются критическими для передачи сигнала от G-белок-связывающего рецептора к G-белку, в данном случае для передачи сигнала от родопсина к трансдуцину. С появлением же импульсного режима ЭПР-регистрации появилась возможность наблюдать динамику и определять амплитуду структурных конформационных перестроек, что дало бесценную информацию о внутримолекулярной "механике" функционирования G-белок-связывающих рецепторов [63]. Следует подчеркнуть, что метод ЭПР в сочетании со спиновыми метками сыграл важнейшую роль в описании фотоиндуцированных конформационных перестроек родопсина и других мембранных белков, поскольку их можно было наблюдать в естественной, билипидной среде.

Кристаллизация родопсина в его темновом состоянии [64], и значительно позже в его физиологически активном состоянии, крайне нестабильным при кристаллизации [65], позволила получить детальные рентгеноструктурные данные, касающиеся структуры родопсина и его внутримолекулярных конформационных перестроек при переходе в метародопсин II [66—68]. Коротко, полученная с помощью совокупности самых различных методов картина перехода родопсина в метародопсин II выглядит в настоящее время так: полностью-*mpaнс*-ретиналь, образовавшийся в результате фотоизомеризации 11-*цис* ретиналя и "не помещающийся" в хромофорном "центре" ("кармане") опсина инициирует смещение внутримембранных, III, V и VI альфа-спиральных сегментов, и разрушение "цитоплазматического ионного замка". Все это вместе приводит, в конечном счете, к формированию в области гидрофильного цитоплазматического домена "щели", в которую "входит" С-полипептидный конец α-субъединицы трансдуцина, тем самым активируя его (для обзора см. [66]).

До сравнительно недавнего времени не вызывало сомнения, что родопсин взаимодействует и активирует трансдуцин [69] и другие белки фоторецепторного каскада, например, связывает арестин [70], в мономерной форме. Действительно, традиционное представление о механизме фототрансдукции у позвоночных основано на свободном перемещении белков в жидкой (вязкость около 2 пуаз) фоторецепторной мембране. Вместе с тем, за последние годы появилась целая серия работ, выполненных, в основном, методами атомно-силовой и крио-электронной микроскопии, согласно которым родопсин в фоторецепторной мембране находится в димерной или даже олигомерной форме. Суммируя результаты этих работ, можно выделить четыре иерархических уровня олигомерной организации родопсина в фоторецепторной мембране: (а) диффузное распределение мономеров по всему диску, (б) диффузное распределение мономеров в центре диска, (в) диффузное распределение рядов димеров, (г) параллельное расположение полос, состоящих из 2-х рядов димеров родопсина [71]. В ряде работ обсуждаются преимущества паракристаллической организации родопсина для осуществления процесса фототрансдукции [72–74]. В то же время, в ряде работ, выполненных методами ЭПР [75, 76] и калориметрии [76], показано, что как родопсин, так и опсин находятся в мембране диска в мономерном состоянии.

Нами в сравнительном малоугловом нейтронном и малоугловом рентгеновском исследовании недавно получены данные, указывающие на то, что димерных цепочек и тем более полос в плоскости диска нет; мы не можем сказать, в какой форме находится родопсин — мономерной или димерной, но мы можем утверждать, что структуризация молекул родопсина в фоторецепторной мембране отсутствует [77, 78]. При этом молекулы родопсина расположены в фоторецепторной мембране диффузно, с исключительно высокой плотностью и совершенно явно без какой-либо регулярной упаковки. Следует в этой связи обратить внимание на рентгеноструктурную работу, выполненную на родопсин-содержащих нанодисках [67]. В этой работе было показано, что в мономерной форме родопсин при переходе к метародопсину II претерпевает конформационные изменения, описанные в рентгеноструктурных работах и ранее. Однако при димеризации взаимодействие между двумя молекулами родопсина оказывает тормозное влияние на их конформационные перестройки на стадии образования метародопсина II, а именно подавляет эти перестройки в ключевых для активации родопсина трансмембранных, альфа-спиральных сегментах. Иными словами, конформационные изменения, характерные для перехода родопсина в метародопсин II, при димеризации существенным образом затормаживаются. В этой связи можно согласится с В.И. Говардовским, по мнению которого в механизме фототрансдукции работает мономерная форма родопсина, а олигомеры родопсина в процессе фототрансдукции не участвуют [79]. Иными словами, регулируемая светом олигомеризация родопсина могла бы быть одним из физиологических механизмов адаптации фоторецепторной клетки к меняющимся условиям освещения.

Проблема конформационных перестроек родопсина на различных стадиях его фотопревращения и его супрамолекулярная организация в фоторецепторной мембране остаются дискуссионным, исключительно актуальным и требующими дальнейших исследований (для обзора см. [68, 80]). Ее решение принципиально важно как для понимания механизма фототрансдукции, так и механизма функционирования родопсин-подобного А-класса G-белок-связывающих рецепторов [81].

ФОТОЛИЗ РОДОПСИНА, РЕТИНОИДНЫЙ ЦИКЛ, ПАТОГЕНЕЗ И ДИАГНО-СТИКА ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕТЧАТКИ

На последней стадии фотопревращения родопсина происходит гидролиз (фотолиз) ковалентной связи Шиффова основания и высвобождение в липидный бислой фоторецепторной мембраны свободного полностью-*транс*-ретиналя. В результате в мембране остается апобелок опсин без хромофорной группы, а свободный полностью-*транс*-ретиналь удаляется из мембраны. Далее в игру вступает т.н. зрительный (ретиноидный) цикл. Его функцией является превращение высвободившегося из опсина полностью-*транс*-ретиналя снова в 11-цис ретиналь, доставка 11-иис ретиналя к опсину и встраивание его в хромофорный центр (регенерация родопсина). Кроме того, в зрительный цикл входит также превращение витамина А (полностью-*транс* ретинола), доставляемого из кровяного русла в пигментный эпителий, в 11-цис ретиналь. Удаление из фоторецепторной мембраны полностью*транс*-ретиналя обеспечивают два фермента – ретинолдегидрогеназа 8 (RDH8) и АТФ-зависимый переносчик – мембранный белок ABCR4 (ATP-binding cassette transporter, retina-specific). Фермент RDH8 в реакции, катализируемой NADPH, восстанавливает полностью-*транс*-ретиналь до нетоксичной спиртовой формы полностью-*транс*-ретинола. Переносчик ABCR4 транспортирует через фоторецепторную мембрану не столько сам полностью-*транс*-ретиналь, сколько N-ретинилиден-фосфатидилэтаноламин – продукт взаимодействия полностью-*транс*-ретиналя с фосфатидилэтаноламином. Как именно согласована в зрительном цикле работа этих двух, локализованных в различных частях фоторецепторного диска ферментов – RDH8 и ABCR4 остается неясным (для см. обзора [82]). С дефектом ABCR4 связан ряд дегенеративных заболеваний, в первую очередь моногенное заболевание болезнь Штаргардта [83]. Дефекты ABCR4 приводят к массивному накоплению в клетках РПЭ липофусциновых гранул, содержащих около двух десятков бисретиноидов. Восстановленный ферментом RDH8 полностью-*транс*-ретинол переносится затем из наружного сегмента в пигментный эпителий. Здесь он этерифицируется лецитин-ретинолацилтрансферазой до ретинилового эфира, а затем одним из ключевых ферментов зрительного цикла – изомерогидролазой RPE65 (также известной как изомераза I) превращается в 11-цис-ретинол. После этого 11-цис-ретинол окисляется до 11-цис-ретиналя и доставляется обратно в наружный сегмент. Таким образом, зрительный (ретиноидный) цикл замыкается: высвободившийся в ходе фотолиза полностью-*транс*-ретиналь вновь превращается в 11-иис-ретиналь, который встраивается в хромофорный центр опсина, в результате чего происходит регенерация зрительного пигмента.

Следует обратить внимание на важный для осуществления зрительного цикла интерфоторецепторный ретиноид-связывающий белок — (interphotoreceptor retinoid-binding protein — IRBP), находящийся во внутриретинальном, межклеточном пространстве. Его основная функция — ретиноидный обмен между фоторецепторами и РПЭ, а также Мюллеровскими клетками. Оказалось, также, что IRBP обладает защитной функцией: он способен перехватывать свободные радикалы [84] и защищать от фотоповреждения ретиноиды, которые он переносит [85]. Сам он при этом, как мы показали, может подвергаться повреждению (фотоокислению) [86].

Большинство форм дегенеративных заболеваний сетчатки связаны с дефектами белков зрительного цикла. Поэтому основные усилия направлены на поиск препаратов для его регуляции, в частности на поиск препаратов для лечения т.н. "сухой" формы возрастной макулярной дегенерации (ВМД) — самой распространенной и социально-значимой из этих форм. В настоящее время предложены ряд препаратов, успешно прошедших, как правило, доклинические испытания, но, тем не менее, еще не разрешенные для клиники. К ним относятся ингибиторы ретинолизомеразы (RPE65), подавляющие регенерацию родопсина и уменьшающие накопление

бисретиноида (А2Е) в пигментном эпителии. Однако клинические испытания такого препарата (Emixustat фирмы Acucela Inc. Seattle, USA) не показали значительной разница в развитии ВМД или улучшении остроты зрения. Был предложен препарат (Fenretinide фирмы ReVision Therapeutics), подавляющий доставку ретинола (витамин А) в пигментный эпителий и, тем самым, уменьшающий накопление в нем бисретиноида А2Е. Однако и он в клиническом исследовании заметного эффекта не проявил. Весьма перспективен поиск "перехватчиков" токсичного и фототоксичного свободного полностью-*транс*-ретиналя, высвобождающегося из опсина на последней стадии фотолиза. В экспериментах на животных такие препараты (т.н. NS2, Neuron Systems, Inc. Burlington, VM200, Vision Medicines и Soraprazan, Katairo GmbH) эффективно предотвращают образование бисретиноидов (A2E) и самих липофусциновых гранул. Но ни один из них пока до клиники не дошел. Перспективен также поиск антиоксидантов, перехватчиков активных форм кислорода. Нами в последнее время предложен новый антиоксидант — фотопротектор "ОКСИБИОЛ" (6-гидрокси-2-аминобензотиазола N-ацетил-L-цистеината) [87, 88]. Сравнении его с другими известными антиоксидантами из того же ряда водорастворимых гетероциклических соединений — мексидолом и эмоксипином показало, что оксибиол обладает более выраженными антирадикальной и антиоксидантной активностями, он эффективно инактивирует фототоксическое действие липофусциновых гранул, исключительно устойчив к действию ультрафиолетового и видимого света, что очень важно для его возможного использования как фотопротектора в офтальмологии; кроме того оксибиол обладает высокой антигликирующей активно-

Как известно, свет в зрении выступает не только как носитель информации, но и как потенциально опасный повреждающий фактор. Это так называемый "фотобиологический парадокс зрения", который в ходе эволюции был успешно разрешен формированием многоуровневой системы защиты структур глаза от опасности такого повреждения [89–91]. Опасность фотоповреждения связана с тем, что в фоторецепторах и РПЭ присутствуют все три фактора, определяющие развитие фотоокислительного стресса по механизму свободно-радикального окисления: фотосенсибилизаторы, кислород и легко окисляющиеся субстраты, в первую очередь полиненасыщенные жирные кислоты в наружном сегменте фоторецепторов. Фотосенсибилизаторами, в основном, выступают полностью-*транс*-ретиналь и бисретиноиды. Они способны повредить искусственные мембраны [92, 93], белки (родопсин) и липиды [94, 95], также и сами фоторецепторные клетки (опыты на нокаутных животных (Abca4–/– Rdh–/–мыши) [96].

стью. К сожалению, до клинических испытаний оксибиол пока не дошел.

Фотосенсибилизирующей активностью обладают и сами липофусциновые гранулы. Нами было впервые показано, что при действии видимого света липофусциновые гранулы способны образовывать активные формы кислорода (суперокисные радикалы), при этом максимум спектра действия их образования находится в синей области спектра [97, 98]. Бисретиноиды обладают не только фотосенсибилизирующим, но и токсическим (вполне вероятно, детергентным) действием. В частности, А2Е и его фотоокисленные продукты высвобождаются при освещении из липофусциновых гранул и повреждают биологические мембраны, в том числе мембраны митохондрий, что может инициировать апоптоз клеток РПЭ [99]. Подробнее об этом в обзорах [100, 101].

Что касается опасности повреждающего действия света на сетчатку и РПЭ, то совокупность огромного количества биохимических, цитологических, электрофизиологических и психофизиологических данных свидетельствуют о том, что потенциально опасна именно коротковолновая (фиолетово-синяя) часть видимого спектра и что частичная фильтрация этой части спектра (интраокулярные линзы, очки, свето-гигиенические мероприятия) способны оказать защитное, профилактическое действие [102–104].

Бисретиноиды обладают сильной флуоресценцией. На этом их свойстве основан неинвазивный метод диагностики старческих изменений и дегенеративных заболеваний сетчатки — метод аутофлуоресценции глазного дна, который в последнее время получил в офтальмологии широкое распространение. Основной вклад в аутофлуоресценцию глазного дна вносят бисретиноиды (флуорофоры) липофусциновых гранул. Поскольку спектры поглощения и, соответственно, флуоресценции неокисленных и окисленных флуорофоров липофусциновых гранул различаются, то на регистрации этих различий мог бы быть основан компонентный анализ картины аутофлуоресценции глазного дна. В норме флуорофоры липофусциновых гранул в основном находятся в неокисленном состоянии. Однако при патологии (дегенеративных заболеваниях сетчатки), как мы показали, могут накапливаться продукты их окисления и деградации, спектры поглощения и флуоресценции которых сдвинуты в коротковолновую область [104, 105]. Такое смещение, регистрируемое методом аутофлуоресценции глазного дна, может быть использовано в качестве критерия ранней диагностики дегенеративного заболевания [107].

Другим перспективным подходом к усовершенствованию метода аутофлуоресценции глазного дна является определение времени жизни флуоресценции при определенных длинах волн возбуждения (т.н. "метод FLIM", Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). В офтальмологических испытаниях было показано, что временные характеристики флуоресценции, полученные методом FLIM для нормы и в случае ВМД различаются [108]. Используя метод регистрации кинетики затухания флуоресценции, нами было недавно показано, что различия этих временных характеристик FLIM в норме и при патологии объясняются, скорее всего, увеличением в составе липофусциновых гранул содержания продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов [109, 110].

Таким образом, можно заключить, что увеличение при дегенеративном заболевании содержания продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов в составе липофусциновых гранул проявляется как в сдвиге спектров их флуоресценции, так и в параметрах кинетических кривых затухания флуоресценции. Оба этих показателя могут стать основой для расширения диагностических возможностей современного, крайне эффективного неинвазивного метода аутофлуоресценции глазного дна, в первую очередь для ранней диагностики дегенеративных заболеваний сетчатки.

МИКРОБИАЛЬНЫЙ И ЗРИТЕЛЬНЫЙ РОДОПСИНЫ КАК ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ "ИНСТРУМЕНТЫ" ДЛЯ ПРОТЕЗИРОВАНИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНОЙ СЕТЧАТКИ

Оптогенетика или точнее оптогенетические методы — новое, бурно развивающееся направление в биологии. Речь идет о методике, позволяющей светом регулировать физиологическую активность клетки. "Инструментом" оптогенетики является светочувствительный мембранный белок, ген которого доставляется в определенный тип клеток. В зависимости от того, какой канальной функцией обладают эти активируемые светом белки, катионы или анионы переносят они через мембрану, клетка деполяризуется или гиперполяризуется.

Широко используемыми "инструментами" оптогенетики являются родопсины. В основном это микробиальные родопсины — катионный канальный родопсин (деполяризация) и хлорный насос — галородопсин (гиперполяризация). В последнее время найден природный анионный канальный родопсин. Получают распространение также метаботропные зрительные родопсины позвоночных. Подробный обзор см. [111].

Оптогенетическое протезирование дегенеративной сетчатки, у которой, независимо от формы дегенераций, погибли фоторецепторные клетки – один из перспективных путей к восстановлению зрительной функции. Такое протезирование возможно, поскольку нижележащие нейронные слои сетчатки сохраняются в течение достаточно длительного времени, хотя и претерпевают структурные изменения (т.н. называемое "ремоделирование" сетчатки). Придание светочувствительности возможно и биполярным, и ганглиозным клеткам (для обзора см. [112]). Однако ганглиозные клетки как более устойчивые к ремоделированию предпочтительнее для протезирования "слепой" сетчатки, хотя при этом полностью теряется возможность обработки информации в слоях сетчатки. Для протезирования сетчатки в экспериментах последних лет были использованы микробиальные родопсины (канальный родопсин 2, модификации канального родопсина 2 и галородопсин) и два G-белок-связывающего опсина (родопсин из палочек и меланопсин из светочувствительных ганглиозных клеток). Каждый из них имеет недостатки. Для канального родопсина основной недостаток - это низкая светочувствительность. Поэтому для освещения сетчатки требуется слишком яркий свет, потенциально опасный с точки зрения фотоповреждения. В отличие от микробиального, родопсин палочек и меланопсин высоко светочувствительны, но имеют слишком медленную кинетику (секунды или десятки секунд). И микробиальные, и животные родопсины работают в относительно узком диапазоне интенсивностей. Недавно появилась работа, в которой для протезирования ганглиозных клеток дегенеративной сетчатки мыши был использован опсин зеленых колбочек человека (MW-орsin) [113]. Этот опсин оказался столь же светочувствителен, как и опсин палочек, но имел на порядок более быструю кинетику. Авторы показали, что MW-opsin обеспечивает уникальную комбинацию скорости, чувствительности и световой адаптации. По их мнению, он исключительно перспективен для восстановления ключевых свойств естественного зрения. Однако целый ряд сложностей, в том числе проблема регенерации как этого колбочкового, так и палочкового родопсинов, могут не позволить, несмотря на всю привлекательность, использовать в ближайшем будущем опсины фоторецепторов для протезирования дегенеративной сетчатки.

Вместе с тем, использование микробиальных канальных родопсинов — катиони анион-переносящих — для протезирования ганглиозных клеток дегенеративной сетчатки представляется весьма реальным и заманчивым. В настоящее время в США и во Франции разрешены и начаты клинические испытания оптогенетического протезирования сетчатки на поздней стадии дегенерации (пигментный ретинит) с использованием канального родопсина 2. В обоих испытаниях протезируются сохранившиеся ганглиозные клетки. Применяется один и тот же относительно простой метод: в глаз инъецируется аденоассоциированный вирус 2-го серотипа, несущий один оптогенетический "инструмент" — канальный родопсин 2 (США, ClinicalTrials.gov Identifier NCT02556736 и Франция, NCT03326336). О результатах этих испытаний информации пока нет.

Как известно, воссоздание ON-OFF и OFF-ON рецептивных полей ганглиозных клеток сетчатки необходимо для восстановления предметного зрения. В этой связи нами предпринят поиск необходимых для этого возбуждающих и тормозных родопсинов [114]. В последнее время получены результаты по субклеточному введению возбуждающего (катион-переносящий канальный родопсин) и тормозного (анион-переносящий канальный родопсин) микробиальных родопсинов в разные отделы нервной клетки — ее тело и дендриты [115]. Для достижения этого была создана и испытана оригинальная бицистронная генетическая конструкция, несущая в себе гены катионного и анионного канальных родопсинов, способная обеспечить воссоздание ON-OFF взаимодействий рецептивного поля ганглиозной клетки сетчатки [116]. В целом, анализ современного состояния проблемы оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки показывает, что

• восстановление зрения — первое, наиболее реальное и ближайшее применение методов оптогенетики в клинической практике;

 наиболее реалистичным способом оптогенетического протезирования сетчатки является в настоящее время использование канальных родопсинов;

• наибольшая надежность обеспечивается при оптогенетическом протезировании ганглиозных клеток дегенеративной сетчатки, а именно субпопуляций ON-OFF- и OFF-ON-ганглиозных клеток;

• аденоассоциированный вирус и сопряженный с ним специфичный промотор, разрешенные к применению, способны обеспечить доставку гену родопсина к клеткам сетчатки;

 использование спектрально отличающихся канальных родопсинов позволяет рассчитывать на восстановление в будущем не только монохроматического, но и цветового зрения;

• в случае успеха протезирования ганглиозных клеток у пациентов может быть восстановлено не только светоощущение, но и предметное зрение;

• и, наконец, важно подчеркнуть, что для оценки качества восстановленного зрения требуются клинические испытания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На протяжении почти 150 лет зрительные пигменты привлекает внимание исследователей, остаются "горячей точкой" современной биологии. Междисциплинарный подход к их изучению открывает все новые и новые возможности для понимания молекулярных механизмов первичных процессов зрения и понимания патогенеза, путей диагностики и разработки способов лечения тяжелых дегенеративных заболеваний сетчатки глаза.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана: Программой фундаментальных исследований президиума РАН № 13, грантами РФФИ № 18-015-00305-а, РФФИ № 17-00-00166-КОМФИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Spudich J.L., Yang C.S., Jung K.H. et al.* Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. Ann. Rev. Cell Develop. Biol. 16: 365–392. 2000.
- Lamb T.D., Collin S.P., Pugh E.N., Jr. Evolution of the Vertebrate Eye: Opsins, Photoreceptors, Retina and Eye Cup. Nature Rev. Neurosci. 8: 960–975. 2007.
- 3. *Розанов А.Ю.* Условия жизни на ранней земле после 4.0 млрд лет назад. Проблемы происхождения жизни. М. РАН 2009. [Rozanov A.Y. Usloviya zhizni na ranney zemle posle 4.0 mlrd. let nazad. Problemy proiskhozhdeniya zhizni. [Living conditions on early earth after 4.0 billion years ago. The problems of the origin of life] Moscow. RAS. 2009].
- Mackin A., Roy R.A., Theobald D.L. An empirical test of convergent evolution in rhodopsins. Mol. Biol. Evol. 31: 85–95. 2014.
 - https://doi.org/10.1093/molbev/mst171
- 5. Ostrovsky M.A., Feldman T.B Chemistry and molecular physiology of vision: the photosensitive protein rhodopsin. Russ. Chem. Rev. 81(11): 1071–1090. 2012.
- 6. *Shen L., Chen C., Zheng H. et al.* The evolutionary relationship between microbial rhodopsins and metazoan rhodopsins. Scientific World J. 2013. https://doi.org/0.1155/2013/435651
- 7. Ostrovsky M.A. Rhodopsin: Evolution and Comparative Physiology. Paleontolog. J. 5: 103–113. 2017.
- 8. *Hunt D.M., Carvalho L.S., Cowing J.A. et al.* Spectral tuning of shortwave-sensitive visual pigments in vertebrates. Photochem. Photobiol. 83(2): 303–310. 2007.
- 9. Crescitelli F. Ionochromic behavior of gecko visual pigments. Science. 195: 187-188. 1977.

- 10. *Slobodianskaya E.M., Abrashin E.V., Ostrovsky M.A.* The study of the ionochromic properties of visual pigments of chicken. Bioorganic Chem. 6(2): 223–226. 1980.
- 11. Novitsky I.Yu., Zak P.P., Ostrovsky M.A. The effect of anions on the spectral properties of iodopsin in native frog retina cones (microsetrophotometric study). Bioorganic Chem. 15(8): 1037–1043. 1989.
- 12. Zak P.P., Ostrovsky M.A., Bowmaker J.K. Ionochronic properties of long-wave-sensitive cones in the goldfish retina: an electrophysiological and microspectrophotometric study. Vision Res. 41: 1755–1763. 2001.
- Говардовский В.И., Астахова М.Л. Специфика физиологических и биохимических механизмов возбуждения и адаптации колбочек сетчатки. Сенсорные системы. 29(4): 296–308. 2015 [Govardovsky V.I., Astakhova, M. L. Specificity of physiological and biochemical mechanisms of excitation and adaptation of retinal cones. Sensory systems. 29(4): 296– 308. 2015 (In Russ)].
- 14. *Katayama K., Gulati S., Ortega J.T. et al.* Specificity of the chromophore-binding site in human cone opsins. J. Biol. Chem. 294(15): 6082–6093. 2019.
- 15. *Bowmaker J.K.* Evolution of vertebrate visual pigments. Vision Res. 48(20): 2022–2204. 2008. https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.03.025
- Belikov N., Yakovleva M., Feldman T. et al. Lake and Sea Populations of Mysis relicta (Crustacea, Mysida) with Different Visual-Pigment Absorbance Spectra Use the Same A1 Chromophore. PloS One. 9(2): 1–8. 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088107
- Jokela-Maatta M., Pahlberg J., Lindström M. et al. Visual pigment absorbance and spectral sensitivity of the Mysis relicta species group (Crustacea, Mysida) in different light environments. J. Comp. Physiol. A. 191(12): 1087–1097. 2005.
- Donner K., Zak P., Viljanen M. Eye spectral sensitivity in fresh- and brackish-water populations of three glacial-relict *Mysis* species (Crustacea): physiology and genetics of differential tuning. J. Comp. Physiol. A. 202: 297–312. 2016. https://doi.org/10.1007/s00359-016-1079-y
- 19. *Lindstrom M.* Eye function of *Mysidacea (Crustacea)* in the northern Baltic Sea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 246:85–101. 2000.
- Frank T.M., Porter M., Cronin T.W. Spectral sensitivity, visual pigments and screening pigments in two life history stages of the ontogenetic migrator *Gnathophausia ingens*. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 89(1): 119–129. 2009.
- 21. *Abu Hamidah E., Demchuk Yu.V., Zak P.P. et al.* Short-wavelength light filtration in the formation of spectral sensitivity of two shrimp populations *M. relicta* (Mysida). Bull. Moscow Univ. Biology. 2: 9–14. 2010.
- 22. Audzijonyte A., Pahlberg J., Viljanen M. Opsin gene sequence variation across phylogenetic and population histories in *Mysis* (Crustacea: Mysida) does not match current light environments or visual-pigment absorbance spectra. Mol. Ecol. 21: 2176–2196. 2012.
- 23. Dartnall H.A.J., Lythgoe J.N. The spectral clustering of visual pigments. Vis. Res. 5: 81–100.1965.
- 24. Bridges C.D.B. The rhodopsin-porphyropsin visual system. In: Dartnall H.J.A. (ed) Handbook of sensory physiology VII/1: Photochemistry of vision. Berlin. Springer. 417–480. 1972.
- Temple S.E., Plate E.M., Ramsden S. Seasonal cycle in vitamin A1/A2-based visual pigment composition during the life history of coho salmon (Oncorhynchus kisutch). J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol. 192(3): 301–313. 2006. https://doi.org/10.1007/s00359-005-0068-3
- 26. *Suzuki T., Arigawa K., Eguchi E.* The effects of light and temperature on the rhodopsin-porphyropsin visual system of the crayfish *Procambarus clarkii*. Zool. Sci. 2: 455–461. 1985.
- Belikov N., Yakovleva M., Feldman T. et al. Lake and Sea Populations of Mysis relicta (Crustacea, Mysida) with Different Visual-Pigment Absorbance Spectra Use the Same A1 Chromophore. PLoS One. 9(2): 1–8. 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088107
- Zak P.P., Lindström M., Demchuk J.V. et al. The eye of the opossum shrimp Mysis relicta (Crustacea, Mysidae) contains two visual pigments located in different photoreceptor cells. Dokl. Biol. Sci. 449: 68–72. 2013. https://doi.org/10.1134/S0012496613020026
- 29. *Lindstrom M., Nilsson H.L.* Eye function of *Mysis relicta* (Crustacea) from two photic environments. Spectral sensitivity and light tolerance. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 120: 23–37. 1988.
- 30. Dontsov A.E., Fedorovich I.B., Lindström M. Comparative study of spectral and antioxidant properties of pigments from the eyes of two Mysis relicta (Crustacea, Mysidacea) populations, with different light damage resistance. J. Comp. Physiol. B. 169(3): 157–164. 1999
- 31. *Feldman T., Yakovleva M., Lindström M.* Eye Adaptation to Different Light Environment in Two Populations of *Mysis relicta:* A Comparative Study of Carotenoids and Retinoids. J. Crustacean Biology. 30(4): 636–642. 2010.

- 32. Ostrovsky M.A., Zak P.P., Dontsov A.E. Vertebral melanosomes and invertebrate ommochromes as shielding cellular organelles. Part 1. Biol. Bull. Russ. Acad. Sci. 45: 105–116. 2018. https://doi.org/10.1134/S1062359019010084
- 33. Ostrovsky M.A., Dontsov A.E. Vertebrate Eye Melanosomes and Invertebrate Eye Ommochromes as Antioxidant Cell Organelles: Part 2. Biol. Bull. Russ. Acad. Sci. 46: 105–116. 2019. https://doi.org/10.1134/S1062359019010084
- Lindstrom M., Nilsson H.L. Eye function of Mysis relicta (Crustacea) from two photic environments. Spectral sensitivity and light tolerance. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 120: 23–37. 1988.
- Johnson P.J., Halpin A., Morizumi T. Local vibrational coherences drive the primary photochemistry of vision. Nature Chem. 12: 980–986. 2015. https://doi.org/10.1038/nchem.2398
- 36. Mathies R.A. A coherent picture of vision. Nature Chem.7: 245-247. 2015.
- 37. *Baylor D.A.* Photoreceptor signals and vision. Proctor lecture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 28(1): 34–49. 1987.
- Li J., Edwards P.C., Burghammer M. Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. J. Mol. Biol. 343(5): 1409–1438. 2004.
- 39. *Polli D., Altoè P., Weingart O.* Conical intersection dynamics of the primary photoisomerization event in vision. Nature. 467(7314): 440–443. 2010.
- Yabushita A., Kobayashi T., Tsuda M. Time-resolved spectroscopy of ultrafast photoisomerization of octopus rhodopsin under photoexcitation. J. Phys. Chem. B. 116(6): 1920–1926. 2012.
- 41. Kobayashi T., Saito T., Ohtani H. Real-time spectroscopy of transition states in bacteriorhodopsin during retinal isomerization. Nature. 414(6863): 531–534. 2001.
- 42. *Yoshizawa T., Wald G.* Pre-lumirhodopsin and the bleaching of visual pigments. Nature. 197: 1279–1286. 1963.
- 43. Колесников А.В., Кореняк Д.А., Шуколюков С.А. и др. Фотореакции метародопсина II. Сенсорные системы, 25(1): 55–64. 2011. [Kolesnikov A.V., Korenyak D.A., Shukolyukov S.A. et al. Photoreactions of metarodopsin II. Sensory Systems, 25 (1): 55–64. 2011 (In Russ)].
- 44. *Krongauz V.A., Shifrina R.R., Fedorovich I.B.* Photochromia of visual pigments. 1. The formation of isochromatic products during the reversible transformations of the frog rhodopsin. Biophysics. 20 (2): 219–224. 1975.
- 45. *Baker B.N., Williams T.P.* Photolysis of metarhodopsin I. Rate and extent of conversion to rhodopsin. Vision Res. 11(5): 449–458. 1971.
- 46. *Krongauz V.A., Shifrina R.R., Fedorovich I.B.* Photochromia of visual pigments. 2. Kinetics of phototransformations of a frog rhodopsin. Biophysics. 20 (3): 419–424. 1975.
- 47. Ostrovsky M.A., Weetall H.H. Octopus rhodopsin photoreversibility of a crude extract from whole retina over several weeks duration. Biosensors and Bioelectronics. 13(1): 61–65. 1998.
- 48. Ostrovsky M.A., Mozgovaya M.N., Feldman T.B. et al. A method for photo-switching a retinalcontaining protein and an optical logic element based on it. Patent for invention No. 2420773. Registered in the State register of inventions of the Russian Federation on June 10, 2011.
- 49. Smitienko O.A., Shelaev I.V., Gostev F.E. Coherent processes in the formation of primary photolysis products of the visual pigment rhodopsin. Dokl. Biol. Sci. 421(2): 277–281. 2008.
- Smitienko O.A., Mozgovaya M.N., Shelaev I.V. Femtosecond formation dynamics of primary photoproducts of visual pigment rhodopsin. Biochemistry (Mosc). 75(1): 25–35. 2010. https://doi.org/10.1134/s0006297910010049
- Shelaev I.V., Mozgovaya M.N., Smitienco O.A. Femtosecond dynamics of primary processes in visual pigment rhodopsin. Russ. J. Phys. Chem. 8(4): 510–517. 2014. https://doi.org/10.1134/S1990793114040101
- 52. *Mozgovaya M.N., Smitienko O.A., Shelaev I.V.* Photochromism of the visual pigment rhodopsin in the femtosecond time scale: coherent control of photoisomerization of the retinal chromophore. Dokl. Biol. Sci. 435(2): 262–266. 2010.
- Smitienko O.A., Nadtochenko V.A., Feldman T.B. Femtosecond laser spectroscopy of the rhodopsin photochromic reaction: a concept for ultrafast optical molecular switch creation (ultrafast reversible photoreaction of rhodopsin). Molecules. 19(11): 18351–18366. 2014. https://doi.org/10.3390/molecules191118351
- Feldman T.B., Smitienko O.A., Shelaev I.V. Femtosecond spectroscopic study of photochromic reactions of bacteriorhodopsin and visual rhodopsin J. Photochem. Photobiol, B: Biology. 164: 296–305. 2016.
- https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.041
- Каламкаров Г.Р., Островский М.А. Молекулярные механизмы зрительной рецепции. М. Наука. 2002. [Kalamkarov G.R., Ostrovsky M.A. Molecular mechanisms of visual reception. M. Nauka. 2002 (In Russ)].
- Deupi X. Relevance of rhodopsin studies for GPCR activation. Biochim. Biophys. Acta.1837(5): 674–682. 2014. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.09.002

- Imamoto Y., Kojima K., Oka T. Conformational Differences among Metarhodopsin I, Metarhodopsin II, and Opsin Probed by Wide-Angle X-ray Scattering. J. Phys. Chem. B. 123(43): 9134–9142. 2019. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b08311
- 58. Островский М.А., Федорович И.Б., Поляк С.Е. Изменение pH-среды при освещении суспензии наружных сегментов фоторецепторов сетчатки. Биофизика. 13(2): 338–339. 1968. [Ostrovsky M.A., Fedorovich I.B., Polyak S.E. Change in pH when illuminating a suspension of the outer segments of the retinal photoreceptors. Biophysics. 13(2): 338–339. 1968. (In Russ)].
- 59. Шевченко Т.Ф., Каламкаров Г.Р., Островский М.А. Отсутствие переноса Н⁺ через фоторецепторную мембрану в ходе фотолиза родопсина. Сенсорные системы. 1(2): 117–126. 1987. [Shevchenko T.F., Kalamkarov G.R., Ostrovsky M.A. The absence of H⁺ transfer through the photoreceptor membrane during the photolysis of rhodopsin. Sensory systems. 1(2): 117– 126. 1987. (In Russ)].
- 60. Погожева И.Д., Кузнецов В.А., Лившиц В.А. Фотоиндуцированные изменения в гидрофильной области молекулы родопсина. Исследование методом ЭПР-спектроскопии с переносом насыщения. Биологические мембраны. 2(9):880–896. 1985. [Pogozheva I.D., Kuznetsov V.A., Livshits V.A. Photoinduced changes in the hydrophilic region of the rhodopsin molecule. EPR spectroscopy study with saturation transfer. Biol. membranes. 2(9): 880–896. 1985. (In Russ)].
- Погожева И.Д., Кузнецов В.А., Лившиц В.А. Конформационная подвижность и взаимодействие доменов родопсина. Биологические мембраны. 2(9): 897–905. 1985. [Pogozheva I.D., Kuznetsov V.A., Livshits V.A. Conformational mobility and interaction of rhodopsin domains. Biol. membranes. 2(9): 897–905. 1985. (In Russ)].
- 62. *Cai K., Langen R., Hubbell W.L.* Structure and function in rhodopsin: topology of the C-terminal polypeptide chain in relation to the cytoplasmic loops. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94(26): 14267–14272. 1997.
- 63. Van Eps N., Caro L.N., Morizumi T. Characterizing rhodopsin signaling by EPR spectroscopy: from structure to dynamics. Photochem. Photobiol. Sci. 14(9): 1586–1597. 2015. https://doi.org/10.1039/c5pp00191a
- 64. Palczewski K., Kumasaka T., Hori T. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. Science. 289: 739–745. 2000.
- Choe H.W., Kim Y.J., Park J.H. Crystal structure of metarhodopsin II. Nature. 471(7340): 651–655. 2011. https://doi.org/10.1038/nature09789
- 66. *Deupi X.* Relevance of rhodopsin studies for GPCR activation. Biochim. Biophys. Acta. 1837(5): 674–682. 2014.
 - https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.09.002
- 67. *Imamoto Y., Kojima K., Oka T.* Helical rearrangement of photoactivated rhodopsin in monomeric and dimeric forms probed by high-angle X-ray scattering. Photochem. Photobiol. Sci. 14(11): 965–1973. 2015
- Imamoto Y., Kojima K., Oka T. Conformational Differences among Metarhodopsin I, Metarhodopsin II, and Opsin Probed by Wide-Angle X-ray Scattering. J. Phys. Chem. B. 123(43): 9134–9142. 2019.
 - https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b08311
- Ernst O.P., Gramse V., Kolbe M. Monomeric G protein coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104: 10859–10864. 2007. https://doi.org/10.1073/pnas.0701967104
- Tsukamoto T. Monomeric rhodopsin is the minimal functional unit required for arrestin binding. J. Mol. Biol. 399: 501–511. 2010. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.029
- 71. Schertler G.F.X. Rhodopsin on tracks: new ways to go in signaling. Structure. 23(4): 606–608. 2015.
 - https://doi.org/10.1016/j.str.2015.03.008
- Ferré S., Casadó V., Devi L.A. G-protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. Pharmacol. Rev. 66: 413–434. 2014. https://doi.org/10.1124/pr.113.008052
- Gunkel M., Schöneberg J., Alkhaldi W. Higher-order architecture of rhodopsin in intact photoreceptors and its implication for phototransduction kinetics. Structure. 23(4): 628–638. 2015. https://doi.org/10.1016/j.str.2015.01.015
- 74. *Dell'Orco D.A.* Physiological role for the supramolecular organization of rhodopsin and transducin in rod photoreceptors. FEBS Lett. 587(13): 2060–2066. 2013. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.017

- Yasuda S., Hara H., Tokunaga F. et al. Spatial arrangement of rhodopsin in retinal rod outer segment membranes studied by spin-labeling and pulsed electron double resonance. Biochem. Biophys. Res. Comm. 425: 134–137. 2012. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.040
- 76. Edvington T.C., Bennett M., Albert A.D. Calorimetric studies of bovine rod outer segment disk membranes support a monomeric unit for both rhodopsin and opsin. Biophys. J. 95: 2859–2866. 2008.

https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.040

- Feldman T.B., Ivankov O.I., Murugova T.N. Study of visual pigment rhodopsin supramolecular organization in photoreceptor membrane by small-angle neutron scattering method with contrast variation. Dokl. Biochem. Biophys. 465: 420–423. 2015. https://doi.org/10.1134/S1607672915060186
- Feldman T.B., Ivankov O.I., Kuklin A.I. Small-angle neutron and X-ray scattering analysis of the supramolecular organization of rhodopsin in photoreceptor membrane. Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1861(10): 183000. 2019. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.022
- 79. Govardovskii V.I., Korenyak D.A., Shukolyukov S.A. Lateral diffusion of rhodopsin in photoreceptor membrane: a reappraisal. Mol. Vision. 15: 1717–1729. 2009.
- 80. *Park PS*. Rhodopsin Oligomerization and Aggregation. J. Membr. Biol. 252(4–5): 413–423. 2019. https://doi.org/10.1007/s00232-019-00078-1
- 81. *Zhou Q., Yang D., Wu M.* Common activation mechanism of class A GPCRs. eLife. 8: e50279. 2019.
 - https://doi.org/10.7554/eLife.50279
- Tsybovsky Y., Molday R.S., Palczewski K. The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease. Adv. Exp. Med. Biol. 703: 105–125. 2010. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5635-4_8
- Tsin A., Betts-Obregon B., Grigsby J. Visual cycle proteins: Structure, function, and roles in human retinal disease. J. Biol. Chem. 2293(34): 13016–13021. 2018. https://doi.org/10.1074/jbc.AW118.003228
- 84. *Gonzalez-Fernandez F., Sung D., Haswell.* Thiol dependent antioxidant activity of interphoto-receptor retinoid-binding protein. Exp. Eye Res. 120: 167–174. 2014.
- 85. *Gonzalez-Fernandez F., Betts-Obregon B., Yust B.* Interphotoreceptor retinoid-binding protein protects retinoids from photodegradation. Photochem. Photobiol. 91: 371–378. 2015.
- Fedorovich I.B., Grant K.M., Ostrovsky M.A. Photodamage to interphotoreceptor retinoidbinding protein. In: Structures and Functions of Retinal Proteins. Ed. J.L. Regaud. Colloque INSERM/J. Libbey Eurotext Ltd. 221: 275–276. 1992.
- 87. Островский М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л. Патент РФ № 2458714 "Средство, обладающее антиоксидантным, фотопротекторным и геропротекторным действием, и способ его получения". 2011. [Ostrovsky M.A., Dontsov A.E., Sakina N.L. RF patent No. 2458714 "A tool with antioxidant, photoprotective and geroprotective effects, and a method for its preparation." 2011. (In Russ)].
- Dontsov A.E., Sakina N.L., Kuznetsov Y.V. Antioxidant and Antiglication Properties of 6-Hydroxy-2-Aminobenzothiazole N-Acetylcysteinate. Russ. J. Phys. Chem. B 13: 947–950. 2019. https://doi.org/10.1134/S1990793119060174
- Островский М.А., Федорович И.Б. Система защиты фоторецепторных клеток от повреждающего действия света. В кн.: "Системы органов чувств. Морфофункциональные аспекты эволюции". Наука, ЛО. 1987. [Ostrovsky M.A., Fedorovich I.B. A system for protecting photoreceptor cells from the damaging effects of light. In the book: "Systems of sensory organs. Morphofunctional aspects of evolution. Nauka, LO. 1987. (In Russ)].
- 90. Ostrovsky M.A. Molecular mechanisms of the damaging effect of light on eye structures and systems of protection against such damage. Advance Biol. Chem. 45: 173–204. 2005.
- 91. Островский М.А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза. В кн. Клиническая физиология зрения под ред. Шамшиновой А.М. 3-е изд. М. Научно-медицинская фирма MБН. 2006. [Ostrovsky M.A. Molecular mechanisms of the damaging effect of light on eye structures. In the book. Clinical physiology of vision, ed. Shamshinova A.M. 3rd ed. Moscow. Publishing house of the Scientific and Medical Firm MBN. 2006. (In Russ)].
- 92. Sokolenko E.A., Sokolov V.S., Sokolov A.V. Interaction of bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. Eur. Biophys. J. 34(6): 772–777. 2005.
- Dontsov A. E., Sakina N.L., Ostrovsky M.A. A comparative study of the dark and light-induced toxicity of lipofuscin granules from the retinal pigment epithelium of the human eye and their chromophore A2E in a model of cardiolipin liposomes. Proceedings of the RAS. Ser. Chem. 2: 1–7. 2012.
- 94. *Loginova M.Yu., Rostovtseva E.V., Feldman T.B.* Impairment of the ability of A2-rhodopsin to regenerate caused by visible (blue) light. Dokl. Biochem. Biophys. 419(6): 838–841. 2008.

- 95. Loginova M.Y., Rostovtseva Y.V., Feldman T.B. Light damaging action of all-trans-retinal and its derivatives on rhodopsin molecules in the photoreceptor membrane. Biochemistry (Mosc). 73(2): 130–138. 2008. https://doi.org/10.1134/s000629790802003x
- Maeda A., Maeda T., Golczak M. Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. J. Biol. Chem. 284: 15173–15183. 2009.
- 97. Островский М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л. и др. Способность липофусциновых гранул из ретинального пигментного эпителия глаза человека фотосенсибилизировать окисление липидов при действии видимого света. Сенсорные системы. 6(3): 51–54. 1992. [Ostrovsky M.A., Dontsov A.E., Sakina N.L. The ability of lipofuscin granules from the retinal pigment epithelium of the human eye to photosensitize lipid oxidation under the action of visible light. Sensory systems. 6(3): 51–54. 1992. (In Russ)].
- Boulton M., Dontsov A., Ostrovsky M. Lipofuscin is a photoinducible free radical generator. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 19: 201–204. 1993.
- Dontsov A.E., Sakina N.L., Ostrovsky M.A. Light-induced release of A2E photooxidation toxic products from lipofuscin granules of human retinal pigment epithelium. Dokl. Biochem. Biophys. 425: 98–101. 2009. https://doi.org/10.1134/s1607672909020112
- 100. Boulton M., Rozanowska M., Rozanowski B. The photoreactivity of ocular lipofuscin. Photochem. Photobiol. Sci. 8: 759–764. 2004.
- 101. Sparrow J.R., Gregory-Roberts E., Yamamoto K. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. Prog. Retin. Eye Res. 31(2): 121–135. 2012.
- 102. *Ham W.T.Jr, Mueller H.A., Sliney D.H.* Retinal sensitivity to damage from short wavelength light. Nature. 260: 153–155. 1976.
- 103. *Meyers S.M., Ostrovsky M.A., Bonner R.F.* A model of spectral filtering to reduce photochemical damage in age-related macular degeneration. Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 102: 83–93. 2004.
- 104. Зак П., Егорова Т., Розенблюм Ю., Островский М. Спектральная коррекция зрения: научные основы и практические приложения.. М. Научный мир, 2005. [Zak P., Egorova T., Rosenblum Yu., Ostrovsky M. Spectral correction of: scientific foundations and practical applications. Moscow. Scientific World. 2005. (In Russ)].
- 105. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M. Changes in spectral properties and composition of lipofuscin fluorophores from human retinal pigment epithelium with age and pathology. Anal. Bioanal. Chem. 407: 1075–1088. 2015.
- 106. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Larichev A.V. Spectral analysis of fundus autofluorescence pattern as a tool to detect early stages of degeneration in the retina and retinal pigment epithelium. EYE. 32: 1440–1448. 2018. https://doi.org/10.1038/s41433-018-0109-0
- 107. Фельдман Т.Б., Островский М.А., Яковлева М.А. Патент РФ на изобретение: № 2651126. Способ раннего выявления возрастной макулярной дистрофии сетчатки. 2018. [Feldman T.B., Ostrovsky M.A., Yakovleva M.A. RF patent for invention: No. 2651126 Method for early detection of age-related macular dystrophy of the retina. 2018. (In Russ)].
- 108. Schweitzer D., Quick S., Schenke S. Comparison of parameters of time-resolved autofluorescence between healthy subjects and patients suffering from early AMD. Ophthalmologe. 106(8): 714–722. 2009. https://doi.org/10.1007/s00347-009-1975-4
- 109. *Yakovleva M.A., Feldman T.B., Arbukhanova P.M.* estimation of fluorescence lifetime of lipofuscin fluorophores contained in lipofuscin granules of retinal pigment epithelium of human cadaver eyes without signs of pathology. Dokl. Biochem. Biophys. 472: 19–22. 2017.
- Yakovleva M.A., Feldman T.B., Arbukhanova P.M. The fluorescence lifetime of lipofuscin granule fluorophores contained in the retinal pigment epithelium cells from human cadaver eyes in normal state and in the case of visualized pathology. Dokl. Biochem. Biophys. 474(1): 239–243. 2017.

https://doi.org/10.1134/S1607672917030231

- 111. Островский М.А., Кирпичников М.П. Перспективы оптогенетического протезирования дегенеративной сетчатки глаза. Биохимия. 84(5): 634–64. 2019. [Ostrovsky M.A., Kirpichnikov M.P. Prospects of optogenetic prosthesis of the degenerative retina of the eye. Biochemistry (Mosc). 84(5): 479–490. 2019.]. https://doi.org/10.1134/S0320972519050038
- 112. Baker C.K., Flannery J.G. Innovative Optogenetic Strategies for Vision Restoration. Front. Cell. Neurosci. 12: 316. 2018. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00316
- 113. *Berry M.H., Holt A., Salari A.* Restoration of high-sensitivity and adapting vision with a cone opsin. Nat. Com. 10: 1221. 2019. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09124-x

- 114. *Malyshev A.Y., Roshchin M.V., Smirnova G.R.* Chloride conducting light activated channel GtACR2 can produce both cessation of firing and generation of action potentials in cortical neurons in response to light. Neurosci. Lett. 640: 76–80. 2017.
- 115. Малышев А.Ю., Островский М.А. Опыт применения оптогенетических подходов к исследованию функций мозга и протезированию дегенеративной сетчатки. Рос. физиол. журн.им. И.М. Сеченова. 105(11): 1406–1416. 2019. [Malyshev A.Y., Ostrovsky M.A. Application of optogenetic approaches to the study of the brain functions and prosthesis of the retina. Russ. J. Physiol. 105(11): 1406–1416. 2019. (In Russ)]. https://doi.org/10.1134/S0869813919110086
- 116. Petrovskaya L.E., Roshchin M.V., Smirnova G. R. Bicistronic construct for optogenetic prosthesis of ganglion cell receptive field of degenerative retina. Dokl. Biochem. Biophys. 486(1): 184–186. 2019. https://doi.org/10.1134/S1607672919030062

The Molecular Physiology of the Visual Pigment Rhodopsin: Current Trends

M. A. Ostrovsky^{a, b, *}

^aEmanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia ^bDepartment of Molecular Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia *e-mail: ostrovskv3535@mail.ru

"e-mail: ostrovsky3535@mail.ru

For almost 150 years, rhodopsin has attracted the attention of researchers, remains the "hot spot" of modern biology. In the mechanism of visual reception, rhodopsin provides several key physiological functions: spectral sensitivity, phototransduction, light and dark adaptation. The pathogenesis of a number of forms of the retina degenerative diseases is associated with rhodopsin and the visual (retinoid) cycle of rhodopsin. Recently, rhodopsin has been considered as a promising optogenetic "tool" for prosthetics of a degenerative retina. The article discusses the most relevant and actively discussed problems of the molecular physiology of rhodopsin.

Keywords: rhodopsin, evolution of rhodopsins, spectral tuning of visual pigments, photochemistry of rhodopsin, phototransduction, visual (retinoid) cycle, optogenetic prosthetic of degenerative retina

ЦИТИРОВАТЬ:

Островский М.А. Молекулярная физиология зрительного пигмента родопсина: актуальные направления. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(4): 401–420. DOI: 10.31857/S0869813920040056

TO CITE THIS ARTICLE:

Ostrovsky M.A. The Molecular Physiology of the Visual Pigment Rhodopsin: Current Trends. Russian Journal of Physiology. 106(4): 401–420.

DOI: 10.31857/S0869813920040056

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 421-435

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

SPECTRAL AND THERMAL PROPERTIES OF RHODOPSINS: CLOSELY RELATED BUT NOT TIGHTLY COUPLED

© 2020 K. Donner*

Molecular and Integrative Biosciences Research Program Faculty of Biological and Environmental Sciences University of Helsinki, Helsinki, Finland

*e-mail: kristian.donner@helsinki.fi

Received February 8, 2020; Revised February 21, 2020; Accepted February 21, 2020

Rhodopsins, the primary molecules of vision in all seeing animals, can be activated not only by photon energy (light) but also by thermal energy (heat). Spectral absorbance is evolutionarily tuned by critical residues in the amino acid sequence of the protein part (opsin), which affect the energy needed for $11-cis \rightarrow all-trans$ isomerization of the covalently bound chromophore. Already in the 1940's it was suggested that high sensitivity to long-wavelength light, being indicative of a low energy barrier for activation, should correlate with high probability for thermal activation, and that randomly occurring thermal activations would constitute an irreducible noise setting absolute constraints for the detection of weak light signals. This idea has received strong experimental as well as theoretical support over the last 40 years. Most of the experimental evidence comes from physiological studies of light responses and dark noise in the light-sensitive current of vertebrate photoreceptor cells. Here I review this work, which has firmly established the correlation of spectral sensitivity and thermal noise and led to new theoretical insights. On the other hand, there remains significant freedom for independent adjustment of the two variables by tinkering with the opsin. This is a question of fundamental evolutionary as well as practical interest.

Keywords: vision, photopigment, chromophore, activation energy, photoreceptor, signal/noise

DOI: 10.31857/S0869813920040019

All seeing animals use basically the same molecule for capturing photons and triggering the phototransduction cascade. The molecule, generically referred to as (visual, or "type 2") rhodopsin, consists of a 7-transmembrane G-protein-coupled receptor, opsin, to which a light-sensitive prosthetic group, the chromophore, is covalently bound [1, 2]. The chromophore is always some form of retinaldehyde (retinal); in vertebrates derived either from vitamin A1 (11-*cis* retinal, A1) or A2 (11-*cis* 3,4-didehydroretinal, A2). Use of the latter is almost entirely restricted to fishes and amphibians [3] (but see [4]), requiring that the animal possess the enzyme Cyp27c1 necessary for synthesizing A2 from A1 [5]. The most important functional variable of visual pigments is the absorbance spectrum, expressing the probability of absorbing photons as function of their energy, usually displayed as the fraction of light absorbed as function of wavelength. Absorbance spectra can be uniquely defined by a template (one for A1 and one for A2 pigments) with a single variable, the wavelength of maximum absorbance (λ_{max}), which defines both the spectral position and the width of the spectrum [6]. Switching from A1 to A2 chromophore in the same opsin may

be used for red-shifting λ_{max} on a physiological time scale [7, 8], while the universal way of tuning the absorbance spectrum of functional visual pigments is by mutations in the amino-acid sequence of the opsin, effective on evolutionary time scales.

It is *a priori* reasonable to think that a molecule designed to be activated by absorbing light energy cannot be perfectly stable against activation by thermal energy. H. Autrum [9] first pointed out that random activation of rhodopsin molecules would constitute a light-identical shot noise setting an ultimate limit to the detection of real photons, and H.B. Barlow [10] showed that the statistics of human light detection near the absolute threshold is consistent with this idea. E.J. Denton and M.H. Pirenne [11] had previously estimated an upper limit for the possible rate of occurrence of such activations in humans, translating into <0.3 rod⁻¹ s⁻¹ in a rod with ~10⁸ rhodopsin molecules, while emphasizing that the rate could in fact be so low as to lack any significance. Whatever the exact value, it was clear that such rare events could not be approached by conventional biochemical methods.

DISCRETE "DARK" EVENTS IN RODS AS PROXIES FOR THERMAL ACTIVATION OF RHODOPSIN

In the late 1970's, it became possible to "see" single-rhodopsin events electrophysiologically, taking advantage of the powerful molecular amplification of phototransduction in dark-adapted rod cells. The suction-electrode technique developed by K.W. Yau et al. [12], inspired by E. Neher and B. Sakmann [13], allowed recording the light-sensitive current of single rods essentially free from confounding effects of rod-rod coupling and voltage-sensitive channels. The first recordings were from the sturdy rods of the cane toad, Bufo marinus¹. Under very dim background illumination, discrete current bumps of fairly standardized shape and size could be discerned, Poisson-distributed in time, as expected from random arrival and absorption of photons [14]. The size of these quantal responses (SQRs) was ~ 1 pA at peak, representing a \sim 5% decrease of the circulating current in a dark-adapted rod. During the following decades, the molecular events that shape most aspects of rod and cone responses to light have been clarified in considerable detail through a fruitful interaction of biochemical and electrophysiological studies. Precisely how the fairly reproducible SORs are generated has been one of the most challenging questions. Full consensus has not yet been reached, but the crucial variables of the amplification [15-18] and termination reactions are now known with reasonable quantitative precision [19–25].

D.A. Baylor et al. [26] found that even in absolute darkness there still occurred occasional discrete current bumps indistinguishable from the SQR. The obvious hypothesis was that these "dark events" originate at the same point as the SQR, at the very input to the amplification cascade, i.e., in the rhodopsin molecule, rather than arising e.g. from bursts of fortuitous synchronous activation of large numbers of intermediates in the cascade (G-proteins or PDE molecules). Thus they seemed to offer an exceptional window into the "dark life" of the rhodopsin molecule.

This notion faced a serious problem, though. From the temperature-dependence of the rates of dark events, D.A. Baylor and colleagues had determined an activation energy of $\sim 22 \text{ kcal mol}^{-1}$ [26]. They stated that this value "seem(s) consistent with isomerization of the 11-*cis* retinal chromophore as the mechanism for thermal activation", because it was close to that determined for thermal isomerization of the chromophore in aquaeous digitonin (24.5 kcal mol⁻¹) [27]. About the same time, however, A. Cooper [28] showed that the ground-state energy of the early photobleaching product, bathorhodopsin, is 35 kcal mol⁻¹ higher than that of rhodopsin, and argued for a 45 kcal mol⁻¹ energy barrier for the

¹ Several of the toads and frogs that have been central model species in photoreceptor research now have different official names from those used when the studies were done. *Bufo marinus* is now *Rhinella marina*, and the green frogs *Rana catesbeiana*, *R. pipiens* and *R. ridibunda* are *Lithobates catesbeianus*, *L. pipiens* and *Pelophylax ridibundus*, respectively. In this article I shall use their old names.

423

ground-state (thermal) 11-*cis* \rightarrow all-*trans* transition. Neither did D.A. Baylor et al. cite two earlier studies of frog rhodopsins in solution: R.J. Lythgoe and J.P. Quilliam [29] had estimated an activation energy of 44 kcal mol⁻¹ for thermal bleaching, and R.C.C. St. George [30] had arrived at a photoactivation energy of 48.5 kcal mol⁻¹ based on the longest wavelength (590 nm) where photon energy alone sufficed for activation (see below). I shall hereafter denote by E_a and E_{aH} the energies for activation by light and by heat, respectively – estimates as well as the underlying entities, even though this may occasionally cause some confusion.

The discrepancy between apparent activation energies for photic and thermal activation caused much speculation on differing molecular routes, stressing that there is actually no reason why E_a and E_{aH} should be the same. R.B. Barlow and colleagues [31] first came up with a testable hypothesis. They proposed that thermal events originate in a small (<0.01%) subpopulation of rhodopsin molecules where the Schiff-base linkage between chromophore and opsin is unprotonated. According to their molecular modelling, this could lower the activation energy for ground-state $11-cis \rightarrow all-trans$ isomerization by about half. Experimental testing is straightforward in principle, since the proportion of rhodopsin molecules with unprotonated Schiff base must increase with alkalinization and decrease with acidification in predictable manner. In *Limulus*, they found that correlated decreases in pH and in the activity of optic nerve fibers could be induced by efferent stimulation. However, the metric they used, spiking in the afferent nerve, is at least twice removed from the rhodopsin molecule. First, decreased activity may result from some factor other than a decreased rate of thermal "quantum bumps" in the photoreceptors (e.g. acidification as such). Second, "quantum bumps" in *Limulus*, originally reported by S. Yeandle [32], do not bear a straightforward relation to activation of single rhodopsin molecules [33]. Subsequent experiments on toad rods [34] and salamander cones [35] indicated no relevant effect of changing pH (intra- and extracellular) on thermal event rates. The deprotonation hypothesis could be rejected.

A second hypothesis disrupting the connection between SQR-like "dark" events in rods and intrinsic properties of the rhodopsin molecule has been advanced by I. Bókkon and R.L.P. Vimal [36]. They proposed that the events are in fact responses to real photons, "biophotons", emitted by the retinal tissue. However, V.I. Govardovskii and coworkers [37] showed by direct measurements that biophoton emission rates in frog and sterlet retina are >100-fold too low to account for the discrete rod events recorded in the same species.

A third possibility that could cast doubt on the use of light-like noise as a measure of thermal rhodopsin activation is if cannot, after all, be distinguished from noise triggered at a later stage of the phototransduction cascade. A recent study [18] shows that the first amplification step, the number of G-proteins activated per activated rhodopsin, in dark-adapted mouse rods is only 12–14 rather than the commonly quoted number ~100, and that PDE-initiated events may be more similar to the SQR than previously thought. This could explain the difficulty of separating SQR-like events from "continuous noise" in mouse rods [38], but quantitative relations are likely to vary between species. In many species SQRs are much more distinct from continuous noise [39].

ESTIMATES OF THERMAL AND PHOTIC ACTIVATION ENERGY RECONCILED

The problem of the 2-fold discrepancy between estimates of photic [28, 40, 41] and thermal [26] activation energies remained unresolved for more than 20 years. The Gordian knot was cut by P. Ala-Laurila and collegues [42] who argued that the low thermal estimate was no more than an analytical artifact. R.J. Lythgoe and J.P. Quilliam [29] had already in 1938 considered whether rhodopsin activation kinetics would be affected by complexities dealt with in a recent treatise by C.N. Hinshelwood [43], and R.C.C. St. George [30] and P.R. Lewis [44] had applied some aspects of it, but only in [42] were its full implications

developed. Briefly, the thermal energy distribution of complex molecules like rhodopsin, or even the 11-cis retinaldehyde chromophore, cannot be described by simple Boltzmann statistics, but must take into account the internal energy of the molecule present in a large number of vibrational modes. The chromophore alone consists of n = 49 atoms and has 3n - 6 = 141 kinetic degrees of freedom. The number of vibrational modes n (≤ 141) that actually contribute towards 11-cis \rightarrow all-trans isomerization in a given opsin environment is unknown and could depend e.g. on the amino acid residues around the chromophore pocket. The predicted effect of temperature on the fraction F of molecules exceeding E_{aH} , and hence on dark event rates, will depend strongly on n, implying that the temperaturedependence of D.A. Baylor et al's [26] data shown as an Arrhenius plot in Fig. 2 will yield very different values of E_{aH} depending on what *n* value is assumed. Based on Boltzmann statistics, the slope of the straight line indeed gives $E_{aH} = 21.9 \text{ kcal mol}^{-1}$, but based on Hinshelwood statistics it may give, for example, $E_{aH} = E_a = 44.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ (where E_a is the estimated photoactivation energy of *Bufo marinus* rhodopsin in [45]) if n = 79, or $E_{aH} =$ = 34.3 kcal mol⁻¹ if n = 44. The last example was given by P. Ala-Laurila et al. [42] to show the robustness of their model against a possible 5-10 kcal mol⁻¹ difference between the electronically excited state and the peak of the ground-state energy barrier $(E_a - E_{aH})$ as suggested by molecular modelling [46, 47]. Obviously, their approach did not enable actual estimation of E_{aH} , but it removed the supposed incompatibility with estimates of E_a , allowing that thermal activation may follow the same molecular pathway as photoactivation, starting from 11-cis \rightarrow all-trans isomerization of the chromophore.

This is consistent with current molecular understanding. The energies of the groundstate barrier for thermal activation and the electronically excited state induced by photon absorption are expected to be close in view of the femtosecond transition from the latter to the earliest identified ground-state photoproduct [46–48]. Quantum chemical modelling [49] suggests that the transition state mediating thermal activation has the same electronic structure as the excited state, manifesting intrinsic chromophore features associated with the existence of a conical intersection between the ground and excited states (cf. [50]). Importantly, this gives a theoretical, molecular-level foundation for a correlation between the wavelength of maximum absorbance λ_{max} and the rate of dark events k ("the Barlow correlation"). The model has recently been applied to the opsins of the endemic cottoid fishes of Lake Baikal in an attempt to identify specific amino acid residues that may regulate both spectral and thermal properties in connection with the blue-shift of corresponding pigments between species with increasing habitat depth [51].

EMPIRICAL TESTING OF "BARLOW'S HYPOTHESIS"

The basically simple idea that long-wavelength sensitivity should correlate with high thermal activation rates first appears in the literature in a brief comment by H. de Vries in 1949 [52]: high sensitivity to long light wavelengths (low-energy photons) entails a low energy barrier for activation, and this will imply a high probability that the barrier be surmounted by molecular thermal energy alone. The conceptual relations between activation energy E_a , spectral absorbance (captured by λ_{max}) and the fraction F of rhodopsins with thermal energy exceeding E_a are shown by the scheme in Fig. 1. H.B. Barlow [53] gave the idea its classical formulation, proposing it as a teleological explanation for the ubiquitous blue-shift of night vision compared with daylight vision (the Purkinje shift). He pointed out that the shift does not increase photon catch at night, since star- and moonlight is in fact somewhat more "reddish" than daylight, but could be useful as a means of decreasing thermal noise.



Fig. 1. General scheme of the presumed interrelations (arrows marked \bigcirc , o and o) between three main functional variables of rhodopsins. Values for all of these can be derived from electrophysiological experiments on the light-sensitive current of photoreceptor cells. Both the absorption spectrum and the thermal activation rate are functions of the activation energy E_a , hypothesized to be the same or close and well-correlated for photic and thermal activation. As a consequence, the absorption spectrum and the thermal event rate are correlated (dashed arrow o). Barlow (1957) [53] initially assumed $\textcircled{o} \lambda_{max} = hc/E_a$, $\textcircled{o} F = \exp(-E_a/kT)$ according to Boltzmann statistics, but envisaged that the assumptions could be improved, referring to Lewis (1955) [44], who replaced λ_{max} in o by a wavelength $\lambda_0 > \lambda_{max}$ and suggested the use of Hinshelwood statistics. A new model based on these ideas was fully developed by Ala-Laurila et al. (2004) [42], who based oon the regression of E_a on λ_{max} in an empirical data set, and o on the fraction of molecules with thermal energy $\geq E_a$ according to Hinshelwood statistics (see Text).

H.B. Barlow's hypothesis inspired several experimental studies of dark noise in rods with different spectral sensitivities even while the conflict between the estimated values E_{aH} and E_a remained unresolved. The first of these, on the blue-sensitive (433-nm) "green" rods of toad, provided a disappointment, as estimated dark event rates per pigment molecule were more than 4 times *higher* than in the regular 503-nm rods ([54] c.f. however [39] and below). We now know that the pigment of these blue-sensitive rods is not a rod rhodopsin (Rh1), but a cone (SWS2) pigment, albeit with a stabilizing mutation [55, 56]. Luckily, studies on bullfrog rods with A1 (502 nm) and A2 (525 nm) pigment [57] and sturgeon (A2) rods with $\lambda_{max} = 538$ and 549 nm [58] were more encouraging, showing a clear correlation between long-wavelength sensitivity and high rates of SQR-like dark events. This kept interest in Barlow's hypothesis alive.

THE PHOTOACTIVATION ENERGY $E_{\rm a}$

In the general scheme (Fig. 1), the activation energy E_a is in a pivotal position, being the determinant of both spectral absorbance and rates of thermal events. H.B. Barlow [53] initially assumed that E_a would be equal to the photon energy at the wavelength of maximum absorption or "maximum visibility" ($E_a = hc/\lambda_{max}$), but he envisaged improvements by taking into account, *inter alia*, "Lewis's further development of Stiles's theory". One such development was the realization that E_a corresponds to the photon energy not at λ_{max} , but at some wavelength $\lambda_0 > \lambda_{max}$, recognizable as the longest wavelength where activation can still occur without supplementation by thermal energy [30, 44, 59]:

$$E_a = hc/\lambda_0 = Chc/\lambda_{\max}, \qquad (1)$$

where $C = \lambda_{max}/\lambda_0 < 1$ may or may not differ between pigments (see below). All this built on Stiles' (1948) "physical interpretation of the spectral sensitivity curve of the eye" [59],



Fig. 2. Arrhenius plot of the temperature-dependence of rates of dark SQR-like events in rods of *Bufo marinus*. Each symbol type marks data from one rod in Table 2 of Baylor et al (1980) [26]. The least-square regression line fitted to the points gives different estimates E_{aH} for the thermal activation energy depending on the underlying assumptions: (i) conventional Arrhenius analysis relying on Boltzmann statistics for simple particles as in [26] gives $E_{aH} = 21.9$ kcal/mol; (ii) Hinshelwood statistics for complex molecules assuming molecular vibration modes n = 79, gives thermal activation energy $E_{aH} = 44.3$ kcal/mol, equal to the photoactivation energy E_a estimated from rods of the same species in [45]; (iii) Hinshelwood statistics assuming n = 44 gives $E_{aH} = 34.3$ kcal mol⁻¹, which would accommodate a possible energy gap of 5–10 kcal mol⁻¹ between E_a and E_{aH} [42].

which also provided a rationale for estimating E_a through the effect of warming on longwavelength sensitivities. At wavelengths λ corresponding to photon energies $hc/\lambda > E_a$, the activation probability should not depend on the thermal energy of the rhodopsin molecule, but beyond a critical wavelength λ_0 the insufficient photon energy requires added thermal energy to activate the pigment. In this domain, raising temperature will therefore increase the probability of activation (i.e., increase sensitivity), the more so the longer the wavelength. In electrophysiological experiments there is no upper limit for the range over which this effect can be measured other than the power of the light source, enabling fairly accurate determination of E_a (and λ_0) [60–64, 45, 39].

Summarizing results of their measurements on 12 photoreceptor species (both rods and cones with both A1 and A2 pigments, and two pigments in crustacean rhabdoms), Ala-Laurila et al. (2004) [64] could not confirm the simple relation expressed by eqn. (1), but still found a significant correlation between E_a and $1/\lambda_{max}$ described by the following linear regression equation:

$$E_a = 7.10 \text{ kcal/mol} + 19800 \text{ nm kcal/mol} \times (1/\lambda_{\text{max}}) \text{ nm}^{-1}$$
. (2)

The coefficient of determination was only 0.73, however, implying that 27% of the variance remained unexplained variation around the regression line. Moreover, the line itself is less steep than expected.

The data underlying eqn. (2) had been obtained by a combination of microspectrophotometry and transretinal ERG recording potentially susceptible to several sources of error, which moreover may differ between species. D.G. Luo et al. [39] reexamined the $E_a - 1/\lambda_{max}$ relation in 7 species of vertebrate rods and cones, recording spectral sensitivities with the more pre-

427

cise suction-pipette technique. They did find a close agreement with eqn. (1), with λ_0 as a remarkably constant multiple of λ_{max} across species (mean ratio $\lambda_{max}/\lambda_0 \pm SD = 0.84 \pm 0.01$). Strict comparison between [64] and [39] is largely impossible, though, as they are based on mainly non-overlapping samples of photoreceptor species. For the *Bufo marinus* "red" rod included in both, the reported values differ significantly ($E_a = 44.3$ kcal mol⁻¹, $\lambda_{max} = 503$ nm, $\lambda_{max}/\lambda_0 = 0.78$ in [64] *versus* $E_a = 48.0$ kcal mol⁻¹, $\lambda_{max} = 500$ nm, $\lambda_{max}/\lambda_0 = 0.84$ in [39]).

While there is no doubt of the superior quality of the suction-pipette recordings in [39], the differences cannot be lightly dismissed as being due to poor quality of the ERG data. The presence of true variation in λ_{max}/λ_0 between species is suggested by a comparison of the E_a values of two A1–A2 pigment pairs (Fig. 3 based on ERG, cf. Fig. 3A in [64]). One pair consists of L-cone pigments of juvenile (A2 with $\lambda_{max} = 629$ nm) and adult (A1 with $\lambda_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$) Rana temporaria (original data from [61]), the other pair of rod pigments from adult *Rana catesbeiana* (A2 pigment with $\lambda_{max} = 525$ nm and A1 pigment with $\lambda_{max} =$ = 502 nm; original data from [62]). The two straight lines plot eqn. (1) with $\lambda_{max}/\lambda_0 = 0.89$ for the R. temporaria L-cones (blue) and 0.81 for the R. catesbeiana rods (green). The good fit of the two different lines to the respective pair of points suggests three things. First, upon a chromophore switch in the same opsin, changes in E_a and λ_{max} may indeed be tightly coupled as described by eqn. (1). Second, random variation of the ERG-based estimates seems to be fairly small, because otherwise one would expect larger variation of λ_{max}/λ_0 within each pair. Third, as there were no clear sources of systematic error liable to differentially affect estimates for these two species of frogs, the ca 10% difference in λ_{max}/λ_0 between the two pairs appears significant. Pending new data, a cautious conclusion is that the relative shallowness of the regression equation (2) does reflect a real biological trend. One may hypothesize that the evolution of opsins that confer high long-wavelength-sensitivity has also involved selection against a "default" decrease in activation energy, as far as decoupling of the two by tinkering with the amino acid sequence is possible.

SYNTHESIS: RATES OF THERMAL ACTIVATIONS VS. SPECTRAL ABSORBANCE

From the viewpoint of visual function, what finally matters is the resultant relation between λ_{max} and the rate of randomly occurring thermal activations k (dashed arrow 3) in Fig. 1). P. Ala-Laurila et al. [42] compared the data then available for rods and cones with their model, where k was predicted by using the empirical equation (2) for the $E_a - 1/\lambda_{max}$ relation, and the fraction of molecules with energy exceeding E_a was obtained from Hinshelwood's distribution for n = 79 (the same value that made $E_{aH} = E_a$ for *Bufo marinus* rods in Fig. 2). Fig. 4 plots the comparison as $\lg k$ against $1/\lambda_{max}$ for rods (A) and cones (B), reproduced from [42]. The solid lines show the model prediction, where the vertical positioning of each line is the only parameter freely fitted. This corresponds to fixing the "preexponential factor" in the Arrhenius equation, i.e., fixing the absolute rates of dark events (which are some three orders of magnitude higher in cones than in rods). The slopes of the lines provide an acceptable description of the admittedly sparse and scattered data for both rods and cones, in qualitative agreement with Barlow's hypothesis. The prediction of Barlow's original formulation (dashed line) is shown for comparison. The dotted lines show the "robustness test", i.e. the model prediction assuming a 10 kcal mol⁻¹ difference between E_a and E_{aH} (whereby n = 44 is assumed, based on the fit to the temperature data in Fig. 2).

Again, D.G. Luo et al. [39] provided new data of reference quality against which the earlier results must be assessed. They mainly found a much tighter connection between $\lg k$, $1/\lambda_{max}$ and theory. This might partly reflect the advantage of standardized protocols,



Fig. 3. Photoactivation energies of two A1–A2 pigment pairs. Data points marked RT represent L-cone pigments of *Rana temporaria* ($\lambda_{max} = 562 \text{ nm}$ (A1) and 629 nm (A2), values from [61]. Data points marked RC represent rod pigments of *Rana catesbeiana* ($\lambda_{max} = 502 \text{ nm}$ (A1) and 525 nm (A2), values from [62, 57]. Both lines are described by the general equation $E_a = hc/\lambda_0$, where $\lambda_0 = 1.12 \lambda_{max}$ for the RT L-cones (blue line) and 1.23 λ_{max} for the RC rods (green line). Reproduced from [64].



Fig. 4. The relation between rates of thermal dark events per rhodopsin molecule $k [\mathbf{R}_{D}^{*} \mathrm{s}^{-1}]$ and spectral sensitivity measured by the wavelength of peak absorbance λ_{\max} in rods (A) and cones (B). Rates k were estimated from dark noise recordings in single cells, and spectral absorbance by microspectrophotometry. Note that the plot of $-\lg k$ against $1/\lambda_{\max} [10^6 \mathrm{m}^{-1}]$ places the noisiest and most long-wavelength-sensitive pigments at the bottom left and the most stable and short-wavelength sensitive ones at the upper right. In both panels the full-drawn line represents the model of Ala-Laurila et al. (2004) [42] with the same number of molecular vibration modes (n = 79), i.e., the number that provided the best fit to the *Bufo* rod temperature data in Fig. 2, combined with the relation between E_a and $1/\lambda_{\max}$ given by eqn. (2). The dotted lines show the model prediction assuming a 10 kcal/mol $E_a - E_{aH}$ difference and n = 44 (see Text). The dashed lines show the prediction of Barlow's hypothesis as originally formulated [53]. Reproduced from Figs. 2 and 3 in [42].



Fig. 5. Differing rates of discrete dark events in rhodopsin rods of a toad and a frog with virtually identical absorption spectra ($\lambda_{max} \approx 502-503$ nm; [6]): (*A*) from a rod of *Bufo marinus* [26]; (*B*) from an A1 rhodopsin rod of *Rana catesbeiana* [57]. All records are displayed on the same time scale, shown below panel (*A*); current scale bars on the left. Temperature was 22 °C for *Bufo* and 17°C for *Rana*. In both (*A*) and (*B*), the three top traces show recordings in complete darkness. In *Bufo* (A), discrete dark events ("bumps") can be clearly discerned as well as continuous noise. The continuous noise is also of biological origin, as shown by the bottom trace where all biological noise has been eliminated by keeping the rod saturated with strong background light. In *Rana* (*B*), only continuous noise but no clear discrete events can be seen during nearly 20 minutes of dark recording. This is not due to poor preparation or recording, as shown by two epochs of light responses (bottom traces) to flashes of nominal light intensity 1.25 R* delivered at 10 s intervals. The SQR amplitude is about 0.4 pA as determined both from the nominal light intensity (0.43 pA) and from the variance-to-mean ratio of the flash responses (0.39 pA). The first flash epoch was recorded before the dark recordings, the second between the second and third dark record.

avoiding the inter-laboratory variation affecting data assembled from many studies. However, precisely because of the persuasiveness of their elegant study, it seems important to keep up awareness that not everything can be so neatly wrapped up. By the examples in Figs. 5 and 6, I wish to emphasize that there exists real and substantial variation in dark event rates between rod rhodopsins that differ negligibly in λ_{max} . On a general level, this can be seen at a glance in Fig. 4 A from the scatter of k values near $1/\lambda_{max} \approx 2 \times 10^6 \text{ m}^{-1}$, i.e., for rods having typical rod λ_{max} values $\approx 500 \text{ nm}$.

Fig. 5 shows dark current recordings from rods of two anuran species with roughly the same λ_{max} (502–503 nm). Panel A shows the iconic first example of dark rod events published by Baylor et al. (1980) [26]. In the 1050 seconds of recording from a *Bufo marinus* rod, a fair number of discrete "bumps" (some 20) can be identified by eye. This and similar recordings from 9 cells, analyzed by several different methods in their study, indicated 0.02–0.03 events per rod per second. Panel B shows a recording from an A1 rod of *Rana*



Fig. 6. Dark event rates in 5 salamander rods as a function of the estimated fraction of A2 pigment in the rods before and after replacement of a significant part of the (native) A2 chromophore by A1, plotted on linear (*A*) and logarithmic (*B*) scales. The linear regression of event rate (*Y*) on A2 content (*X*) (Y = 0.0009 + 0.318X, straight line) extrapolates (for X = [A2] = 0) to one event per 18 minutes among the ca. 3.8×10^9 A1 rhodopsin molecules of the mean recorded rod volume. The rate per molecule of visual pigment is similar to that in A1 rods of *Rana catesbeiana* (cf. Fig. 5 B, where there is not a single dark event during nearly 20 minutes of recording). Reproduced from [67].

catesbeiana [57]. In ca 20 minutes, not a single discrete bump can be seen (implying a rate of < 0.0008 per second), nor did more sophisticated analyses indicate any. Two epochs of responses to light flashes delivering ca 1 photoisomerization on average are shown below the "dark" traces. The first of these was taken before all the dark epochs, the second between the two latter ones, showing that the absence of dark events is not due to SQRs being undetectable in this rod and recording. Such total silence in darkness was observed in 3 other rods out of 5 studied. In one rod a rate of 0.006 per second was determined from the current probability density histogram, and in a sixth rod recorded after the publication of [57], there was one event distinctly identified by eye in a ca. 1000 second epoch (implying 0.001 per second, or 2.5×10^{-13} events per pigment molecule per second, R* s⁻¹). By any statistics, these results are incompatible with those from *Bufo marinus*, and even in the 2 out of 6 rods where any dark events at all were detected, it is doubtful whether they originate in the Al pigment. Rana catesbeiana, as opposed to Bufo marinus, uses the inherently less stable A2 chromophore during the larval stage and even in the adult stage in the dorsal retina [65], but minimal amounts in other parts of the retina cannot be excluded. (It should be noted that SQRs produced by A1 and A2 pigments cannot be distinguished [66]). A natural hypothesis would be that the *Rana* opsin has evolved to limit noise when collaborating with A2, and that this results in exceptional stability of the A1 version of the pigment. Even a minute fraction of A2 remaining may significantly increase the rate of dark events. P. Ala-Laurila et al. [67] tested the relative noise contribution of A1 and A2 pigment systematically in experiments on rods of larval tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*), where the native pigment is almost 100% A2. They measured changes in dark event rates upon replacing most of the A2 by A1, and plotted the rates as function of remaining A2 (Fig. 6). The dark events decreased linearly with decreasing A2 fraction, extrapolating to a rate of 0.0009 events per rod per second (~ $2.4 \times 10^{-13} \text{ R}^* \text{ s}^{-1}$) for zero A2 (pure A1). This suggests that A1 pigments of Ambystoma tigrinum ($\lambda_{max} = 502 \text{ nm}$) and Rana catesbeiana ($\lambda_{max} = 502 \text{ nm}$) have roughly the same, extremely low thermal activation rates, which are more than one order of magnitude lower than those in *Bufo marinus* ($\lambda_{max} = 503 \text{ nm}$) ([26]: $1.2 \times 10^{-11} \text{ R*s}^{-1}$; [39]: $3.2 \times 10^{-12} \text{ R* s}^{-1}$) and in *Bufo bufo* ($\lambda_{max} = 502 \text{ nm}$) ([68]: $5.4 \times 10^{-12} \text{ R* s}^{-1}$; [34]: $8.4 \times 10^{-12} \text{ R* s}^{-1}$). (All values refer to rates temperature-corrected to 21° C.) With respect to the existence of species differences, it may further be noted that Luo et al. [39] found a 16-fold higher temperature-corrected activation rate per molecule of visual pigment in mouse rods compared with *Bufo marinus* rods. *A priori*, toad and mouse pigments are expected to be roughly similar, and if anything, a possible difference would be expected to go in the opposite direction (mouse rod $\lambda_{max} = 497 \text{ nm [69]}$).

Thus there can be little doubt that true interspecies variation exists around the average functional relationships of λ_{max} , k and E_a (Fig. 1). However, besides species differences and "acceptable" random differences between results from different laboratories, there are cases where results on the *same* photoreceptor species differ to a degree for which there is no clear explanation. It is tempting to think that there could be polymorphisms between populations/strains of the same species used in different laboratories. These amphibians, unlike laboratory rodents, have not been bred for global standardization of strains. For example, significant spectral polymorphism (not due to varying A2 admixture) has been found between individuals of the common frog *Rana temporaria*, with rod λ_{max} varying by 8 nm, far more than normal experimental variation [70]. Above, I have also referred to the significant differences in E_a and k values of *Bufo marinus* reported in [39] compared with those in [45] (E_a) and [26] (k).

A major unresolved conflict of this kind concerns the thermal stability of the blue-sensitive pigment of *Bufo* "green" rods (with $\lambda_{max} \approx 432-433$ nm, [6]). Whereas G. Matthews [54] originally reported an unexpectedly high dark event rate, 4 times higher than in the "red" rods (see above), D.G. Luo et al. [39] found an event rate 100 times *lower* than in the "red" rods. The high value seemed to make sense when it was shown that the anuran green-rod pigment is an SWS2 *cone* pigment [55]. Cone pigments are generically less stable by 2–3 orders of magnitude [71–73, 39, 42], but the most short-wavelength-sensitive ones may approach the stability of rod pigments [74, 75]. The recent discovery of a stabilizing mutation in the anuran green-rod SWS2 pigment [56] might give reason to expect it to be particularly silent even compared with rod pigments, but really there is no easy explanation for the large discrepancy of the estimates in [54] and [39]. This question certainly merits further investigation.

TUNING OF SPECTRAL ABSORBANCE AND THERMAL STABILITY BY THE OPSIN

Over 30 years, a huge literature has accumulated on how amino acid residues in the opsin tune the chromophore for diffent spectral absorbances in single species and across species (e.g. [76–80]). On a general level, the results exemplify the "multiple realizability" of function in complex biological systems, meaning in this case that (for practical purposes) identical spectral absorbance can be achieved by different combinations of amino acids in critical positions. This also makes it seem likely that similar spectra can be associated with different thermal properties, and that mutations affecting spectral and thermal properties may be independent targets of natural selection. Recently there has been increasing interest specifically in the tuning of thermal stability [56, 81]. Earlier, N. Fyhrquist et al. [82] sequenced the rod opsins of the anuran species presented above as examples where the same λ_{max} is associated with different dark event rates: *Rana catesbeiana* (plus two other *Rana* species, as well as *Xenopus laevis*) vs. the two *Bufo* species. Although it was not possible to identify unique residues for stability, among sixteen non-conserved substitutions and six involving gain/loss of hydroxyl groups, a few clear contrasts between *Bufo* and *Rana* were found. Some of these were shared by the *Rana* opsins and the *Xenopus laevis* opsin (which also has to collaborate with the A2 chromophore). The resolution of such studies have improved since then. In [81], two residues were identified that explain at least some of the generically increased stability of rod compared with cone pigments, and in [56] a single threonine at position 47 was identified as responsible for the rod-like stability of the anuran (in contrast to the urodelan) blue-cone pigment (SWS2). The green rods equipped with this stabilized pigment allow frogs to make blue/green wavelength discriminations at the absolute threshold of vision [83].

These developments enable us to address new evolutionary questions. Does the rarity of strongly stabilized rod pigments like those of *Rana catesbeiana* and *Ambystoma tigrinum* (Figs. 5 and 6) indicate that pigment noise in e.g. *Bufo* and other typical vertebrate rods is already driven to an acceptably low level, given the presence of other noise sources? In other words, is the extreme silence of *Rana* and *Ambystoma* A1 pigments mainly a side effect of having to limit the noisiness of the A2 pigment? Could there be mutations making pigments with λ_{max} beyond the long-wavelength limit of ca. 630 nm found in nature stable enough to be useful? On a different track, it is interesting to follow the engineering of microbial ("type 1") rhodopsins with the purpose of developing improved tools for optogenetics, for example, by moving their spectral absorbance further into the infrared [84–87].

FUNDING SOURCES

This work was supported by The Academy of Finland and Societas Scientiarum Fennica.

ACKNOWLEDGEMENTS

I thank Dr. Petri Ala-Laurila and Ms. Sanna Koskela, MSc, for critical comments on the manuscript.

REFERENCES

- 1. *Hargrave P.A.* Rhodopsin chemistry, structure and topography. Progress in Retinal Res. 1: 1–51. 1982.
- 2. Wald G. Carotenoids and the visual cycle. J. Gen. Physiol. 19: 351-371. 1935.
- Bridges C.D.B. The rhodopsin-porphyropsin visual system. In: Handbook of Sensory Physiology VII/1: Photochemistry of Vision (ed. H.J.A. Dartnall). 417–480. Berlin. Springer-Verlag. 1972.
- Provencio I., Loew E.R., Foster R.G. Vitamin A2-based visual pigments in fully terrestrial vertebrates. Vision Res. 32: 2201–2208. 1992.
- Enright J.M., Toomey M.B., Sato S.-Y., Temple S.E., Allen J.R., Fujiwara R., Kramlinger V.M., Nag L.D., Johnson K.M., Xiao Y., How M.J., Johnson S.L., Robert, N.W., Kefalov V.J., Guengerich F.P., Corbo J.C. Cyp27c1 red-shifts the spectral sensitivity of photoreceptors by converting vitamin A1 into A2. Current Biol. 25: 3048–3057. 2015.
- Govardovskii V.I., Fyhrquist N., Reuter T., Kuzmin D.G., Donner K. In search of the visual pigment template. Visual Neurosci. 17: 509–528. 2000.
- 7. *Dartnall H.J.A., Lythgoe J.N.* The spectral clustering of visual pigments. Vision Res. 5: 81–100. 1965.
- Hárosi F.I. An analysis of two spectral properties of vertebrate visual pigments. Vision Res. 34: 1359–1367. 1994.
- 9. Autrum H. Über kleinste Reize bei Sinnesorganen. Biol. Zentralblatt. 66: 209–236. 1943.
- 10. Barlow H.B. Retinal noise and absolute threshold. J. Opt. Society of America. 46: 634–639. 1956.
- 11. *Denton E.J., Pirenne M.H.* The absolute sensitivity and functional stability of the human eye. J. Physiol. 123: 417–442. 1954.
- 12. Yau K.W., Lamb T.D., Baylor D.A. Light-induced fluctuations in membrane current of single toad rod outer segments. Nature. 269: 78–80. 1977.
- 13. *Neher E., Sakmann B.* Single-channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibres. Nature. 260: 799–802. 1976.
- 14. Baylor D.A., Lamb T.D., Yau K.-W. Responses of retinal rods to single photons. J. Physiol. 288: 613–634. 1979.
- Pugh E.N., Lamb T.D. Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. Biochim. Biophys. Acta. 1141: 111–149. 1993.
- Leskov I.B., Klenchin V.A., Handy J.W., Whitloc G.G., Govardovskii V.I., Bownds M.D., Lamb T.D., Pugh E.N., Jr., Arshavsky V.Y. The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements. Neuron. 27: 525–537. 2000.
- Arshavsky V.Y., Burns M.E. Current understanding of signal amplification in phototransduction. Cellular Logistics. 4: e29390 DOI:. 2014. https://doi.org/10.4161/cl.29390
- Yue W.W.S., Silverman D., Ren X., Frederiksen R., Sakai K., Yamashita T., Shichida Y., Cornwall M.C., Chen J., Yau K.-W. Elementary response triggered by transducin in retinal rods. PNAS. 116: 5144–5153. 2019.
- Rieke F., Baylor D.A. Origin of reproducibility in the responses of retinal rods to single photons. Biophysi. J. 75: 1836–1857. 1998.
- 20. *Whitlock G.G., Lamb T.D.* Variability in the time course of single photon responses from toad rods: termination of rhodopsin's activity. Neuron. 23: 337–351. 1999.
- 21. Field G.D., Rieke, F. Mechanisms regulating variability of the single photon responses of mammalian rod photoreceptors. Neuron. 35: 733–47. 2002.
- Hamer R.D., Nicholas S.C., Tranchina D., Liebman P.A., Lamb T.D. Multiple steps of phosphorylation of activated rhodopsin can account for the reproducibility of vertebrate rod single-photon responses. J. Gen. Physiol. 122: 419–444. 2003.
- Doan T., Mende A., Detwiler P.B., Chen J., Rieke F. Multiple phosphorylation sites confer reproducibility of the rod's single-photon responses. Science. 313: 530–533. 2006.
- Krispel C., Chen D., Melling N., Chen Y.-J., Martemyanov K.A., Quillinan N., Arshavsky V.Y., Wensel T.G., Chen C.-K., Burns M.E. RGS expression rate-limits recovery of rod photoresponses. Neuron. 51: 409–416. 2006.
- 25. Lamb T.D., Kraft T.W. Quantitative modeling of the molecular steps underlying shut-off of rhodopsin activity in rod phototransduction. Mol. Vision. 22: 674–696. 2016.
- Baylor D.A., Matthews G., Yau K.W. Two components of electrical dark noise in toad retinal rod outer segments. J. Physiol. 309: 591–621. 1980.
- 27. Hubbard R. The stereoisomerization of 11-cis retinal. J. Biol. Chem. 241: 1814–1818. 1966.
- 28. Cooper A. Energy uptake in the first step of visual excitation. Nature. 282: 531–533. 1979.
- 29. *Lythgoe R.J., Quilliam J.P.* The thermal decomposition of visual purple. J. Physiol. 93: 24–38. 1938.
- 30. *St. George R.C.C.* The interplay of light and heat in bleaching rhodopsin. J. Gen. Physiol. 35: 495–517. 1952.
- 31. Barlow R.B.Jr., Birge R.R., Kaplan E., Tallent J.R. On the molecular origin of photoreceptor noise. Nature. 366: 64–66. 1993.
- 32. *Yeandle S*. Evidence of quantized slow potentials in the eye of *Limulus*. Am. J. Ophthalmol. 46: 82–87. 1958.
- Yeandle S., Spiegler J.B. Light-evoked and spontaneous discrete waves in the ventral nerve photoreceptor of Limulus. J. Gen. Physiol. 61: 552–571. 1973.
- 34. *Firsov M.L., Donner K., Govardovskii V.I.* pH and rate of "dark" events in toad retinal rods: test of a hypothesis on the molecular origin of photoreceptor noise. J. Physiol. 539: 3–46. 2002.
- 35. *Sampath A.P., Baylor D.A.* Molecular mechanism of spontaneous pigment activation in retinal cones. Biophysic. J. 83: 184–193. 2002.
- 36. *Bókkon I., Vimal R.L.P.* Retinal phosphenes and discrete dark noises in rods: a new biophysical framework. J. Photochem. Photobiol. B 96: 255–259. 2009.
- 37. Govardovskii V.I., Astakhova L.A., Rotov A.Yu., Firsov M.L. Rejection of the biophoton hypothesis on the origin of photoreceptor dark noise. J. Gen. Physiol. 151: 887–897. 2019.
- 38. *Field G.D., Rieke F.* Nonlinear signal transfer from mouse rods to bipolar cells and implications for visual sensitivity. Neuron. 34: 773–785. 2002.
- Luo D.G., Yue W.W., Ala-Laurila P., Yau K.W. Activation of visual pigments by light and heat. Science. 332: 1307–12. 2011.
- Schick G.A., Cooper T.M., Holloway R.A., Murray L.P., Birge R.R. Energy storage in the primary photochemical events of rhodopsin and isorhodopsin. Biochemistry. 26: 2556–2562. 1987.
- 41. Tallent J.R., Hyde E.W., Findsen L.A., Fox G.C., Birge R.R. Molecular dynamics of the primary photochemical event in rhodopsin. J. Am. Chem. Society. 114: 1581–1592. 1992.
- Ala-Laurila P., Donner K., Koskelainen A. Thermal activation and photoactivation of visual pigments. Biophys. J. 86: 3653–3662. 2004.
- Hinshelwood C.N. The kinetics of chemical change in gaseous systems. Clarendon Press. Oxford. UK. 1933.
- 44. *Lewis P.R.* A theoretical interpretation of spectral sensitivity curves at long wavelengths. J. Physiol. 130: 45–52. 1955.

- 45. *Ala-Laurila P., Saarinen P., Albert R., Koskelainen A., Donner K.* Temperature effects on spectral properties of red and green rods in toad retina. Visual Neurosci. 19: 781–792. 2002.
- 46. Okada T., Ernst O.P., Palczewski K., Hofmann K.P. Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. Trends Biochem. Sci. 26: 318–324. 2001.
- 47. *Mathies R.A.* Photons, femtoseconds and dipolar interactions: a molecular picture of the primary events in vision. Novartis Found. Symp. 224: 70–84. 1999.
- 48. Schoenlein R.W., Peteanu L.A., Mathies R.A., Shank C.V. The first step in vision: femtosecond isomerization of rhodopsin. Science. 254: 412–415. 1991.
- 49. Gozem S., Schapiro I., Ferré N., Olivucci M. On the molecular mechanism of thermal noise in rod photoreceptors. Science. 337: 1225–1228. 2012.
- Polli D., Altoè P., Weingart O., Spillane K., Manzoni C., Brida D., Tomasello G., Orlandi G., Kukura P., Mathies R.A., Garavelli M., Cerullo G. Conical intersection dynamics of the primary photoisomerization event in vision. Nature. 467: 440–443. 2010.
- Luk H.L., Bhattacharyya N., Montisci F., Morrow J.M., Melaccio F., Wada A., Sheves M., Fanelli F., Chang B.S.W., Olivucci M. Modulation of thermal noise and spectral sensitivity in Lake Baikal cottoid fish rhodopsins. Scient. Rep. 6:38425. 2016. https://doi.org/10.1038/srep38425
- 52. de Vries H. Comment to Dr. Wald's lecture. Document. Ophthalmol. 3: 137. 1949.
- 53. Barlow H.B. Purkinje shift and retinal noise. Nature. 179: 255-256. 1957.
- 54. *Matthews G.* Dark noise in the outer segment membrane current of green rod photoreceptors from toad retina. J. Physiol. 349: 607–618. 1984.
- 55. *Hisatomi O., Takahashi Y., Taniguchi Y., Tsukahara Y., Tokunaga F.* Primary structure of a visual pigment in bullfrog green rods. FEBS Letters. 447: 44–48. 1999.
- 56. Kojima K., Matsutania Y., Yamashita T., Yanagawa M., Imamoto Y., Yamano Y., Wada A., Hisatomi O., Nishikaw, K., Sakurai K., Shichida Y. Adaptation of cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation. PNAS. 114: 5437–5442. 2017.
- 57. Donner K., Firsov M.L., Govardovskii V.I. The frequency of isomerization-like"dark" events in rhodopsin and porphyropsin rods of the bull-frog retina. J. Physiol. 428: 673–692. 1990.
- Firsov M.L., Govardovskii V.I. Dark noise of visual pigments with different absorption maxima. Sensornye Sistemy. 4: 25–34. 1990. (In Russ).
- Stiles W.S. The physical interpretation of the spectral sensitivity curve of the eye. In: Transactions of the Optical Convention of the Worshipful Company of Spectacle Makers. Spectacle Makers' Co. London. UK. 97–107. 1948.
- Srebro R. A thermal component of excitation in the lateral eye of *Limulus*. J. Physiol. 187. 417–425. 1966.
- 61. Koskelainen A., Ala-Laurila, P., Fyhrquist N., Donner K. Measurement of thermal contribution to photoreceptor sensitivity. Nature. 403: 220–223. 2000.
- 62. Ala-Laurila P., Albert R-J., Saarinen P., Koskelainen A., Donner K. The thermal contribution to photoactivation in A2 visual pigments studied by temperature effects on spectral properties. Visual Neurosci. 20: 411–419. 2003.
- 63. Pahlberg J., Lindström M., Ala-Laurila P., Fyhrquist-Vanni N., Koskelainen A., Donner K. The photoactivation energy of the visual pigment in two spectrally different populations of Mysis relicta (Crustacea, Mysida). J. Compar. Physiol. A 191: 837–844. 2005.
- 64. Ala-Laurila P., Pahlberg J., Koskelainen A., Donner K. On the relation between the photoactivation energy and the absorbance spectrum of visual pigments. Vision Res. 44: 2153–2158. 2004.
- 65. *Reuter T.E., White R.H., Wald G.* Rhodopsin and porphyropsin fields in the adult bullfrog retina. J. Gen. Physiol. 58: 351–371. 1971.
- Firsov M.L., Govardovskii V.I., Donner K. Response univariance in bull-frog rods with two visual pigments. Vision Res. 34: 839–847. 1994.
- Ala-Laurila P, Donner K., Crouch R.K., Cornwall M.C. Chromophore switch from 11-cis dehydroretinal (A2) to 11-cis-retinal (A1) decreases dark noise in salamander red rods. J. Physiol. 585: 57–74. 2007.
- Fyhrquist N., Govardovskii V.I., Leibrock C., Reuter T. Rod pigment and rod noise in the European toad Bufo bufo. Vision Res. 38: 483–486. 1998.
- Smeds L., Takeshita D., Turunen T., Tiihonen J., Westö J., Martyniuk N., Seppänen A., Ala-Laurila P. Paradoxical rules of spike train decoding revealed at the sensitivity limit of vision. Neuron. 104: 576–587. 2019.
- 70. Bowmaker J.K., Loew E.R., Liebman P.A. Variation in the λ_{max} of rhodopsin from individual frogs. Vision Res. 15: 997–1003. 1975.
- 71. Kefalov V., Fu Y., Marsh-Armstrong N., Yau K.-W. Role of visual pigment properties in rod and cone phototransduction. Nature. 425: 526–531. 2003.
- Sakura K., Onishi A., Imai H., Chisaka O., Ueda Y., Usukura J., Nakatani K., Shichida Y. Physiological Properties of Rod Photoreceptor Cells in Green-sensitive Cone Pigment Knock-in Mice. J. Gen. Physiol. 130: 21–40. 2007.

- 73. Fu Y., Kefalov V., Luo D.G., Xue T., Yau K.W. Quantal noise from human red cone pigment. Nature Neurosci. 11: 565–71. 2008.
- 74. *Rieke F., Baylor D.A.* Origin and functional impact of dark noise in retinal cones. Neuron. 26: 181–186. 2000.
- 75. *Shi G., Yau K.-W., Chen J., Kefalov V.J.* Signaling properties of a short-wave cone visual pigment and its role in phototransduction. J. Neurosci. 27: 10084–10093. 2007.
- 76. *Nathans J.* Determinants of visual pigment absorbance: role of charged amino acids in the putative transmembrane segments. Biochemistry. 29: 937–942. 1990.
- Yokoyama S. Amino acid replacements and wavelength absorption of visual pigments in vertebrates. Mol. Biol. Evol. 12: 53–61. 1995.
- Yokoyama S., Yang H., Starmer W.T. Molecular basis of spectral tuning in the red- and greensensitive (M/LWS) pigments in vertebrates. Genetics. 179: 2037–2043. 2008.
- 79. *Hunt D.M., Dulai K.S., Partridge J.C., Cottrill P., Bowmaker J.K.* The molecular basis of a spectral tuning of rod visual pigments in deep-sea fish. J. Exper. Biol. 204: 3333–3344. 2001.
- Hunt D.M., Carvalho L.S., Cowing J.A., Davies W.L. Evolution and spectral tuning of visual pigments in birds and mammals. Philosoph. Transactions of the Royal Soc. B 364: 2941–2955. 2009.
- Yanagawa M., Kojima K., Yamashita T., Imamoto Y., Matsuyama T., Nakanishi T., Yamano Y., Wada A., Sako Y., Shichida Y. Origin of the low thermal isomerization rate of rhodopsin chromophore. Scient. Rep. 5: 11081. DOI: . 2015 https://doi.org/10.1038/srep11081
- Fyhrquist N., Donner K., Hargrave P.A., McDowell J.H., Popp M.P., Smith W.C. Rhodopsins from three frog and toad species: Sequences and functional comparisons. Exp. Eye Res. 66: 295–305. 1998.
- 83. Yovanovich C.A.M., Koskela S.M., Nevala N., Kondrashev S.L., Kelber A., Donner K. The dual rod system of amphibians supports colour discrimination at the absolute visual threshold. Philos. Transactions of the Royal Society. Biol. Sci. 372: 1717–1726. 2017.
- McIsaac R.S., Engqvist M.K., Wannier T., Rosenthal A.Z., Herwig L., Flytzani N.C., Imasheva E.S., Lanyi J.K., Balashov S.P., Gradinaru V., Arnold F.H. Directed evolution of a far-red fluorescent rhodopsin. PNAS. 111: 13034–13039. 2014.
- 85. McIsaac R.S., Bedbrook C.N., Arnold F.H. Recent advances in engineering microbial rhodopsins for optogenetics. Current Opinion in Struct. Biol. 33: 8–15. 2015.
- 86. Ganapath S., Venselaar H., Chen Q., de Groot H.J.M., Hellingwerf K.J., de Grip W.J. Retinalbased proton pumping in the near infrared. J. Am. Chem. Society. 139: 2338–2344. 2017.
- Ganapathy S., Kratz S., Chen Q., Hellingwerf K.J., de Groot H.J.M., Rothschild K.J., de Grip W.J. Red-shifted and near-infrared active analog pigments based upon archaerhodopsin-3. Photochem. and Photobiol. 95: 959–968. 2019.

TO CITE THIS ARTICLE:

Donner K. Spectral and Thermal Properties of Rhodopsins: Closely Related but not Tightly Coupled. Russian Journal of Physiology. 106(4): 421–435.

DOI: 10.31857/S0869813920040019

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 436-447

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

ЧТО ТАКОЕ "ХОРОШИЙ СЛУХ"? ПОКАЗАТЕЛИ ЧАСТОТНОЙ РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СЛУХА

© 2020 г. А. Я. Супин*

Институт проблем экологии и эволюции РАН, Москва, Россия *E-mail: alex supin@mail.ru

> Поступила в редакцию 21.01.2020 г. После доработки 07.02.2020 г. Принята к публикации 07.02.2020 г.

В настоящее время уровень развития диагностических методов для чувствительности и для частотной разрешающей способности (ЧРС) слуха существенно различается. Приборы для точного измерения ЧРС не вошли в клиническую практику. Лабораторные методы измерения ЧРС малопригодны для использования в практических целях. Сигналы с гребенчатыми спектрами могут быть эффективным инструментом для тестирования ЧРС слуха как при исследованиях фундаментальных механизмов слуха, так и в практической аудиологии. Использование таких сигналов для тестирования позволяет измерять не добротность отдельных частотно-избирательных каналов-фильтров, а непосредственно способность анализировать звуковые сигналы со сложным спектрально-временным рисунком. Кроме того, измерение ЧРС с помощью гребенчатых тест-сигналов удобно для практического применения. Измерения с применением гребенчатых тест-сигналов дали сведения о реальной способности слуховой системы различать сложные звуковые сигналы. Кроме того, эти измерения показали роль ряда фундаментальных слуховых механизмов – компрессивной нелинейности, латерального подавления, частотного и временного механизмов частотного анализа – в восприятии сложных звуковых сигналов. В зависимости от задачи различения включается либо частотный, либо временной анализ, что дает принципиально различные оценки ЧРС. Имеется успешный опыт применения тест-сигналов с гребенчатыми спектрами для оценки остроты слуха у носителей кохлеарных имплантов.

Ключевые слова: слух, избирательность, разрешающая способность, гребенчатые спектры

DOI: 10.31857/S0869813920040093

ОСТРОТА СЛУХА: ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ

Полная или частичная потеря слуха — широко распространенное явление [1]. Причины ухудшения или потери слуха могут быть разными: генетические дефекты, травмы, инфекционные заболевания, акустические травмы, применение ототоксических препаратов. Соответственно могут быть различными меры лечения, восстановления или компенсации. Но в любом случае необходимым мерам предшествует диагностика. В свою очередь, диагностика начинается с определения сохранности слуха, а именно, с определения способности слуховой системы воспринимать и анализировать звуки. Эту способность принято называть остротой слуха. Любая сенсорная система, биологическая или техническая, может быть охарактеризована, как минимум, двумя важнейшими характеристиками: чувствительностью и разрешающей способностью. Чувствительность системы определяет, какая минимальная мощность сигналов достаточна, чтобы сигнал был воспринят, обнаружен. Но обнаружение сигнала недостаточно для полноценного функционирования сенсорной системы. Необходимо отличать один сигнал от другого, без чего невозможно распознавание сигналов. Разрешающая способность определяет, насколько тонкое отличие одного сигнала от другого допускает их различение. Это общее положение, безусловно, относится и к слуховой системе. Для распознавания звуковых сигналов важна способность слуховой системы различать их как по частотно-спектральному рисунку (частотная разрешающая способность, ВРС), так и по временному рисунку (временная разрешающая способность, ВРС).

Однако в настоящее время уровень развития диагностических методов для чувствительности и для разрешающей способности слуховой системы существенно различается. Стандартный прибор для диагностики слуха – аудиометр – имеется в распоряжении практически любого аудиолога или даже отоларинголога. Но стандартный аудиометр предназначен для определения минимальной интенсивности звука, которую может услышать пациент, т.е. для определения чувствительности. Аудиометры для определения разрешающей способности слуха не вошли в практику. Для этого есть причины: при многих патологиях одновременно страдают как чувствительность, так и разрешающая способность слуха, так что измерение чувствительности – достаточно информативная процедура. Но все же нельзя игнорировать то обстоятельство, что чувствительность и разрешающая способность – разные характеристики слуха, и обе они важны.

Для слуховой системы важнейший показатель разрешающей способности – ЧРС. Многие данные указывают на диагностическую важность ЧРС слуха. Потеря слуха нейросенсорного характера сопровождается снижением способности к частотному различению [2–6]. Возрастная тугоухость также связана с ухудшением частотного различения. Снижение же способности к частотному различению прямо ведет к ухудшению распознавания сложных звуковых образов, в первую очередь, звуков речи [7–11].

Различное функциональное значение чувствительности и ЧРС слуха проявляет себя при слухопротезировании. Обычные слухопротезные аппараты обеспечивают усиление громкости звуковых сигналов, компенсируя таким образом снижение слуховой чувствительности. За счет специально подобранной частотной характеристики аппарата возможно улучшить соотношение чувствительности к разным частотам и, таким образом, частично компенсировать потерю чувствительности к высоким частотам, которая характерна для многих случаев нейросенсорной тугоухости. Однако если у пациента снижена ЧРС, то усиление громкости, делая звуки слышимыми, не делает их различимыми, в том числе не обеспечивает в полной мере разборчивое восприятие звуков речи: пациент, использующий слуховой аппарат, слышит даже негромкие звуки, но плохо отличает друг от друга звуки со схожими спектрально-временными характеристиками. Поэтому отмечалось, что измерение частотного различения важно для правильного подбора характеристик слухопротезных аппаратов [12–14].

Поскольку нет приборов для точного измерения разрешающей способности слуха, а игнорировать эту характеристику слуха невозможно, используется речевая аудиометрия (speech discrimination test): врач тихо (обычно шепотом) произносит слова, пациент должен их повторять. Но строго говоря, такую процедуру нельзя называть измерительной. Прежде всего, частотный спектр шепотной речи отличается от нормальной, а характеристики голоса могут различаться у разных врачей. Эти проблемы можно устранить, используя записи, надиктованные профессиональными дикторами, и воспроизводя их с разной громкостью. Но даже в этом случае остается главная проблема: речевое тестирование не дает результата в строгих физических единицах.

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ ЧРС

Хотя методы аппаратурного измерения ЧРС практически не применяются в клинической практике (исключение – диагностика работы кохлеарных имплантов, рассмотренная ниже), в фундаментальной аудиологии имеются хорошо разработанные и вполне строгие методы измерения способности к частотному различению. Это методы измерения ширины частотных каналов-фильтров слуховой системы и их психоакустических эквивалентов – критических полос слуха. Именно полоса пропускания частотных слуховых фильтров (критическая полоса) определяет способность слуховой системы различать звуки разного частотного состава. Если частотные интервалы между спектральными составляющими звукового сигнала больше, чем полоса пропускания фильтров, то эти спектральные составляющие возбуждают разные фильтры (попадают в разные критические полосы) и могут восприниматься как раздельные компоненты сигнала. В противном случае они возбуждают один и тот же частотный фильтр (попадают в одну и ту же критическую полосу) и раздельно не воспринимаются.

Болышинство методов определения полосы пропускания частотных слуховых фильтров основаны на методе маскировки. Общий принцип состоит в том, что измеряются пороги маскировки тонального сигнала (пробы) звуками-маскерами различного спектрального состава. Предполагается, что маскировка частотно-зависима: чем лучше маскер пропускается тем фильтром, через который проходит сигнал, тем сильнее маскировка. Поэтому зависимость порогов маскировки от спектрального состава маскера позволяет вычислить полосу пропускания частотных слуховых фильтров.

В разных работах использовались различные формы маскеров [15, 16], но во всех случаях измерение частотной избирательности слуха было основано на общем фундаментальном принципе: принципе частотно-зависимой маскировки. В многочисленных экспериментальных исследованиях, проведенных с применением разных вариантов метода маскировки, были получены достаточно полные данные по полосам пропускания частотных фильтров слуха человека в норме. Обобщение многочисленных данных о зависимости остроты настройки (добротности) фильтров от частоты [17] привело к результату, согласно которому в большей части частотного диапазона слуха полоса пропускания составляет 10–11% от центральной частоты фильтра.

Однако эти достаточно точные методы, как правило, не применяются в практической аудиологии. Тому есть несколько причин. Одна из них состоит в том, что все методы, основанные на частотно-зависимой маскировке, требуют значительного времени измерений, поскольку большинство вариантов метода маскировки являются мультиточечными. Это означает, что для получения одного результата (например, для измерения полосы пропускания фильтра на некоторой частоте) необходимо выполнить как минимум несколько измерений порога маскировки при разных частотах маскера. Сделав ряд таких измерений, можно построить функцию, показывающую, как порог маскировки зависит от частоты маскера. А уже из этой функции может быть вычислена полоса пропускания фильтра. Но каждое из пороговых измерений требует многократного предъявления сигнала на фоне маскера, чтобы получить статистически обоснованное значение порога. Если требуется получить не одно, а несколько значений полосы пропускания фильтров на нескольких частотах, то общий объем измерений получается неприемлемо большим. Такие измерения возможны при фундаментальных исследованиях, но в клинических условиях время обследования неизбежно ограничено, что делает мультиточечные методы измерений неприменимыми.

Помимо практических резонов, есть и принципиальная трудность при применении рассмотренных методов для определения ЧРС. ЧРС, действительно, зависит о остроты настройки (ширины полос пропускания) слуховых фильтров. Имея данные о полосах пропускания фильтров, для линейной системы можно вычислить, насколько детально будет воспроизведен частотный спектр любого звукового сигнала. Но слуховая система заведомо нелинейна, во-первых, из-за нелинейности характеристики вход—выход, и во-вторых, из-за сложных взаимодействий между соседними частотно-избирательными каналами-фильтрами. Для такой системы получение картины возбуждения, создаваемой сложным сигналом, практически нереально.

СЛОЖНЫЕ ТЕСТ-СИГНАЛЫ – ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧРС

Неудобство применения маскировочных методов для определения ЧРС слуха не означает, что строгий, пригодный для аппаратной реализации и для практического применения способ измерения ЧРС принципиально невозможен. Проблема может быть решена, если найти способ определять ЧРС не косвенно, через измерение полос пропускания слуховых фильтров, а непосредственно, т.е. определяя способность слуха различать звуковые сигналы с более или менее сложным спектральным рисунком. Именно на таком подходе основана речевая аудиометрия. Однако натуральные звуки речи — слишком сложные сигналы. Они не подходят для такого тестирования, поскольку характеризуются многими параметрами, не только частотно-спектральной структурой.

Однако можно найти им удовлетворительную замену — такие тест-сигналы, чтобы они позволяли оценить способность различать частотные спектры, но при этом описывались небольшим количеством строгих физических параметров. Эффективный подход к тестированию ЧРС слуха может состоять в том, чтобы создать на рецепторной поверхности органа слуха (на кортиевом органе) "решетку" из чередующихся возбужденных и невозбужденных (или сильнее и слабее возбужденных) участков. Предельная плотность чередующихся участков, при которой может восприниматься рисунок такой решетки, будет показателем разрешающей способности.

На кортиевом органе представлена развернутая шкала звуковых частот: максимальная активация определенного участка возникает при определенной частоте звука. Следовательно, для создания тестовой "решетки" на рецепторной поверхности органа слуха следует использовать "спектральную решетку", т.е. такие звуковые сигналы, в спектре которых содержатся чередующиеся максимумы и минимумы спектральной мощности.

Такие сигналы известны и использовались в аудиологии. Их частотный спектр называют гребенчатым спектром (rippled spectrum), а сигналы – гребенчатыми или гребенчато-фильтрованными сигналами (rippled signals, comb-filtered signals). До того как гребенчатые сигналы нашли широкое применение для измерения ЧРС, они использовались в ряде исследований частотной избирательности нейронов слуховой системы [18–21], в психоакустических экспериментах в качестве маскера для исследования частотной избирательности [2, 23, 24] и при исследовании восприятия высоты в сложных звуках [25–28]. Но применение гребенчатых сигналов для тестирования ЧРС, тем более дробный рисунок гребенчатого спектра может различаться слуховой системой. При этом максимальная "частота" (плотность) гребней, разрешаемая слуховой системой, принимается за меру ЧРС, причем ЧРС может быть охарактеризована в конкретных физических единицах.

Принципиальная особенность тестирования частотной избирательности слуха с помощью спектральных решеток состоит в том, что этот метод измеряет не остроту отдельных слуховых частотных фильтров, а результирующую, реальную ЧРС слуха, которая может определяться действием нескольких механизмов: и периферической частотной фильтрацией, и нейронными процессами обострения спектральной селективности, и другими механизмами. Именно такой интегральный показатель желателен во многих случаях. А вклад отдельных конкретных механизмов в этот интегральный показатель представляет интерес скорее для решения фундаментальных вопросов физиологии слуха, которые требуют специальных исследований.

Кроме того, можно отметить ряд других положительных свойств метода определения ЧРС.

1. Метод не требует от испытуемого какой бы то ни было субъективной оценки качества звука. От испытуемого требуется лишь сообщить о любом изменении в предъявляемом ему звуке. Это может быть важно при практическом использовании метода, когда пациенты не имеют опыта участия в измерениях.

2. Процедура измерения является одноточечной, т.е. для получения одного значения ЧРС требуется только одно определение предельной различаемой плотности спектральной решетки. Это делает процедуру приемлемой для применения как в фундаментальных исследованиях, так и в практических целях.

3. В отличие от речевой аудиометрии предложенный метод подразумевает аппаратурную генерацию пробных сигналов с возможностью точного контроля и воспроизведения их параметров. Результат измерения получается в физических единицах.

При измерениях ЧРС с помощью гребенчатых сигналов важно, в каких единицах измеряется плотность гребней и соответственно ЧРС. Для тестирования ЧРС основном используются два варианта гребенчатых спектров: с равномерной и с частотно-пропорциональной плотностью гребней. При равномерной плотности частотные интервалы между соседними гребнями постоянны в пределах всей частотной полосы сигнала. В этом случае плотность гребней характеризуется их количеством на линейную единицу частоты (цикл/кГц). При частотно-пропорциональной плотности гребней постоянно отношение $f/\delta f$ центральной частоты гребней к частотному интервалу, т.е. плотность гребней постоянна на логарифмической шкале частот. Плотность гребней характеризуется либо отношением $f/\delta f$, либо количеством гребней на логарифмическую единицу частоты, обычно октаву (цикл/окт). В последнее время чаще используется второй вариант, поскольку проекция частот в слуховую улитку близка к логарифмической, и равномерный рисунок гребней на логарифмической шкале частот лучше соответствует проекции частот в улитке.

ЧРС НОРМАЛЬНОГО СЛУХА

Применение метода спектральных решеток для определения ЧРС дало интригующие результаты [29]. Для разных участков частотного диапазона слуха она составила от 7 до 12 цикл/окт. Эти результаты показали, насколько важно иметь возможность прямой оценки ЧРС слуха, а не только ее расчета по характеристикам частотно-избирательных фильтров. Если рассчитать ЧРС по характеристикам фильтров исходя из линейной модели, то получаются значения ЧРС приблизительно вдвое меньшие, чем полученные при прямых измерениях этой величины.

Скорее всего, разница между предсказаниями линейной модели и фактическими значениями ЧРС обусловлена нелинейностью системы, конкретно — эффектом латерального подавления между соседними частотно-избирательными каналами. Возможность обострения спектрального контраста, аналогичного зрительной иллюзии "полос Maxa" на границе светлого и темного участков зрительного изображения, была показана в экспериментах с маскировкой [22, 30]. Ту же природу может иметь демаскирование при действии двух тональных маскеров: добавление второго маскера не затрудняет, а облегчает обнаружение сигнала, что можно объяснить латеральным подавлением одного маскера другим [31]. Если тот же эффект имеет место при действии гребенчатых сигналов, то обострение за счет латерального подавления должно привести к более высокой ЧРС, чем предсказывается остротой настройки отдельных фильтров. Подтверждение этому предположению было получено при измерении зависимости порогов спектрального контраста от плотности гребней [32]. Прямое измерение ЧРС дало важные результаты, касающиеся и другой проблемы: различения сигналов на фоне шума. В естественной обстановке "целевой", т.е. подлежащий различению и распознаванию сигнал редко действует в идеальных условиях, на фоне тишины. Как правило, он возникает на фоне других звуков, которые по отношению к целевому сигналу играют роль шума. Чтобы понять, как различение тонкой частотно-временной структуры сигнала зависит от соотношения характеристик сигнала и шума (частоты и интенсивности того и другого), также оказались важными результаты прямого измерения ЧРС с помощью гребенчатых сигналов.

Естественно, добавление шумового фона ухудшало различение сигналов – снижало ЧРС [33–37]. Но в отношении того, как именно эффект шумового фона зависел от характеристик сигнала и шума, здесь также были получены интригующие результаты. Принципиально важным оказался вклад такого фундаментального свойства слуховой системы как компрессивная нелинейность передачи сигналов. Благодаря механизму компрессивной нелинейности увеличение интенсивности звука, например, на 10 дБ приводит к увеличению колебаний базилярной мембраны всего на 2–3 дБ. Этот механизм позволяет слуховой системе воспринимать и анализировать звуковые сигналы в широком диапазоне интенсивностей – до 120 дБ. Но в определенных обстоятельствах компрессивная нелинейность может негативно влиять на восприятие сигнала на фоне шума.

Если шум содержит те же частоты, что и сигнал (изочастотный шум), то он эффективно маскирует шум, поскольку совпадающие частоты сигнала и шума конкурируют друг с другом. Но зато такой шум подвержен компрессии в той же степени, что и сигнал. Поэтому усиление звука (например, с помощью слухового аппарата) не улучшает, но и не ухудшает соотношение сигнал/шум. Еще же частота шума ниже, чем частота сигнала (низкочастотный шум), то при низких интенсивностях низкочастотный шум слабее маскирует сигнал, чем изочастотный, но зато маскирующий эффект низкочастотного шума не подвержен компрессии: он возрастает настолько же, насколько увеличивается интенсивность шума. Поэтому при одинаковом усилении сигнала и маскера (например, с помощью слухового аппарата) маскирующий эффект низкочастотного шума растет пропорционально усилению, а ответ органа слуха на сигнал из-за компрессии растет значительно медленнее. В результате соотношение сигнал/шум не только не улучшается, но и ухудшается.

Таким образом, эффект усиления звука на различение сигналов приходится оценивать скорее пессимистически: различение сигналов может не улучшаться, а при каких-то условиях может и ухудшаться.

Прямые измерения показали, в какой степени это ожидание справедливо в отношении ЧРС. Действительно, при повышении интенсивности гребенчатого тестсигнала для достижения порога маскировки требовалось значительно меньшее приращение низкочастотного маскера, чем изочастотного, т.е. относительный эффект низкочастотного маскера возрастал по сравнению с изочастотным [38–40]. Наиболее надежный способ устранения негативного влияния шумового фона на различение сигналов состоит в пространственном (азимутальном) разнесении источников сигнала и шума, чтобы сигнал воздействовал преимущественно на одно ухо, а шум – на другое. В экспериментальных условиях эта ситуация может моделироваться подачей сигнала и шума через головные телефоны раздельно на одно и другое ухо (дихотическая стимуляция). В таких условиях негативное влияние шумового фона оказывается минимальным в широком диапазоне интенсивностей сигнала и шума, как изочастотного, так и низкочастотного [37].

СПОСОБЫ ИЗМЕРЕНИЯ ЧРС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРЕБЕНЧАТЫХ ТЕСТ-СИГНАЛОВ

Выработано несколько схем эксперимента, которые могут показать, различается ли испытуемым спектральная решетка. Все схемы основаны на сравнении тест-

сигнала, который в этом случае обязательно имеет гребенчатый спектр, с некоторым референтным сигналом, подбирающимся таким образом, чтобы различение двух сигналов было возможно только в том случае, если параметры спектральной решетки тест-сигнала не выходили за пределы разрешающей способности слуха.

Такая схема эксперимента была предложена в работах [29, 41]. Процедура тестирования состояла в том, что сигнал с гребенчатым спектром (спектральная решетка), предъявленный испытуемому, в некоторый момент времени заменяется на другой сигнал с противоположным расположением максимумов и минимумов спектральной амплитуды (реверсия фазы гребней). Это замещение может быть обнаружено испытуемым. Референтный сигнал также имеет гребенчатый спектр с такой же плотностью и глубиной гребней, как тест-сигнал, но фаза гребней в нем постоянна. Если параметры гребенчатого спектра лежат в пределах разрешающей способности слуха, то тестовый и референтный сигнал звучат по-разному, и испытуемый может правильно указать, какой из двух сигналов является тестовым. Если же плотность элементов гребней слишком велика, то максимумы и минимумы спектральной амплитуды сливаются в равномерный спектр, реверсия фазы гребней не может быть обнаружена, и тестовый и референтный сигнал не различаются. Таким образом, максимальная плотность гребней, при котором различаются тестовый и референтный сигнал, есть мера разрешающей способности слуховой системы.

Представленный выше вариант — не единственно возможный. Альтернативная схема эксперимента — применение референтного сигнала с "плоским" спектром, т.е. без гребенчатой структуры [42–47]. При этом тест-сигнал может быть представлен в разных вариантах: либо с постоянной фазой гребней в течение действия сигнала, либо с периодическими реверсиями фазы гребней, либо со "скользящими" (gliding) гребнями, фаза которых плавно меняется во время действия сигнала. Вариант такой схемы эксперимента — использование гребенчатого референтного сигнала, у которого плотность гребней значительно превышает ожидаемый предел разрешения и который поэтому заведомо воспринимается как плоский [46, 48]. Основная идея, лежащая в основе этого теста, та же, что и для предыдущего варианта. Если плотность гребней в тест-сигнале превосходит предел разрешения, то гребенчатый спектр воспринимается как плоский, поэтому тест-сигнал с гребенчатым спектром не может быть отличен от референтного сигнала с плоским спектром.

Можно было ожидать, что и оценки ЧРС, полученные двумя этими методами, будут одинаковыми. На самом деле, результат оказался совсем иным.

Различение тестового и *гребенчатого* референтного сигнала нормально слышащими испытуемыми было возможно при плотности гребней 9–10 цикл/окт или несколько менее, если тест-сигнал содержал периодические реверсии фазы гребней [33, 41], причем, если сигнал был узкополосным, то полученные оценки ЧРС мало зависели от частоты [33]. Если тест-сигнал имел постоянную фазу гребней, то предел разрешения был еще ниже: 7–9 цикл/окт [40, 49]. Небольшая разница между результатами, полученными с применением разных тест-сигналов, объяснялось тем, что при различении двух последовательно предъявляемых сигналов с разными фазами гребней требуется вовлечение кратковременной памяти для сравнения более позднего сигнала с сохраненным в памяти образом предшествующего сигнала, что создает дополнительную сложность для решения задачи.

Если же применялся плоский референтный сигнал, то испытуемые с нормальным слухом могли отличить тестовый сигнал от референтного при плотности гребней в тест-сигнале более 26 цикл/окт [51] или даже до 32 цикл/окт [50] или 60 цикл/окт [52], причем этот предел зависит от частоты: чем выше центральная частота сигнала, тем выше оценка ЧРС [50].

УЧАСТИЕ МЕХАНИЗМОВ ЧАСТОТНОГО АНАЛИЗА В РАЗЛИЧЕНИИ СИГНАЛОВ С ГРЕБЕНЧАТЫМ СПЕКТРОМ

Поскольку оценки ЧРС, полученные при разных схемах эксперимента, различались не на проценты, а в несколько раз, это различие нельзя объяснить разбросом данных, разными контингентами испытуемых или незначительными различиями в условиях экспериментов.

Приходилось допустить, что в зависимости от схемы эксперимента (примененный референтный сигнал) действуют принципиально разные механизмы различения спектральных рисунков. В качества таких механизмов прежде всего целесообразно рассмотреть два основных способа, которыми в слуховой системе передается информация о частоте звука: спектральный и временной [51, 52]. Строго говоря, разделение механизмов частотного анализа на спектральный и временной условно, поскольку любой процесс может быть одинаково успешно описан как в спектральном, так и во временном представлении. Но применительно к слуховой системе под этими терминами понимаются вполне определенные физиологические и биофизические процессы.

Под спектральным механизмом понимается частотный анализ, основанный на частотно-избирательных свойствах базилярной мембраны улитки. Каждый ее участок избирателен к определенной частоте звука, т.е. эквивалентен частотно-избирательному фильтру: проксимальные участки чувствительны к более высоким частотам, дистальные — к низким. Положение участка базилярной мембраны, дающий наибольший отклик на воздействующий звук, информирует о частоте звука. Временной анализ основан на том, что в определенном диапазоне частот импульсация, посылаемая улиткой в мозг, может воспроизводить форму звуковых колебаний, т.е. импульсный поток оказывается модулированным с частотой звука. Слуховые нервные центры способны анализировать афферентный поток и выявлять частоту его модуляции, таким образом определяя частоту звука.

При воздействии сигнала с гребенчатым спектром на базилярной мембране создается некоторый профиль возбуждения (внутренний спектр) [53], который является основой частотного механизма различения гребенчатых сигналов. Этот профиль также имеет гребенчатую структуру. Однако глубина гребней в профиле возбуждения уменьшена по сравнению с входным сигналом из-за ограниченной остроты (добротности) эквивалентных частотно-избирательных фильтров базилярной мембраны. Чем выше плотность гребней, тем сильнее сглаживание (меньше глубина) гребней в профиле возбуждения. Различение гребенчатой структуры сигнала по частотному механизму становится невозможным, если глубина гребней профиля возбуждения падает ниже некоторого порога. При какой плотности гребней будет достигнут этот порог (т.е. будет достигнут предел различения гребенчатой структуры спектра) — зависит от соотношения плотности гребней и добротности фильтров. Ширина полос пропускания эквивалентных фильтров приблизительно пропорциональна их характеристической частоте [17]. Если плотность гребней в спектре сигнала также частотно-пропорциональна, то соотношение этих двух величин приблизительно постоянно во всем частотном диапазоне слуха. Поэтому ЧРС, определяемая частотным механизмом, должна быть независима или мало зависима от частоты. Именно так ведут себя оценки ЧРС в экспериментах с гребенчатыми референтными сигналами [50].

В отличие от частотного временной механизм основывается на временной структуре интегрального импульсного потока от улитки, который воспроизводит временную структуру сигнала. Гребенчатые сигналы характеризуются определенной шириной спектральной полосы, т.е. имеют характер шумов. Они не имеют явной временной организации, но имеют скрытую организацию, отражающуюся в их автокорреляционной функции (АКФ). Эта организация характеризуются повторением рисунка с задержкой $1/\delta f$, где δf – частотные интервалы между соседними гребнями. Различение гребенчатой структуры сигнала по временному механизму

становится невозможным, если задержка увеличивается сверх некоторого предела, до которого возможно отслеживание временной организации сигнала. При заданной плотности гребней (в размерности цикл/окт) задержка тем короче, чем выше частота. Поэтому ЧРС, определяемая временным механизмом, должна быть зависима от частоты. Именно так ведут себя оценки ЧРС в экспериментах с плоскими референтными сигналами [50]. Таким образом, тестирование гребенчатыми сигналами позволяет не просто быстро и эффективно измерить ЧРС слуха, но и дифференцировать оценки ЧРС для разных слуховых механизмов.

ЧРС ПРИ ОСЛАБЛЕННОМ СЛУХЕ И У НОСИТЕЛЕЙ КОХЛЕАРНЫХ ИМПЛАНТОВ

Несмотря на ряд несомненных преимуществ диагностики слуха с помощью гребенчатых тест-сигналов, этот метод пока не вошел в широкую клиническую практику. Возможно, причиной такого положения вещей является обычная инерция. Однако есть область аудиологии, где тест различения гребенчатых спектров активно применяется начиная с 2000-х годов. Это — использование кохлеарных имплантов.

Кохлеарная имплантация — высокотехнологичная операция, применяемая при некоторых формах глубокой нейросенсорной тугоухости или при полной потере слуха. Во многих случаях нейросенсорная потеря слуха возникает из-за поражения слуховых механорецепторов — волосковых клеток. Эти сверхчувствительные рецепторы характеризуются высокой уязвимостью при акустических травмах, инфекционных заболеваниях, действии ототоксических препаратов, и т.п. Они теряют свои функциональные свойства при старении или из-за генетических дефектов. При этом нервные волокна спирального ганглия могут оставаться сохранными. В таких случаях показана кохлеарная имплантация. Кохлеарный имплант — высокотехнологический протез, работа которого основана на восприятии звуков через микрофон, обработке сигналов микропроцессором и подаче стимулирующих электрических импульсов через вживленные электроды непосредственно на нервные волокна.

Кохлеарная имплантация — сложная и дорогостоящая операция. Для эффективной работы кохлеарного импланта требуется точная настройка его процессора. Любая ошибка в настройке процессора стоит дорого во всех смыслах. Поэтому для тестирования работы процессора применяются объективные показатели различения звуковых сигналов. Речевой тест является необходимой процедурой для оценки эффективности импланта, поскольку одна из основных целей имплантации — обеспечить пациенту возможность речевого общения. Но речевой тест применим не всегда, и не всегда он дает полную и объективную картину работы импланта. В этих случаях тестирование гребенчатыми сигналами оказалось незаменимой диагностической процедурой.

Применение теста различения гребенчатых спектров показало, что даже наиболее совершенные из существующих кохлеарных имплантов не могут обеспечить качество восприятия звуков, сравнимое с нормальным слухом. Если у нормально слышащих испытуемых предел разрешения плотности гребней спектра составляет около 10 цикл/окт (при процедуре тестирования, адресующейся к частотному механизму различения) или даже десятки цикл/окт (при процедуре тестирования, адресующейся к временному механизму различения), то у носителей кохлеарных имплантов предел разрешения плотности гребней составляет обычно единицы цикл/окт, в некоторых случаях ниже 1 цикл/окт [45, 46, 48, 49, 54–58]. В определенной степени это обусловлено тем, что наиболее распространенная "стратегия" стимуляции (т.е. алгоритм преобразования звуковых сигналов в электрические импульсы) такова, что частота электрических импульсов не воспроизводит частоту звуковых колебаний, а информация о частоте передается только выбором электрода, через который подаются импульсы [59]. При такой стратегии стимуляции в анализе поступающих сигналов может участвовать только частотный, но не временной механизм. Несмотря на сниженное частотное различение, во всех случаях, когда показатели ЧРС сравнивали с показателями речевого теста, наблюдалась значимая корреляция между ними [55, 57, 58, 60]. Это означает, что ЧРС, измеренная с помощью гребенчатых тест-сигналов, является информативным показателем для оценки эффективности работы кохлеарного импланта, в том числе его способности обеспечивать речевое общение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все изложенное позволяет заключить, что всесторонняя оценка остроты слуха невозможна без учета разрешающей способности. В значительной степени эта задача может быть решена применением тест-сигналов со сложными спектральными рисунками. Такой способ тестирования показал свою эффективность как при решении фундаментальных вопросов физиологии слуха, так и для практического применения в диагностических целях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 20-015-00054.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. World Health Organization. Deafness and hearing loss. https://www.who.int/health-topics/ hearing-loss.
- 2. *Pick G.F., Evans E.F., Wilson J.P.* Frequency resolution in patients with hearing loss of cochlear origin. In: Psychophysics and Physiology of Hearing. Eds. Evans E.F., Wilson J.P. New York. Acad. Press. 273-282. 1977.
- 3. Zwicker E., Schorn K. Psychoacoustical tuning curves in audiology. Audiology. 17: 120–140. 1978.
- 4. Florentine M., Buus S., Scharf B., Zwicker E. Frequency selectivity in normally-hearing and hearing-impaired observers. J. Speech Hear. Res. 23: 646–669. 1980.
- 5. *Moore B.C.J.* Frequency selectivity and temporal resolution in normal and hearing-impaired listeners. British J. Audiol. 19: 189–201. 1985.
- 6. *Tyler R.S., Tye-Murray N.* Frequency resolution measured by adaptively varying the notchwidth: results from normal and hearing impaired. In:*Auditory Frequency Selectivity.* Eds. Moore B.C.J., Patterson R.D. New-York. Plenum Press. 323–330. 1986.
- 7. *Dreschler W.A., Plomp R.* Relation between psychophysical data and speech perception for hearing impaired subjects. J. Acoust. Soc. Am. 68: 1608–1615. 1980.
- 8. Gorga M.P., Abbas P. J. Forward-masking AP tuning curves in normal and in acoustically traumatized ears. J. Acoust. Soc. Am. 70: 1322–1330. 1981.
- 9. *Patterson R.D., Nimmo-Smith I., Weber D.L., Milory R.* The deterioration of hearing with age: Frequency selectivity, the critical ratio, the audiogram, and speech threshold. J. Acoust. Soc. Am. 72: 1788–1803. 1982.
- Festen J.M., Plomp R. Relations between auditory functions in impaired hearing. J. Acoust. Soc. Am. 73: 652–662. 1983.
- Stelmachowitz P.G., Jesteadt W., Gorga M.P., Mott J. Speech discrimination ability and its relation to psychophysical tuning curves (PTCs). J. Acoust. Soc. Am. 77: 620–627. 1985.
- 12. Thornton A.R., Abbas P.J. Low-frequency hearing loss: Perception of filtered speech, psychophysical tuning curves, and masking. J. Acoust. Soc. Am. 67: 638–643. 1980.
- Hannley M., Dorman M.F. Susceptibility to intraspeech spread of masking in listeners with sensorineural hearing loss. J. Acoust. Soc. Am. 74: 40–51. 1983.
- 14. *Tyler R.S., Hall J.W., Glasberg B.R., Moore B.C.J., Patterson R.D.* Auditory filter asymmetry in the hearing impaired. J. Acoust. Soc. Am. 76: 1363–1368. 1984.
- Zwicker E. On a psychoacoustical equivalent of tuning curves. In: Facts and Models in Hearing. Eds. Zwicker E., Terhardt E. Berlin. Springer. 132–141. 1974.
- 16. Zwicker E. Psychoacustic. Berlin. Springer. 1982.
- 17. Glasberg B.R., Moore B.C.J. Derivation of auditory filter shapes from notched-noise data. Hearing Res. 47: 103–138. 1990.
- Wilson J.P., Evans E.F. Grating acuity of the ear: psychophysical and neurophysiological measures of frequency resolving power. 7th Internat. Congr. on Acoustics. Budapest. Akad. Kiado. 3: 397–400. 1971.
- 19. Evans E.F., Wilson J.P. Frequency selectivity of the cochlea. Basic Mechanisms of Hearing. Ed. A.R. Miller. New York. Academic. 519–551. 1973.

- 20. Bilsen F.A., ten Kate J.H., Buunen T.J.F., Raatgever J. Responses of single units in the cochlear nucleus of the cat to cosine noise. J. Acoust. Soc. Am. 58: 858–866. 1975.
- Evans E.F. Frequency selectivity at high signal levels of single units in cochlear nerve and cochlear nucleus. Psychophysics and Physiology of Hearing. Eds. Evans E.F., Wilson J.P. London. Academic. 185–192. 1977.
- 22. *Houtgast T.* Psychophysical evidence for lateral inhibition in hearing. J. Acoust. Soc. Am. 51: 1885–1894. 1972.
- Houtgast T. Masking patterns and lateral inhibition. Facts and Models in Hearing. Eds. Zwicker E., Terhardt E. Berlin. Springer. 258–265. 1974.
- 24. *Pick G.F.* Level dependence of psychophysical frequency resolution and auditory filter shape. J. Acoust. Soc. Am. 68: 1085–1095. 1980.
- 25. *Bilsen F.A., Wieman J.L.* Atonal periodicity sensation for comb filtered noise signals. Psychophysical and Behavioral Studies in Hearing. Eds. van der Brink G., Bilsen F.A. Delft. Delft Univ. Press. 379–382. 1980.
- Yost W.A. The dominance region and ripple-noise pitch: A test of the peripheral weighting model. J. Acoust. Soc. Am. 72: 416–425. 1982.
- 27. Yost W.A., Hill R., Perez-Falcon T. Pitch discrimination of ripple noise. J. Acoust. Soc. Am. 63: 1166–1173. 1977.
- Yost W.A., Hill R. Models of the pitch and pitch strength of ripple noise. J. Acoust. Soc. Am. 66: 400–410. 1979.
- 29. Supin A. Ya., Popov V.V., Milekhina O.N., Tarakanov M.B. Frequency resolving power measured by rippled noise. Hearing Res. 78: 31–40. 1994.
- 30. Carterette F.C., Friedman M.P., Lovell J.D. Mach bands in hearing. J. Acoust. Soc. Amer. 45: 986–998. 1969.
- Shannon R.V. Two-tone unmasking and suppression in a forward-masking situation. J. Acoust. Soc. Am. 59: 1460–1470. 1976.
- 32. *Supin A.Ya., Nechaev D.I., Popov V.V., Sysueva E.V.* Sharpening of the signal spectrum contrast as a result of Lateral suppression in the human auditory system. Dokl. Biol. Sci. 478: 240–244. 2018.
- 33. Supin A.Ya., Popov V.V., Milekhina O.N., Tarakanov M.B. Ripple depth and density resolution of rippled noise. J. Acoust. Soc. Am. 106: 2800–2804. 1999.
- 34. Supin A. Ya., Popov V.V., Milekhina O.N., Tarakanov M.B. The effect of masking noise on rippled-spectrum resolution. Hearing Res. 151: 157–166. 2001.
- Supin A. Ya., Popov V.V., Milekhina O.N., Tarakanov M.B. Rippled-spectrum resolution dependence on level. Hearing Res. 185: 1–12. 2003.
- Supin A. Ya., Popov V.V., Milekhina O.N., Tarakanov M.B. Rippled-spectrum resolution dependence on masker-to-probe ratio. Hearing Res. 204: 191–199. 2005.
- 37. Supin A. Ya., Popov V.V., Milekhina O.N., Tarakanov M.B. Masking of rippled-spectrum-pattern resolution in diotic and dichotic presentations. Hearing Res. 260: 109–116. 2010.
- 38. *Milekhina O.N., Nechaev D.I., Popov V.V., Supin A.Ya.* Compressive nonlinearity in the fuditory system: Manifestation in the action of complex sound signals. Biol. Bull. 44: 603–609. 2017.
- 39. *Milekhina O.N., Nechaev D.I., Supin A.Ya.* Compressive nonlinearity of human hearing in sound spectra discrimination. Dokl. Biol. Sci. 474: 89–92. 2017.
- 40. *Milekhina O.N., Nechaev D.I., Supin A.Ya.* Contribution of cochlear compression to discrimination of rippled spectra in on- and low-frequency noise. J. Assoc. Res. Otolaryngology. 19(5): 611–618. 2018.
- 41. Supin A.Ya., Popov V.V., Milekhina O.N., Tarakanov M.B. Ripple density resolution for various rippled-noise patterns. J. Acoust. Soc. Am. 103: 2042–2050. 1998.
- 42. van Zanten G.A., Senten C.J.J. Spectro-temporal modulation transfer function (STMTF) for various types of temporal modulation and a peak distance of 200 Hz. J. Acoust. Soc. Am. 74: 52–62. 1983.
- 43. *Chi T., Gao Y., Guyton M.G., Ru P., Shamma S.* Spectro-temporal modulation transfer function and speech intelligibility. J. Acoust. Soc. Am. 106: 2719–2732. 1999.
- 44. *Litvak L.M., Spahr A.J., Saoji A.A., Fridman G.Y.* Relationship between perception of spectral ripple and speech recognition in cochlear implant and vocoder listeners. J. Acoust. Soc. Am. 122: 982–991. 2007.
- 45. Saoji A.A., Litvak L., Spahr A.J., Eddins D.A. Spectral modulation detection and vowel and consonant identification in cochlear implant listeners. J. Acoust. Soc. Am. 126: 955–958. 2009.
- 46. Aronoff J.M., Landsberger D.M. The development of a modified spectral ripple test. J. Acoust. Soc. Am. 134: EL217–222. 2013.
- 47. Nechae D.I., Milekhina O.N., Supin A.Ya. Hearing sensitivity to gliding rippled spectrum patterns. J. Acoust. Soc. Am. 143: 2387–2393. 2018.
- Narne V.K., Van Dun B., Bansal S., Prabhu L., Moore B.C.J. Effects of spectral smearing on performance of the spectral ripple and spectro-temporal ripple tests. J. Acoust. Soc. Am. 140: 4298– 4306. 2016.
- Henry B.A., Turne C.W., Behren A. Spectral peak resolution and speech recognition in quiet: Normal hearing, hearing impaired, and cochlear implant listeners. J. Acoust. Soc. Am. 118: 1111–1121. 2005.
- Milekhina O.N., Nechaev D.I., Supin A.Ya. Rippled-spectrum resolution dependence on frequency: Estimates obtained by discrimination from rippled and nonrippled reference signals. J. Acoust. Soc. Am. 146: 2231–2239. 2019.

- Nechaev D.I., Milekhin O.N., Supin A.Y. Estimates of ripple-density resolution based on the discrimination from rippled and nonrippled reference signals. Trends Hear. 23. 2019. DOI 2331216518824435
- 52. Anderson E.S., Oxenham A.J., Nelson P.B., Nelson D.A. Assessing the role of spectral and intensity cues in spectral ripple detection and discrimination in cochlear-implant users. J. Acoust. Soc. Am. 132: 3925–3934. 2012.
- Zwicker E. Masking and psychophysical excitation as consequences of the ear's frequency analysis. Frequency Analysis and Periodicity Detection in Hearing. Eds. Plomp R., Smoorenburg G.F. Sijthoff. Leiden. 376–394. 1970.
- 54. *Henry B.A., Turner C.W.* The resolution of complex spectral patterns by cochlear implant and normal-hearing listeners. J. Acoust. Soc. Am. 113: 2861–2873. 2003.
- Won J.H., Drennan W.R., Rubinstei J.T. Spectral-ripple resolution correlates with speech reception in noise in cochlear implant users. J. Assoc. Res. Otolaryngol. 8: 384–392. 2007.
- Won J.H., Humphrey E.L., Yeager K.R., Martinez A.A., Robinson C.H., Mills K.E., Johnstone P.M., Moon I.J., Woo J. Relationship among the physiologic channel interactions, spectral-ripple discrimination, and vowel identification in cochlear implant users. J. Acoust. Soc. Am. 136: 2714–2725. 2014.
- Anderson E.S., Nelson D.A., Kreft H., Nelson P.B., Oxenham A.J. Comparing spatial tuning curves, spectral ripple resolution, and speech perception in cochlear implant users. J. Acoust. Soc. Am. 130: 364–375. 2011.
- 58. Jeon E.K., Turner C.W., Karsten S.A., Henry B.A., Gant B.J. Cochlear implant users' spectral ripple resolution. J. Acoust. Soc. Am. 138: 2350–2358. 2015.
- 59. *Choi C.T.V., Lee Y.H.* A review of stimulating strategies for cochlear implants. Cochlear implant research update. Ed. *C. Umat.* IntechOpen. Malaysia. 2012.
- 60. Drennan W.R., Anderson E.S., Won J.H., Rubinstein J.T. Validation of a clinical assessment of spectral-ripple resolution for cochlear implant users. Ear and Hearing. 35(3): e92–e98. 2014.

Acute Hearing: What is It? Indicators of Frequency Resolving Power of Hearing

A. Ya. Supin*

Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia *e-mail: alex supin@mail.ru

Nowadays, diagnostical methods for sensitivity and for frequency resolution of hearing are developed in different degrees. Instruments for precise measurements of frequency resolving power (FRP) of hearing are not widely used for practical needs. Laboratory methods for FRP measurements are not convenient for the practical use. Signals with rippled spectra may be an effective tool for testing FRP both for fundamental investigations of hearing and for practical audiology. The use of such test signals allows to measure not the acuteness of individual frequency-tuned auditory filters but the real capability for discrimination of complex-spectrum sound signals. FRP measurements with the use of rippled test signals are convenient for the practical use. Apart from that, data on discrimination of rippled signals provided data on the role of several fundamental hearing mechanisms: compressive non-linearity, lateral suppression, frequency and temporal mechanisms of frequency analysis. Depending on the discrimination task, either frequency or temporal mechanism of frequency analysis determines FRP. Rippled signals were successfully used for assessment of frequency resolution in cochlear implant users.

Keywords: hearing, selectivity, resolution, rippled spectra

ЦИТИРОВАТЬ:

Супин А.Я. Что такое "хороший слух"? Показатели частотной разрешающей способности слуха. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(4): 436–447. DOI: 10.31857/S0869813920040093

TO CITE THIS ARTICLE:

Supin A.Ya. Acute Hearing: What is It? Indicators of Frequency Resolving Power of Hearing. Russian Journal of Physiology. 106(4): 436–447.

DOI: 10.31857/S0869813920040093

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 448-461

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ОСОБЕННОСТИ цАМФ-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛИРОВКИ КАСКАДА ФОТОТРАНСДУКЦИИ В КОЛБОЧКАХ

© 2020 г. В. С. Ситникова^{1, *}, Л. А. Астахова¹, М. Л. Фирсов¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: viktoriya_sergeevna_sitnikova@mail.ru

> Поступила в редакцию 19.02.2020 г. После доработки 25.02.2020 г. Принята к публикации 25.02.2020 г.

Фоторецепторы сетчатки – колбочки и палочки – способны к световой адаптации в широком диапазоне освещенностей за счет комплекса регулирующих механизмов. Среди них наиболее изученными являются кальциевые обратные связи, способные объяснить примерно 50% реальной регулировки светочувствительности. Есть и другие регуляторные механизмы, также способствующие настройке реакции фоторецептора на свет в зависимости от уровня освещенности, в частности, регулирование каскада фототрансдукции в течение суточного ритма. Во время "темной" фазы суточного цикла в фоторецепторах увеличивается уровень ц ${
m AM}\Phi$ и повышается чувствительность палочек, что можно считать адаптивным действием. Для колбочек, которые работают при высоких освещенностях, а в сумерках почти утрачивают свой вклад в зрение, увеличение чувствительности в "темную" фазу может не иметь адаптивного значения. В настоящей работе исследовалось, как изменение [цАМФ]_{in} влияет на работу каскада фототрансдукции в колбочках карася. Повышение [цАМФ]_{in} достигалось путем инкубации клеток с активатором аденилатциклазы – форсколином. Показано, что в колбочках форсколин замедляет обе фазы фотоответа – нарастание и выключение. Как следствие, в колбочках, в отличие от палочек, форсколин не увеличивает чувствительность к свету, но почти в два раза уменьшает темновой ток. Таким образом, реакция каскада фототрансдукции колбочки на повышение [цАМФ]_{in} существенно отличается от реакции в палочках. Для колбочек такой эффект $[\mu AM\Phi]_{in}$ также может иметь адаптивное значение, но не в форме увеличения чувствительности, а в форме уменьшения метаболической нагрузки на клетки, не функционирующие в "темную" фазу.

Ключевые слова: колбочка, фототрансдукция, циркадный ритм, цАМФ, палочка **DOI:** 10.31857/S0869813920040081

Фоторецепторы позвоночных способны к адаптации в очень широком диапазоне интенсивностей. Способность к адаптации обеспечивается целым комплексом регулирующих механизмов, использующих разные медиаторные системы. Исторически первой и наиболее изученной является группа механизмов, регулируемых внутриклеточной концентрацией кальция [1–6]. Источником регулирующего воздействия для всех этих механизмов является изменение баланса входа и выхода кальция через плазматическую мембрану наружного сегмента фоторецептора. Активация фоторецептора светом приводит к частичному или полному закрытию цГМФ-управляемых каналов плазматической мембраны и к уменьшению или прекращению входа в на-

ружный сегмент ионов натрия и кальция, в то время как откачка кальция из цитоплазмы наружу при помощи Na, K/Ca обменника продолжается с прежней скоростью и не зависит от уровня активации фоторецептора светом [7]. Концентрация кальшия в цитоплазме уменьшается, вследствие чего а) увеличивается активность родопсинкиназы GRK1 (у палочек) или GRK7 (у колбочек), б) увеличивается активность гуанилатциклазы (ГЦ) retGC1 и retGC2 и в) увеличивается сродство цГМФ-управляемых каналов плазматической мембраны к цГМФ. Во всех трех случаях непосредственными кальциевыми сенсорами являются не родопсинкиназа, гуанилатциклаза и каналы, а специальные белки-посредники – рековерин, GCAP и кальмодулин. В результате работы кальциевой обратной связи фоторецептор быстрее возвращается к пре-стимульному состоянию, а также уменьшается его возбуждение в ответ на последующую стимуляцию, что позволяет ему оставаться в рамках динамического диапазона реакции на свет. Конечный результат всех вышеперечисленных механизмов — ускорение процесса выхода фоторецептора из состояния насыщения и оптимальное сочетание реакции на постоянную и переменную составляющую светового стимула.

Три вышеперечисленных механизма кальциевой обратной связи способны объяснить примерно 50% реальной регулировки чувствительности, происходящей в фоторецепторах в ответ на свет, что свидетельствует о существовании и других регуляторных механизмов. Так, нами показан механизм ускорения выключения активированной светом фосфодиэстеразы (ФДЭ) [8]. Существуют и другие регуляторные механизмы, также способствующие настройке величины реакции фоторецептора на свет в соответствии со средним уровнем освещенности. Эти механизмы работают в существенно более медленной временной шкале, чем вышеописанные. К ним относятся процессы светоиндуцированного транспорта некоторых ключевых белков, участвующих в работе каскада фототрансдукции. Так, при очень высоких уровнях освещенности неизвестный пока механизм запускает транспорт трансдуцина из наружного сегмента во внутренний [9], уменьшая таким образом концентрацию трансдушина в наружном сегменте и снижая коэффициент усиления каскада фототрансдукции. Другой механизм, также пока не идентифицированный, запускает транспорт аррестина из внутреннего сегмента в наружный, усиливая тем самым способность к выключению остаточной активности родопсина [10].

Регулирование работы каскада необязательно должно включать непосредственную реакцию на уровень светового фона. Так, другие механизмы могут регулировать работу каскада в течение суточного ритма, когда циклические изменения $\mu AM\Phi$ в палочковом фоторецепторе ([11, 12], обзор в [13]), приводят к изменению чувствительности каскада фототрансдукции [14]. В указанной работе мы показали, что аппликация 2 мкМ активатора аденилатциклазы (АЦ) форсколина в 2.5 раза увеличивает внутриклеточную концентрацию $([\mu AM\Phi]_{in})$ и в 2 раза увеличивает чувствительность палочки лягушки к свету. Детальный анализ показал, что причинами изменения чувствительности являются изменение базальной активности Φ ДЭ, а также изменение светоиндуцированной активности Φ ДЭ и изменение активности ГЦ. Последние два эффекта могли бы быть объяснены регулирующим воздействием концентрации кальция, и действительно, в работе [15] было также показано, что увеличение [цАМФ]_{in} приводит к увеличению в 1.6 раза концентрации кальция в цитоплазме. С другой стороны, в современной модели каскада фототрансдукции нет описания кальций-зависимой регулировки базальной активности ФДЭ, и природа этого эффекта остается неизвестной.

Рост чувствительности палочки в условиях повышенного [цАМФ]_{in} сопровождается также усилением низкочастотной компоненты, так называемого непрерывного темнового шума [16–18], однако общее отношение сигнал/шум увеличивается в два раза и оказывается более благоприятным для детекции одноквантовых ответов.

449

Этот эффект, очевидно, должен способствовать обеспечиваемому палочками зрению в условиях низкой освещенности, в ночную фазу суточного цикла. Механизм, обеспечивающий циклическое изменение [цАМФ]_{in} в фоторецепторных клетках является дофамин-зависимым. В соответствии с общими представлениями циркадные ритмы в сетчатке основаны на реципрокных изменениях внеклеточной концентрации двух нейромедиаторов – дофамина и мелатонина, которые регулируют многочисленные функции во всех клетках сетчатки. При этом мелатонин вырабатывается в фоторецепторах и воздействует на дофаминергические амакриновые клетки, вырабатывающие дофамин (обзоры [19, 20]). Фоторецепторы являются одной из главных мишеней циркадной дофаминовой регуляции, однако эффекты аппликации дофамина на палочки лягушки позволяют предположить, что регуляторный эффект дофамина реализуется не только через изменения [цАМФ]_{in}, но и, возможно, через прямое, цАМФ-независимое регулирование [Са²⁺]_{in} [21].

Во время "темной" фазы циркадного цикла в фоторецепторных клетках увеличивается уровень [цАМФ]_{іп} и повышается чувствительность палочек, что можно трактовать как полезный адаптивный эффект. Вклад колбочковой системы в обеспечение чувствительности уменьшается с понижением общей освещенности, и после определенной величины исчезает совсем. Отсюда следует, что для колбочек возможное повышение чувствительности в темновую фазу суточного цикла не должно иметь адаптивного значения. С другой стороны, эффект увеличения [цАМФ]_{in} на каскад фототрансдукции в колбочках неизвестен, и нет оснований полагать, что он должен быть идентичен эффекту увеличения [$\mu AM\Phi$]_{in} в палочках. Репертуар элементов каскада фототрансдукции в палочках и колбочках очень близок, однако каждый компонент каскада существует в соответствующей специфической изоформе. Стехиометрическое соотношение между элементами каскада также может сильно отличаться в палочках и колбочках, что в свою очередь выражается в существенных функциональных различиях [22]. Кроме того, было показано, что уровень экспрессии некоторых белков-участников каскада в палочках и колбочках в ходе суточного цикла меняется противоположным образом [23]. Поэтому целью настоящей работы было изучение повышения внутриклеточной концентрации цАМФ на работу каскада фототрансдукции в колбочках. В качестве объекта изучения были выбраны колбочки рыбы *Carassius carassius*, повышение $[\mu AM\Phi]_{in}$ достигалось аппликацией во внеклеточную среду 2 мкМ активатора АЦ, форсколина. Мы выяснили, что в колбочках форсколин влияет на обе стадии, формирующие фотоответ – развитие ответа и выключение ответа, замедляя каждую из них. В результате, в колбочках, в отличие от палочек, форсколин достоверно не увеличивает чувствительность клеток. Кроме того, в колбочках форсколин существенно (почти в два раза) уменьшает темновой ток фоторецептора. Таким образом, реакция каскада фототрансдукции колбочки на повышение $[4M\Phi]_{in}$ существенно отличается от реакции палочкового каскада. Такое поведение колбочкового каскада во время темновой фазы суточного цикла также может иметь адаптивное значение, но не в отношении увеличения чувствительности (как у палочек), а в отношении уменьшения метаболической нагрузки на клетки, не функционирующие во время темновой фазы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор и подготовка экспериментальных животных

Все эксперименты выполнены на сетчатке рыб вида *Carassius carassius*, поскольку в их сетчатке, как и у большинства рыб, преобладают колбочки. Колбочки *Carassius carassius* достаточно крупные и хорошо переносят длительные экспериментальные

протоколы. Содержание животных и забор материала производились в соответствии с Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996, National Academy of Sciences, Washington, DC), а также с правилами, утвержденными биоэтической комиссией ИЭФБ РАН. Рыбы содержались в аквариуме в лаборатории при температуре воды 24°C, с двенадцатичасовым циклом день/ночь.

Ночью перед экспериментом животные 12 ч адаптировались к темноте. Глаза извлекались при свете красного фонаря, а дальнейшее отделение сетчатки от остальных оболочек глаза и ее разделение на более мелкие части осуществлялось под бинокулярной лупой с инфракрасной подсветкой. Полученная суспензия из небольших фрагментов сетчатки и изолированных фоторецепторов перемещалась в камеру для перфузии в составе экспериментальной установки, после чего проводился поиск и всасывание клетки в пипетку. Все манипуляции выполнялись при комнатной температуре (18°С).

Используемые растворы

Для перфузии и подготовки препаратов фоторецепторов применяли раствор Рингера следующего состава (концентрация в мМ): NaCl 102, KCl 2.6, MgCl₂ 1, D-глюкоза 5, CaCl₂ 1, NaHCO₃ 28, HEPES 5 и БСА 50 мг/л, pH 7.8–8.0.

Растворы исследуемых фармакологических агентов — форсколин (2 мкМ) и ролипрам (10 мкМ) в растворе Рингера — получали из ранее приготовленных маточных растворов в диметилсульфоксиде (DMSO) с концентрацией 10 мМ. Все перечисленные реагенты были приобретены у Sigma-Aldrich, США.

Регистрация тока фоторецепторов и стимуляция светом

В данном исследовании использовался метод, описанный D.A. Baylor с соавт. [24]. Эксперимент включал регистрацию токовых ответов колбочек, прикрепленных к сетчатке. При переключении входного потока перфузирующий раствор заменялся во всей камере для перфузии в течение 2.5 мин. Стимуляция светом осуществлялась по двум каналам, в одном из которых источником света служил зеленый (519 нм), а в другом — красный (632 нм) светодиод. Интенсивность, длительность и частота следования световых стимулов контролировались программой и платой LabView (National Instruments, Austin, TX). Световая стимуляция на двух разных длинах волн применялась для определения спектрального типа колбочек. Контроль интенсивности световых стимулов осуществлялся с помощью серых нейтральных светофильтров и тока светодиода. Стандартная длительность вспышки составляла 2 мс.

Экспериментальный протокол

После помещения во всасывающую пипетку у колбочек в определенном порядке записывались ответы на световые стимулы возрастающей интенсивности, в том числе насыщающей интенсивности, после чего перфузирующий раствор заменялся на раствор, содержащий форсколин или ролипрам. В новом растворе клетки инкубировались около 20 мин, после чего протокол записи ответов повторялся.

В ходе исследований оценивался эффект форсколина (2 мкМ) и ролипрама (10 мкМ) на характеристики фотоответов, а также были проведены контрольные эксперименты с тем же протоколом, но без добавления исследуемых фармакологических агентов для сравнения. В каждом эксперименте (с инкубацией в растворах форсколина и ролипрама) или при записи контрольных экспериментов в нормальном растворе Рингера оценивались параметры фотоответов колбочек (описаны ниже) до и после их двадцатиминутной инкубации в заданном растворе.



Рис. 1. Ответы колбочек на стимулы возрастающей интенсивности в чистом растворе Рингера (A) и в растворе Рингера с форсколином (2 мкМ) (B). Интенсивность вспышки для каждого ответа на рис. A совпадает с интенсивностью для соответствующего ответа на рис. B. C – анализ изменения чувствительности колбочки по положению кривой ответ-интенсивность (сплошная кривая – ответы в нормальном растворе Рингера; пунктирная кривая – ответы после инкубации в течение 20 мин в растворе, содержащем форсколин). **Fig. 1.** Responses of cones to stimuli of increasing intensity in normal Ringer's solution (A) and in Ringer's solution with forskolin ($2 \mu M$) (B). The flash intensity for each response from the panel A coincides with the intensity for the corresponding response in the panel B. C – analysis of the sensitivity change by the shift of the response-intensity curve (solid curve shows are responses in normal Ringer's solution; the dashed curve shows responses after incubation in forskolin-containing solution for 20 min).

Результаты для контрольных колбочек по всем исследуемым параметрам фотоответов использовались для статистического сравнения с группами колбочек, подвергшихся воздействию форсколина или ролипрама.

Исследуемые параметры фотоответов

Мы оценивали эффекты исследуемых веществ на чувствительность колбочек к свету, уровень темнового тока и кинетику фотоответа как на слабые, так и на насыщающие стимулы.

Изменение чувствительности клетки оценивалось двумя способами: по сдвигу кривой "ответ—интенсивность" (рис. 1*С*), сдвиг кривой оценивался на уровне 50% от максимального ответа клетки, и дополнительно — по изменению величины нормированного фотоответа на слабые, ненасыщающие, стимулы.



Рис. 2. Усредненные ответы всей группы клеток в растворе Рингера до инкубации, после инкубации (в течение 20 мин) в чистом растворе Рингера (контроль) и после инкубации в растворе, содержащем 2 мкМ форсколина.

Fig. 2. Flash responses averaged over the entire group of cells in Ringer's solution before incubation, after incubation (for 20 min) in normal Ringer's solution (control), and after incubation in a solution containing 2 µM Forskolin.

Изменения уровня темнового тока определялись как отношение амплитуды насыщенного ответа клетки после инкубации препарата с исследуемым веществом к амплитуде ответа в нормальном растворе Рингера.

Для анализа кинетики ответов на ненасыщающие стимулы оценивалась восходящая фаза ответов, как усредненные значения всех фотоответов одной интенсивности (до инкубации, после инкуации в растворе Рингера и после инкубации в растворе с форсколином) (рис. 2), а нисходящая фаза фотоответа аппроксимировалась одноэкспоненциальной функцией в программе Microsoft Excel (рис. 3), участок нисходящей фазы ответа, пригодный для аппроксимации, выбирался на основании визуальной оценки. Такая аппроксимация давала постоянную времени выключения фотоответа. Кинетика выключения насыщенных ответов изучались посредством оценки времени пребывания ответа в насыщении (время до 20% восстановления темнового тока после начала фотоответа, рис. 4). Для всех параметров сравнительный анализ проводился на основе данных, зарегистрированных в стандартном растворе Рингера и в растворе Рингера с добавлением 2 мкМ форсколина или 10 мкМ ингибитора ФДЭ 4 типа, ролипрама.

Обработка данных

Обработка экспериментальных данных производилась при помощи программ Microsoft Excel (Microsoft), GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) и пакета программ LabVIEW (National Instruments).



Рис. 3. Сравнение кинетики ненасыщенных ответов с использованием экспоненциального приближения нисходящей фазы, τ_{off} – постоянная времени экспоненты. **Fig. 3.** Comparison of the kinetics of non-saturated responses using the exponential approximation of the declin-

ing phase, τ_{off} – time constant extracted from approximating exponent function.



Рис. 4. Время пребывания колбочки в насыщении после яркой вспышки света в растворе Рингера и в растворе форсколина.

Fig. 4. Time in saturation after bright flash of light, in normal Ringer's solution and in forskolin-containing solution.

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ SPSS Statistics 22 (IBM). Нормальность распределения выборочных данных проверялась с применением критерия Шапиро–Уилка. Поскольку многие из исследованных показателей не имели нормального распределения, для сравнения групп использовался H-критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным попарным сравнением критерием Манна–Уитни с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Различия считались достоверными при уровне значимости нулевой гипотезы $p \leq 0.05$ (с поправкой Бонферрони $p \le 0.025$). Данные на рисунках представлены как медианы и квартили (рис. 5).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всасывающая пипетка позволяет регистрировать внеклеточный ток. При работе с палочками амфибий возможны варианты регистрации тока как в конфигурации *attached cell* (клетка прикреплена к небольшому фрагменту сетчатки и относительно интактна), так и в конфигурации *isolated cell*. В последнем случае возможна конфигурация *inner segment in* (внутренний сегмент внутри пипетки, наружный сегмент доступен для фармакологического воздействия, в том числе для быстрой замены перфузирующего раствора) или *outer segment in*. В настоящей работе для регистрации тока фоторецептора использовалась конфигурация *attached cell*, при которой наружный сегмент колбочки находится внутри регистрирующей пипетки, а внутренний сегмент экспонирован наружу. Ранее на изолированных препаратах палочек лягушки мы показали, что эффект форсколина практически инвариантен к конфигурации записи (*outer segment in* или *inner segment in*) [16], поэтому в рамках данной работы мы ожидали, что форсколин, воздействующий на внутренний сегмент колбочки в конфигурации *attached cell*, вызывал такой же эффект, как если бы он воздействовал на свободный наружный сегмент колбочки.

В ответ на стимуляцию короткой (2 мс) вспышкой света колбочка генерирует однополярную волну уменьшения тока (рис. 1*A*, набор ответов на стимулы нарастающей интенсивности в нормальном растворе Рингера). Для всех ответов были проанализированы изменения величины темнового тока (I_d), кинетика нарастания и спада фотоответа (τ_{off}), а также изменения чувствительности. Для всех колбочек строились кривые чувствительности к красному и зеленому стимулу, после чего протокол регистрации фотоответов на стимулы нарастающей интенсивности проводился при стимуляции зеленым светом. Спектральный тип колбочки определялся после окончания эксперимента при обработке данных. Общее количество красных колбочек составляло ¼ от общего количества зеленых колбочек. В общей статистике данных (21 клетка), мы не делали разделения на красные и зеленые колбочки.

<u>Контроль влияния всасывающей пипетки</u>. В нормальном растворе Рингера за 20 мин, что приблизительно соответствует времени полного развития реакции колбочки на инкубацию в 2 мкМ растворе форсколина, темновой ток снижался на $13 \pm 6\%$ (n = 14). Остальные параметры фотоответа — чувствительность и скорости нарастания и спада, не показали статистически достоверных изменений.

<u>Форсколин влияет на темновой ток колбочек и кинетику фотоответа</u>. 20-минутная инкубация в 2 мкМ форсколина приводит к почти двукратному уменьшению темнового тока (табл. 1). Кроме того, в растворе с форсколином замедляются оба процесса, формирующие фотоответ колбочки – нарастание ответа и спад ответа. Этот эффект хорошо виден на рис. 2, на котором представлены ответы на стимул одинаковой интенсивности, усредненные по всем включенным в анализ клеткам и зарегистрированные в нормальном растворе Рингера до инкубации в любом из растворов, после 20-минутной инкубации в нормальном растворе Рингера и после 20-минутной инкубации в растворе Рингера, содержащем 2 мкМ форсколина. Для количественной оценки замедления спада ответа колбочки на вспышку света нисходящая фаза ответа аппроксимировалась экспоненциальной функцией (рис. 3). Постоянная времени спада ответа увеличивалась под действием форсколина более чем в два раза (табл. 1).

Анализ эффекта форсколина на кинетику восходящей фазы ненасыщенного ответа проводился по усредненным для всех анализируемых клеток ответам на вспышку одной и той же интенсивности до и после воздействия исследуемого ве-



Рис. 5. Диаграммы сравнения изменения параметров под воздействием вещества относительно контрольной группы клеток, *n* – количество колбочек в группе: *A*) изменение амплитуды темнового тока; B) изменение чувствительности по амплитуде нормированного ответа; C) изменение чувствительности по сдвигу кривой "ответ-интенсивность"; Д) сравнение кинетики насыщенных фотоответов путем определения времени ответа в насыщении; Е) сравнение кинетики выключения фотоответа путем определения постоянной времени выключения (τ). * – достоверные различия по U критерию Манна– Уитни с поправкой Бонферрони ($p \le 0.025$) между контрольной группой клеток и группой клеток, инкубировавшихся в растворе с форсколином. Данные выражены как медиана и квартили.

Fig. 5. Comparison of parameter changes under the action of a substance relative to the control group of cells, n is the number of cones in the group: A) change of the dark current; B) change of the sensitivity assessed by normalized response amplitude; C) change of the sensitivity assessed by the shift of the "response vs. intensity" curve; D) comparison the kinetics of saturated photoresponses by determining the time in saturation; E) the kinetics the photoresponse turn-off by determining the time constant of the response decay (τ). * – significant differences in the U Mann–Whitney test with Bonferroni correction ($p \le 0.025$) between the control group of cells and the group of cells incubated in the solution with forskolin. The data presented as a Median and Interquartile range

щества. У каждой индивидуальной колбочки такой анализ не представляется возможным из-за шума фотоответа. Степень изменения скорости активации каскада была оценена по усредненным для всех клеток ответам, в норме и после инкубации в форсколине (рис. 2). Уменьшенный вследствие усреднения шум экспериментальной кривой делает возможным сравнение двух кривых и показывает замедление скорости нарастания ответа под действием форсколина.

Форсколин влияет на время насыщения колбочки, но не на чувствительность фотоответа. Известно, что достаточно яркая вспышка света вызывает гидролиз свободной фракции внутриклеточного пула ц $\Gamma M \Phi$ до уровня, при котором закрываются все цГМФ-зависимые каналы плазматической мембраны. В результате цГМФ-зависимый фототок прекращается, и клетка входит в состояние насыщения, а время пребывания в насыщении зависит от интенсивности вспышки и от чувствительности каскада фототрансдукции. Таким образом, время пребывания клетки в состоянии насыщения косвенно характеризует чувствительность клетки. Наши результаты показали, что инкубация в форсколине увеличивает время пребывания колбочки в состоянии насыщения в 2.2 раза (табл. 1, рис. 4).

Изменение чувствительности оценивалось по изменению величины нормированного фотоответа на вспышки стандартной интенсивности или по изменению положения полунасыщающей интенсивности стимула на кривой "нормированный ответ-интенсивность" (рис. 1С). Последнее является более объективной оценкой чув-

Таблица	 Сводная таблиі 	а результатов	(среднее	значение	± стандартная	ошибка	среднего
значения	I)						
Table 1.	Summary table of re	sults (mean valu	ue \pm stand	dard error o	of the mean)		

Отношение параметров

parameters ratio (arter action/belore action)							
	темновой ток dark current	чувствите. sensiti	льность vity	кинетика выключения фотоответа kinetic of turn-off photoresponse			
		сравнение амплитуд amplitude of normalized response	по сдвигу кривой shift of "response—in- tensity"-curve	постоянная времени выключения time constant of falling phase	время ответа в насыщении time of stay in saturation		
Контроль control	0.87 ± 0.06	0.98 ± 0.12	1.03 ± 0.02	0.83 ± 0.06	1.03 ± 0.02		
Ролипрам rolipram (10 µM)	0.78 ± 0.11	1.00 ± 0.14	0.91 ± 0.11	1.12 ± 0.09	1.21 ± 0.05		
Форсколин forskolin (2 µM)	0.58 ± 0.05	1.12 ± 0.1	0.87 ± 0.07	2.05 ± 0.26	$2.23\pm0,.0$		

	/		
Table 1.	Summary table of results	(mean value \pm standard error of the mean)	

ствительности, так как принимает в расчет величину не одного, а нескольких ответов клетки на стимулы разной интенсивности. Оказалось, что чувствительность статистически значимо не изменялась ни по одному из исследуемых параметров (рис. 5, табл. 1).

Ролипрам не влияет на величину темнового тока, чувствительность и кинетические параметры фотоответа колбочки. Возможное влияние ингибитора ФДЭ 4 типа — ролипрама изучалось по протоколу, аналогичному протоколу с использованием форсколина. Сравнительный анализ параметров, описывающих работу каскада фототрансдукции, показал, что уровень темнового тока в результате 20-минутной перфузии раствором, содержащим ролипрам, уменьшается на $22 \pm 11\%$ (n = 8), что сопоставимо с величиной $13 \pm 6\%$, полученной в контрольных экспериментах с перфузией раствором Рингера. Чувствительность под действием ролипрама упала до $91 \pm 11\%$ от контрольной (n = 7, p = 0.71). Выключение ответа колбочки на вспышку за время перфузии с ролипрамом замедлилось в 1.12 ± 0.09 раза (n = 8, p = 0.13) (в 1.3 раза в контрольных экспериментах). Таким образом, никакие из оцененных параметров работы каскада фототрансдукции не демонстрируют статистически значимой зависимости от аппликации ролипрама (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аппликация форсколина и повышение внутриклеточной концентрации цАМФ. Влияние форсколина на уровень [цАМФ]_{in} в наружных сегментах палочки лягушки *Rana ridibunda* было нами ранее показано экспериментально [14]. Мы установили, что инкубация изолированной сетчатки лягушки в течение 17 мин в растворе Рингера, содержащем 2 мкМ форсколина, увеличивает [цАМФ]_{in} в наружных сегментах фоторецепторов, которые представлены на 98% палочками, в 2.5 раза. В настоящей работе мы не проводили прямое измерение [цАМФ]_{in} в наружных сегментах фоторецепторов рыбы, однако известно, что воздействие 1 и 10 мкМ форсколина на изолированную сетчатку курицы, в которой, как и в сетчатке рыбы, доминируют колбочки, вызывало рост уровня цАМФ в сетчатке в 2.1 и 2.3 раза соответственно [27].

<u>Влияние повышения $[uAM\Phi]_{in}$ на работу каскада фототрансдукции в колбочках.</u> Основной вывод настоящей работы состоит в том, что реакция каскада фототрансдукции колбочек на повышение $[uAM\Phi]_{in}$ заметно отличается от реакции каскада в палочках лягушки. Первое отличие заключается в реакции темнового тока фоторецептора на увеличение $[uAM\Phi]_{in} - у$ палочек лягушки он достоверно не меняется, а у колбочек рыбы уменьшается почти в два раза (рис. 1*A*, *B*, табл. 1).

Второе отличие состоит в изменении светочувствительности палочек и колбочек в ответ на увеличение $[\mu AM\Phi]_{in}$. С одной стороны, форсколин увеличивает время пребывания колбочки в насыщенном состоянии (рис. 4, табл. 1) в 2.2 раза, что примерно совпадает с реакцией палочек на форсколин [14]. Время пребывания в насыщении определяется интегралом фотоответа клетки, который, как хорошо видно на рис. 4, значительно увеличивается под воздействием форсколина.

У палочки при увеличении [цАМФ]_{in} не изменяется скорость нарастания ответа, но замедляется его выключение. Вследствие этого ответ палочки на свет увеличивается по амплитуде более чем в два раза [14]. У колбочек выключение фотоответа также замедляется в два раза, однако достоверного увеличения амплитуды ответа не происходит из-за того, что скорость нарастания ответа также уменьшается. В результате чувствительность клетки, определяемая по амплитуде нормированного ответа на ненасыщающий световой стимул, не изменяется.

Можно предложить следующее объяснение разницы в реакции каскада фототрансдукции палочек и колбочек на [цАМФ]_{in}. У палочек форсколин и повышение [μ АМФ]_{in} приводит к увеличению в 1.6 раза внутриклеточной концентрации кальция, однако уровень [μ ГМФ]_{in} и темновой ток не изменяются из-за компенсаторного влияния μ АМФ на темновую активность ФЛЭ6 (объяснения в [14]). К сожале-

го влияния цАМФ на темновую активность ФДЭ6 (объяснения в [14]). К сожалению, в колбочках, из-за особенностей кинетики их ответов, определить возможные изменения $[Ca^{2+}]_{in}$ тем же способом (по кинетике обменного тока) не представляется возможным, однако можно предположить, что $[Ca^{2+}]_{in}$, как и в палочках, увеличивается. В таком случае, хорошо известный эффект уменьшения активности ГЦ под воздействием повышенного $[Ca^{2+}]_{in}$ [28, 29] и отсутствие у колбочек компенсаторного уменьшения активности ФДЭ6 объясняет уменьшение темнового тока. Замедление выключения фотоответа у колбочек может быть объяснено, по аналогии с палочками, увеличением внутриклеточной концентрации кальция.

Таким образом, принципиально различными остаются реакции на увеличение $[\mu AM\Phi]_{in}$ темновой активности $\Phi Д Э 6$ и скорости нарастания фотоответа, а именно – повышенный уровень $[\mu AM\Phi]_{in}$ уменьшает темновую активность $\Phi Д Э 6$ в палочках, но не в колбочках, и повышенный уровень $[\mu AM\Phi]_{in}$ замедляет нарастание фотоответа в колбочках, но не в палочках. Имеющиеся данные не позволяют сделать окончательный вывод о причине этой разницы кроме общего аргумента о том, что каскады фототрансдукции в палочках и колбочках представлены различными наборами белков, хотя и с аналогичными функциями, но довольно различными свойствами [22, 26]. Несомненно, однако, что описанное поведение каскада фототрансдукции колбочек может иметь адаптивное значение [29]. Концентрация $\mu AM\Phi$ в фоторецепторе повышается во время темной фазы суточного цикла, когда уровень освещения недостаточен для работы колбочек. В таком случае снижение уровня темнового тока и замедление всех реакций каскада фототрансдукции можно интерпретировать как переход в режим метаболической экономии.

<u>Ролипрам.</u> Инкубация колбочек рыбы с ролипрамом в конфигурации "attached cell, outer segment in" не приводила к статистически значимым изменениям ни одного из исследуемых параметров фотоответов колбочек. Ролипрам является селективным ингибитором ФДЭ4, и наличие реакции фоторецепторной клетки на ролипрам могло бы служить косвенным подтверждением присутствия ФДЭ4 в колбочках рыбы. Такие доказательства были получены нами ранее для палочек лягушки – инкубация изолированных палочек в конфигурации "inner segment in" в 10 мкМ ролипрама вызывала эффекты, близкие к эффекту инкубации в 2 мкМ форсколина. Возможным объяснением отсутствия эффекта ролипрама в случае колбочек могут быть 1) недоступность мишени ролипрама, ФДЭ4, из-за инвертированной конфигурации расположения клетки (наружный сегмент колбочки находится внутри пипетки), или 2) отсутствие ФДЭ4 в колбочках. Против первого предположения говорит тот факт, что другие агенты, также воздействующие на мишени, находящиеся в наружном сегменте фоторецептора, в конфигурации "inner segment in" вызывают сходный эффект, как и в конфигурации "outer segment in" (форсколин, [14]; IBMX, неопубликованные данные). Поэтому более вероятно второе объяснение – контур синтеза-гидролиза цАМ Φ в колбочках, в отличие от палочек, не включает $\Phi Д \ni 4$ типа. Возможно, в его состав входят другие цАМФ-специфичные ФДЭ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Александру Юрьевичу Ротову за помощь в статистической обработке и Виктору Исаевичу Говардовскому за плодотворную дискуссию при написании рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00776-19-02.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Molday R.S., Moritz O.L. Photoreceptors at a glance. J. Cell Sci. 128.22: 4039–4045. 2015.
- 2. Chen C.K. The vertebrate phototransduction cascade: amplification and termination mechanisms. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 154: 101-121. 2005.
- 3. Pugh E.N. Jr., Lamb T.D. Phototransduction in Vertebrate Rods and Cones: Molecular Mechanisms of Amplification, Recovery and Adaptation. Handbook Biol. Physics. V. 3. 183-225. 2000.
- Arshavsky V.Y., Burns M.E. Photoreceptor Signaling: Supporting Vision across a Wide Range of Light Intensities. J. Biol. Chem. 287(3): 1620–1626. 2012.
 Vinberg F., Kefalov V.J. Investigating the Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms
- for mammalian cone light adaptation. Sci. Rep. 8(1): 15864. 2018.
- 6. Lamb T.D., Hunt D.M. Evolution of the calcium feedback steps of vertebrate phototransduction. Open Biol. 8(9). 2018.
- Schnetkamp P.P., Jalloul A.H., Liu G., Szerencsei R.T. The SLC24 family of K⁺-dependent Na⁺-Ca²⁺ exchangers: structure-function relationships. Curr. Top Membr. 73: 263–287. 2014.
- 8. Astakhova L.A., Firsov M.L., Govardovskii V.I. Kinetics of turn-offs of frog rod phototransduction cascade. J. Gen. Physiol 132(5): 587-604. 2008.
- 9. Sokolov M., Lyubarsky A.L., Strissel K.J., Savchenko A.B., Govardovskii V.I., Pugh E.N. Jr., Arshavsky V.Y. Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. Neuron. 34(1): 95–106. 2002.
- 10. Peterson J.J., Tam B.M., Moritz O.L., Shelamer C.L., Dugger D.R., McDowell J.H., Hargrave P.A., Pa-permaster D.S., Smith W.C. Arrestin migrates in photoreceptors in response to light: a study of arrestin localization using an arrestin-GFP fusion protein in transgenic frogs. Exp. Eye Res. 76(5): 553-563. 2003.
- 11. Nir I., Haque R., Iuvone P.M. Regulation of cAMP by light and dopamine receptors is dysfunctional in photoreceptors of dystrophic retinal degeneration slow(rds) mice. Exp. Eye Res. 73(2): 265-272.2001.
- 12. Chaurasia S.S., Haque R., Pozdeyev N., Jackson C.R., Iuvone P.M. Temporal coupling of cyclic AMP and Ca/calmodulin-stimulated adenylyl cyclase to the circadian clock in chick retinal photoreceptor cells. J. Neurochem. 99(4): 1142-1150. 2006.
- 13. Tosini G., Pozdeyev N., Sakamoto K., Iuvone P.M. The circadian clock system in the mammalian retina. Bioessays. 30(7): 624-633. 2008.
- 14. Astakhova L.A., Samoiliuk E.V., Govardovskii V.I., Firsov M.L. cAMP controls rod photoreceptor sensitivity via multiple targets in the phototransduction cascade. J. Gen. Physiol. 140(4): 421-433. 2012.
- 15. Астахова Л.А., Капицкий С.В., Говардовский В.И., Фирсов М.Л. цАМФ как регулятор каскада фототрансдукции. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 98(11): 1273–1285. 2012. [Astakhova L.A., Kapitskii S.V., Govardovskii V.I., Firsov M.L. cAMP as a regulator of the pho-totransduction cascade. Russ. J. Physiol. 98(11): 1273–1285. 2012. (In Russ)].
- 16. Astakhova L.A., Nikolaeva D.A., Fedotkina T.V., Govardovskii V.I., Firsov M.L. Elevated cAMP improves signal-to-noise ratio in amphibian rod photoreceptors. J. Gen. Physiol. 149(7): 689– 701. 2017.
- 17. Baylor D.A., Matthews G., Yau K.W. Two components of electrical dark noise in toad retinal rod outer segments. J. Physiol. 309: 591-621. 1980.
- 18. Rieke F, Baylor D.A. Molecular origin of continuous dark noise in rod photoreceptors. Biophys. J. 71(5): 2553-2572. 1996.
- 19. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. Doc. Ophthalmol. 108(1): 17–40. 2004.
- 20. Popova E. Role of dopamine in distal retina, J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol. 200(5): 333-358. 2014.
- 21. Nikolaeva D.A., Astakhova L.A., Firsov M.L. The effects of dopamine and dopamine receptor agonists on the phototransduction cascade of frog rods. Mol. Vision. 25: 400–414. 2019.
- 22. Ingram N.T., Sampath A.P., Fain G.L. Why are rods more sensitive than cones? J. Physiol. 594(19): 5415-5426. 2016.
- 23. Abalo X.M., Lagman D., Heras G., Del Pozo A., Eggert J., Larhammar D. Circadian regulation of phosphodiesterase 6 genes in zebrafish differs between cones and rods: Implications for photopic and scotopic vision. Vision Res. 166: 43-51. 2020.
- 24. Baylor D.A., Lamb T.D., Yau K.W. The membrane current of single rod outer segments. J. Physiol. 288: 589-611. 1979.
- 25. Lamb T.D., Pugh E.N. Jr. A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors. J. Physiol. 449: 719-758. 1992.

- 26. Astakhova L., Firsov M., Govardovskii V. Activation and quenching of the phototransduction cascade in retinal cones as inferred from electrophysiology and mathematical modeling. Mol. Vision. 21: 244–263. 2015.
- Nowak J.Z., Sek B., Zurawska E. Activation of D2 dopamine receptors in hen retina decreases forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation and serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity. Neurochem. Internat. 16(1): 73–80. 1990.
- Koch K.W., Stryer L. Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. Nature. 334: 64–66. 1988.
- 29. *Dizhoor A.M., Lowe D.G., Olshevskaya E.V., Laura R.P., Hurley J.B.* The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. Neuron. 12(6): 1345–1352. 1994.

Specificity of cAMP-Dependent Regulation of the Phototransduction Cascade in Cone Photoreceptors

V. S. Sitnikova^a, *, L. A. Astakhova^a, and M. L. Firsov^a

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

*e-mail: viktoriya_sergeevna_sitnikova@mail.ru

Retinal photoreceptor cells, rods and cones, are capable of light adaptation in a wide range of illuminations due to a set of regulatory mechanisms. Among them, the most studied are calcium feedbacks, and they may account approximately 50% of actual regulation of photosensitivity. There are other regulating mechanisms that contribute to adjusting photoreceptor reaction to light depending on the level of illumination, for example, regulation of phototransduction cascade under circadian cycle. During the dark phase of the circadian cycle, the level of cAMP increases and the sensitivity of rods also increases, which can be considered as an adaptive effect. In cone photoreceptors, operating under high light intensities and losing their contribution in the twilight, rise of photosensitivity may not have adaptive significance. In present study we investigated how the change in [cAMP]_{in} affect the function of phototransduction cascade in carp cones. [cAMP]_{in} in cones was elevated using adenylate cyclase activator forskolin. It has been shown that in cones, forskolin slows down both rising and declining phases of photoresponse. As a result, in cones, unlike rods, forskolin does not increase photosensitivity but causes nearly two-fold decrease of dark current. Thus, reaction of the cone phototransduction cascade to an increase in cAMP level is distinctly different from reaction of rod photoreceptors. For cones, this effect of [cAMP]_{in} may also have an adaptive significance, not in the sense of increasing sensitivity, but for the purpose of reduction of metabolic load on cells that do not function in the "dark" phase.

Keywords: cone, phototransduction, circadian rhythm, cAMP, rod

ЦИТИРОВАТЬ:

Ситникова В.С., Астахова Л.А., Фирсов М.Л. Особенности цАМФ-зависимой регулировки каскада фототрансдукции в колбочках. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(4): 448–461. DOI: 10.31857/S0869813920040081

TO CITE THIS ARTICLE:

Sitnikova V.S., Astakhova L.A., Firsov M.L. Specificity of Camp-Dependent Regulation of the Phototransduction Cascade in Cone Photoreceptors. Russian Journal of Physiology. 106(4): 448–461. DOI: 10.31857/S0869813920040081

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 462-473

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ ==

СВЕТОВАЯ АДАПТАЦИЯ ПАЛОЧЕК СЕТЧАТКИ, АДАПТАЦИОННАЯ ПАМЯТЬ И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫЕ ОБРАЗЫ

© 2020 г. А. Ю. Ротов^{1, *}, Л. А. Астахова¹, М. Л. Фирсов¹, В. И. Говардовский¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: rotovau@gmail.com

> Поступила в редакцию 01.02.2020 г. После доработки 11.02.2020 г. Принята к публикации 11.02.2020 г.

GPCR-сигнальный каскад в фоторецепторных клетках сетчатки – палочках и колбочках – обеспечивает высокое усиление сигнала и позволяет палочкам надежно реагировать на одиночные кванты света. При этом палочки сохраняют работоспособность при световых потоках до 10⁵ квантов в секунду, что поддерживается высокоэффективной системой световой адаптации. Световая адаптация основана на цепях отрицательной обратной связи, в основном через изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺. Надежно идентифицированы три петли кальциевой регуляции – ускорение выключения фотоактивированного родопсина, ускорение синтеза цГМФ гуанилатциклазой и повышение сродства цГМФ-управляемых ионных каналов к нуклеотиду. Известно, однако, что существуют еще один или два высокоэффективных механизма адаптации, один из которых регулирует время жизни активированнной фосфодиэстеразы; для второго мишень регуляции неизвестна. Неизвестны также посредники этих регуляций. При исследовании этих механизмов мы обнаружили новый феномен, упущенный в предыдущих работах. Мы нашли, что восстановление темнового тока палочки после выключения ненасыщающего адаптирующего света может занимать 20–30 с. Более того, после формального возвращения мембранного тока к темновому уровню чувствительность клетки к тестирующим стимулам остается пониженной еще в течение одной-двух минут. Мы назвали это явление "адаптационной памятью". Адаптационная память напоминает феноменологию последовательных образов. Постепенное возвращение мембранного тока к темновому уровню могло бы соответствовать затуханию положительного последовательного образа. Длительное понижение чувствительности фоторецепторов к добавочной стимуляции может обеспечить возникновение негативного образа. Насколько мы знаем, это первая экспериментальная физиологическая демонстрация возможности генерации последовательных образов уже на уровне одиночных фоторецепторов.

Ключевые слова: фоторецептор, палочка, световая адаптация, кальциевая обратная связь, адаптационная память, последовательные образы

DOI: 10.31857/S0869813920040068

Исходной целью этой работы было исследование механизмов световой адаптации палочек сетчатки. Фоторецепторные клетки сетчатки – палочки и колбочки – используют GPCR-сигнальный каскад для генерации электрического сигнала в ответ на поглощение света молекулами рецепторного белка – родопсина. Двухступенчатый каскад ферментативного усиления использует фосфодиэстеразу (ФДЭ) цГМФ как эффекторный фермент, а цГМФ служит внутриклеточным посредником, регулируя ионную проницаемость плазматической мембраны клетки. Высокое усиление в каскаде позволяет палочкам надежно регистрировать одиночные кванты света [1, 2].

Несмотря на предельно высокую чувствительность, палочки сохраняют работоспособность при световых потоках до 10^5 фотонов на клетку в секунду. Такой широкий динамический диапазон поддерживается механизмами световой адаптации, которые регулируют чувствительность и быстродействие каскада. Световая адаптация обеспечивается отрицательной обратной связью, основанной на изменениях внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺ при освещении (см. рис. 1). Твердо установлены три мишени кальция. Во-первых, светоиндуцированное падение [Ca²⁺] ускоряет выключение активированного родопсина (R*), снижая в итоге каталитическую активность ФДЭ. Во-вторых, понижение [Ca²⁺] активирует гуанилатциклазу, ускоряя возврат концентрации цГМФ к темновому уровню. В-третьих, при низкой [Ca²⁺] увеличивается сродство цГМФ-управляемых каналов к цГМФ, так что они удерживаются в открытом состоянии при более низкой концентрации посредника. Все три механизма способствуют восстановлению "темнового" состояния фоторецептора и противодействуют насыщению фотоответа при высоких освещенностях [3–6].

Было, однако, показано, что механизмы световой адаптации не ограничиваются тремя уже известными. Суммарная регуляция чувствительности всеми известными механизмами недостаточна для объяснения полного диапазона работы палочки. Существует медленный (десятки секунд) механизм адаптации, который обеспечивает дополнительную регулировку чувствительности примерно на порядок, и мишени которого и участвующие посредники пока неизвестны [7]. Недавно мы нашли, что вдобавок к уже известным регуляциям, в ходе световой адаптации ускоряется выключение светоиндуцированной активности ФДЭ, что также препятствует насыщению фотоответа [8]. Посредник, регулирующий выключение активированной ФДЭ, и временной ход этой регуляции тоже неизвестны.

Мы начали детальное экспериментальное исследование упущенных механизмов световой адаптации и обнаружили новый феномен, каким-то образом незамеченный в предыдущих работах. Мы нашли, что восстановление темнового тока (= темнового мембранного потенциала) палочки после выключения ненасыщающего адаптирующего света может занимать 20–30 с. Более того, после формального возвращения мембранного тока к темновому уровню чувствительность клетки к тестирующим стимулам остается пониженной еще в течение более минуты. Мы назвали это явление "адаптационной памятью".

Поведение палочки после выключения светоадаптирующего стимула напоминает феноменологию последовательных образов. Постепенное возвращение мембранного тока к темновому уровню могло бы соответствовать затуханию положительного последовательного образа. Длительное понижение чувствительности фоторецепторов к добавочной стимуляции может обеспечить возникновение негативного образа. По-видимому, это первая экспериментальная физиологическая демонстрация возможности генерации последовательных образов уже на уровне одиночных палочек.

Данная работа посвящена описанию и первичному анализу этого феномена.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и подготовка препаратов

Эксперименты были проведены на озерных лягушках *Rana ridibunda*, отловленных в Астраханской области. Животных содержали в виварии ИЭФБ РАН при тем-



Рис. 1. Схема возбуждения и адаптации каскада фототрансдукции в фоторецепторах сетчатки позвоночных. R, светочувствительный GPCR белок родопсин. R*, фотоактивированный родопсин. T, гетеротримерный ГТФ-связывающий белок трансдуцин. PDE, фосфодиэстераза циклического ГМФ. GC, гуанилатциклаза. Channel, цГМФ-управляемые катионные каналы плазматической мембраны. Некоторые компоненты каскада (родопсинкиназа, аррестин и рековерин в блоке "Inactivation", RGS9-G β 5-комплекс выключения PDE, кальций-чувствительный белок GCAP, активирующий GC, Na,K/Ca обменник в плазматической мембране) не показаны, чтобы не загромождать рисунок. Стрелки 1, 2 и 3 показывают надежно установленные цепи Ca²⁺ обратной связи, ускоряющие фотоответ и управляющие световой адаптацией. Штриховая стрелка показывает путь регуляции выключения PDE [8], посредник которой неизвестен.

Fig. 1. A simplified scheme of activation and adaptation of the phototransduction cascade in vertebrate retinal photoreceptors. **R**, light-sensitive GPCR protein rhodopsin. **R***, photoactivated rhodopsin. **T**, heterotrimeric GTP-binging protein transducin. PDE, cyclic GMP phosphodiesterase. GC, guanylate cyclase. Channel, cG-MP-gated cationic channels of the plasma membrane. Some components of the cascade (rhodopsin kinase, arrestin and recoverin in the "Inactivation" block, RGS9-G β 5 complex of PDE turn-off, Ca²⁺-sensitive protein GCAP that activates guanylate cyclase, and Na,K/Ca exchanger in the plasma membrane) are not shown to avoid clutter. Arrows 1, 2, 3 point to firmly established pathways of Ca²⁺ feedback that accelerates the photoresponse and controls light adaptation. Dashed arrow points to the mechanism that controls the rate of PDE* turn-off [8] whose messenger is unknown.

пературе 15–18°С и естественном цикле день—ночь, и кормили мучными червями. Обращение с экспериментальными животными соответствовало требованиям Директивы Совета Европейских сообществ 1986 г. 86/609/ЕЕС и рекомендациям биоэтического комитета ИЭФБ РАН. Перед началом эксперимента животные находились в течение 12 часов в условиях темновой адаптации. Затем лягушек декапитировали, глаза извлекали и из глазного бокала выделяли сетчатку. Из сетчатки готовили суспензию фоторецепторных клеток в растворе Рингера. Все манипуляции проводили при свете красного фонаря и под контролем системы наблюдения в инфракрасном свете.

Раствор

Для приготовления препаратов фоторецепторных клеток и их перфузии во время эксперимента использовали раствор Рингера для амфибий. Он готовился перед каждым экспериментом и содержал (в мМ): NaCl 90, KCl 2.5, MgCl₂ 1.6, CaCl₂ 1, NaHCO₃ 5, HEPES 5, глюкозу 10, EDTA 0.05, pH корректировали до 7.6 гидроксидом натрия. Все компоненты раствора были приобретены у Sigma-Aldrich, США.

Регистрация токовых ответов фоторецепторных клеток

Ток одиночных фоторецепторов регистрировали при помощи всасывающей пипетки [9]. Палочки всасывались в стеклянную пипетку наружным или внутренним сегментом внутрь, и их ток регистрировался при различных режимах световой стимуляции. Система световой стимуляции включала в себя два независимых канала на основе мощных светодиодов с максимум излучения λ_{max} 525 нм, интенсивность задавалась током через светодиоды и набором серых нейтральных светофильтров. Ответы пропускали через аналоговый фильтр низких частот с граничной частотой 100 Гц и записывали с частотой дискретизации 2 мс/точку. Захват данных, время подачи и длительность стимулов, а также интенсивность стимулов контролировали при помощи плат и программ LabView (National Instruments, Austin, TX). При необходимости зарегистрированные ответы могли дополнительно подвергаться цифровой Гаусс-фильтрации с окном от 5 до 50 мс. Все расчеты выполнялись в пакете MathCad 15 PTC.

Экспериментальный протокол

Типичный экспериментальный протокол включал: а) регистрацию ответов на стимулы возрастающей интенсивности для определения рабочего диапазона конкретной палочки и б) регистрацию ответов на сочетания длительной фоновой засветки (10–40 с) по одному каналу и подаваемых с равным интервалом коротких световых стимулов длительностью 2 мс или 2 с по второму каналу. Пример такого комбинированного протокола световой стимуляции показан на рис. 2.

Специально следует оговорить принятую здесь форму представления ответов палочек на свет. В состоянии темновой адаптации, при высокой концентрации цГМФ, катионные каналы плазматической мембраны открыты, и через них течет входящий ток. Петля тока замыкается через калиевые каналы внутреннего сегмента. Этот темновой ток регистрируется всасывающей пипеткой. При освещении каналы наружного сегмента закрываются, ток уменьшается и при достаточно ярких стимулах падает до нуля. Таким образом, ответ фоторецептора на свет — это уменьшение темнового тока. Однако в большинстве физиологических работ ответ принято изображать как положительный сигнал. Поэтому на наших рисунках нулевой уровень соответствует темноадаптированному состоянию клетки, т.е. максимальному току через каналы. Уменьшение тока в ответ на свет называется фототоком и изображается отклонением вверх. Таким образом, максимальный фотоответ при ярких стимулах соответствует нулевому току через каналы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рис. 2 показывает результаты типичного эксперимента. Палочка периодически стимулируется короткими вспышками, вызывающими ответ, составляющий примерно 30% от насыщенного. После первой вспышки, поданной в состоянии темновой адаптации, включается стационарный фоновый стимул длительностью 40 с. Он вызывает ответ, который вначале близок к насыщенному, а затем частично спадает, демонстрируя процесс световой адаптации. В течение всего периода действия



Рис. 2. Ответ палочки лягушки на периодические короткие вспышки, с наложенным 40-секундным адаптирующим фоном. (A) – непрерывная запись. Под кривой показана отметка стимула. Вспышка I подана в состоянии темновой адаптации. Ответы на вспышки на адаптирующем фоне не видны вследствие уменьшенной чувствительности. Вспышка 2 отмечает первый фотоответ, видимый в фазе восстановления. Вспышка 4 соответствует моменту полного восстановления темнового уровня тока. Однако чувствительность к вспышкам остается сниженной еще в течение 1.5 мин (вспышка 14). (B) – изменение амплитуды и кинетики ответов на вспышки, выделенные из записи (A) в ходе темновой адаптации. (C) – амплитуда (относится к левой шкале y) и время до пика (относится к правой шкале y) ответов на вспышки, выделенные из записи (A). (D) – изменение времени интегрирования фотответа в ходе темновой адаптации. Вспышки длительностью 2 мс, 0.7 фотона мкм⁻² за вспышку. 40-секундная адаптирующая фоновая засветка 30 фотонов мкм⁻² с⁻¹. Усреднение 9 записей, Гаусс-фильтрация 50 мс.

Fig. 2. Response of a frog rod to periodically applied short flashes with superimposed 40-s adapting background. (*A*), continuous record. Stimulus timing mark is shown below the curve. Flash # 1 was applied in a dark-adapted state. Responses to following flashes against the adapting background are not detectable due to greatly reduced sensitivity. Flash # 2 refers to the response that is first seen during the recovery phase. Flash # 4 marks full recovery of the dark current. However, sensitivity to test flashes remains suppressed for extra 1.5 minutes, until the flash #14. (*B*) shows the changes of amplitude and time course of test flash responses in course of dark adaptation. (*C*) shows amplitude (refers to the left y-axis) and time to peak (refers to the right y-axis) of flash responses during dark adaptation. (*D*) shows changes of the summation time of the flash response during the adaptation. Flash duration 2 ms, intensity 0.7 photon mm⁻² per flash. Light-adapting background illumination of 40 s duration, intensity 30 photons mm⁻² s⁻¹. Average of 9 scans, Gauss-filtered with 50-ms window.

фона ответы на вспышки отсутствуют, так как чувствительность к ним подавлена. После выключения фона фототок возвращается к темновому уровню примерно по экспоненте с постоянной времени около 6 с. По мере восстановления темнового тока градуально восстанавливаются и ответы на вспышки. Однако и в момент формально полного восстановления темнового тока (достижения темнового состояния) через 25 с после выключения фона амплитуда ответа на вспышки составляет только примерно половину от исходной темноадаптированной (вспышка 4 на панелях рис. 2A, B). Полное восстановление чувствительности не достигается даже через полторы минуты темновой адаптации (сравните ответы на вспышки 1 и 14 на рис. 2A, B).

На панели *В* рис. 2 показаны изменения ответов на вспышки в ходе адаптации. Панель *С* рис. 2 показывает изменение амплитуды ответа (кружки) и времени до пика (треугольники) в зависимости от времени после выключения адаптирующего стимула. Обе зависимости удается удовлетворительно аппроксимировать одноэкспоненциальными функциями с близкими постоянными времени (штриховые кривые).

Рис. 2 демонстрирует изменение чувствительности клетки к коротким вспышкам света. Однако при естественных условиях наблюдения изменение освещенности в каждой точке сетчатки может соответствовать достаточно длительным по времени изменениям интенсивности. Поэтому мы также провели эксперименты с использованием тестирующих стимулов в виде световых стимулов длительностью 2 с (рис. 3). При такой стимуляции эффект "адаптационной памяти" оказался более выраженным (см. панели *C* на рис. 2 и рис. 3).

Мы также исследовали эффект изменения длительности адаптирующего фона на восстановление чувствительности. На рис. 4A две записи с длительностью фонового освещения 10 и 40 с смещены вдоль оси времени так, что момент выключения фона на каждой кривой совпадает с 0. Запись для фона 10 с смещена по вертикали, чтобы уменьшить перекрытие с записью для 40-секундного фона и облегчить их сравнение. Интересно, что при короткой (10 с) световой адаптации восстановление темнового тока начинается с задержкой в несколько секунд после выключения фона (стрелка на рис. 4A). При 40-секундной световой адаптации восстановление темнового тока начинается немедленно после выключения фона. Этот феномен, не имеющий пока объяснения, был обнаружен ранее [7]. Несмотря на это различие, восстановление чувствительности к вспышкам после выключения 10- и 40-секундного фона происходит практически одинаково (рис. 4B).

Сложная феноменология световой и темновой адаптации не имеет пока очевидного объяснения в рамках современных знаний о каскаде фототрансдукции и требует дальнейшего детального исследования. Некоторые особенности полученных результатов, однако, позволяют провести интерпретацию в терминах известных механизмов и их возможного функционального значения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Механизмы изменения чувствительности в ходе световой и темновой адаптации

Сравнение ответов на короткие вспышки света в состоянии темновой адаптации и в ходе восстановления чувствительности после выключения светоадаптирующего фона показывает, что в ходе адаптации крутизна фронта ответов не изменяется. Начальные участки всех кривых совпадают, а различная амплитуда ответов связана с изменениями длительности фазы активации, т.е. момента достижения пика и начала возврата к пре-стимульному состоянию (рис. 2B, C). Это предполагает, что при световой/темновой адаптации не происходит изменения коэффициента усиления в каскаде, т.е. скорости активации в цепочке $R^*-T^*-PDE^*$ -гидролиз цГМФ. Световая адаптация контролируется процессами, обеспечивающими ускорение выключения активированного каскада. Это позволяет фоторецептору эффективно обменивать чувствительность на быстродействие.

Темновая адаптация в значительной мере (но не полностью) есть обращение световой адаптации [10]. Увеличение длительности ответов на вспышки при выходе из насыщения параллельно с увеличением их амплитуды означает, что при темновой адаптации увеличивается время интегрирования фотоответа (рис. 2D). Время интегрирования t_i определяется как

$$t_i = \frac{1}{r_{\max}} \int_0^T r(t) dt,$$

где r(t) – фотоответ, r_{max} – его пиковое значение, а T – полная длительность.



Рис. 3. Влияние длительности тестирующего стимула на ход темновой адаптации. (A) – тот же протокол, что и на рис. 2, но вместо 2-миллисекундных вспышек использованы 2-секундные стимулы с интенсивностью 8 фотонов мкм⁻² с⁻¹. Адаптирующая фоновая засветка длительностью 50 с, 225 фотонов мкм⁻² с⁻¹. Одиночная запись, Гаусс-фильтрация 50 мс. (B) – форма ответов на тестирующие стимулы. (C) – сравнение хода темновой адаптации при тестировании короткими вспышками и 2-секундными стимулами. Диапазон изменения чувствительности к 2-секундным стимулам значительно шире, чем к вспышкам, вследствие изменения времени интегрирования (рис. 2, панели B, C). Сплошные кривые – одноэкспоненциальные аппроксимации с практически одинаковыми постоянными времени (39 с для ступенек и 42 с для вспышек).

Fig. 3. Effect of the duration of test stimuli on deduced time course of dark adaptation. (*A*), same stimulus sequence as in Fig. 2, but 2-s steps of light are used instead of 2-ms flashes as testing stimuli. Test step intensity was 8 photons $\mu m^{-2} s^{-1}$. Intensity of adapting 50-s background illumination intensity was 225 photons $\mu m^{-2} s^{-1}$. Single record, Gauss-filtered with 50-ms window. (*B*) shows the shape of responses to test steps. (*C*). Comparing the time course of dark adaptation as tested by 2 ms flashes vs. 2 s steps. The extent of change of sensitivity to steps markedly exceeds that to flashes, evidently due to changing summation time (Fig. 2*B*, *C*). Solid lines show single-exponential approximations of the data. Time constants of the exponentials are virtually identical.

Увеличение времени интегрирования должно дополнительно повышать чувствительность к длительным стимулам (ступенькам света). Действительно, ответ на 2-секундные стимулы изменяется в ходе темновой адаптации в большей мере, чем ответ на вспышки (рис. 3A-C).

Сложившееся сейчас представление о механизмах световой адаптации приписывает изменения чувствительности и скорости фотоответа кальциевой обратной связи (стрелки 1–3 на рис. 1). Очевидно, что скорость таких регуляций определяется скоростью светоиндуцированных изменений концентрации свободного цитоплазматического Ca²⁺. Предполагается, что эти изменения примерно соответствуют кинетике ответа на вспышки и укладываются в несколько секунд [3–8]. Математиче-


Рис. 4. Влияние длительности адаптирующей засветки на восстановление чувствительности в ходе темновой адаптации. (A) – две записи с одинаковой интенсивностью тестирующих вспышек и адаптирующего фона. Длительность фоновых засветок 10 и 40 с. Записи сдвинуты вдоль оси времени так, чтобы моменты выключения фона приходились на 0 с. Кривая для 10-секундной фоновой засветки дополнительно сдвинута вертикально для меньшего перекрытия с кривой для 40 с фона. Стрелка у кривой для 10-секундной фоновой засветки указывает на задержку начала восстановления темнового тока после выключения фона. При 40-секундной фоновой засветке такой задержки нет. (B) – восстановление чувствительности после адаптации к 10- и 40-секундным фоновым засветкам происходит по сходной кинетике. Фоновая засветка 225 фотонов мкм⁻² с⁻¹, вспышка 2 мс, 0.88 фотонов мкм⁻² за вспышку, усреднение 10 записей, Гаусс-фильтрация 50 мс.

Fig. 4. Effect of the duration of the adapting steps on recovery of sensitivity during dark adaptation. (*A*), two records with identical adapting and testing intensities, but with the adapting durations of 10 s and 40 s. The records are shifted along the time axis to place the background turn-off at 0 s. 10-s background curve is additionally shifted vertically to reduce curves' overlap. Arrow at the 10-s background curve points to a few-second delay between the background turn-off and the start of the recovery of the dark current. The delay is absent at 40-s background. (*B*). After either 10-s or 40-s light adaptation, the recovery of sensitivity follows the same time courses. Steps of 225 photons μ m⁻² s⁻¹. Test flash duration 2 ms, intensity 0.88 photons μ m⁻² per flash. Average of 10 scans, Gauss-filtered with 50-ms window.

ские модели возбуждения и адаптации, построенные на основе этих соображений, хорошо описывают экспериментальные ответы на вспышки [8, 11–13]. Описание ответов палочки на действие длительных (десятки секунд) стимулов менее удовлетворительно и требует введения *ad hoc* дополнительных механизмов, возможно, контролируемых не Ca²⁺, а другими посредниками со специально сконструированной кинетикой [14]. Кроме того, экспериментально обнаружено, что существует медленная фаза регулировки чувствительности при световой адаптации, механизм которой не идентифицирован [7]. Мы также показали, что в ходе световой адаптации регулируется время жизни активированной $\PhiДЭ$ – механизм, также не включенный в существующую схему (штриховая стрелка с вопросительным знаком на рис. 1) [8].

Наши новые результаты дополнительно усложняют проблему. Мы показываем, что через 20-25 с после выключения адаптирующей засветки ток фоторецептора возвращается к темновому уровню (рис. 2*A*). В существующей схеме (рис. 1) это должно соответствовать восстановлению "темновой" концентрации Ca²⁺ и возвращению всех компонентов каскада в темноадаптированное состояние. В действительности чувствительность палочки остается пониженной, а кинетика ответа существенно ускоренной еще в течение более минуты при сохранении стабильного темнового тока (рис. 2–4). Мы назвали этот эффект "адаптационной памятью". Адаптационная память предполагает существование длительной модификации компонентов фототрансдукционного каскада, возможно, зависящей не от Ca²⁺, а, например, от фосфорилирования каких-то белков. Идентификация этих мишеней и участвующих посредников должна быть задачей дальнейшей работы.

Адаптационная память и последовательные образы

Последовательные образы возникают после действия на сетчатку интенсивных локальных стимулов. Выключение такого индуцирующего стимула оставляет светлое пятно, которое постепенно затухает и в конце концов исчезает — положительный последовательный образ. При наличии стационарного освещения достаточно обширной области зрительного поля, за затуханием положительного образа возникает отрицательный образ — темное пятно на светлом фоне. При ахроматическом локальном стимуле его последовательный образ также ахроматичен. При цветном освещении положительный образ имеет тот же цвет, что и индуцирующий стимул, а отрицательный образ — дополнительный к нему (пары зеленый—пурпурный, красный—циан, желтый—синий).

В самом общем смысле, основа последовательных образов достаточно очевидна. Возбуждение на некоторых уровнях зрительной системы не исчезает мгновенно после выключения индуцирующего стимула, а затухает постепенно, создавая положительный последовательный образ. С другой стороны, индуцирующий стимул вызывает локальную световую адаптацию, снижая чувствительность системы. Поэтому при наличии светлого окружающего фона стимулированная область выглядит темной (отрицательный образ).

Исследование свойств последовательных образов и механизмов их генерации имеет более чем вековую историю. Известно, что источником последовательных образов служит периферия. Если экспериментально блокировать передачу сигнала из глаза в мозг на время действия индуцирующего стимула, а потом ее восстановить, последовательный образ все равно возникает [15]. С другой стороны, в формировании субъективного восприятия последовательного образа (цвет, временной ход, зависимость от окружения и т.п.) большую роль играют центральные механизмы. Так, например, последовательные образы чувствительны к контекстному окружению в зрительном поле, в частности, к наличию отчетливых контуров у индуцирующих стимулов [16, 17]. При работе со стимулами в виде мозаичных многоцветно окрашенных поверхностей (картин Мондриана) последовательные образы, как и реальные объекты, демонстрируют константность воспринимаемого цвета в значительной мере независимо от спектрального состава освещения [18].

Тем не менее, вопрос об источниках последовательных образов в глазу остается нерешенным. Это могли бы быть сами фоторецепторные клетки, которые продолжали бы сигнализировать некоторое время после выключения света, и более длительно сохранять пониженную чувствительность из-за адаптационной памяти. Это могли бы быть и нейронные сети внутренней сетчатки, если бы возбуждение в них поддерживалось и после выключения света, а адаптационные перестройки сохра-

нялись достаточно долгое время. Разумеется, эти две гипотезы не исключают друг друга [19, 20].

Наши результаты показывают, что необходимые для последовательных образов свойства обнаруживаются уже на самом первом уровне — в выходных сигналах фоторецепторов. Идея о том, что последовательные образы вызываются обесцвечиванием родопсина, была высказана уже давно [21–23]. Разумеется, это безусловно правильно, поскольку первичным источником зрительного сигнала является поглощение света зрительным пигментом. В ранних работах в основном не специфицировалось, каким образом обесцвечивание пигмента вызывает последовательный образ, конечно, из-за отсутствия конкретных биохимических и физиологических знаний о работе каскада фототрансдукции. Современный уровень исследованности каскада позволяет достаточно надежно идентифицировать молекулярные механизмы, ответственные за затухающую сигнализацию (положительный образ) и изменение чувствительности фоторецептора (отрицательный образ).

Прежде всего, поглощение кванта света вызывает серию реакций активации, а затем инактивации сигнального каскада, которые в палочках лягушки имеют характерные времена от 1 до 5 с. В результате выходной сигнал фоторецептора (фототок или мембранный потенциал в синаптической области) в ответ на короткую вспышку света имеет вид волны со временем затухания около 5 с. При увеличении интенсивности стимула амплитуда ответа градуально увеличивается, а затем насыщается. Время нахождения в насыщении может достигать 30–50 с и определяется в основном кинетикой выключения светоактивированного родопсина [10]. Важно отметить, что такие длительные ответы достигаются при интенсивностях стимула, обесцвечивающих около 10000 молекул пигмента на палочку, т.е. меньше 0.001% наличного родопсина. Поэтому обесцвечивание как таковое (потеря родопсина) пренебрежимо и не может быть причиной понижения чувствительности после индукции последовательного образа.

Показано, что дальнейшее увеличение интенсивности стимула резко замедляет выход палочки из насыщения и последующее восстановление темнового тока [10]. При обесцвечивании ≈0.5% родопсина, по-прежнему пренебрежимом в отношении снижения поглощения, выход из насыщения начинается через 5 мин, а полное восстановление темнового тока занимает больше 20 мин. Медленность восстановления связана с накоплением и последующим распадом промежуточных продуктов фотолиза, которые с низкой вероятностью возбуждают каскад фототрансдукции. Наконец, восстановление чувствительности после значительного (десятки процентов) обесцвечивания родопсина (полная темновая адаптация) требует регенерации обесцвеченного родопсина и у человека занимает больше часа.

Таким образом, темновая адаптация палочек, в зависимости от уровня обесцвечивания, обеспечивается двумя группами механизмов. Быстрая ("биохимическая") фаза создается теми же процессами выключения каскада фототрансдукции, что формируют кинетику ответа на короткие стимулы умеренной яркости (фосфорилирование родопсина, выключение активированной ФДЭ, активация гуанилатциклазы и цГМФ-управляемых каналов). Резкое замедление адаптации при высоких обесцвечениях ("фотохимическая" фаза) связана с потерей родопсина и накоплением его фотопродуктов, длительно стимулирующих каскад [10]. Очевидно, что при различных уровнях обесцвечивания может изменяться вклад периферических (фоторецепторы) и центральных (нейронные сети сетчатки и зрительных центров мозга) механизмов в генерацию и восприятие последовательных образов. Поэтому реального противоречия между фотохимической и нервной теорией возникновения последовательных образов, вероятно, нет.

В наших экспериментах использовались умеренные интенсивности стимулов, находящиеся в пределах биохимической фазы адаптации. Соответственно, восста-

новление темнового тока после выключения адаптирующего фона (затухание положительного последовательного образа) происходит достаточно быстро и соответствует выключению активированных компонентов каскада (родопсина и ФДЭ). В рамках имеющейся схемы (рис. 1), полное восстановление темнового тока должно означать полное возврашение компонентов каскала в исходное темновое состояние. Мы, однако, показываем, что после возврата тока к темновому уровню чувствительность палочки остается пониженной в течение 1-2 мин (рис. 2-4). Чувствительность подавлена в результате медленно обратимых процессов, ускоряющих выключение активированного каскада на свету (адаптационной памяти). Адаптационная память может отвечать за возникновение отрицательных последовательных образов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00776-19-02.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Pugh Jr., Edward N., Lamb T.D.* Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation. In: Handbook of biological physics. V. 3. 183–255. North-Holland. 2000.
- 2. Arshavsky V.Y., Lamb T.D., Pugh E.N. Jr. G proteins and phototransduction. Annu. Rev. Physiol. 64: 153–187. 2002.
- Фирсов М.Л., Говардовский В.И. Световая адаптация фоторецепторов: смысл и механизмы. Сенс. сист. 15(2): 101–113. 2001. [Firsov M.L., Govardovskii V.I. Photoreceptor light adaptation: meanings and mechanisms. Sens. Syst. 15(2): 101–113. 2001. (In Russ)].
- 4. Arshavsky V.Y., Burns M.E. Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities. J. Biol. Chem. 287(3): 1620–1626. 2012.
- Chen J., Woodruff M.L., Wang T., Concepcion F.A., Tranchina D., Fain G.L. Channel modulation and the mechanism of light adaptation in mouse rods. J. Neurosci. 30(48): 16232–16240. 2010.
- 6. *Vinberg F., Chen J., Kefalov V.J.* Regulation of calcium homeostasis in the outer segments of rod and cone photoreceptors. Prog. Retin. Eye Res. 67: 87–101. 2018.
- Calvert P.D., Govardovskii V.I., Arshavsky V.Y., Makino C.L. Two temporal phases of light adaptation in retinal rods. J. Gen. Physiol. 119(2): 129–146. 2002.
- Astakhova L.A., Firsov M.L., Govardovski V.I. Kinetics of turn-offs of frog rod phototransduction cascade. J. Gen. Physiol. 132(5): 587–604. 2008.
- 9. Baylor D.A., Lamb T.D., Yau. K.-W. The membrane current of single rod outer segments. J. Physiol. 288: 589–611. 1979.
- Firsov M.L., Kolesnikov A.V., Golobokova E.Y. Govardovskii V.I. Two realms of dark adaptation. Vision Res. 45(2): 147–151. 2005.
- 11. *Hamer R.D., Nicholas S.C., Tranchina D., Lamb T.D., Jarvinen J.L.* Toward a unified model of vertebrate rod phototransduction. Vision Neurosci. 22: 417–436. 2005.
- 12. *Invergo B.M., Dell'Orco D., Montanucci L., Koch K.W., Bertranpetit J.* A comprehensive model of the phototransduction cascade in mouse rod cells. Mol. Biosystems. 10(6): 1481–1489. 2014.
- Кузьмин Д.Г., Травников С.В., Фирсов М.Л., Говардовский В.И. Математическое моделирование фототрансдукции и световой адаптации в палочках сетчатки лягушки. Сенс. сист. 18 (4): 305–316. 2004. [Kuzmin D.G., Travnikov S.V., Firsov M.L., Govardovskii V.I. Mathematical Model of Phototransduction and Light Adaptation in Frog Retinal Rods. Sens. Syst. 18 (4): 305–316. 2004. [In Russ)].
- 14. *Morshedian A., Fain G.L.* Molecular mechanism of adaptation in vertebrate rods. In: Vertebrate Photoreceptors. 73–90. Springer. Tokyo. 2014.
- 15. Craik K.J.W. Origin of visual after-images. Nature. 145: 512. 1940.
- 16. van Lier R., Vergeer M., Anstis S. Filling-in afterimage colors between the lines. Curr. Biol. 19(8): R323–R324. 2009.
- 17. *Powell G., Bompas A., Sumner P.* Making the incredible credible: Afterimages are modulated by contextual edges more than real stimuli. J. Vision. 12(10): 1–13. 2012.
- Zeki S., Cheadle S., Pepper J., Mylonas D. The constancy of colored after-images. Front. Hum. Neurosci. 11: 229. 2017.
- 19. Loomis J.M. The photopigment bleaching hypothesis of complementary after-images. Vision Res. 12: 1587–1594. 1972.

- 20. *Virsu V., Laurinen P.* Long-lasting afterimages caused by neural adaptation. Vision Res. 17(7): 853–860. 1977.
- 21. Brindley G.S. The discrimination of after-images. J. Physiol. (London). 147: 194-203. 1959.
- 22. Barlow H.B., Sparrock J.M.B. The role of afterimages in dark adaptation. Science. 144: 1309–1314. 1964.
- 23. MacLeod D.I.A. Rod origin of prolonged afterimages. Science. 185: 1171-1172. 1974.

Light Adaptation of Retinal Rods, Adaptation Memory and Afterimages

A. Yu. Rotov^a, *, L. A. Astakhova^a, M. L. Firsov^a, and V. I. Govardovskii^a

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

*e-mail: rotovau@gmail.com

The GPCR signaling cascade in the retinal photoreceptor cells, rods and cones, provides high signal amplification and allows rods to respond reliably to single photons. At the same time, rods remain operational under light fluxes up to 10^5 photons per second, which is supported by a highly efficient system of light adaptation. Light adaptation is based on negative feedback chains, mainly through changes in the intracellular concentration of Ca^{2+} ions. There are three reliably identified loops of calcium regulation – the acceleration of quenching of photoactivated rhodopsin, the acceleration of cGMP synthesis by guanylate cyclase, and an increase of cGMP-controlled ion channels' affinity to the nucleotide. However, it is known that there are additional one or two highly effective adaptation mechanisms, one of which regulates the lifetime of activated phosphodiesterase; for the second one, the target of regulation is unknown. The messengers of these regulations also remain unknown. While studying these mechanisms, we discovered a new phenomenon that was not noticed in previous works. We found that the restoration of rod's dark current after turning off the non-saturating adapting light can take 20-30 s. Moreover, after the membrane current formally returns to the dark level, the sensitivity of the cell to testing stimuli remains reduced for one to two minutes. We called this phenomenon "adaptation memory". Adaptation memory resembles the phenomenology of the afterimages. The gradual return of the membrane current to the dark level could correspond to the fading of positive afterimage. Long-term decrease in the sensitivity of photoreceptors to an additional stimulation can create a negative afterimage. As far as we know, this is the first experimental physiological demonstration of the possibility of afterimages generation already at the level of single photoreceptors.

Keywords: photoreceptor, rod, light adaptation, calcium feedback, adaptation memory, afterimages

ЦИТИРОВАТЬ:

Ротов А.Ю., Астахова Л.А., Фирсов М.Л., Говардовский В.И. Световая адаптация палочек сетчатки, адаптационная память и последовательные образы. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(4): 462–473.

DOI: 10.31857/S0869813920040068

TO CITE THIS ARTICLE:

Rotov A.Yu., Astakhova L.A., Firsov M.L., Govardovskii V.I. Light Adaptation of Retinal Rods, Adaptation Memory and Afterimages. Russian Journal of Physiology. 106(4): 462–473. DOI: 10.31857/S0869813920040068 РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 474-485

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

РАЗНООБРАЗИЕ И АДАПТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЗРИТЕЛЬНЫХ ПИГМЕНТОВ РЫБ С ИЗМЕНЯЕМОЙ ОКРАСКОЙ РОГОВИЦЫ

© 2020 г. С. Л. Кондрашев*

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия *E-mail: navodon@rambler.ru

> Поступила в редакцию 26.01.2020 г. После доработки 25.02.2020 г. Принята к публикации 26.02.2020 г.

В статье описаны свойства зрительных пигментов у нескольких видов рыб, обладающих уникальным физиологическим механизмом изменения окраски роговицы в зависимости от уровня освещенности. С помощью микроспектрофотометрии для бурого терпуга *Hexagrammos octogrammus* и пяти видов рыб отряда Tetraodontiformes (рыбы-фугу, иглобрюхи и др.) получены спектры поглощения зрительных пигментов и спектральные характеристики роговицы. У всех видов фоторецепторы сетчатки содержали смесь родопсина (A1) и порфиропсина (A2) в разных пропорциях от 0 до 100%. Смещение спектрального поглощения двойных колбочек в длинноволновую область спектра у рыб-фугу по сравнению с большинством других морских мелководных рыб связано, по-видимому, с наличием желто-оранжевых каротиноидных переменных фильтров роговицы. Экспериников двойных колбочек в сторону коротких длин волн (ионохромный эффект), что позволяет предположить присутствие одного пигмента LWS-типа у рыб-фугу ($\lambda_{макс} = A2_{567}$ нм) и двух LWS-пигментов у терпуга ($\lambda_{макс} = A2_{625}$ и A1_560 нм).

Ключевые слова: рыбы, *Tetraodontidae, Hexagrammos octogrammus*, микроспектрофотометрия, зрительные пигменты, ионохромный эффект, физиологическая адаптация, окраска роговицы

DOI: 10.31857/S0869813920040032

Сенсорные системы рыб демонстрируют впечатляющее богатство решений, обеспечивающих выживание и эволюционный успех этого класса позвоночных животных. Пресноводные и морские рыбы традиционно используются в качестве многочисленных примеров и экспериментальных моделей при изучении морфофизиологических и биохимических адаптаций, в том числе и в исследованиях адаптивных свойств зрительной системы на разных уровнях организации [1].

В зрительной системе рыб были обнаружены разнообразные, в том числе — уникальные механизмы, регулирующие количество и спектральный состав света, попадающего на сетчатку глаза [2]. Среди них изменяемая окраска роговицы, впервые описанная у морской рыбы, бурого терпута *Hexagrammos octogrammus* [3]. Изменение окраски роговицы обратимо, регулируется уровнем освещенности окружающей среды и в диапазоне от максимальной до максимальной плотности занимает от 1 до 1.5 ч [3, 4]. Оно является следствием миграции желтых и оранжевых каротиноидных пигментов в специализированных хроматофорах, тела которых расположены по периферии роговицы, а длинные отростки перекрывают ее центральную зону [5–8]. Некоторые виды терпуговых (Hexagrammidae) имеют в состоянии световой адаптации, по-видимому, наиболее оптически плотные роговичные фильтры. Кроме того, у одного из них, бурого терпуга, колбочки содержат наиболее длинноволновые зрительные пигменты, известные для морских рыб, содержащие в качестве хромофора 3-дегидроретиналь [9, 10]. Для пигментов терпуга характерно необычное поведение: состав смесей родопсина и порфиропсина в фоторецепторах всех типов способен меняться в зависимости от продолжительности непрерывной световой или темновой адаптации (несколько недель): на свету в сетчатке преобладает порфиропсин (А2), а в темноте – родопсин (А1). Следует отметить, что эти изменения у терпуга противополжны обычно наблюдаемым у других видов рыб [10, 25]. Указанные свойства зрительной системы делают терпугов особо интересными объектами для исследования структуры роговицы, различных аспектов физиологической регуляции роговичных хроматофоров [4, 5, 11, 12], и свойств зрительных пигментов [9, 13].

Скрининг на наличие механизма переменной окраски роговицы среди рыб других семейств выявил его еще у нескольких десятков видов. Наиболее интенсивные желто-оранжевые изменяемые фильтры роговицы (кроме терпугов) имеет ряд представителей семейств Tetraodontidae (рыбы-фугу, иглобрюхи и др.), Stichaeidae и Cottidae [4, 7, 14–18].

Вполне понятно, что цветные фильтры оптики глаза, отрезая существенную коротковолновую часть видимого спектра, неизбежно должны влиять на результирующую спектральную чувствительность фоторецепторов. Ранее мы обнаружили, что чем выше оптическая плотность роговичного фильтра, тем более смещен в длинноволновую область спектра диапазон значений максимумов чувствительности колбочек сетчатки у терпугов [13]. Однако до сих пор неясна принадлежность зрительных пигментов этих рыб к определенному "молекулярно-генетическому типу" (LWS, RH2, SWS2, SWS1 [19]). Сведения о спектрах зрительных пигментах рыб из отр. Tetraodontiformes, насчитывающего более 400 видов, ограничиваются данными о $\lambda_{\text{макс}}$ у семи тропических видов, без указания на типы хромофоров и опсинов [18, 20]. Расширение списка видов с известными зрительными пигментами представляет интерес для оценки того, насколько отмечаемая "подстройка" роговичного и сетчаточного механизмов универсальна и характерна не только для терпугов, но и для других рыб, а также для понимания того, какие зрительные пигменты в этом задействованы.

Из-за чрезвычайно компактного генома [21] рыбы-фугу и иглобрюхи представляют большой интерес как "модельные" объекты молекулярно-генетических исследований позвоночных животных по многим направлениям, включая физиологию адаптаций и эволюцию зрительных пигментов [22]. Однако их спектральные свойства неизвестны даже у видов, давно введенных в лабораторную аквакультуру (*Takifugu rubripes* и пресноводные иглобрюхи),

Основной задачей данного исследования было определение спектров поглощения и других свойств зрительных пигментов у морских и пресноводных тетрадонтов (представителей Tetraodontiformes). В связи с тем, что соответствие между молекулярной структурой их опсинов и данными о спектральной чувствительности пока не установлено, мы оценили возможную принадлежность обнаруженных зрительных пигментов к определенным молекулярным типам с помощью сопоставления с некоторыми данными литературы и с помощью ионохромного эффекта – изменения спектра поглощения в среде, лишенной ионов хлора, характерного для пигментов LWS-типа с особой организацией связи между опсином и хромофором [23, 24]. Этот эффект также использовали для получения дополнительных сведений о природе зрительных пигментов бурого терпуга, отличающихся особой длинноволновой чувствительностью [9].

Таблица 1	I. Ma	ксимумы	спектров	поглощ	ения и хр	омоф	юрный	состав	зрительн	ых пи	гментов
фотореце	ептор	ов сетчатк	и бурого т	герпуга	и рыб от	p. Teti	raodont	oidei			

Table 1	I. The max	ximum a	lbsorption	spectra and	the c	hromopł	ore	composition	of t	he visual	pigments
of the	photorece	ptors of t	the retina	of brown ras	p and	l fish neg	. Tet	raodontoide	i		

Вид	п	Палочки Rods	Одиночные колбочки	Двойные колбочки Double cones					
Species		Rous	Single cones	MW	MW_CI ⁻	LW	LW_CI ⁻		
Бурый терпуг Masked greenling Hexagrammos octogrammus	9	_	_	543 (15) 525 & 562 0.4/0.6	<i>523</i> (16)	582 (18) 560 & 625 0.4/0.6	547 (12)		
Бурый терпуг Hexagrammos octogrammus; После 1 месяца содержания в темноте Masked greenling after 1 month of dark adaptation	3	502 500 & 525 0.85/0.15*	505 500 & 525 0.7/0.3*	530 (22) 525 & 562 0.6/0.4	520 (21)	565 (12) 560 & 625 0.8/0.2	<i>520</i> (21)		
Takifugu xanthopterus	5	502_A1 (33)	448_A2 (31)	525 (54) 520 & 555 0.76/0.24	525 (11)	567_A2 (41)	550 (11)		
Takifugu rubripes	2	505 (10) 502 & 527 0.78/0.22	445 (19) A1_A2-??	524 (21) 520 & 555 0.73/0.27	-	567_A2 (19)	_		
Takifugu chinensis	1	502_A1 (5)	445_A2 (11)	<i>523</i> (15) 520 & 555 0.84/0.16	-	566_A2 (16)	_		
Thamnaconus modestus	3	495_A1 (4)	409 (17) A1_A2??	486 (16) 478 & 494 0.46/0.54	_	523_A2 (12)	_		
Dichotomyctere (Teraodon) fluviatilis	2	519_A2 (8)	463_A2 (8)	555_A2 (21)	_	610_A2 (17)	_		
Pao (Tetraodon) leiurus**	6	530_A2	530_A2	570_A2	_	630_A2	_		

* [13]. ** [37].

n – число изученных рыб; МW – средневолновый и LW – длинноволновый членики двойных колбочек; MW Cl[–] и LW Cl[–] – то же самое в беслорной среде. Курсивом выделены максимумы поглощения для смесей пигментов. Сумма двух значений максимума указывает на наличие смеси двух пигментов (родопсина A1 и порфиропсина A2), доли которых приведено ниже; в скобках – количество снятых спектров. Латинские названия видов приводятся по современной номенклатуре [26].

n is the number of fish studied; MW – medium wave and LW – long wave segments of double cones; MW Cl⁻ and LW Cl⁻ are the same in a chlorine-free medium. Italics highlighted absorption maxima for pigment mixtures. The sum of the two maximum values indicates the presence of a mixture of two pigments (rhodopsin A1 and porphyropsin A2), the proportions of which are given below; in parentheses is the number of spectra taken.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были морские и пресноводные рыбы из семейств Tetraodontidae, Monanacanthidae, Hexagrammidae (табл. 1, [26]). Пресноводных аквариумных иглобрюхов *Dichotomyctere (Tetraodon) fluviatilis и Pao (Tetraodon) leiurus* приобретали в торговой сети. Морских рыб отлавливали в мае—июле в зал. Восток (зал. Петра Великого, Японское море) донными ловушками или ставной сетью. Эксперименты были проведены на рыбах, отловленных не более чем за неделю до опытов, чтобы избежать известного влияния длительного содержания в иных условиях на состав зрительных пигментов [10, 25]. Перед экспериментами морских рыб содержали в ваннах с проточной водой при температуре 10–15°С при освещении светодиодными осветителями СДО-5 (FATO Group, KHP; цветовая температура 6500 K), суточный световой режим 12 : 12. Освещенность (около 6000 лк) контролировали люксметром Ю-116 (Машприборинторг, Москва). Длительная темновая адаптация (в необходимых случаях до одного месяца) достигалась содержанием рыб в ваннах, постоянно закрытых сверху непрозрачным материалом.

Спектры поглощения роговицы

После 5–6 ч световой адаптации рыб обездвиживали, помещая в раствор MS222 (Sigma Co., США), затем декапитировали. Для изготовления препарата роговицы рыб использовали метод, описанный ранее [7]. Роговицу выделяли из глаза, после чего помещали под покровное стекло в нескольких каплях фосфатного буфера. Спектры пропускания на отдельных участках целой роговицы измеряли с помощью спектрометра USB2000+ (Ocean Optics Co.) [13]. Для подведения и отведения света использовали световоды с диаметром 0.6 мм и источник с галогенной лампой HL-2000 этой же фирмы.

Микроспектрофотометрия

Методика микроспектрофотометрического исследования фоторецепторов сетчатки подробно и неоднократно была описана ранее [27, 28]. Для измерений использовали микроспектрофотометр оригинальной конструкции [29] с записью результатов в файлы на персональном компьютере. Регистрировали спектры поглощения наружных сегментов изолированных фоторецепторов (25 рыб, 470 учтенных спектров). Записи обрабатывали с помощью компьютерной программы MSP-PRO, переданной нам ее автором В.И. Говардовским (ИЭФБ РАН, Санкт-Петербург), и принципы работы которой были описаны ранее [27]. Программа аппроксимирует данные измерений в предположении, что результат представляет собой суперпозицию спектров пары пигментов в определенной пропорции, построенных из одного и того же опсина и разных хромофоров – ретиналя (А1) или 3-дегидроретиналя (А2). Таким образом были определены состав зрительных пигментов (А1-родопсины, А2-порфиропсины или их смесь) и средние величины максимумов поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$). Стандартное отклонение $\lambda_{\text{макс}}$ для всех типов фоторецепторов составляло

Использовали два вида простых физиологических растворов (pH 7.2–7.4): один – стандартный, содержащий ионы Cl⁻ в форме NaCl в обычной концентрации для морских (0.9%-ный или 170 мМ) или пресноводных (0.6%-ный) рыб, а другой – без ионов Cl⁻, в котором использовалась бидистиллированная вода, и где NaCl был заменен на NaNO₃ в той же концентрации (170 мМ). Эксперименты с влиянием бесхлорной среды проводили только с сетчаткой морских рыб спустя 1 ч после вымачивания сетчатки в этом растворе при 2–4°С. Поскольку известно, что ионохромный эффект проявляется на зрительных пигментах типа LWS [23, 24], его наличие проверялось только у двойных колбочек, имевших наиболее длинноволновые пигменты. Продолжительность каждого эксперимента с записями спектров не превышала 2 ч, во время которых полностью сохранялась целостность наружных сегментов фоторецепторов.

Условия экспериментов соответствовали правилам работы с животными, установленными Комитетом по этике Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектры поглощения роговицы и фоторецепторов в обычном физиологическом растворе

После содержания рыб на свету в течение 2 ч оптическая плотность роговицы у *T. xantopterus*, *Takifugu chinensis* и *D. fluviatilis* достигала максимально возможных значений от 0.5 до 2 лог. единиц (полная световая адаптация). Пересчет спектров в виде кривой пропускания сглаживает максимумы, характерные для каротиноидов,

и показывает, что на ярком свету эти роговицы максимально поглощают свет от 40 до 99% в диапазоне 420-500 нм (рис. 1A, D)

У всех исследованных 6 видов тетрадонтов имеются многочисленные тонкие (диаметром менее 2 мкм) палочки, а также одиночные и двойные колбочки. Три морских вида рода *Takifugu* (рыбы-фугу) имели почти одинаковый состав пигментов, незначительно различаясь лишь составом смесей родопсина (A1) и порфиропсина (A2), судя по результатам аппроксимации стандартными кривыми (табл. 1; рис. 1*A*). Данные для одиночных колбочек *T. rubripes* не удалось трактовать однозначно, поэтому мы приняли для $\lambda_{\text{макс}}$ среднее значение 445 нм между крайними величинами, соответствующими либо родопсину либо порфиропсину (447–442 нм).

Зрительные пигменты спинорога *Thamnaconus modestus* (Monacanthidae) отличались другой особенностью: все типы фоторецепторов оказались более "коротковолновыми" по сравнению с найденными у других видов. Наибольшее значение $\lambda_{\text{макс}}$ зрительных пигментов спинорога зафиксировано для одного из члеников двойных колбочек — всего 523 нм (табл. 1; рис. 1*С*). Пигменты представлены как родопсином (палочки), порфиропсином (длинноволновый, LW — членик двойных колбочек), так и их смесью в средневолновом (MW) членике двойных колбочек. Как и в случае с *T. rubripes*, для $\lambda_{\text{макс}}$ одиночных колбочек было принято среднее значение 409 нм между крайними величинами для пары родопсина и порфиропсина (406–412 нм).

Два пресноводных вида иглобрюхов имели более красно-чувствительные пигменты по сравнению с другими рыбами отряда (табл. 1). Наибольшие значения $\lambda_{\text{макс}}$ характерны для таиландского иглобрюха *Pao (Tetraodon) leiurus*, у которого один из компонентов двойных колбочек имеет $\lambda_{\text{макс}} = 630$ нм. Судя по результатам аппроксимации спектральных данных, все пигменты у этих рыб являются порфиропсинами (тип A2) (рис. 1*D*).

У *Т. хапthopterus* при использовании бесхлорной среды сдвиг $\lambda_{\text{макс}}$ на 17 нм наблюдали только для LW-членика двойных колбочек (550 нм против 567 нм). Спектр поглощения MW-членика в норме хорошо совпадал с показателями поглощения, измеренными в бесхлорной среде по всему длиноволновому плечу спектра (рис. 1*B*). Так как все использованные в работе рыбы-фугу имели практически одинаковый набор зрительных пигментов, то опыты с другими видами не проводили.

Ионохромный эффект у бурого терпуга отчетливо проявлялся в том, что $\lambda_{\text{макс}}$ у LW-члеников двойных колбочек смещался в сторону коротких волн на 35 нм (с 582 до 547 нм), а у МW-члеников — на 20 нм (с 543 до 523 нм) (табл. 1, рис. 2*A*). Такая картина наблюдалась в колбочках летом, когда в сетчатке преобладал порфиропсин [9].

Серия экспериментов с продолжительным содержанием рыб в темноте была направлена на выявление вклада в ионохромный эффект отдельных компонентов, входящих в состав смеси зрительных пигментов. После длительной непрерывной темновой адаптации (до одного месяца) соотношение пигментов в сетчатке изменилось в сторону родопсина (10, табл. 1). В результате, в бесхлорном растворе было обнаружено смещение максимума поглощения LW-членика примерно на 45 нм, а MW-членика на 10 нм (рис. 2*B*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Спектральные свойства зрительных пигментов и роговиц

Микроспектрофотометрическое исследование показало, что три близкородственных вида рыб-фугу имеют единообразный состав зрительных пигментов с $\lambda_{\text{макс}} = 502-505$ нм (палочки), 445 нм (одиночные колбочки) и 524/567 нм (двой-



Рис. 1. Микроспектрофотометрия колбочек и роговиц рыб отряда Tetraodontiformes. Средние значения положения максимумов кривых, состав смесей A1/A2 и количество измерений представлены в таблице. Кривые для пигментов получены после наилучшей аппроксимации стандартными кривыми для A1, A2 или их комбинации (A1 + A2) [27]. A – Рыбы-фугу. *Takifugu xanthopterus*: короткий штрих – одиночные колбочки, длинный штрих – MW-членик, сплошная линия – LW-членик. Правая ось ординат – пропускание дорсальной части роговицы: пунктир – *T. chinensis*; штрих-пунктир – *T. xanthopterus*. *B* – Двойные колбочки рыбы-фугу *T. xanthopterus* в нормальном растворе (заливка) и в бесхлорной среде (открытые символы). *I*, *3* – LW-членики; *2*, *4* – MW-членики. Черные кривые – аппроксимация, серая кривая – сглаживание экспериментальных данных методом скользящей средней. *C* – Спинорог *Thamnaconus modestus*. *1* – LW-членики двойных колбочек; *3* – одиночные колбочки. Кривая для *1* – A2, кривая для *2* – комбинация A1/A2. Штриховая кривая для *3* – комбинация 50% A1 + 50% A2. *D*. Колбочки и роговица иглобрюха *Dichotomyctere fluviatilis*. Аппроксимация стандартной кривой для порфиропсина: *1* – LW-членики двойных колбочек; *2* – MW членики двойных колбочек; *2* – MW членики двойных колбочек; *3* – одиночные колбочки, кривая для *1* – A2, кривая для *2* – комбинация A1/A2. Штриховая кривая для *3* – комбинация 50% A1 + 50% A2. *D*. Колбочки и роговица иглобрюха *Dichotomyctere fluviatilis*. Аппроксимация стандартной кривой для порфиропсина: *1* – LW-членики двойных колбочек; *2* – MW членики двойных колбочек; *2* – MW членики двойных колбочек; *3* – одиночные колбочек; *3* – одиночные колбочки. *4* – пропускание роговицы в состоянии максимальной световой адаптации, относится к правой шкале Y.

Fig. 1. MSP data of absorbance spectra of cones and corneas of some species from Tetraodontiformes. Mean λ_{max} value of the pigment mixtures and its components, corresponding A1/A2 ratio of the components and the number of cell measured are presented in the Table. Smooth curves for the pigments are the best fits of the normalized data using templates for A1 and A2 pigments [27]. A - Fugu-fish. *Takifugu xanthopterus:* short dash – single cones; long dash – MW member of double cones; solid line – LW member of double cones. Right Y-axis—transmittance of the dorsal part of the cornea: dotted line – T. chinensis, dash-dotted – T. xanthopterus. B – Double cones of the puffer T. xanthopterus in normal solution (filled symbols) and Cl-free medium (substitution of NaCl for NaNO₃, open symbols). 1, 3 – LW-members, 2, 4 – MW-members. Black curves – template fitting, grey curve – smoothing of the data by the method of running average. C – Filefish Thamnaconus modestus. I – LW-members of double cones; 2 – MW-members of double cones; 3 – single cones. Curves for 1 and 2 data – template fits for A2 and A1/A2, correspondingly. Short dash – superposition of templates for 50% A1 + 50% A2. D. Cones and cornea of the pufferfish Dichotomyctere fluviatilis. Best fit by the A2-templates: *I*–LW-members of double cones, 3 – single cones. 4 – corneal transmittance after maximal light adaptation (refer to the right Y-axis).



Рис. 2. Спектры поглощения пигментов в члениках двойных колбочек бурого терпуга *Hexagrammos octogrammus*. Сплошные и штриховые кривые – результаты аппроксимации стандартными кривыми усредненных данных для LW- и MW-члеников в нормальном растворе. *А* – Свежевыловленные рыбы из моря, обычные условия содержания. Результаты изменения спектров в бесхлорной среде: *1* – LW-членики, *2* – MW-членики. *B* – Рыбы через месяц после содержания в темноте в бассейне. Символы на панели (*B*) соответствуют поглощению, измеренному в бесхлорном растворе в обоих члениках.

Fig. 2. Normalized absorbance spectra of visual pigments in LW- and MW-members of doubles cones of greenling, *Hexagrammos octogrammus.* (*A*) Fish from the sea. Solid and dashed curves are the results of fitting of mean data for LW- and MW-members, correspondingly. Absorbance in the Cl-free medium: I - LW-members, 2 -MW-members. (*B*) Fish after 1 month of dark adaptation in the water tank. Symbols on panel (*B*) correspond to equal absorbance in both members of double cones in the Cl-free medium.

ные колбочки) (рис. 1*A*). Значения для палочек и одиночных колбочек вполне соответствуют величинам для большинства прибрежных рыб Японского моря с переменными фильтрами роговицы, изученных нами ранее (503 ± 2 , 450 ± 5 нм), но $\lambda_{\text{макс}}$ двойных колбочек у рыб-фугу отличались в большую сторону по сравнению со средними для других рыб (520 ± 5 , 553 ± 8 нм) [28]. Почти все зрительные пигменты рыб-фугу являются исключительно порфиропсинами (особенно в колбочках), либо представлены смесью порфиропсина и родопсина в разной пропорции (табл. 1). Наличие А2 хромофора в сетчатке *T. rubripes* было подтверждено также с помощью хроматографии [30].

Пигментные фильтры роговицы этих рыб в состоянии максимальной плотности лишь частично ограничивают уровень средневолнового излучения. Во всяком случае, "синечувствительные" одиночные колбочки у этих рыб могут быть функционально значимыми в диапазоне 440–500 нм даже при полной световой адаптации роговичного фильтра. Здесь мы находим аналогию с некоторыми видами терпугов в случаях, когда при неполной световой адаптации плотность роговицы мала [13].

Зрительные пигменты колбочек спинорога *Thamnaconus modestus* имеют на 35– 45 нм меньшие величины $\lambda_{\text{макс}}$ по сравнению с пигментами рыб-фугу (табл. 1, рис. 1*C*). Это согласуется со свойствами пигментов других видов спинорогов и многих рыб с коралловых рифов, где вода более чистая [18]. Судя по результатам аппроксимации, разные членики двойных колбочек спинорога содержат равное количество порфиропсина. Примечателен коротковолновый спектр поглощения одиночных колбочек у этого вида ($\lambda_{\text{макс}} = 409$ нм), хотя судить о природе хромофора в них затруднительно. Оптические среды глаза, включая роговицу, у спинорога совершенно бесцветны и, по-видимому, не ограничивают доступ света с длиной волны >400 нм к сетчатке.

Фоторецепторы иглобрюхов содержат чистый порфиропсин (рис. 1D), что типично для многих пресноводных рыб. Обращает на себя внимание большое сходство набора порфиропсинов в колбочках у пресноводного *P. leiurus* и типичной морской рыбы, бурого терпуга, летом или при длительной адаптации к свету [9]: $\lambda_{\text{макс}} = 530$ и 525 нм, 570 и 562 нм, 630 и 625 нм соответственно и отсутствие "обычных" для прибрежных морских рыб синечувствительных колбочек с максимумом поглощения около 450 нм. Такое сходство систематически и экологически очень далеких видов можно объяснить наличием очень плотных желто-оранжевых фильтров роговицы, делающих такие фоторецепторы неэффективными при почти полной "блокаде" сине-зеленой части спектра при дневном освещении [9, 13]. Остается неясным, однако, почему в сетчатке близкородственного вида D. fluviatilis имеются колбочки с $\lambda_{\text{макс}} = 463$ нм, попадающими в область минимального пропускания этого плотно окрашенного фильтра (рис. 1D)? Возможно, это можно объяснить особенностями экологии (выбор местообитания, суточная активность при разных световых условиях и др.) когда пигментный фильтр в роговице находится преимущественно в неполном светоадаптированном состоянии.

Типы зрительных пигментов

Результаты, полученные с помощью ионохромного эффекта, как и микроспектрофотометрические данные, не могут служить окончательных указанием на молекулярный тип зрительных пигментов. Для этого необходимы дополнительные молекулярно-генетические и иммунологические исследования. Способ определения $\lambda_{\text{макс}}$ аппроксимацией стандартными кривыми для пигментов A1 и A2 имеет известные ограничения по точности [27], поэтому более точные сведения о наличии пигментов с разными хромофорами обычно получают с помощью хроматографии [30]. Принятие во внимание только максимума поглощения может привести к ошибкам, так как нередко в одном наружном сегменте содержится смесь нескольких пигментов [31], а спектральные диапазоны для разных молекулярных типов пигментов перекрываются. Например, известны случаи нахождения весьма "коротковолновых" LWS-пигментов ($\lambda_{\text{макс}} = 509-516$ нм у некоторых млекопитающих [32]; $\lambda_{\text{макс}} = 512$ нм у японского анчоуса [33]).

Тем не менее в отношении изученных нами объектов можно сделать определенные заключения, сопоставив наши данные с немногочисленными результатами молекулярно-генетических исследований опсинов у тетрадонтов.

Поскольку ионохромное смещение характерно лишь для LWS-пигментов и наблюдалось только у одного членика двойных колбочек *T. xantopterus*, имеющего в норме $\lambda_{\text{макс}} = 567$ нм (рис. 1*B*), то можно полагать, что у фугу имеется всего один пигмент LWS-типа. Так как все виды рыбы-фугу имели практически идентичный набор пигментов, то этот вывод можно отнести и к ним. Это соответствует результатам молекулярно-генетических исследований рыбы-фугу *T. rubripes*, одного из объектов нашего исследования, у которой показано наличие всего одной копии гена LWS-опсина [22]. Эти же авторы не нашли гена SWS1 ни у рыбы-фугу, ни у иглобрюха *Tetraodon nigroviridis*, что подтверждается нашими результатами об отсутствии ультрафиолетовых зрительных пигментов. Пигменты MW-членика двойных колбочек с $\lambda_{\text{макс}} = A1_520$ и A2_555 нм, построенные на одном и том же опсине, очевидно, соответствуют единственному функциональному гену RH2, установленному для фугу и иглобрюха [22].

У бурого терпуга мы имеем более сложное проявление ионохромного эффекта в связи с тем, что колбочки содержат смесь двух пигментов. В отсутствие данных о типах опсинов терпуга мы изначально предполагали, что в каждом из члеников двойных колбочек терпуга пигменты построены на основе одного опсина, но имеют разные хромофоры. Результаты, опубликованные ранее, этому не противоречат [9, 10, 13]. В литературе имеются сведения о ко-экспресии разных молекулярных типов пигментов в одной колбочке: например, у японского анчоуса [10], гуппи и мыши [32]. Однако мы не рассматриваем такую возможность для терпуга ввиду отсутствия в настоящее время надежных молекулярно-генетических данных.

Сдвиг $\lambda_{\text{макс}}$ длинноволнового членика двойных колбочек на 35 нм (рис. 24) можно объяснить только тем, что применение NaNO₃ в бесхлорной среде привело к смещению максимума поглощения каждого из компонентов смеси в коротковолновую сторону (обычно от 18 до 44 нм для разных пигментов [23]). Если бы в этой смеси из двух пигментов был только один LWS-пигмент с $\lambda_{\text{макс}} = 625$ нм, то при примерно равной доле содержания компонентов (табл. 1) следовало бы ожидать смещение максимума поглощения смеси до значения более чем 560 нм. Однако мы имеем смещенный спектр с максимумом около 540 нм, что указывает на то, что и второй компонент с $\lambda_{\text{макс}} = 560$ нм также проявляет ионохромные свойства и, следовательно, является пигментом LWS-типа.

Этот вывод дополнительно подтверждается результатами эксперимента после длительного содержания рыбы в темноте (около одного месяца) в параллельной серии экспериментов [10]. В этих условиях в LW-члениках содержался преимущественно пигмент A1_560, что привело к сдвигу максимума поглощения смеси пигментов на 45 нм (рис. 2B).

Менее определенно можно судить о молекулярных типах пигментов в МW-членике двойных колбочек бурого терпуга. Ионохромный сдвиг происходит, но он меньше (20 нм) по сравнению с результатом для LW-члеников. Это можно объяснить тем, что, как было отмечено в предыдущем абзаце, для разных пигментов величина сдвига может различаться. После длительной темновой адаптации, при уменьшении содержания A2_562 в MW-членике до 40% (табл. 1) был зафиксирован еще меньший сдвиг – всего 10 нм, что приближается к точности определения максимума поглощения на спектральной кривой.

При этом экспериментальные данные для LW- и MW-членика в бесхлорной среде неразличимы и практически совпадают с длинноволновым плечом спектральной кривой поглощения для MW-членика в нормальном растворе (рис. 2*B*).

Если предположить, что в бесхлорной среде максимумы поглощения каждого из пигментов-компонентов смеси в МW-членике сдвигаются, как и в LW-членике, примерно на 40 нм, то следовало бы предположить, что ионохромный сдвиг происходит только для пигмента с $\lambda_{\text{макс}} = A2_562$ нм. Но это означало бы, что другой компонент смеси принадлежит к другому молекулярному типу. Это возможно, но требует дополнительных весомых доказательств. Таким образом, учитывая довольно противоречивые данные, у нас нет уверенности в том, что какой-либо из зрительных пигментов сетчатки бурого терпуга из МW-членика относится к LWS-типу.

Физиологическая роль фильтров роговицы

Возможная физиологическая роль каротиноидных фильтров роговицы обсуждалась неоднократно, однако до сих пор нет надежных экспериментальных данных, подтверждающих какую-либо из гипотез [16, 34, 35]. Несомненно, что привлечение максимума сведений о свойствах зрительных пигментов и спектральных характеристиках роговицы в сочетании с данными по зрительной экологии многих видов рыб будут способствовать прояснению этой проблемы. Можно предположить, что, как у для терпугов, переменные фильтры роговицы у мелководных дневных представителей тетрадонтов выполняют роль защиты от яркого света [13], в особенности – от влияния ультрафиолета. В то же время у рыб-фугу сдвиг максимумов поглощения пигментов в длинноволновую часть спектра из-за наличия фильтров роговицы, "компенсирующее" потерю общей чувствительности сетчатки, оказалось меньше, чем у терпугов. Оно было выражено только у двойных колбочек, очевидно из-за сравнительно невысокой оптической плотности роговицы.

Присутствие порфиропсина в сетчатке делает более эффективным поглощение длинноволнового излучения, поэтому этот факт считается адаптацией к освоению рыбами пресных и солоноватых водоемов, имещих иной спектр распределения энергии света по сравнению с морем [30]. Таким образом, с одной стороны, наличие порфиропсина в фоторецепторах большинства видов рыб с желто-оранжевыми роговицами [9, 13] можно считать адаптацией к изменению спектрального состава света, попадающего на сетчатку. С другой стороны неясно, какое преимущество могут дать колбочки с порфиропсином при $\lambda_{\text{макс}} = 523$ нм у спинорога — типичной морской рыбы (рис. 1С)? Интересно отметить, что у 4х других видов спинорогов из того же семейства, обитающих на коралловых рифах, имеется желтая роговица с переменной окраской [14, 16, 18, 20], однако диапазоны значений спектральной чувствительности их колбочек совпадают с положением $\lambda_{\text{макс}}$ колбочек спинорога, описанных нами (λ_{макс} = (398–407) и (476–492)/(510–522) нм против 409 и 486/523 нм). Очевидно, это объясняется близостью систематического положения видов, а также незначительным влиянием фильтров низкой плотности на результирующие эффективные спектры зрительных пигментов. Расчет для спинорога Rhinecanthus acu*leatus* показал, что роговица лишь слегка модифицирует поглощение, "срезая" в основном бета-полосы спектров зрительных пигментов, и не влияет на способность рыб использовать цветовое зрение в поведенческих опытах [20].

Несмотря на хорошее качество регистрируемых спектров, микроспектрофотометрические данные необходимо в будущем подкрепить с помощью хроматографии и других методов. Если порфиропсины (включая коротковолновые) у морских Tetraodontoidei действительносуществуют, то не есть ли это следствие каких-то более глубоких, родственных (генетических) связей между видами этого отряда, лежащих в основе общих биохимических и физиологических механизмов, адаптивность которых не всегда ясна? Можно надеяться, что эта группа рыб, благодаря уникальным свойствам их генома, будет успешно использоваться в качестве перспективной модели для исследований по эволюции сенсорных систем и физиологии адаптаций [22, 36].

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит В.И. Говардовского (ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург) за предоставление компьютерной программы для анализа спектров и данных о спектрах поглощения зрительных пигментов таиландского тетраодона, а также Е.Г. Рейзмана (ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН) за помощь при отлове рыб.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Госзадания ННЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Collin S.P., Davies W.L., Hart N.S., Hunt D.M. The evolution of early vertebrate photoreceptors. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 364(1531): 2925–2940. 2009.
- 2. *Collin S.P.* Specialisations of the teleost visual system: adaptive diversity from shallow-water to deep-sea. Acta Physiol. Scand. 161 (Suppl. 638): 5–24. 1997.
- 3. Orlov O.Y., Gamburtzeva A.G. Changeable coloration of cornea in the fish Hexagrammos octogrammus. Nature. 263: 405–406. 1976.
- Kondrashev S.L., Gnyubkin V.F. The effect of temperature on the light-induced pigment movement in fish corneal chromatophores. Pigment Cell Res. 12: 193–198. 1999.

- Гамбурцева А.Г., Орлов О.Ю. Красящие клетки роговицы терпуга. Цитология. 18(6): 676– 682. 1976. [Gamburtzeva A.G., Orlov O.Yu. Staining cells of the cornea of greenling. Tsitilogiya. 18(6): 676–682. 1976. (In Russ)].
- Орлов О.Ю., Гамбурцева А.Г. Динамика окраски роговицы терпуга. Биофизика. 21(2): 362–365. 1976. [Orlov O.Yu., Gamburtzeva A.G. Dynamics of corneal coloration of greenling. Biofizika. 21(2): 362–365. 1976. (In Russ)].
- Гамбурцева А.Г., Гнюбкина В П., Кондрашев С.Л., Орлов О.Ю. Хроматофоры и окраска роговицы рыб Японского моря. Биология моря. 6: 44–51. 1979. [Gamburtseva A.G., Gnyubkina V.P., Kondrashev S.L., Orlov O.Yu. Chromatophores and changeable coloration of cornea of fishes from the Sea of Japan. Biologiya morya. 6: 44–51. 1979. [In Russ)].
- Гамбурцева А.Г., Свиткина Т.М., Тинт И.С., Кондрашев С.Л., Сахаров В.Б. Особенности строения поверхности хроматофоров в роговице с переменной окраской у рыб. Цитология. 35(4): 49–53. 1993. [Gamburtzeva A.G., Svitkina T.M., Tint I.S., Kondrashev S.L., Sakharov V.B. Peculiarities of the chromatophore surface structure in the fish cornea with changeable coloration. Tsitologiya. 35(4): 49–53. 1993. [In Russ)].
- 9. *Kondrashev S.L.* Long-wave sensitivity in the masked greenling (*Hexagrammos octogrammus*), a shallow-water marine fish. Vision Res. 48: 2269–2274. 2008.
- 10. Kondrashev S.L., Lamash, N.E. Unusual A1/A2-visual pigment conversion during light/dark adaptation in marine fish. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 238: 110560. 2019.
- 11. *Kondrashev S.L., Khodtsev A.S.* Light-dependent and humoral control of pigment transport in corneal chromatophores in marine fishes. Zool. Jb. Physiol. 88: 317–325. 1984.
- 12. Гнюбкин В.Ф. Реакции пигментированной роговицы глаза пятнистого терпуга на изменение освещения. Биология моря. 1: 25–32. 1989. [*Gnyubkin V.F.* Responses of the pigmented cornea of the white-spotted greenling to changes in illumination. Biologiya morya. 1: 25–32. 1989. (In Russ)].
- 13. *Kondrashev S.L.* Spectral sensitivity of photoreceptors and screening function of the eye cornea of greenlings (Hexagrammidae). Russ. J. Mar. Biol. 45: 22–30. 2019.
- 14. Kondrashev S.L., Gamburtzeva A.G., Gnjubkina V.P., Orlov O.J., Pam Thi My. Coloration of corneas in fish. A list of species. Vision Res. 26: 287–290. 1986.
- 15. *Appleby S.J., Muntz W.R.A.* Occlusable yellow corneas in Tetraodontidae. J. Exp. Biol. 83: 249–259. 1979.
- 16. *Siebeck U.E., Marshall N.J.* Ocular media transmission of coral reef fish-can coral reef fish see ultraviolet light? Vision Res. 41(2): 133–149. 2001.
- 17. *Siebeck U.E., Collin S.P., Ghoddusi M., Marshall N.J.* Occlusable corneas in toadfishes: light transmission, movement and ultrastructure of pigment during light- and dark-adaptation. J. Exp. Biol. 206: 2177–2190. 2003.
- Losey G.S., McFarland W.N., Loew E.R., Zamzow J.P., Nelson P.A., Marshall N.J. Visual biology of Hawaiian coral reef fishes. I. Ocular transmission and visual pigments. Copeia. 3: 433–454. 2003.
- 19. Bowmaker J.K. Evolution of vertebrate visual pigments. Vision Res. 48: 2022–2041. 2008.
- Pignatelli V., Champ C., Marshall J., Vorobyev M. Double cones are used for colour discrimination in the reef fish, *Rhinecanthus aculeatus*. Biol. Lett. 6: 537–539. 2010.
- 21. Brenner S., Elgar G., Sanford R., Macrae A., Venkatesh B., Aparicio, S. Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. Nature. 366: 265–268. 1993.
- 22. *Neafsey D.E., Hartl D.I.* Convergent loss of an anciently duplicated, functionally divergent RH2 opsin gene in the fugu and Tetraodon pufferfish lineages. Gene. 350: 161–171. 2005.
- 23. *Kleinschmidt J., Harosi F.I.* Anion sensitivity and spectral tuning of cone visual pigments in situ. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89: 9181–9185. 1992.
- 24. Zak P.P., Ostrovsky M.A., Bowmaker J.K. 2001. Ionochromic properties of long-wave-sensitive cones in the goldfish retina: an electrophysiological and microspectrophotometric study. Vision Res. 41: 1755–1763. 2001.
- 25. *Bridges C.D.B.* The rhodopsin-porphyropsin visual system. In: Handbook of sensory physiology. Vol. 7/1. Springer. Berlin. 417–480. 1972.
- Eschmeyers catalog of fishes: Genera, Species, References. Fricke R., Eschmeyer W. N. & R. van der Laan. (Eds.). 2019. (http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp). Electronic version accessed 15.01.2020.
- Govardovskii V.I., Fyhrquist N., Reuter T., Kuzmin D.G., Donner K. In search of the visual pigment template. Vis. Neurosci. 17(4): 509–528. 2000.
- 28. *Kondrashev S.L.* Spectral sensitivity and visual pigments of retinal photoreceptors in near-shore fishes of the Sea of Japan. Russ. J. Mar. Biol. 36: 443–451. 2010.
- Говардовский В.И., Зуева Л.В. Простой высокочувствительный регистрирующий спектрофотометр. Цитология. 30(4): 499–502. 1988. [Govardovskii V.I., Zueva L.V. A simple high-sensitive recording microspectrophotometer. Tsitologiya. 30(4): 499–502. 1988. (In Russ)].
- Toyama M., Hironaka M., Yamahama Y., Horiguchi H., Tsukada O., Uto N., Ueno Y., Tokunaga F., Seno K., Hariyama T. Presence of rhodopsin and porphyropsin in the eyes of 164 fishes, representing marine, diadromous, coastal and freshwater species a qualitative and comparative study. Photochem. Photobiol. 84: 996–1002. 2008.

- Isayama T., Makino C.L. Pigment mixtures and other determinants of spectral sensitivity of vertebrate retinal photoreceptors. In: Akutagawa E., Ozaki K. (Eds.). Photoreceptors: Physiology, Types and Abnormalities. Nova Science Publishers. 1–31. 2012.
- 32. Yokoyama S., Radlwimmer F.B. The molecular genetics of red and green color vision in mammals. Genetics. 153: 919–932. 1999.
- Kondrashev S.L., Miyazaki T., Lamash, N. E., Tsuchiya, T. Three cone opsin genes determine the properties of the visual spectra in the Japanese anchovy Engraulis japonicus (Engraulidae, Teleostei). J. Exp. Biol. 216: 1041–1052. 2013.
- 34. Орлов О.Ю. Зрительная система терпуга. Механизмы зрения животных. М. Наука. 180– 199. 1978. [Orlov O.Yu. Visual system of greenlings. In: Mekhanizmy zreniya zhivotnykh (Mechanizms of animal' vision). Moscow. Nauka. 180–199. 1978. (In Russ)].
- 35. Heinermann P. H. Yellow intraocular filters in fishes. Exp. Biol. 43: 127-147. 1984.
- 36. Yamanoue Y., Miya M., Matsuura K., Katoh M., Sakai H., Nishida M. A new perspective on phylogeny and evolution of tetraodontiform fishes (Pisces: Acanthopterygii) based on whole mitochondrial genome sequences: Basal ecological diversification? BMC Evol. Biol. 8: 212. 2008.
- 37. Кондрашев С.Л., Орлов О.Ю., Говардовский В.И. Фоторецепторы сетчатки и переменная окраска роговицы иглобрюха Tetraodon leiurus. X Всес. совещание эвол. физиол. Ленинград, 28-30 ноября 1990 г. Тезисы докладов. Л. Наука. 71–72. 1990. [Kondrashev S.L., Orlov O.Yu., Govardovskii V.I. Retinal photoreceptors and changeable colouration of the cornea in pufferfish, Tetraodon leiurus. X Vsesoyuznoye soveshchaniye po evolyutsionnoi fiziologii. Leningrad, 28–30 Nov. 1990. Abstracts. Leningrad. Nauka. 71–71. 1990. (In Russ)].

Diversity and Adaptive Properties of the Visual Pigments in Fish with Changeable Corneal Colouration

S. L. Kondrashev*

Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 690041 Vladivostok, Russia *e-mail: navodon@rambler.ru

The properties of the visual pigments in several fish species that possess a unique physiological mechanism of changing the corneal colouration depending on the intensity of ambient illumination are described in the present paper. The absorbance spectra of the visual pigments and the spectral characteristics of the cornea have been measured in masked greenling *Hexagrammos octogrammus* and five fish species of the order Tetraodontiformes using microspectrophotometry. In all the species, retinal photoreceptors contain a mixture of the rhodopsin (A1) and porphyropsin (A2) pigments in different proportions, from 0 to 100%. The experiments with double cones in a chloride-free medium have revealed a shift of λ_{max} in some of the pigments to the shortwave region (ionochromic effect). This suggests that pufferfishes have one pigment of the LWS type ($\lambda_{max} = A2_{567}$ nm), while greenling has two LWS-pigments ($\lambda_{max} = A2_{625}$, and A1_560 nm). The shift of the spectral absorbance of double cones towards the longwave region in pufferfish, as compared to that in most other shallow-sea fishes, is probably explained by the presence of a changeable yellow-orange carotenoid corneal filter.

Keywords: fish, *Tetraodontidae*, *Hexagrammos octogrammus*, microspectrophotometry, visual pigments, ionochrome effect, corneal colouration, physiological adaptation

ЦИТИРОВАТЬ:

Кондрашев С.Л. Разнообразие и адаптивные свойства зрительных пигментов рыб с изменяемой окраской роговицы. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(4): 474–485. DOI: 10.31857/S0869813920040032

TO CITE THIS ARTICLE:

Kondrashev S.L. Diversity and Adaptive Properties of the Visual Pigments in Fish With Changeable Corneal Colouration. Russian Journal of Physiology. 106(4): 474–485. DOI: 10.31857/S0869813920040032 РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 486-503

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ГАНГЛИОЗНЫЕ КЛЕТКИ С ФОНОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ СЕТЧАТКИ РЫБ И ИХ ВОЗМОЖНАЯ ФУНКЦИЯ В ОЦЕНКЕ ЗРИТЕЛЬНОЙ СЦЕНЫ

© 2020 г. Е. М. Максимова¹, А. Т. Алипер¹, И. З. Дамянович¹, А. А. Зайчикова^{1, 2}, П. В. Максимов^{1, *}

¹Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, Россия ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия *E-mail: pmaximov@iitp.ru

> Поступила в редакцию 31.01.2020 г. После доработки 17.02.2020 г. Принята к публикации 17.02.2020 г.

Регистрировали экстраклеточно импульсную фоновую активность одиночных ганглиозных клеток от окончаний их аксонов в тектум оптикум живой обездвиженной рыбы. Размеры рецептивных полей ON- и OFF-элементов с фоновой активностью (ЭФА) составляли $4^{\circ}-5^{\circ}$ и были сопоставимы с таковыми детекторов признаков. Для возникновения импульсного разряда ЭФА необходимо наличие контраста между центром и периферией рецептивного поля. В отсутствие контраста импульсная активность не возникает. Величина реакции монотонно зависела от степени этого контраста. ЭФА как ON-, так и OFF-типа связаны с тремя типами колбочек (L, M, S). Как в центре, так и на периферии рецептивного поля обнаружена цветовая оппонентность, причем центр и периферия рецептивного поля оппонентны по этому признаку. Иными словами, ЭФА являются дважды оппонентными и, следовательно, могут принимать участие в цветоразличении. Совместная работа детекторов признаков и ганглиозных клеток с фоновой активностью, разделенной по ON- и OFF-каналам, представленная ретинотопически, может обеспечить нейроны тектум оптикум необходимой информацией о зрительной сцене для осуществления его функции – контроля внешнего внимания.

Ключевые слова: зрение, *Carassius gibelio*, ганглиозные клетки, экстраклеточные реакции, рецептивное поле, контрастная чувствительность, тектум оптикум, цветное зрение

DOI: 10.31857/S0869813920040044

Поведение рыб во многом определяется зрением [1]. Врожденные зрительно управляемые формы поведения: фототаксис, оптомоторная реакция, охотничье поведение (prey-catch) и оборонительный рефлекс — избегание (avoidance) наблюдаются уже у четырехдневных мальков и сохраняются во взрослом состоянии [2, 3]. В организации всех этих разных форм поведения участвует тектум оптикум (TO) — главный первичный зрительный центр рыб [4]. Удаление TO или определенных его нейронов приводит к устранению или нарушению этих поведенческих реакций [5, 6]. Нейроны TO имеют дело уже с результатами первичной обработки изображения внешнего мира, формируемого оптикой глаза на матрице фоторецепторов. Эта обработка осуществляется параллельно ансамблями биполярных, горизонтальных, амакриновых клеток и завершается на дендритах ганглиозных клеток (ГК) — выходных нейронах сетчатки. В сетчатке рыб описано два десятка морфофункцио-

нальных типов ГК, каждый из которых сформирован специфическими связями его дендрита с входными нейронами [7, 8]. Дендритные мозаики ГК каждого типа полностью покрывают всю поверхность сетчатки на своем уровне стратификации внутреннего синаптического слоя (ВСС) сетчатки, практически не перекрываясь (тайлинг) [9–12]. Так, соответственно количеству морфофункциональных типов ГК уже в сетчатке формируются около двух десятков разных "описаний" картины внешнего мира. Эти "описания" в виде импульсных реакций ГК поступают по зрительным волокнам в 10 первичных зрительных центров [13, 14]. У рыб 98% аксонов ГК приходит в ТО. Аксоны входят в ростральный отдел контралатерального ТО, распределяются ретинотопически и оканчиваются на разных уровнях ретинореципиентного слоя (Stratum Fibrosum et Griseum Superficiale – SFGS), где контактируют с дендритами нейронов собственно TO [4, 8, 15–18].

Методом микроэлектродной экстраклеточной регистрации от окончаний аксонов ГК в ТО живой рыбы обнаружены реакции тринадцати разных типов детекторов признаков. Это реакции шести типов дирекционально избирательных ГК, или детекторов направления движения; два типа детекторов ориентированных линий (горизонтального и вертикального края); детекторы малого белого и черного пятна; цвето-оппонентные ГК (одного типа из многих, описанных в сетчатке) и ГК ОN- и OFF- типов с лабильной фоновой активностью [19–22].

Окончания ГК, детектирующих разные признаки изображения, образуют ретинотопические карты выделяемого ими признака, каждый тип на своем уровне. Оценено и взаиморасположение одиночных источников этих ретинальных реакций друг относительно друга и нейронов собственно ТО [21]. Набор (комплект) из нескольких карт признаков (таких как знак контраста стимула относительно фона, его размер, направление движения, ориентация), расположенных стопкой друг под другом составляют ретино-тектальную карту значимых признаков (saliency map). Считается, что в ТО по карте значимых признаков происходит выбор главного объекта, видимого в поле зрения (рор-out stimulus), и переключение на него внимания [6, 23–28].

Наблюдение за свободно плавающими (и частично обездвиженными) мальками Данио (в возрасте от четырех до двенадцати дней после оплодотворения) дает представление о том, реакции каких специализированных ГК – детекторов признаков, описанных выше, используются в поведении. В охотничьем поведении – это детекторы малых пятен и дирекционально избирательных ГК. Объекты, меньшие 5°, интерпретируются как пищевые, и вызывают охотничье поведение; объекты, превышающие 10°, вызывают реакцию избегания [2, 29]. Реакции детекторов ориентированных линий (вертикального и горизонтального края), вероятно, используются в оптомоторной реакции (Поведение рыбы в оптомоторном барабане – экспериментальный вариант стайного поведения) [30–33].

Для целостного восприятия зрительной сцены животному необходимы сведения не только о потенциальных хищниках и пищевых объектах, которые поставляют детекторы признаков. Освещенность обстановки, равномерность или неоднородность этого освещения, его интенсивность, цвет — важные факторы внешней среды. Такой информации ни дирекционально избирательные ГК, ни детекторы ориентированных линий, ни детекторы пятна, предоставить не могут, так как работают практически по принципу "все или ничего" в широком диапазоне освещенностей вне зависимости от их уровня, реагируя только на "свои" стимулы [22, 34—36]. Более того, детекторы признаков вообще не реагируют на общее изменение освещенности.

Сведения об освещенности могут поставлять в ТО ГК, обладающие некоторым лабильным уровнем фоновой активности. У одних из них он градуально повышается на свету и тормозится затемнением, у других, напротив, усиливается в темноте и тормозится светом [21, 37].

Настоящая работа посвящена изучению свойств OFF- и ON-элементов с фоновой активностью (ЭФА) — структуре рецептивных полей (РП), контрастной чувствительности, связи с разными типами колбочек — для ответа на вопрос о предполагаемой функции этих ГК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом исследования был серебряный карась (*Carassius gibelio*). Опыты ставили также на карпах (*Cyprinus carpio*), плотве (*Rutilus rutilus*), окуне (*Perca fluviatilis*). Проведены опыты на восьми карпах, двадцати девяти карасях, четырех плотвицах и двух окунях. Работа проводилась на компьютеризованной установке собственной оригинальной конструкции, позволяющей предъявлять разнообразные зрительные стимулы и записывать ответные импульсные реакции в разных форматах. Стандартные экспериментальные процедуры, используемые при стимуляции (обмер РП, контрастная чувствительность и др.) оформлены в виде программных инструментов. Установка содержит усилитель переменного тока (полоса пропускания 100 Гц–3.5 кГц), аналого-цифровой преобразователь (частота дискретизации 25 кГц) и систему из трех взаимосвязанных и синхронизированных компьютерных модулей. Она была подробно описана в наших предыдущих работах [38–40]. Результаты опытов и их offline обработка заносились в базу данных. В процессе опыта картину импульсации наблюдали на экране осциллографа C1-73 и прослушивали через громкоговоритель.

Рыбу, обездвиженную тубокурарином (0.3 мг на 100 г массы тела), помещали в естественном положении в аквариум из плексигласа, через прозрачную стенку которого она смотрела правым глазом на экран монитора (LG Flatron 775 FT) стимулирующего компьютера. Расстояние рыбы до экрана было около 30 см. Рыбу перфузировали аэрируемой водой через жабры. Уровень воды в аквариуме поддерживался постоянно на таком уровне, чтобы глаза находились под водой, но вода не заливалась в мозг. В опыте циркулировало примерно 10 л воды. Работали в основном в боковых полях зрения.

Для доступа к зрительным долям тектума у рыбы с левой стороны черепа, контралатерально относительно "рабочего" правого глаза, удаляли теменно-затылочную кость, убирали жировую клетчатку и вскрывали мягкую оболочку мозга. С рыбами обращались в соответствии с директивой European Communities Council от 24 ноября 1986 г. Экспериментальные процедуры были одобрены этическим комитетом ИППИ РАН (Протокол № 1 от 24 апреля 2018 г.).

Ответы ганглиозных клеток регистрировали от окончаний их аксонов в ретинореципиентном слое — stratum fibrosum et griseum superficiale (SFGS) ТО самодельными, заключенными в стекло металлическими платинированными микроэлектродами с платиновой шляпкой диаметром 3—5 мкм и сопротивлением 200—500 кОм на частоте 1 кГц [41]. Под контролем бинокуляра (Olympus SZ51) с помощью микроманипулятора (MP-225, Sutter Instrument) подводили микроэлектрод к интересующей области поверхности тектума согласно ретинотопической проекции [15]. Осторожно погружая микроэлектрод, добивались стабильного одиночного отведения, о чем судили по одинаковой величине импульсов, значительно превышающей шум, и их звучанию. Глубина регистрируемых реакций оценивалась относительно поверхности ТО по показаниям на экране микроманипулятора.

Типичные размеры РП ретинальных элементов обычно составляют единицы градусов, поэтому в ходе опытов не было нужды двигать стимулы по всей поверхности экрана (размером $45^{\circ} \times 35^{\circ}$). Область стимуляции обычно ограничивали квадратом со стороной около 11°. На остальной части экрана поддерживалась не-изменная яркость. В экспериментах, описанных в настоящей статье, использова-

лись как ахроматические, так и цветные стимулы (о чем рассказано подробнее в соответствующих разделах статьи).

Измерение рецептивных полей

Положение и размер РП (точнее, его возбудительной части – reactive receptive field) оценивали методом "шахматной доски" ("random checkerboard"). Последовательно в псевдослучайном порядке на экране в пределах квадратной области стимуляции 11° × 11° предъявляли вспыхивающие пятна (квадратные) небольшого размера (1.5°) и записывали величины реакций (количество спайков за стандартное время). Как правило, выбирали $7 \times 7 = 49$ положений стимулов. При обработке данных зависимость величины ответа от положения стимула в области стимуляции представляли в виде двумерной гауссианы. Для определения ее параметров по полученным экспериментальным данным рассчитывали моменты распределения математические ожидания, дисперсии и ковариацию. Полученные математические ожидания характеризуют положение найденного центра РП клетки в области стимуляции, а дисперсии и ковариация характеризуют размер и форму возбудительной части РП. Границей возбудительной части РП считали эллипс, являющийся пересечением рассчитанной двумерной гауссианы с плоскостью $f = f_{\text{max}}/e$, где f_{max} максимум гауссовой функции, е ≈ 2.72 – основание натурального логарифма. При этом длины большой и малой осей этого эллипса получаются равными $2\sqrt{2}$ от рассчитанных для гауссианы максимального и минимального среднеквадратических отклонений. За размер возбудительной части РП принимали среднее геометрическое от длин осей этого эллипса. Результаты обработки представляли в виде карты в географической палитре.

Контрастная чувствительность

Для систематического измерения контрастной чувствительности применялся специальный программный инструмент. На фоне некоторой задаваемой экспериментатором яркости в центре РП вперемежку предъявлялись стимулы (движущиеся границы или вспыхивающие пятна) разных яркостей и строились графики зависимости среднего количества импульсов в залпе ГК от яркости стимула [38]. При измерении контрастной чувствительности на периферии РП яркость изменялась сразу по всей периферии (при неизменной яркости в центре РП).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общие свойства

Реакции элементов с фоновой активностью (ЭФА) регистрируются на глубине 190—200 мкм от поверхности, глубже шести типов дирекционально избирательных ГК, двух типов ориентационно избирательных элементов и двух типов детекторов пятна (рис. 1).

Одни из них активируются в темноте и тормозятся светом (OFF-тип), другие, напротив, активируются на свету и тормозятся затемнением (ON-тип). Как правило, суммарная активность тех и других регистрируется одновременно. При этом на слух, по высоте звука, отчетливо различаются спайки элементов с темновой активностью, звук у которых ниже, чем у элементов со световой активностью. По субъективной оценке на слух не вызывает сомнений то, что фоновая активность, усиливающаяся при посветлении, регистрируется глубже темновой, т.е., что генераторы этой активности — терминали аксонов ГК — располагаются чуть глубже генераторов темновой фоновой активности. Однако по результатам измерений глубины регистрации ЭФА ON- и OFF-типов оказываются в одном кластере (рис. 1).



Рис. 1. Три кластера в ретинореципиентном слое TO, где экстраклетоточно отводятся реакции ГК – детекторов разных признаков от окончаний их аксонов. Применен критерий Краскела–Уоллиса при p < 0.05. Данные представлены в виде медиана \pm интерквартильный размах. Прямоугольниками выделены три кластера, между которыми есть статистически значимые различия. Слева – дирекционально избирательные ГК; в центре – детекторы ориентированных линий, детекторы малых пятен; справа – ГК с фоновой активностью (ЭФА) ОN- и OFF-типов. Обозначения: rDSU c/r, rDSU d/v, rDSU v/d – ретинальные дирекционально-избирательные элементы каудо-рострального (41 элемент), дорзо-вентрального и вентро-дорзального предпочтительных направлений соответственно (в сумме 25 элементов); rSD – ретинальные детекторы малых пятен (29 элементов); rOSU – ретинальные ориентационно-избирательные элементы (15 элементов); rdSust и rlSust – ЭФА OFF- и ON-типов соответственно (45 и 13 элементов соответственно).

Fig. 1. Three clusters in retinorecipient layer of TO; the responses were recorded extracellularly from the axon terminals of retinal ganglion cells (GCs). We used Kruskal-Wallis test with p < 0,05. Data are presented as median \pm interquartile range. Three statistically different clusters are indicated by rectangles. From left to right: DSGCs; group formed by OSGCs, spot detectors; sustained GCs (SGCs) of OFF- and ON-types. Designations: rDSU c|r, rDSU v|d, rDSU d|v – retinal direction-selective units of the caudo-rostral (41 unit), ventro-dorsal and dorso-ventral preferred directions, respectively (25 units in total); rSD – retinal spot detectors (29 units); rOSU – retinal orientation-selective units (15 units); rdSust and rlSust – SGCs of OFF- and ON-types (45 and 13 units, respectively).

Выделение одиночной (элементарной) реакции ЭФА из общего хора длящейся активности требует определенного навыка и выполнено нами впервые. Показателем одиночности отведения (кроме оценки на слух и одинаковости амплитуды спайков в разряде) служит отсутствие импульсов в период рефрактерности при записи реакции на ждущей развертке (рис. 2).

Рецептивные поля элементов с фоновой активностью OFF- и ON-типов

ЭФА реагируют не только на изменение общего освещения, но и на движение границы или пятна в их поле зрения. Реагируют они и на мелькающее пятно небольшого, примерно 1.5° , размера. Это позволяет картировать их рецептивное по-



Рис. 2. Критерии одиночности экстраклеточного отведения. Сверху – длящаяся импульсная активность ЭФА ОN-типа, отмечен порог (250 мкВ) для амплитудной дискриминации; внизу – запись активности на ждущей развертке (наблюдается отсутствие спайков в рефрактерный период). Слева – конфигурация стимула (размер белого пятна составляет 11°).

Fig. 2. The criteria of single unit response recorded extracellularly. The maintained response of an USR of ON-type; the threshold $(250 \,\mu\text{V})$ for amplitude discrimination is marked by horizontal line; below – the same discharge represented in spike driven extended sweep. The stimulus configuration (11° white spot) – on the left.

ле, а точнее его центральную возбудительную область (reactive receptive field), стандартным методом "шахматной доски" (см. "Методы исследования") (рис. 3).

Проведено картирование РП 112 OFF-элементов черными пятнышками на белом фоне и 77 ON-элементов белыми пятнышками на черном фоне. Распределение размеров РП представлено на рис. 4.

Зависимость реакции ЭФА от характера освещения

РП большинства ГК имеют центрально-периферическую оппонентную организацию. Затемнение или освещение периферии сказывается обычно на величине центральной реакции ГК, но само по себе не вызывает реакции клетки. Отличительным свойством ЭФА является то, что стимуляция только периферии поля (при неизменном центре) вызывает отчетливую реакцию. Так ЭФА ОN-типа реагируют на освещение центра РП и на затемнение периферии. ЭФА OFF-типа отвечают на затемнение центра РП и на осветление периферии. Непременным условием возбуждения ЭФА является наличие контраста центра и периферии РП (рис. 5*A*, 6*A*). Самая мощная длящаяся реакция тех и других (ON- и OFF-ЭФА) возникает при условии максимального контраста центра и периферии их РП. Эта импульсация прекращается (или сильно ослабевает), если периферию РП сделать неотличимой по контрасту от центра (рис. 5*B*, 6*B*). Неожиданно было впервые увидеть, что на затемнение всего поля зрения (экрана монитора 45° × 35°) отсутствует (или прекращается) реакция ЭФА OFF-типа. Также и ЭФА ON-типа не отвечают на равномерно осве-



Рис. 3. Рецептивные поля ЭФА OFF-типа (слева) и ON-типа (справа), картированные методом "шахматной доски". Эллипсами обозначены оценки границ возбудительных зон рецептивных полей. Fig. 3. Receptive field (RF) maps of the USRs of OFF- and ON- types (left and right, respectively), measured by the random checkerboard method. Ellipses indicate the estimated borders of the reactive receptive fields. Below is a scale in the geographic palette.



Рис. 4. Гистограммы распределения размеров рецептивных полей 189 ЭФА. Размеры представлены в виде: среднее \pm среднеквадратичное отклонение. Слева – суммарная выборка из 189 ЭФА обоих типов (5.0° \pm 1.13°), в центре – выборка из 112 темновых ЭФА (OFF-тип) (4.8° \pm 1.19°), справа – выборка из 77 световых (ОN-тип) (5.2° \pm 0.99°).

Fig. 4. Histograms of the distribution of USR RFs by size. On the left is the total sample (189 USRs): $5.0^{\circ} \pm 1.13^{\circ}$ (mean \pm SD); OFF-USRs in the center (112 USRs): $4.8^{\circ} \pm 1.19^{\circ}$; ON USRs on the right (77 USRs): $5.2^{\circ} \pm 0.99^{\circ}$.

щенный экран. Это говорит о том, что процессы возбуждения в центре РП и торможения с периферии так уравновешены, что одновременная однородная стимуляция той и другой областей РП не приводит к генерации импульсного разряда (рис. 5*B*, 6*B*).

Появление минимального контраста между центром РП и периферией сразу вызывает ответную реакцию ЭФА. Контрастную чувствительность и зависимость величины реакции от степени контраста стимула и фона в центре РП измеряли двумя способами: движущейся контрастной границей по неизменному фону или мелькающим в центре поля пятном, по размеру близким к размеру центра РП.

Проведено исследование зависимости величины реакции (количества спайков) от яркости центра и периферии РП. На 114 ЭФА OFF-типа и 60 ЭФА ON-типа





Fig. 5. Maintained spike activity of the OFF-type USR observed when the center of its RF is darker then far surround (above), and absence of the activity when far surround is dark too (in the absence of contrast between the center and the surround). The stimuli configurations are shown on the left.

произведены измерения контрастной чувствительности при изменяющейся яркости в центре РП и неизменной яркости периферии. На 35 ЭФА OFF-типа и 23 ЭФА ON-типа проведены измерения при изменяющейся яркости периферии и неизменной яркости в центре РП. Рис. 7 иллюстрирует результаты такого опыта на ЭФА OFF-типа.

Иногда при одном положении электрода можно зарегистрировать одновременно одиночные реакции ON- и OFF-ЭФА [21]. Положения РП таких элементов практически совпадают. Можно думать, что такая пара ГК конвергирует на один тектальный нейрон, который по соотношению мощности импульсации этих элементов составляет свое представление об освещении в данной области пространства.

У рыб четырех видов наблюдается совпадение таких характеристик исследованных клеток, как размеры РП, зависимость мощности реакции от интенсивности стимула в центре РП и зависимости реакции от контраста периферии и центра РП.

Цветовые свойства ЭФА ОЛ- и OFF-типов

Рыбы в поведении демонстрируют хорошее цветное зрение [42]. В сетчатке взрослых карасей и карпов имеется три типа колбочек с максимумами чувстви-



Рис. 6. Условие возникновения реакции ЭФА ОN-типа. Вверху (A) — установившаяся импульсная реакция ЭФА ON-типа при светлом центре РП и более темной дальней периферии; внизу (B) — значительно сниженная импульсная активность при освещенной дальней периферии РП (отсутствии контраста центра и окружения). Слева — конфигурация стимулов.

Fig. 6. Maintained spike activity of the ON-type USR observed when the center of its RF is brighter then far surround; significantly reduced spike activity in the absence of contrast between the center and its surround. Other conventions are the same as on the previous figure.

тельности 623, 535, и 454 нм [43–45]. Богатый набор цветооппонентных клеток в сетчатке (биполяров, горизонтальных и ганглиозных клеток) свидетельствует о соответствующей обработке сигналов от колбочек разных типов [46–53]. В то же время показано, что многие типы ганглиозных клеток, проецирующиеся в TO, будучи связаны со всеми тремя типами колбочек, не обладают цветоразличительными способностями и демонстрируют принцип унивариантности [54–56]. Мы постарались выяснить, каковы цветовые свойства ЭФА. В свете гипотезы о том, что они формируют представление об освещенности обстановки, цветоразличение было бы весьма полезно.

Кривые спектральной чувствительности колбочек (L – длинноволновых, М – средневолновых, S – коротковолновых) перекрываются. Вследствие этого возбудить отдельные типы колбочек насыщенными узкополосными спектральными стимулами от темноты невозможно. Можно, однако, от некоторого общего уровня возбуждения добавить или убавить возбуждение одного выбранного типа колбочек (или двух). Такие инкрементные (+) и декрементные (–) стимулы были рассчитаны для L, M, и S колбочек карася, исходя из возможностей монитора (LG Flatron

Рис. 7. Зависимости реакций ЭФА OFF-типа от контраста стимула и фона в центре РП и от контраста центра и окружения. Слева – реакция на вспыхивающее в центре РП пятно размером 11°. По оси абсцисс – яркость стимула (в мониторных и энергетических величинах), по оси ординат – число импульсов в ответе клетки за время вспышки (700 мс). Вертикальной штриховой линией обозначена яркость фона. Справа – реакция на изменение яркости далекого окружения (60 × 40 угловых градусов) при отсутствии изменений в центральной области (серое пятно размером 11°). По оси абсцисс – яркость далекого окружения (в мониторных и энергетических величинах), по оси ординат – число импульсов в ответе клетки за время вспышки (700 мс). Вертикальной штриховой линией обозначена яркость далекого окружения (в мониторных и энергетических величинах), по оси ординат – число импульсов в ответе клетки за время вспышки дальней периферии (700 мс). Вертикальной штриховой линией обозначена яркость далекого окружения (в мониторных и энергетических величинах), по оси ординат – число импульсов в ответе клетки за время вспышки дальней периферии (700 мс). Вертикальной штриховой линией обозначена яркость центрального пятна.

Fig. 7. Dependences of the responses of the OFF-type USR on the contrast of the stimulus and the background in the center of the RF and on the contrast of the center and surround. On the left is a response to a big spot (11°) flashing in the center of the RF on the grey background. On the abscissa axis is the stimulus brightness (in monitor and energy values), on the ordinate axis is the number of spikes in the unit discharge during the flash (700 ms). The vertical dashed line indicates the brightness of the background. On the right is the response to a change in the brightness of the far surround (60×40 angular degrees) in the absence of changes in the center of the RF (gray spot 11° in size). On the abscissa axis is the brightness of the far surround (in monitor and energy values), on the ordinate axis is the number of spikes in the unit discharge during the flash of the far periphery (700 ms). The vertical dashed line indicates the brightness of the central spot.

775FT) [55, 56]. Исследование цветовых свойств ЭФА при помощи селективной стимуляции каждого из трех типов (L, M, S) колбочек проведено на 176 элементах ЭФА OFF-типа и на 59 элементах ЭФА ON-типа. (Цветовые свойства ЭФА мы изучали только на двух видах — карасе и карпе, т.к. кривые спектральной чувствительности колбочек окуня и плотвы в точности неизвестны).

С помощью этих стимулов показано, что и темновые, и световые ЭФА связаны со всеми тремя типами колбочек, причем не единообразно. У темновых ЭФА выделено три основных типа связей: 1) длящаяся реакция вызывается стимулами (L+-, M-, S+); 2) другие реагируют на стимулы (L-, M+-, S+); 3) третьи – на стимулы (L+-, M+-, S+-).

То, что уменьшение возбуждения любого типа колбочек (декрементные стимулы) вызывает реакцию в ЭФА OFF-типа ожидаемо и нормально. Но наличие ON-реакции на увеличение возбуждения по какому-либо из каналов (L, M, S) в ЭФА OFF-типа кажется парадоксальным (рис. 8).

При помощи стимулов, предъявляемых в центре РП, возбуждающих различные типы колбочек попарно, обнаружено тормозное и (в редких случаях) усилительное взаимодействие сигналов от разных типов колбочек. Реакция на совместное воз-

Рис. 8. Растровое представление реакций ЭФА OFF-типа на цветные селективные стимулы, включаемые в центре РП при неизменной серой периферии. Серая полоса обозначает время действия стимула. Каждый стимул предъявлялся шесть раз. Цвета селективных инкрементных (+) и декрементных (-) стимулов представлены буквами, соответствующими типу возбуждаемых ими колбочек. Обратите внимание на парадоксальную реакцию на включение L+ стимула.

Fig. 8. Raster plot of OFF-type USR responses to central flashes of selective colors on the grey background. Grey bar indicates the stimulus presentation time. Each stimulus is presented six times. Selective increment (+) and decrement (-) stimuli are marked by letters, corresponding to the cones which they excite. Please pay attention to the paradoxical response of the OFF-unit to the L + stimulus.

буждение стимулом (L+M+) была всегда меньше, чем реакции на каждый из стимулов (L+ и M+) в отдельности. Даже в том случае, когда реакция на стимул M+ отсутствовала, а на L+ была большая, реакция на стимул (L+M+) была меньше, чем на L+, а то и совсем исчезала (рис. 8). С учетом этих оппонентных взаимодействий между входами становится объяснимо, что при ахроматических стимулах одновременное увеличение возбуждения всех трех входов (L+M+S+) не вызывает реакции темновых ЭФА. Сложные взаимодействия цветовых каналов (в частности, оппонентное взаимодействие между L и M каналами при инкрементной стимуляции этих каналов и усилительное при декрементной) невозможны в унистратифицированных OFF ГК.

Световые ЭФА также разнообразны по признаку зависимости величины реакции от селективного возбуждения L, M, S колбочек. Обычно это реакции на инкрементный стимул для L и декрементные стимулы для M и S колбочек (L+, M-, S-) (рис. 9). Иногда отмечалась и реакции на декрементный стимул для L-колбочек. Наличие достаточно выраженной реакции ЭФА ON-типа на уменьшение возбуждения по каждому из трех типов колбочек (L, M, S) остается парадоксальным (рис. 9).

С учетом этих оппонентных взаимодействий между входами становится объяснимо, что при ахроматических стимулах одновременное увеличение возбуждения всех трех входов (L+M+S+) не вызывает реакции темновых ЭФА, а уменьшение возбуждения по всем трем типам колбочек (L, M, S) не вызывает реакции ЭФА ON-типа (у некоторых ЭФА ON-типа наблюдается сниженная фоновая активность в отсутствие контраста центра и периферии РП). Темновые и световые ЭФА при ахроматической стимуляции выглядят как OFF- и ON-элементы (соответственно) и представлялись нам ранее как ганглиозные клетки, унистратифицированные во внутреннем синаптическом слое (ВСС) сетчатки, получающие входные

Рис. 9. Растровое представление реакций ЭФА ОN-типа на цветные селективные стимулы, включаемые в центре РП. Наблюдается незначительная фоновая активность до предъявления стимула. Обозначения как на рис. 8.

Fig. 9. Raster plot of USR of ON-type responses to selective color stimuli flashing on the grey background in the center of the RF. Slight sustained activity can be seen before the presentation of the stimulus. Other conventions are the same as on the Fig. 8.

сигналы, темновые — от OFF-типа, световые — от ON-типа биполяров, в соответствующих стратах BCC. Обнаруженные в данной работе сложные взаимодействия цветовых каналов в реакциях ЭФА затрудняют такое толкование [57].

Наличие цветовой оппонентности и взаимодействий цветовых каналов, выявленных в реакциях в центре РП ЭФА ОN- и OFF-типов говорит о возможном участии этих ГК в цветоразличении.

Оппонентность центра и периферии

Как уже говорилось, гомогенное освещение (или затемнение) большой области экрана тормозит спонтанную импульсацию как темновых, так и световых ЭФА. Включение тех же цветных стимулов, которыми исследовали центральную часть РП, на всей периферии РП восстанавливает длящуюся активность. Причем эта реакция, вызванная стимуляцией периферии РП, оппонентна той, которую вызывали эти стимулы в центре. Это хорошо видно на рис. 10.

В колонке слева растровая запись темнового ЭФА (того же, что и на рис. 8), в колонке справа – реакция этого же элемента на возбуждение периферии его РП теми же стимулами. Аналогичную картину мы видим и на рис. 11, где представлены реакции светового ЭФА на возбуждение центра и периферии его РП. У этого светового ЭФА (того же, что на рис. 9) гомогенное освещение не полностью затормаживало длящуюся активность. Предъявление стимула (L+) в центре РП вызывало повышение уровня этой активности, а на периферии РП существенно ее тормозило. Такие же противоположные (оппонентные) эффекты наблюдаются для всех без исключения стимулов. Таким образом, ЭФА и ON- и OFF-типов являются дважды оппонентными цветными клетками.

По нашим представлениям оппонентное влияние далекого окружения на реакцию ЭФА обеспечивается с помощью горизонтальных клеток. В сетчатке рыб существует три типа колбочковых горизонтальных клеток. Горизонтальные клетки

Рис. 10. Цветовая оппонентность в центре и на периферии РП ЭФА OFF-типа. Слева – растровое представление ответов элемента на цветные селективные стимулы, включаемые в центре РП при неизменной периферии. Справа – растровое представление ответов элемента на селективные изменения цвета на всей периферии при неизменном центре. Обозначения как на рис. 8.

Fig. 10. Color opponency in the center and on the periphery of the RF of an OFF-type USR. On the left – raster plot of central responses of the unit to the selective color stimuli. On the right – raster plot of unit responses to surround flashes of selective colors with unchanged gray color in the center. Other conventions are the same as in Fig. 8.

Рис. 11. Цветовая оппонентность в центре и на периферии РП ЭФА ОN-типа. Слева – растровое представление ответов элемента на цветные селективные стимулы, включаемые в центре РП при неизменной периферии. Справа – растровое представление ответов элемента на селективные изменения цвета на всей периферии при неизменном центре. Обозначения как на рис. 8.

Fig. 11. Color opponency in the center and on the periphery of the RF of an ON-type USR. On the left – raster plot of central responses of the unit to the selective color stimuli. On the right – raster plot of unit responses to surround flashes of selective colors with unchanged gray color in the center. Other conventions are the same as in Fig. 8.

каждого типа по преимуществу связаны с одним из типов колбочек. Объединенные в независимые электрические синцитии щелевыми контактами эти горизонтальные клетки передают сигнал о возбуждении колбочек на далекие расстояния. Посредством обратной связи с горизонтальных клеток на колбочки и осуществляется оппонентность центра и периферия РП ГК [58–60].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы регулярно регистрировали глубоко в ретинореципиентном слое TO у рыб четырех видов ЭФА ON- и OFF-типов. Наблюдается полное совпадение таких характеристик исследованных клеток, как размеры РП, зависимость мощности реакции от интенсивности стимула в центре РП и зависимость реакции от контраста периферии и центра РП. Во многих отношениях эти элементы выглядят как позитив и негатив.

ЭФА были отмечены ранее в ТО и у других видов рыб [19, 20]. Длящаяся активность, усиливающаяся при потемнении, описана и у лягушки *Rana pipiens* в глубоких слоях ТО [61]. ГК двух типов с фоновой активностью (maintained activity) с аналогичными свойствами описаны и в сетчатке мыши. Это альфа-OFF и альфа-ON ГК. Куда, в какие первичные зрительные центры проецируются эти ГК неизвестно, т.к. работы проводились на изолированной сетчатке [62, 63].

Темновые и световые ЭФА у рыб при ахроматической стимуляции выглядят как OFF- и ON-элементы (соответственно) и ранее представлялись нам тоже (как и у мыши) как ГК, унистратифицированные в OFF- и ON- подпластинах ВСС сетчатки, получающие входные сигналы, темновые – от биполяров OFF-типа, световые – от биполяров ON-типа в соответствующих стратах ВСС. Однако парадоксальные свойства, касающиеся характера связи этих ГК с колбочками разных типов, обнаруженные в данной работе, противоречат такому представлению. Была предложена эмпирическая модель организации коннектомов ЭФА [57]. Это бистратифицированные ГК, возбуждение на которые передается от биполярных клеток ON- и OFF-типов, у каждого из которых присутствуют связи со всеми тремя типами колбочек посредством разных типов синапсов (ионо- и метаботропных). Вопрос о морфологическом субстрате ЭФА обоих типов не может быть решен экспериментально нашей методикой, он требует дальнейшего исследования.

Интересно отметить, что у цветокодирующих ON-элементов лягушки, проецирующихся в ядро Беллончи, тоже наблюдается парадоксальная реакция на уменьшение света при введении синего фильтра в стимулирующий пучок белого света [64]. Это напоминает реакции ЭФА ON-типа карася на декрементный стимул (М–), уменьшающий возбуждения средневолново-чувствительных колбочек.

Одно несомненно, что темновые и световые ЭФА являются дважды оппонентными по цвету ГК. Наличие такого рода нейронов в каком-либо отделе зрительной системы является признаком наличия у животного цветного зрения [65].

ЭФА, изучаемые в настоящей работе, отличаются от описанных нами ранее цветооппонентных элементов R/G типа, проецирующихся в TO рыб [66]. Последние встречаются крайне редко на том же уровне SFGS, что детекторы пятна и детекторы ориентированных линий, и не имеют фоновой активности. ЭФА образуют отчетливо звучащий мощный слой в глубине SFGS и подразделяются на ON- и OFF-типы. Раньше мы предполагали, что у рыб основная информация о цвете из сетчатки поступает не в TO, но в некое (неизвестное нам) специализированное ядро – аналог ядра Беллончи у лягушки [64]. Теперь мы видим, что в TO рыб поступают сведения о цвете от трех типов дважды оппонентных ГК, проецирующихся в разные подслои SFGS.

В одном треке микроэлектрода, погружаемого нормально к поверхности ТО, РП последовательно регистрируемых элементов разных типов полностью или частич-

но перекрываются и находятся в пределах (5°) области, т.е. передают сигналы практически об одной и той же площадке фоторецепторов [21].

Принцип обработки изображения в сетчатке универсален и во многом схож у разных животных, далеких как эволюционно (рыбы, амфибии, рептилии, птицы, млекопитающие), так и экологически (хищные и травоядные, водные и наземные). ГК, детектирующие такие признаки видимых объектов, как размер, ориентация, направление и скорость движения, приближение, удаление, цвет, степень контраста относительно фона, описаны в сетчатках нескольких видов рыб, у черепах, мышей, кролика [12, 15, 19, 34, 67–74]. Логично сделать вывод, что детектирование этих признаков изображения является основой для узнавания видимых объектов. ЭФА передают сведения о неравномерном освещении, об изменении его интенсивности и цвете, а детекторы признаков передают сведения о размере, форме, направлении и скорости перемещения объектов на этом фоне.

ТО – главный первичный зрительный центр рыб – обладает полной информацией об окружающей видимой среде. Здесь формируется карта значимых признаков, соотнесенная с картой тела. С участием нейронов ТО и премоторных ядер выделяется главный объект внимания в поле зрения и выбирается тип поведенческой реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены свойства световых и темновых элементов с фоновой активностью (ЭФА), проецирующихся в ТО рыб. Показана высокая контрастная чувствительность, монотонная (в некоторых пределах) зависимость частоты импульсации от интенсивности освещения центра поля при контрастной ему периферии.

2. Размеры РП ЭФА составляют в среднем 5°, что сопоставимо с таковыми детекторов признаков.

3. Показано, что ЭФА как ON-, так и OFF-типов связаны с тремя типами колбочек.

4. РП ЭФА имеют дважды оппонентную по цвету структуру.

5. Наличие слоя проекций дважды оппонентных по цвету ГК в ТО свидетельствует о существовании цветоразличения на уровне ТО.

6. Представленная ретинотопически, совместная работа детекторов признаков и ЭФА с описанными свойствами, может обеспечить нейроны ТО богатой необходимой информацией о зрительной сцене.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет гранта РФФИ № 16-04-00029 "Нейрофизиологические механизмы восприятия характера освещения зрительной сцены в ретино-тектальной системе серебряного карася".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Cronin T.W., Douglas R.H.* Seeing and doing: how vision shapes animal behaviour. Phil. Trans. R. Soc. B 369. 2014.
- 2. *Bianco I.H., Kampff A.R., Engert F.* Prey capture behavior evoked by simple visual stimuli in larval zebrafish. Front. Syst. Neurosci. 5: 10. 2011.
- 3. *Dunn T.W., Gebhardt C., Naumann E.A., Riegler C., Ahrens M.B., Engert F., Del Bene F.* Neural circuits underlying visually evoked escapes in larval zebrafish. Neuron. 89: 613–628. 2016.
- 4. Northmore D.P.M. The optic tectum. Encyclopedia of fish physiology: From genome to environment. A.P. Farrell (Ed.) 131–142. London. UK: Elsevier. 2011.
- 5. Springer A.D., Easter S.S., Agranoff B.W. The role of the optic tectum in various visually mediated behaviors of goldfish. Brain Res. 128: 393–404. 1977.
- 6. *BarkerA.J., Baier H.* Sensorimotor decision making in the zebrafish tectum. Curr. Biol. 25: 2804-2814. 2015.
- 7. *Mangrum W.I., Dowling J.E., Cohen E.D.* A morphological classification of ganglion cells in the zebrafish retina. Visual Neurosci. 19: 767–779. 2002.

- Robles E., Filosa A., Baier H. Precise lamination of retinal axons generates multiple parallel input pathways in the tectum. J. Neurosci. 33: 5027–5039. 2013.
- 9. Cook J.E., Becker D.L., Kapila R. Independent mosaics of large inner-and outer-stratified ganglion cells in the goldfish retina. J. Comp. Neurol. 318: 355–366. 1992.
- 10. *Cook J.E., Podugolnikova T.A., Kondrashev S.L.* Species-dependent variation in the dendritic stratification of apparently homologous retinal ganglion cell mosaics in two neoteleost fishes. Vision Res. 39: 2615–2631. 1999.
- 11. Field G.D., Chichilnisky E.J. Information processing in the primate retina: Circuitry and coding. Annu. Rev. Neurosci. 30: 1–30. 2007.
- 12. Masland R.H. The neuronal organization of the retina. Neuron 76: 266–280. 2012.
- 13. Johnston J., Lagnado L. What the Fish's Eye Tells the Fish's Brain. Neuron 76: 257–259. 2012.
- 14. *Robles E., Laurell E., Baier H.* The retinal projectome reveals brain-area-specific visual representations generated by ganglion cell diversity. Curr. Biol. 24: 2085–2096. 2014.
- 15. Jacobson M., Gaze R.M. Types of visual response from single units in the optic tectum and optic nerve of the goldfish. Q. J. Exp. Physiol. 49: 199–209. 1964.
- Nikolaou N., Lowe A.S., Walker A.S., Abbas F., Hunter P.R., Thompson I.D., Meyer M.P. Parametric functional maps of visual inputs to the tectum. Neuron. 76: 317–324. 2012.
- 17. *Kassing V., Engelman G., Kurtz R.* Monitoring of single-cell responses in the optic tectum of adult zebrafish with dextrancoupled calcium dyes delivered via local electroporation. PLoS One 8: e62846. 2013.
- 18. Preuss S.J., Triverdi C.A., Berg-Maurer C.M., Ryu S., Bollman J.H. Classification of objectsize in retinotectal microcircuits. Curr. Biol. 24: 2376–2385. 2014.
- 19. Zenkin G.M., Pigarev I.N. Detector properties of the ganglion cells of the pike retina. Biofizika. 14: 763–772. 1969.
- Максимова Е.М., Орлов О.Ю., Диментман А.М. Исследование зрительной системы нескольких видов морских рыб. Вопр. ихтиол. 11: 893–899. 1971. [Maximova E.M., Orlov O.Yu., Dimentman A.M. Investigation of visual system of some marine fishes. Voprocy Ichtiologii 11: 893– 899. 1971. (In Russ)].
- Aliper A. T., Zaichikova A.A., Damjanović I., Maximov P.V., Kasparson A.A., Gačić Z., Maximova E.M. Updated functional segregation of retinal ganglion cell projections in the tectum of a cyprinid fish – Further elaboration based on microelectrode recordings. Fish Physiol. Biochem. 45: 773–792. 2019.
- 22. Maximova E.M., Aliper A.T., Damjanović I., Zaichikova A.A., Maximov P.V. On the organization of receptive fields of retinal spot detectors projecting to the fish tectum: Analogies with the local edge detectors in frogs and mammals. J. Comp. Neurol. 1–13. 2019. https://doi.org/10.1002/cne.24824
- 23. Mysore S.P., Knudsen É.I. The role of a midbrain network in competitive stimulus selection. Curr. Opin. Neurobiol. 21: 653–660. 2011.
- Krauzli R.J., Lovejoy L.P., Zéno A. Superior colliculus and visual spatial attention. Annu. Rev. Neurosci. 36: 165–182. 2013.
- Sridharan D., Schwarz J.S., Knudsen E.I. Selective attention in birds. Curr. Biol. 24: R510– R513. 2014.
- 26. Ben-Tov M., Donchin O., Ben-Shahar O., Segev R. Pop-out in visual search of moving targets in the archer fish. Nat. Commun. 6: 1–11. 2015.
- Kardamakis A.A., Saitoh K., Grillner S. Tectal microcircuit generating visual selection commands on gaze-controlling neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 112: E1956–E1965. 2015.
- Zhaoping L. From the optic tectum to the primary visual cortex: Migration through evolution of the saliency map for exogenous attentional guidance. Curr. Opin. Neurobiol. 40: 94–102. 2016.
- 29. *Bianco I.H., Engert F.* Visuomotor transformations underlying hunting behavior in zebrafish. Curr. Biol. 25: 831–846. 2015.
- 30. Neave D.A. The development of visual acuity in larval plaice (*Pleuronectes platessa L.*) and turbot (*Scophthalmus maximus L.*). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 78: 167–175. 1984.
- 31. Schaerer S., Neumeyer C. Motion detection in goldfish investigated with the optomotor response is color blind". Vision Res. 36: 4025–4034. 1996.
- 32. Dobberfuhl A.P., Ullmann J.F.P., Shumway C.A. Visual acuity, environmental complexity, and social organization in African cichlid fishes. Behav. Neurosci. 119: 1648–1655. 2005.
- 33. Haug M.F., Biehlmaier O., Mueller K.P., Neuhauss S.C.F. Visual acuity in larval zebrafish: Behavior and histology. Front. Zool. 7: 8. 2010.
- Maximov V.V., Maximova E.M., Maximov P.V. Direction selectivity in the goldfish tectum revisited. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1048: 198–205. 2005.
- 35. Damjanović I., Maximova E.M., Maximov V.V. On the organization of receptive fields of orientation-selective units recorded in the fish tectum. J. Integr. Neurosci. 8: 323–344. 2009.
- 36. *Maximov V.V., Maximova E.M., Damjanović I., Maximov P.V.* Detection and resolution of drifting gratings by motion detectors in the fish retina. J. Integr. Neurosci. 12: 117–143. 2013.
- 37. Алипер А. Т. Размеры рецептивных полей спонтанно-активных ганглиозных клеток сетчатки серебряного карася. Сенсорные системы 32: 8-13. 2018. [Aliper A. T. Receptive field sizes of sustained ganglion cells in the goldfish retina. Sensornye Sistemy 32: 8–13. 2018. (In Russ)].

- Максимов В.В., Максимова Е.М., Максимов П.В. Классификация дирекционально-избирательных элементов, регистрируемых в тектуме карася. Сенсорные системы 19: 322– 335. 2005. [Maximov V.V., Maximova E.M., Maximov P.V. Classification of direction-selective units recorded in the goldfish tectum. Sensornye Sistemy 19: 322–335. 2005. (In Russ)].
- Damjanović I., Maximova E.M., Maximov V.V. Receptive field sizes of direction-selective units in the fish tectum. J. Integr. Neurosci. 8: 77–93. 2009.
- 40. *Maximov P.V., Maximov V.V.* A hardware-software complex for electrophysiological studies of the fish visual system. Internat. Symposium "Ivan Djaja's (Jaen Giaja) Belgrade School of Physiology". Belgrade. Serbia. Book of Abstracts. 151. 2010.
- 41. Gesteland R.C., Howland B., Lettvin J.Y., Pitts W.H. Comments on microelectrodes. Proc. IRE 47: 1856–1862. 1959.
- Neumeyer C. Tetrachromatic color vision in goldfish. Evidence from color mixture experiments. J. Comp. Physiol. A 171: 639–649. 1992.
- 43. *MacNichol E.F. Jr.* A unifying presentation of photopigment spectra. Vision Res. 26: 1543–1556. 1986.
- Govardovskii V.I., Fyhrquist N., Reuter T., Kuzmin D.G., Donner K. In search of the visual pigment template. Vision Neurosci. 17: 509–28. 2000.
- 45. Maximova E.M., Govardovskii V.I., Maximov P.V., Maximov V.V. Spectral sensitivity of directionselective ganglion cells in the fish retina. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1048: 433–434. 2005.
- 46. Svaetichin G., MacNichol E.F.Jr. Retinal mechanisms for chromatic and achromatic vision. Ann. N.Y. Acad. Sci. 74: 385–404. 1958.
- MacNichol E.F. Jr., Wolbarsht M.L., Wagner H.G. Electrophysiological evidence for a mechanism of color vision in the goldfish. In: Light and Life. McElroy W.D., Glass B. (Eds). 795–814. Baltimore. Johns Hopkins Press. 1961.
- 48. MacNichol E.F. Jr. Three-pigment color vision. Sci. Amer. 211: 48-56. 1964.
- 49. Orlov O.Yu., Maximova E.M. S-potential sources as excitation pools. Vision Res. 5: 573–582. 1965.
- 50. *Mitarai G.* Chromatic properties of S-potentials in fish. In: The S-potential. Drujan B.D., Laufer M. (Eds). 137–150. New York. Liss. 1982.
- Stell W.K., Kretz R., Lightfoot D.O. Horizontal cell conectivity in goldfish. In: The S-potential. Drujan B.D., Laufer M. (Eds). 51–75. New York. Liss. 1982.
- 52. *Li Y.N., Matsui J.I., Dowling J.E.* Specificity of the horizontal cell-photoreceptor connections in the zebrafish (Danio rerio) retina. J. Comp. Neurol. 516: 442–453. 2009.
- 53. Meier A., Nelson R., Connaughton V.P. Color Processing in Zebrafish Retina. Front. Cell. Neurosci. 12: 327. 2018.
- Maximov V.V., Maximova E.M., Damjanović I., Maximov, P.V. Color properties of the motion detectors projecting to the goldfish tectum: I. A color matching study. J. Integr. Neurosci. 13: 465–484. 2014.
- 55. Maximov V.V., Maximova E.M., Damjanović I., Aliper A.T., Maximov P.V. Color properties of the motion detectors projecting to the goldfish tectum: II. Selective stimulation of different chromatic types of cones. J. Integr. Neurosci. 14: 31–52. 2015.
- 56. Maximova E.M., Maximov, P.V., Damjanović I., Aliper A.T., Kasparson A.A., Maximov V.V. Color properties of the motion detectors projecting to the goldfish tectum: III. Color-opponent interactions in the receptive field. J. Integr. Neurosci. 14: 441–454. 2015.
- 57. Maximov P.V., Aliper A.T., Maximova E.M. Colour-specific responses of the goldfish retinal ganglion cells revealed by cone-isolated visual stimulation. The 25th Symposium of the Internat. Colour Vision Society. Riga, Latvia. Book of Abstracts. 107. 2019.
- 58. Бызов А.Л. Горизонтальные клетки ретины как регуляторы синаптической трансмиссии. Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. 53: 1115–1123. 1967. [*Вудок А.L.* Horizontal cells of the retina as regulators of synaptic transmission. Sechenov. Fiziol. Zh. USSR. 53: 1115– 1123. 1967. (In Russ)].
- 59. *Maximova E.M.* Effect of intracellular polarization of horizontal cells on the activity of the ganglion cells in the fish retina. Biofizika. 14: 537–544. 1969.
- Kamermans M., Vandijk B.W., Spekreijse H. Color opponency in cone-driven horizontal cells in carp retina – aspecific pathways between cones and horizontal cells. J. Gen. Physiol. 97: 819–843. 1991.
- 61. Lettvin J. Y., Maturana H.R., McCulloch W.S., Pitts W.H. What frog's eye tells to the frog's brain. Proc. IRE 47: 1940–1951. 1959.
- Margolis D.J., Detwiler P.B. Different mechanisms generate maintained activity in ON and OFF retinal ganglion cells. J. Neurosci. 27: 5994–6005. 2007.
- 63. Krieger B., Qiao M., Rousso D.L., Sanes J.R., Meister M. Four alpha ganglion cell types in mouse retina: Function, structure, and molecular signatures. PLoS ONE 12: e0180091. 2017.
- 64. *Maximov V., Orlov O., Reuter T.* Chromatic properties of the retinal afferents in the thalamus and the tectum of the frog (*Rana temporaria*). Vision Res. 25: 1037–1049. 1985.
- 65. Daw N.W. Goldfish retina: organization for simultaneous color contrast. Science 58: 942–944. 1967.
- 66. Maximova E.M., Dimentman A.M., Maximov V.V., Nikolayev P.P., Orlov O.Yu. The physiological mechanisms of colour constancy. Neirofiziologiya. 7: 16–20. 1975.
- 67. Cronly-Dillon J.R. Units sensitive to direction of movement in goldfish tectum. Nature. 203: 214–215. 1964.

- Liège B., Galand G. Types of single-unit visual responses in the trout's optic tectum. In: Visual information processing and control of motor activity. *Gudikov A*. (Ed). 63–65. Publ. House Bulg. Acad. Sci. Sofia. 1971.
- 69. *Granda A.M., Fulbrook J.E.* Classification of turtle retinal ganglion cells. J. Neurophysiol. 62: 723–737. 1989
- O'Brien B.J., Isayama T., Berson D.M. Light responses of morphologically identified cat ganglion cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science 40: ARVO Abstract 815. 1999.
- 71. *van Wyk M., Taylor W.R., Vaney D.I.* Local edge detectors: A substrate for fine spatial vision at low temporal frequencies in rabbit retina. J. Neurosci. 26: 13250–13263. 2006
- 72. Venkataramani S., Taylo W.R. Orientation selectivity in rabbit retinal ganglion cells is mediated by presynaptic inhibition. J. Neurosci. 30: 15664–15676. 2010.
- 73. Damjanović I., Maximova E.M., Aliper A.T., Maximov P.V., Maximov V.V. Opposing motion inhibits responses of direction-selective ganglion cells in the fish retina. J. Integr. Neurosci. 14: 53–72. 2015.
- Baden T., Berens P., Franke K., Roson M. R., Bethge M., Euler T. The functional diversity of retinal ganglion cells in mouse. Nature. 529: 345–350. 2016.

Ganglion Cells with Sustained Activity of the Fish Retina and Their Putative Function in Comprehension of the Visual Surround

E. M. Maximova^{*a*}, A. T. Aliper^{*a*}, I. Z. Damjanović^{*a*}, A. A. Zaichikova^{*a*, *b*}, and P. V. Maximov^{*a*, *}

^a Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), Moscow, Russia ^bLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia *e-mail: pmaximov@iitp.ru

Extracellular spike activities were recorded from the axon terminals of single ganglion cells (GCs) in tectum opticum (TO) of living immobilized fish. The layer of units with sustained responses (USR) is located 190–200 μ m under the surface of TO (deeper than every type of feature detectors). The sizes of the receptive fields (RFs) of both ON and OFF USRs make up to 4°–5° which is comparable to the RF sizes of the feature detectors. We've shown that minimal contrast between center and surround is crucial (obligatory) to induce spike discharge in USRs; the intensity of discharge depends on the contrast gradually; spike activity does not emerge in the absence of contrast. We've also shown that USRs of both ON- and OFF-types receive inputs from all three types of cones (L, M and S). We have found that USRs demonstrate color opponency both in the center and on the surround and moreover there is color opponency between center and surround. This makes USRs double opponent cells and thus they might participate in color discrimination. TO – the main visual centre appears to get plenty of information from feature detectors and USRs splitted in ON- and OFF-channels. Proper comprehension of the visual scene allows TO to perform its primary role – the external visual attention control.

Keywords: vision, *Carassius gibelio*, ganglion cells, extracellular spike response, receptive field, contrast sensitivity, tectum opticum, color vision

ЦИТИРОВАТЬ:

Максимова Е.М., Алипер А.Т., Дамянович И.З., Зайчикова А.А., Максимов П.В. Ганглиозные клетки с фоновой активностью сетчатки рыб и их возможная функция в оценке зрительной сцены. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(4): 486–503.

DOI: 10.31857/S0869813920040044

TO CITE THIS ARTICLE:

Maximova E.M., Aliper A.T., Damjanović I.Z., Zaichikova A.A., Maximov P.V. Ganglion Cells with Sustained Activity of the Fish Retina and their Putative Function in Comprehension of the Visual Surround. Russian Journal of Physiology. 106(4): 486–503.

DOI: 10.31857/S0869813920040044

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 504–520

— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

ПЕРЕСТРОЙКА АКТИВНОСТИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДОСТИЖЕНИИ ПОРОГА РАСПОЗНАВАНИИ ФРАГМЕНТИРОВАННЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

© 2020 г. К. Ю. Шелепин¹, Ю. Е. Шелепин^{1, *}

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия *E-mail: yshelepin@yandex.ru

> Поступила в редакцию 29.01.2020 г. После доработки 14.02.2020 г. Принята к публикации 23.02.2020 г.

Установлены общие закономерности перестройки нейронных сетей всего головного мозга человека при достижении порога распознавания изображений в условиях неопределенности. Этот результат достигнут с помощью сочетания цифрового синтеза динамических изображений и метода картирования активности головного мозга по BOLD (Blood-Oxygen-Level Dependent)-сигналу функциональной магнитно-резонансной томографии. Показано, что при достижении порога распознавания изображений объектов человеком в одних зонах головного мозга происходит увеличение BOLD сигнала, а в других зонах мозга — снижении активности нейронных сетей. Описаны зоны мозга, активность которых максимальна во время, соответствующее порогу распознавания, решения задачи, а также показано, что эта активность меньше при подпороговых и даже надпороговых условиях наблюдения динамических изображений. Выявлены зоны, где эта активность минимальна. Интерпретация данных проведена в рамках многоканальной и многоуровневой модели системы принятия решений о зрительных сигналах.

Ключевые слова: зрение, распознавание зрительных образов, неполное изображение, порог, принятие решения, цитоархитектоника мозга, визуализация активности мозга

DOI: 10.31857/S086981392004007X

В данной работе мы исследовали нейронные структуры головного мозга человека, которые участвуют в решении задач распознавания и классификации. Возможность решения этих задач относится к обширной области междисциплинарных исследований, направленных на решение гносеологических проблем построения зрительной картины мира и которые имеют практическую направленность как база создания новых технологий, востребованных практически во всех областях деятельности человека.

Уже более ста лет интенсивное изучение локализации механизмов, обеспечивающих процесс построения целостного зрительного образа, позволил установить в самых общих чертах организацию нейронных сетей, осуществляющих распознавание. К середине 20 века было выявлено, что локальные разрушения коры головного мозга приводят к самым разным нарушениям зрительного восприятия [1]. К концу 20 века интенсивные нейрофизиологические исследования зрительной коры позволили представить в самых общих чертах нейрофизиологические механизмы, обеспечивающие распознавание зрительных образов [2].
Существует огромное число моделей этого процесса, однако общим является то, что уже на первом этапе оптическое изображение запускает процесс адаптации и кодирования зрительной информации в рецептивных полях сетчатки. Выходы рецептивных полей ганглиозных клеток сетчатки с разными пространственно-временными характеристиками — это входы разнообразных каналов зрительной системы [3]. В рецептивных полях сетчатки происходит декорреляция статистических связей в изображениях [4].

Нейронные сети головного мозга обеспечивают восприятие и распознавание изображений, определяют глобальные статистические свойства изображений, выделяют локальные информативные признаки. Проблема заключается в том, при решении каких задач какой из этих механизмов доминирует. Психофизические и нейрофизиологические исследования как локального, так и глобального анализа в зрительной системе могут быть разделены на две группы: изучение пространственных механизмов и изучение временных характеристик этого процесса [5–13].

Исследование механизмов и алгоритмов реконструкции целостного объекта из фрагментированного является многообещающим в решении проблемы распознавания зрительных образов. Наш подход построен на основе представлений о выделении сигнала из шума в каналах первичной фильтрации, построения и распознавания образа согласованной фильтрации, воспринимаемого сигнала и инвариантного описания, извлекаемого из памяти [14, 15]. В последние годы согласованная фильтрация реализована в многоуровневых сверточных нейронных сетях глубокого обучения [16–18].

Исследование механизмов связывания фрагментов в единое целое позволяет установить: как осуществляется переход от оптического описания изображений к представлению этих объектов в зрительной системе; как зрительная система распознает целостный объект при наблюдении его фрагментов; как зрительная система выделяет физические свойства фрагментов; какие нейрофизиологические механизмы в зрительной системе обеспечивают сравнение фрагментов и объединение их в целостный образ.

Итак, мы рассматриваем два подхода к описанию восприятия неполных изображений: локальный — на основе локальных признаков, и глобальный — на основе статистических характеристик целостного изображения.

Изображение наблюдаемого объекта представлено в мозгу системой параллельных каналов — рецептивных информационных полей. Для выделения объекта и описания целостного образа-гештальта отклики этих полей должны быть связаны. В первичной зрительной коре эта взаимосвязь наиболее выражена между нейронами, выделяющими элементы контура с одной ориентацией. Изменение ориентации непрерывного контура и разрывы контура усложняют задачу [8, 9].

Для исследования порогов восприятия фрагментированных фигур мы применяем различные методы, и первым среди них является Голлин-тест [19, 20]. Голлин-тест заключается в предъявлении контурных изображений различной степени фрагментации и измерении порогового значения фрагментации, при котором происходит распознавание формы тестовой фигуры. На рис. 1 показан принцип формирования фрагментированных изображений в современной версии Голлин-теста [21–23].

Особый интерес представляет решение задачи определения локализации нейронной сети, резко изменяющей свою активность в момент достижения порога, соответствующего моменту формирования целостного образа. Этот момент достижения порога распознавания (в условиях неопределенности) может быть отождествлен с возникновением инсайта, "внезапного озарения", обеспечивающего узнавание объекта в разрозненных фрагментах [22, 23]. Процесс достижения инсайта протекает неосознанно. Наблюдатель, видящий фрагменты, ожидает увидеть объект, но не знает какой. Знать пороги распознавания фрагментированных изображений



Puc. 1. Динамические тестовые изображения с уменьшением уровня незавершенности формирования контура. На картинке изображены только три уровня заполнения контура изображения тестового объекта. Вверху над 10% контуром даны возможные варианты мысленного завершения контура.
Fig. 1. Dynamic test images with a decrease in the level of incomplete formation of the contour. The picture shows only three levels of filling the contour of the image of the test object. Above 10% of the contour are possible options for the mental completion of the contour.

важно, но не менее важно знать где, в каких нейронных сетях происходит связывание фрагментов в целостный образ.

Цель данной работы — с помощью метода визуализации работы головного мозга изучить распределение активности крупномасштабных нейронных сетей головного мозга человека в процессе восприятия, а именно, перераспределение их активности до, при и после достижения порога распознавания неполных фрагментированных изображений тестовых объектов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования состоял из разработки системы тестов, динамического синтеза тестовых изображений, согласованных с методами визуализации динамики активности по Blood-Oxygen-Level Dependent (BOLD)-сигналу функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ).

Система тестов и психофизические исследования

Проведенные исследования следуют принципам Хельсинской декларации, и одобрены Этическим комитетом СПБГУ.

В качестве динамических изображений выбран компьютеризированный Голлин-тест, запуск которого приводит к постепенно нарастающему контуру из случайно возникающих фрагментов [20–22]. Мы выбрали этот метод определения порога узнавания неполных фрагментированных изображений – компьютерный метод Голлин теста в последней версии, разработанной С.В. Прониным в Институте физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (рис. 1). Программу читатель может скачать с сайта Оптического журнала [22]. Компьютерный метод Голлин-тест содержит набор (алфавит) из 72 контурных стилизованных изображений, объектов, знакомых каждому из повседневной жизни. Изображение каждого объекта стандартизировано по толщине контура и равно 8 пикселам экрана. Длина контура несколько варьировала от изображения одного объекта до другого. Так как стимулы имели одинаковые размеры, то длина контура изменяла сложность изображений. Применение изображений 72 объектов в наборе нивелировало эти различия. Задача испытуемого была распознать объект в одной серии исследований мысленно, назвать его, и классифицировать на объекты живой и неживой природы в другой. Для этого надо было нажать соответствующую левую или правую кнопку пульта испытуемого в момент классификации [22, 23]. Многолетняя работа позволяет утверждать, что Голлин-тест – это один из наиболее эффективных методов тестирования мозга. Этот метод является удобным и надежным. Ранее нами было показано, что порог распознавания в среднем при первом предъявлении равен 20%, но меняется и зависит от сложности рисунка, знакомства испытуемого с данным рисунком, с набором и с числом рисунков в наборе (размером алфавита стимулов), с методом исследования, техникой предъявления стимулов. Пороги зависят и от состояния испытуемого, от его возраста.

На рис. 1 показано изменение во времени тестового сигнала. Изображение 10% незавершенности вызывает состояние неопределенности, и воображение может создавать самые разнообразные формы. Так, по десяти процентам точек контура изображения, например, медведя можно построить и бублик, и зонтик, и другие объекты. Изображение 20% порогового уровня позволяет большинству людей уверенно распознать предъявляемый объект.

В психофизических исследованиях определяли порог распознавания в зависимости от процента заполнения контура изображений. В фМРТ исследованиях верхняя граница предъявления была ограничена 45% (не 100%, как на рис. 1). Ограничение накладывала необходимость не превышать суммарное время безопасного пребывания испытуемого в магнитном поле. Выбор данного теста – динамический сигнал (постепенное во времени заполнение контура различных контурных изображений живых и неживых объектов) был обусловлен возможностью контролировать условия стимуляции. Этот метод позволил последовательно предъявлять подпороговые, пороговые и надпороговые стимулы. Заполнение контура происходило по случайному закону. Компьютеризированная программа позволяет регулировать скорость нарастания заполнения контура, мы изменяли скорость заполнения контура. Эта возможность позволила нам согласовать скорость заполнения контура со скоростью изменения BOLD сигнала. Естественно, порог распознавания наступал в разное время от начала стимуляции. Была подобрана такая скорость предъявления фрагментов контура, чтобы время развития BOLD-сигнала и величина заполнения контура численно были равны.

Методы визуализации и измерения активности мозга

Методы цифрового синтеза динамических тестов Голлина были использованы для исследования активности крупномасштабных нейронных сетей мозга человека в условиях порогового распознавания. Для измерения активации мозга в момент предъявления стимулов мы проводили функциональную магнитно-резонансную томографию (фМРТ), которая позволяет визуализировать активацию разных областей мозга на основании измерения BOLD-сигнала — изменения локального кровотока. Существует взаимосвязь между кровотоком и активностью нейронов и глии. Метод визуализации активности человеческого мозга, в сочетании с разработанными нами временными и пространственными характеристиками цифрового синтеза тестовых сигналов, позволяет решить поставленную задачу.

Цифровая обработка изображений головного мозга была синхронизирована с разворачиванием поэлементного предъявление тестовых изображений. Синхронизация позволяет выявить активность крупномасштабных нейронных сетей в подпороговых, пороговых и сверхпороговых условиях. Мерой количественной оценки активности зон областей головного мозга, мы выбрали изменение величины BOLDсигнала, синхронизированной с изменяющимся числом элементов стимулов. Для качественной оценки состояния мозга были построены карты распределенной активности нейронной сети при сигнале и относительно активности состояний, рассматриваемых в рамках базового режима мозга (REST).

Обработка данных фМРТ

Проводили расчет GLM, contrast vectors. Вероятность выбрали на уровне p = 0.01. Использовали универсальный 12-канальный DMX-512 конвертор сигналов (драйвер SPM-12) для обработки виртуальных срезов мозга по данным фМРТ и проводили дополнительную статистическую обработку.

Регистрация психоэмоциональной реакции в период до возникновения порога, в момент порога и после возникновения порога осуществлялась при помощи самотестирования испытуемого, электро-энцефалографии (ЭЭГ) и электромиографии (ЭМГ) лицевых мышц. Также регистрировались изменения диаметра зрачка и микротремор глаз.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В психофизических исследования при разной скорости предъявления фрагментов была установлена взаимосвязь оптических свойств неполных (фрагментированных) изображений и порогов психофизического распознавания. Предъявление постоянно нарастающего числа элементов контура осуществляли с заполнением контура от 0 до 45%.

На рис. 1 представлены отдельные кадры из серии тестовых изображений теста Голлина. Уровень 10% заполнения контура намного ниже порога распознавания объекта. Представление заполнения контура приблизительно в 10% (от 0 до 15% представления контура) создает для наблюдателя неопределенность. Эта неопределенность, преимущественно в первом исследовании в распознавании и в принятии решений об изображении, позволяет наблюдателю лишь гадать и вообразить любую фигуру. На уровне около 20% заполнения контура при первом наблюдении данного набора стимулов возникает распознавание, т.е. контур, заполненный (в среднем) на 20% снимает неопределенность.

Изменение нарастания процента заполнения контура происходит медленно и согласованно с изменением BOLD-сигнала во времени. Мы подобрали время заполнения контура так, чтобы оно было численно равно проценту заполнения контура, необходимого для распознавания. Порог распознавания мы отождествили с моментом возникновения внезапного озарения — инсайтом, так как этот момент сопровождается всеми характерными для этого состояния реакциями организма. Визуализацию активации нейронных сетей, в ответ на предъявление медленного нарастания заполнения контура, мы провели в исследованиях фМРТ. Последующее наращивание заполнения контура тестового изображения не приводит к наращиванию отклика, а приводит к его постепенному уменьшению [22, 23].

Особенность фМРТ-измерений состоит в том, что интерес представляет не абсолютное значение BOLD-сигнала, а разница между его значением в разных состояниях испытуемого. При выполнении распознавания Голлин-теста исследовали карты распределения мозговой активности по BOLD-сигналу в момент предъявления стимула — динамического изображения относительно распределенной активности нейронной сети базового режима мозга. Мы сравнивали изображения, отражающие активность разных зон мозга (отклик мозга) относительно состояния при отсутствии стимуляции (условного покоя, REST), и как разницу активности в момент достижения порога распознавания (относительно до порогового состояния), и в момент достижения порога распознавания (относительно после порогового состояния мозга). Сравнение "виртуальных срезов мозга" (по данным фМРТ) осуществляли на основании стандартных методов статистической обработки изображений в среде MatLab и SPM12. Мы сравнивали относительные величины откликов.

Были получены статистически достоверные различия максимальной активности мозга в момент достижения порога, т.е. в момент, когда наблюдатель внезапно видит в случайном паттерне точек или фрагментов контура целостный объект.

В момент достижения порога распознавания изображений объектов, на полученных нами с помощью фМРТ "срезах мозга", активация зон мозга на основании статистического сравнения больше по отношению к покою и к величине активации при сверх-пороговой и пред-пороговой стимуляции. Важно отметить, что в момент достижения порога распознавания, наблюдается максимум общего числа активированных вокселов фМРТ-срезов.

Рассмотрим отклики отдельных областей головного мозга в наших исследованиях. Обычно, инерционность метода не позволяет определять динамику развития BOLD-сигнала как отклика мозга на тестовый сигнал в той или иной области головного мозга человека. Но мы предъявляли отдельные фрагменты со скоростью один фрагмент в секунду, "замедлили время" стимуляции. Этот экспериментальный прием позволил увидеть динамику изменения BOLD-сигнала именно при данных условиях стимуляции.

Реакция различных структур мозга была не однородна. Есть принципиальные отличия в откликах разных структур, и эти отличия развиваются в процессе стимуляции. Наглядно это проявляется при наблюдении динамики изменения BOLD-сигнала во времени.

Рассмотрим представленные на рис. 2 отклики основных областей затылочной коры, в так называемой зрительной коре. Первичная зрительная кора по классификации Бродмана — зона ВА17. Видимый на морфологических срезах коры четвертый слой дал название этой первичной зрительной коры как стриарной (полосатой) области. Следующие за ней зоны ВА18 и ВА19 получили название пара- и пери-стриарной коры соответственно [1].

Мы видим (рис. 1) синхронность изменения BOLD-сигнала после начала предъявления. Сразу после начала предъявлений характерно торможение в первичной зрительной коре в BA17, BA18. В зонах BA19 и BA37 вначале наблюдается отсутствие реакции, а затем в BA19 и BA37 происходит неуклонное нарастание сигнала. В первичных областях зрительной коры BA17, BA18, вслед за торможением также происходит нарастание BOLD-сигнала. Но в BA19 и BA37 этот рост BOLD-сигнала более значительный.

Максимум ответа наблюдается в зоне ВА37. Важно отметить, что этот максимум совпадает с моментом распознавания, он равен 20% заполнению контура. Таким образом, он соответствует психофизическим данным величины заполнения контура при пороге распознавания в условиях, когда испытуемый впервые видит данный алфавит (набор) стимулов. Это средняя величина для всей группы испытуемых. Время по шкале абсцисс поэлементного вывода фрагментов контура подобрано эмпирически.

Изменение откликов разных зон мозга на изменение во времени входного сигнала отражают работу мозга и многие из них находятся в оппонентных взаимоотношениях. Судя по изменениям BOLD-сигнала, при достижении порога распознавания затылочные структуры увеличивают свою активность, а другие, например, медиальная теменная BA7M, снижают свою активность. Изменение кровотока во времени в BA7 (предклинье – precuneus) теменной коры в BA37 задневисочной коры представлены на рис. 1. Видны выраженные оппонентные взаимоотношения между зонами. Заметим, что справа отклики зоны BA37 и BA7 (предклинья) более выражены, чем слева. Иными словами, отклики работы в затылочно-задневисочной коре, называемой еще перистриарной корой, BA37 ведут себя оппонентно к откликам в теменной коре. Максимум отклика в зонах BA19 и BA37, соответствуют моменту распознавания. В этот момент активации BA37 и BA19 происходит относительное торможение активности в теменной коре BA7, преимущественно в ее медиальной части в предклинье.

Ростральнее поля 37 (ВА37) расположены важные зоны слуховой и "ассоциативной" коры – ВА21 и ВА22 (рис. 3). На этом же рисунке представлены отклики задней части лимбической коры ВА23 и ВА38 – полюс височной коры. Область ВА21 височной коры головного мозга человека обрабатывает слуховые и речевые сигналы. ВА38 – самая ростральная часть височной коры имеет сложную сеть связей с областями височных долей (ВА21 и ВА22), что предполагает и ее участие в сложной речевой функции, согласовании со зрительным описанием. Известны связи данной зоны со зрительными областями с ВА37 и затылочной доли мозга. Область ВА20 у человека в нижней височной извилине коры головного мозга в обработке зрительных сигналов и зрительной памяти в связи со значение распознаваемого объекта для человека. Область ВА21 височной коры играет существенную роль в обработке слуха и речи. Область ВА23 (на схеме не видна) расположена медиально, это задней поясной извилины, лимбической коры. Рассмотрим отклики этих зон в наших исследованиях. Ответ этих зон слуховой и "ассоциативной" коры совершенно другой по сравнению с откликами затылочной коры и ВА37, представлены на рис. 3.

В этих зонах, которые относятся к слуховой, "ассоциативной" части височной и к лимбической коре, отклики мозга, регистрируемые по BOLD-сигналу, развиваются в течение первых 15 с после начала стимуляции, т.е. задолго до порога распознавания, равного 20% контура. Аналогичную форму отклика в первые 15 с имели и области теменной части BA7, захватывающей медиальную поверхность коры (ответы теменной коры здесь не показаны).

Отклики мозга (по BOLD-сигналу), представленные на рис. 3, имеют общую форму, хотя и несколько варьируют от зоны к зоне. Интересно отметить, что активация наиболее выражена именно на первые, еще случайно разбросанные по экрану точки, — фрагменты будущего контура. Только после 15% контура начинает неясно вырисовываться контур объекта. Первоначальные очертания вызывают у наблюдателя состояние неопределенности в принятии решений. Из рис. 3 видно, что в момент неопределенности (до пороговый), в зонах BA21, BA22, BA23 и BA38 актив-

Рис. 2. Изменение во времени BOLD-сигнала важнейших областей затылочной доли мозга BA17, 18 и 19 по Бродману, области BA37 нижневисочной коры, расположенной на границе с затылочной и медиальной теменной коры. По оси абсцисс — время и одновременно процент заполнения контура, численно равный моменту предъявления. По оси ординат — величина BOLD-сигнала в относительных единицах, называемая как Z-оценка. L — левое полушарие, R — правое полушарие.

Fig. 2. The time-dependent change in the BOLD signal of the most important areas of the occipital lobe of the brain BA17, 18, and 19, according to Broadman, the region of VA37 of the inferior temporal cortex, located on the border with the occipital and medial parietal cortex. On the abscissa axis is the time and at the same time the percentage of filling the circuit, numerically equal to the moment of presentation. On the y-axis – the magnitude of the BOLD signal in relative units referred to as Z-score. L is the left hemisphere, R is the right hemisphere.





Рис. 3. Изменения BOLD-сигнала в височной доле Бродману BA21, 22, 38 и задней лимбической коре в BA23. По оси абсцисс – время от начала предъявления стимула и соответствующей ему численно процент предъявления контура. По оси ординат – значение BOLD-сигнала в относительных единицах Z оценки предъявления. L – левое полушарие, R – правое полушарие.

Fig. 3. Changes in the BOLD signal in the temporal lobe according to Broadman VA21, 22, 38 and the posterior limbic cortex in VA23. On the abscissa, the time from the beginning of the presentation of the stimulus and the corresponding percentage of presentation of the contour. On the ordinate axis, the value of the BOLD signal in relative units Z of the presentation estimate. L is the left hemisphere, R is the right hemisphere.

ность мозга существенно увеличивается. Однако, к моменту достижения порога распознавания и в пост-пороговый период снижается.

Таким образом, отклик на формирование из случайных скоплений точек некоего паттерна, как мы видим, различен в разных областях. В одних он проявляется увеличением активности, как в ВА37, ВА19 (см. рис. 2), а в других – снижением активности, как например, в височной, лимбической и теменной области ВА7, преимущественно в ее медиальной части, в precunius.

Рассмотрим отклики во фронтальной коре. Нейронные сети в лобных долях работают своеобразно. Зона ВА9 и ВА10 демонстрируют слабые отклики, но значимые отличия. Активность зоны BA9 не изменяется, а зона BA10 уменьшает активность. Торможение активности зоны BA10 лобной коры в момент развития достижения порога распознавания значимо сильнее в левом полушарии. Реакции зон лобной коры BA44 и BA46 представлены на рис. 4. В зоне BA46 (справа) развивается выраженная активация во время распознавания зрительного сигнала.

Изменения BOLD-сигнала в лобных долях отличаются в левом и в правом полушариях. Так, именно в правом полушарии BA46 активируется значительно сильнее, чем в левом в тот момент, когда достигается порог распознавания. На рис. 4 мы видим, что этот ответ возникает несколько позднее срабатывания крупномасштабной нейронной сети, обеспечивающей распознавание, и включающей BA37, хотя эта задержка значима, но надо относится с осторожностью, так как сам метод фМРТ и развитие BOLD-сигнала во времени инерционно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для решения задачи визуализации процесса распознавания, по изменению активности различных структур головного мозга человека, был разработали метод зайн исследования. Из-за инерционности метода фМРТ мы разработали метод "растягивания" процесса предъявления зрительного сигнала во времени. В проведенных исследования показана реакция практически всех образований коры головного мозга на перестройку зрительного стимула в соответствии с изменением тестового сигнала во времени. В этих, "замедленных" условиях пошагового изменения стимула, удалось показать целостный процесс восприятия. Этот процесс построения гештальта вовлекает в работу практически все структуры мозга, одни из них активируются, другие тормозятся. Такой режим работы позволяет сохранять почти постоянный суммарный кровоток головного мозга, в результате перераспределения мозгового кровообращения.

По данным изменения BOLD-сигнала мы смогли рассмотреть нейрофизиологические механизмы реакций мозга на изменяющийся сигнал. Мы сравнили величину отклика в момент достижения порога относительно покоя, относительно подпороговой стимуляции и относительно надпороговой стимуляции. Показано, что момент достижения порога распознавания наблюдается максимум активированных вокселов. На этом основании мы допустили, что порогу распознавания соответствует максимум активности, и решили поставленную задачу. Далее мы установили, что этот максимум активности не гомогенно распределен по мозгу, а соответствует областям ВА19. ВА37. разрушение которых приводит к агнозии [1]. Мы определили, что после достижения порога распознавания при дальнейшем наращивании "заполнения" контура в условиях уже надпорогового предъявления стимула происходит спад активности по сравнению с моментом порога распознавания. Это, казалось бы, простое утверждение, явно вытекающее из полученных данных, требует специального обсуждения. Процесс внезапного узнавания достаточно быстрый. Если предъявлять мгновенно появляющийся стимул, то узнавание его произойдет через 100-250 мс после его появления. Если стимулы длятся около одной секунды или дольше мы видим по данным когнитивных вызванных потенциалов, что испытуемый несколько раз перепроверят свой выбор, проявившийся нажатием соответствующей клавиши на пульте, которое обычно происходит через 500-600 мс после появления стимула. Эта перепроверка видна в амплитудных характеристиках поздних компонентов когнитивных вызванных потенциалах [24]. Поэтому, на самом деле мы измеряем не мгновенное срабатывание элементов нейронной сети, которое видим в когнитивных вызванных потенциалах, а разворачивание непрерывной целенаправленной деятельности мозга в процессе решения задачи в условиях замедленного предъявления стимулов. Аналог такой деятельности издревле сопровождает человека в условиях



Рис. 4. Изменение во времени BOLD-сигнала в префронтальной коре BA44, BA46 и BA10, BA9. По оси абсцисс – время от начала предъявления стимула и соответствующей ему численно процент предъявления контура. По оси ординат – значение BOLD-сигнала в относительных единицах Z оценки предъявления. L – левое полушарие, R – правое полушарие.

Fig. 4. The change in time of the BOLD signal in the prefrontal cortex BA44, BA46 and BA10, BA9. The abscissa is the time from the beginning of the presentation of the stimulus and the corresponding percentage of the presentation of the contour. On the ordinate axis, the value of the BOLD signal in relative units Z of the presentation estimate. L is the left hemisphere, R is the right hemisphere.

охоты или боевых действий при слежении за движущимися объектами, скрытыми листвой. Голлин-тест в его замедленном варианте идеально имитирует эти условия, определившие сформированную в эволюции конструкцию зрительной системы человека (приматов) и хищников. Это характерно не для любого достижения порога, а только того, при котором наблюдение происходит в условиях неопределенности. Полученный результат позволил момент достижения порога в условиях неопределенности ленности предложить в качестве модели "инсайта" [22, 23].

На основе анализа собственных результатов моделирования горизонтальных взаимодействий в первичной зрительной коре была показана возможность восстановления контура за счет внутрикорковых горизонтальных связей [8, 9]. Однако предложенное объяснение распознавания за счет организации связей коротких межмодульных связей ВА17 вызывает возражения. Горизонтальная активность может развиваться в пределах представительства одного полуполя зрения в стриарной коре ВА17 короткими связями, распространяющимися по коре и имеющими торможение в направлениях, ортогональных к другим ориентациям. Поэтому нужен был другой дизайн исследования, и мы его разработали [22, 23]. В результате проведенной работы удалось показать, что для объединения фрагментов в единое целое в гештальт и его распознавания и классификации, недостаточна работа нейронной сети взаимодействующих модулей первичной зрительной коры. Этим другим механизмом может служить зона, обеспечивающая целостное восприятие в нижневисочной коре ВА37. Что мы и видим в наших исследованиях.

Перистриарная кора (которая включает зоны по Бродману ВА19 и ВА37) является ключевой для формирования целостного образа — гештальта. Последствия разрушения ВА37 соответствуют классическим клиническим представлениям об агнозиях. На основании клинических наблюдений и физиологических исследований [1] предполагали, что именно эти зоны мозга обеспечивают формирование конкретного образного мышления [2]. Установленные нами изменения активности до, во время и после достижения порога распознавания, демонстрирует как взаимодействие ВА17–ВА18 с ВА19–ВА37 и с префронтальной корой ВА46, обеспечивает распознавание и принятие решений (см. рис. 5).

Отклик на зрительный сигнал мы наблюдали во всем мозге, а не только в структурах, связанных со зрительной системой. Его регистрировали и в соматосенсорной, и в двигательной коре. Соматосенсорная кора реагирует активацией в момент распознавания, так как получает сигналы от непроизвольного напряжения мышц, в первую очередь лицевых. Обратим внимание читателя и на некоторые другие "побочные" изменения активности BOLD-сигнала, связанные с процедурой распознавания и исследования с помощью фМРТ. После начала стимуляции, задолго до момента распознавания, в некоторых зонах возникает увеличение BOLD-сигнала с пиком от 3 до 15 секунд от начала предъявления. Наиболее ярко этот пик проявляется в большинстве зон, которые обычно связывают с участием в обеспечении внимания. Мы привели примеры откликов височных зон (ВА20, 21, 22, 36), лимбической коры (ВА23) и медиальной части (ВА7) теменной коры, активированных самим появлением стимула. В это время неопределенности, когда совсем не ясно, какое изображение будет сформировано из отдельных, случайно появляющихся точек по контуру (см. рис. 1), активирована и слуховая кора (ВА22). Человек настораживается. Затем, после 15% контура, в зонах внимания, и в слуховой коре наступает торможение. В это время в зрительных зонах и в височно-затылочной коре (ВА37), и в лобной доле (ВА46) начинается активация (см. рис. 3). Заметим, что общие принципы межсенсорного взаимодействия условно-рефлекторными методами были показаны впервые С.В. Кравковым еще в 30-х годах прошлого века [26].

Перестройка активности нейронной сети обусловлена перераспределением активности оппонентных корковых областей мозга и подкорковых ядер, что было



Рис. 5. Изменение BOLD-сигнала во времени в двух важнейших зонах BA37, расположенной в височнозатылочной коре и BA46 префронтальной коры справа [23] и схема цитоархитектонических полей коры головного мозга человека по Бродману. Внизу показан результат исследований по принятию решений и проведение трактографии одного испытуемого [25], демонстрирующей связи префронтальной коры (BA46) с перистриарной корой (BA37).

Fig. 5. The scheme of cytoarchitectonic fields of the human cerebral cortex according to Brodman and the change in the BOLD signal in time in the two most important zones BA37 of the temporal-occipital cortex and BA46 of the prefrontal cortex on the right [23]. Below is the result of other studies on decision-making and tractography of one subject [25], demonstrating the relationship of the prefrontal cortex (BA46) with the third visual cortex (BA37).

установлено на основании изменения BOLD-сигнала. Этот результат подтверждает результаты других исследователей, показавших, что изменение BOLD-сигнала во времени коррелирует с изменением спектра ЭЭГ – снижением альфа- и повышением гамма-ритма [27].

Таким образом, активность в одних областях уменьшается и увеличивается в других. Эти изменения происходят именно в процессе действия стимула: до порога распознавания активны одни зоны мозга, в момент достижения порога распознавания другие, а затем все затухает. Хотя стимуляция еще продолжается, но неопределенность после достижения порога уже исчезла. Оппонентные взаимодействия, например, ВА37 в височно-затылочной и ВА7 (ее медиальная часть) в теменной доле, или ВА9 и ВА10 во фронтальных областях полушарий головного мозга отражают многоуровневый процесс принятия решений по конфликтующим оценкам, существование которых было предсказано ранее [28].

Таким образом, в результате анализа работы всего мозга нами установлен максимум активности одних зон в момент достижения порогового уровня предъявления контура и его снижение после достижения этого уровня. В других зонах момент достижения порога совпадает с абсолютным минимумом активности. Это для условий непрерывной деятельности всего мозга показано впервые. Наличие оппонентных взаимоотношений при выборе появляющихся и исчезающих стимулов между соседними зонами в префронтальной коре было показано ранее, при решении испытуемым задач распознавания улыбки [29]. Теперь удалось показать, что обеспечение баланса критериев при принятии решения осуществляется путем перераспределения активности между всеми областями мозга. Структуры мозга, которые обеспечивают наиболее важные когнитивные функции, и эмоциональные процессы, их сопровождающие, взаимодействуют синхронно, но между ними существуют возбудительные и тормозные взаимодействия. В результате становится возможным реализовать решение по нескольким критериям и противоречивым оценкам события. Именно этот принцип взаимодействия элементов обеспечивает процесс принятия решений. Эти самые общие представления о механизме принятии решений, который обеспечивает целенаправленное, мотивированное поведение. Принятие решений — результат многоуровневого взаимодействия и обучения нейронных сетей, основанный именно на оппонентных взаимодействиях, начиная от сетчатки и заканчивая взаимодействием крупномасштабными нейронных сетей, обеспечивающих планирование и организацию движений, подкрепляемых наказанием или вознаграждением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новые методы позволили показать разворачивание во времени откликов всего мозга на допороговые, пороговые и надпороговые динамические зрительные сигналы. Показаны отклики ряда зон коры по Бродману на зрительные сигналы при переходе от неопределенности к распознаванию. При всех условностях привязки данных фМРТ к цитоархитектоническим областям мозга в зрительных, слуховых, двигательных соматосенсорных и в "ассоциативных", т.е. практически во всех областях головного мозга человека. Ранее нами впервые показана динамика изменения ВОLD-сигнала от подпорогового, до порогового и надпорогового уровня и принятия решений [23]. Обеспечение баланса критериев при принятии решения осуществляется путем перераспределения активности между областями мозга.

Перестройка активности нейронной сети обусловлена перераспределением активности оппонентных корковых областей мозга и подкорковых ядер, что было установлено на основании изменения BOLD-сигнала. Оппонентные изменение BOLD-сигнала в разных зонах во время распознавания коррелирует с оппонентным изменением частотных составляющих ЭЭГ – снижением альфа- и повышением гамма-ритма в процесс решения задач, при переходе от условий неопределенности к моменту решения, а именно в наших исследованиях в момент распознавания [27].

Вероятно, зона ВА37 — это область узлового пересечения нескольких нейронных сетей: первой, осуществляющей оценку значения опознанного объекта для наблюдателя и обеспечивающей связь с эмоциональной сферой, которая включает нижневисочную кору, подкорковые ядра, и второй, обеспечивающей переход из зрительного конкретного описания в абстрактное речевое. Эти соображения перекликаются с клиническими данными как уже ставшими классическими [1], так и полученными в последние годы, на основе новых технологий [30–33].

Структуры мозга, обеспечивающие важнейшие когнитивные функции и непременно сопровождающие их эмоциональные процессы, взаимодействуют синхронно, между ними существуют возбудительные и тормозные взаимодействия. Эти процессы определяют состояние мозга до порога, при пороге распознавания и после порога распознавания. Мы отождествили эти состояния с прединсайтом, инсайтом и состоянием после инсайта [23, 34]. С запозданием подобный подход начали развивать и другие исследователи [35]. То же касается начального процесса мыслительной деятельности распознавания зрительного образа, важнейшего процесса зрительного конкретного мышления [2].

Кроме того, известно, что ВА37 имеет значимые связи с крупномасшабной нейронной сетью — default mode system, в которую входят области медиальной префронтальной коры, лимбической коры, и медиальной теменной области (precuneus). С default mode system сетью работающей в ждущем режиме рассредоточенного мысленного поиска выхода из неопределенности, что видно из полученных результатов и частично согласуется с представлениям об этой (default mode system) системе, как системе, обеспечивающей общую готовность испытуемого [36, 37].

Распознавание происходит за счет сочетания возможностей архитектуры и возможности обучения крупномасштабных и локальных нейронных (нейрон-глиальных) сетей. Обучение происходит за счет наказаний или наград, например, в суровых условиях при своевременном или при запоздалом распознавании врага от друга.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках финансирования Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013—2020 гг. (ГП-14, раздел 63), Институт физиологии им. И.П. Павлова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Duke-Elder S. (Sir Stewart)* System of ophthalmology. V. 2. The anatomy of the visual system. London. Henry Kimpton. 1961.
- Glezer V.D. Vision and Mind: Modeling Mental Functions. Erlbaum Associates, Inc. New Jersey. 1995.
- 3. *Glezer V.D., Yakovlev V.V., Gauzelman V.E.* Harmonic basis functions for spatial coding in the cat striate cortex. Visual Neurosci. 3: 351–356. 1989.
- 4. *Глезер В.Д., Цукерман И.И.* Информация и зрение. Изд-во АН СССР. М-Л. 1961. [Glezer V.D., Tsukkerman I.I. Information and Vision. NASA Technical Translation (In Russ)].
- Giersch A., Humphreys G.W., Boucart M., Kovacs I. The computation of occluded contours in visual agnosia: Evidence for early computation prior to shape binding and figure – ground coding. Cognitive Neuropsychol. 17: 731–759. 2000.
- 6. *Ginsburg A*. Spatial filtering and visual form perception. Handbook of Perception and Human Performance. K. Boff. (Ed.). New York. John Wiley and Sons. 99–109. 1986.
- Павлов Н.Н., Коскин С.А., Шелепин Ю.Е. Влияние пространственной дискретизации и фильтрации элементов изображений на возможность объединения их в образ. Сенсорные системы. 3(4): 417–422. 1989. [Pavlov N.N., Koskin S.A., Shelepin Yu.E. Influence of spatial discretization and filtering of image elements on the possibility of combining them into an image. Sensory systems. 3(4): 417–422. 1989. (In Russ)].
- 8. *Field D.J., Hayes A., Hess R.F.* Contour integration by the human visual system: evidence for a local 'association field. Vis. Res. 33: 173–93. 1993.
- 9. *Hess R., Field D.* Integration of contours: new Insights. Trends in Cognitive Sciences. 3(12): 480–486. 1999.
- Шевелев И., Каменкович В., Лазарева Н., Новикова Р., Тихомиров А., Шараев Г. Психофизическое и нейрофизиологическое исследование опознания неполных изображений. Сенсорные системы. 17(4): 339–346. 2003. [Shevelev I., Kamenkovich V., Lazareva N., Novikova R., Tikhomirov A., Sharaev G. Psychophysical and neurophysiological study of recognition of incomplete images. Sensory systems. 17(4): 339–346. 2003. [In Russ)].
- Подвигин Н.Ф., Багаева Т.В., Подвигина Д.Н. Селективная самосинхронизация импульсных потоков в нейронных сетях зрительной системы. Докл. АН. 400(1): 1–3. 2005. [Podvigin N.F., Bagaeva T.V., Podvigina D.N. Selective self-synchronization of impulse flows in neural networks of the visual system. Dokl. Akad. Nauk. 400 (1): 1–3. 2005. [In Russ)].
- 12. *Ghosh A., Petkov N.* Robustness of shape descriptors to incomplete contour representations. IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence (PAMI). 27(11): 1793–1804. 2005.
- 13. Шелепин Ю.Е., Чихман В.Н., Фореман Н. Анализ исследований восприятия фрагментированных изображений: целостное восприятие и восприятие по локальным признакам. Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 94(7): 758–776. 2008. [Shelepin Yu.E., Chikhman V.N., Foreman N. Analysis of studies of the perception of fragmented images: holistic perception and perception according to local signs. Russ. J. Physiol. 94 (7): 758–776. 2008. [In Russ)].
- 14. *Krasil'nikov N.N., Krasil'nikova O.I., Shelepin Yu.E.* A spatiotemporal functional model of the primary links of the visual system. J. Opt. Technol. 71(7): 438–443. 2004.
- Krasil'nikov N.N., Shelepin Yu.E., Krasil'nikova O.I. The use of the principles of the optimal observer in modelling the human visual system. J. Opt. Technol. 66(9): 782–787. 1999.

- 16. *Malashin R.O.* The principle of least action in dynamically configured image analysis systems. J. Opt. Technol. 86(11): 778-784. 2019.
- 17. Malashin D.O., Malashin R.O. Efficient hardware implementation of neural networks . In: Neural Networks and Neurotechnologies. Y. Shelepin, E. Ogorodnikova. (Eds.). SPb. Publish by VVM. 2019.
- 18. Malakhova K. Visualization of information encoded by neurons in the higher level areas of the visual system. J. Opt. Technol. 85(8): 494-498. 2018.
- 19. Gollin E.S. Developmental studies of visual recognition of incomplete objects. Perceptual and Motor Skills. 11: 289–298. 1960.
- 20. Foreman N., Hemmings R. The Gollin incomplete figures test: a flexible, computerised version. Perception. 16(4): 543–548. 1987.
- 21. Shelepin Y.E., Chikhman V.N., Foreman N. Analysis of the studies of the perception of fragmented images: global description and perception using local features. Neurosci. Behav. Physiol. 39(6): 569-580. 2009. https://doi.org/10.1007/s11055-009-9171-1
- 22. Shelepin K. Yu., Pronin S.V., Shelepin Yu.E. Recognizing fragmented images and the appearance of "insight". J. Opt. Technol. 82(10): 700-706. 2015.
- 23. Shelepin K.Yu., Trufanov G.E., Fokin V.A., Vasil'ev P.P.; Sokolov A.V. Digital visualization of the activity of neural networks of the human brain before, during, and after insight when images are being recognized. J. Opt. Technol. 85(8): 468-475. 2018.
- 24. Shelepin Yu.E., Kharauzov A.K., Pronin S.V., Vakhrameeva O.A., Fokin V.A., Chikhman V.N., Foreman N. Using neuroimaging methods to localize mechanisms for making decisions concerning the ordering of textures. J. Opt. Technol. 78(12): 808-816. 2011.
- Shelepin Yu.E., Fokin V.A., Harauzov A.K., Pronin S.V., Chikhman V.N. Doklady Biological Sciences. 429: 511–513. 2009. Pleiades Publishing, Ltd., 2009. Original Russian Text published in Doklady Akademii Nauk. 429. 2009 https://doi.org/10.1134/S001249660906009X
- 26. Kravkov S.V. Changes of visual acuity in one eye under the influence of the illumination of the other or of acoustic stimuli. J. Exp. Psychol. 17(6): 805-812. 1934. https://doi.org/10.1037/h0074852
- 27. Kounios J., Beeman M. The Cognitive Neuroscience of Insight. Annu. Rev. Psychol. 65: 71–93. 2014
- 28. Saaty T.L. The analytic hierarchy and analytic network measurement processes: Applications to decisions under Risk. Eur. J. Pure Appl. Mathematics, 1(1): 122-196. 2008.
- 29. Borachuk O.V., Shelepin Yu.E., Kharauzov A.K., Vasil'ev P.P., Fokin V.A., Sokolov A.V. Study of the influence of the role of the instruction to the observer in tasks of recognizing emotionally colored patterns. J. Opt. Technol. 82(10): 678-684. 2015.
- 30. Gomez J., Natu V., Jeska B. Barnett M., Grill-Spector K. Development differentially sculpts receptive fields across early and high-level human visual cortex. Nat. Communications. 9: 788. 2018. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03166-3
- 31. Garikoitz Lerma-Usabiaga, Noah Benson, Jonathan Winawer, Brian A. Wandell. A validation framework for neuroimaging software: the case of population receptive fields (Short Title: Validation framework: PRF case) bioRxiv preprint first posted online Jan. 8, 2020; https://doi.org/10.1101/2020.01.07.897991 https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.07.897991v1.full.pdf
- 32. Byron Bernal, Iris Broce, Alfredo Ardila Brodmann's Interactive Connectivity Map. [www.fmriconsulting.com/brodmannconn]
- 33. Whitwell R.L., Milner A.D., Cavina-Pratesi C., Barat M., Goodale M.A. Patient DF's visual brain in action: visual feedforward control in visual form agnosia. Vision Res. 110: 265–276. 2015. https://doi.org/10.1016/j.visres.2014.08.016
- 34. Shelepin K.Yu., Sokolov A.V., Fokin V.A., Vasiliev P.P., Pronin S.V. The Insight Phenomenon and the Digital Visualization of the Human Brain Activity. Bull. South Ural State University. Ser. Psychology. 10(4): 47-55. 2017. (In Russ). https://doi.org/10.14529/psv170405
- 35. Ogawa T., Aihar, T., Shimokawa T. Large-scale brain network associated with creative insight: combined voxel-based morphometry and resting-state functional connectivity analyses. Sci. Rep. 8. 6477. 2018. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24981-0
- 36. Raichle M. Neuroscience. The brain's dark energy. Science 314: 1249–1250. 2016.
- 37. Хараузов А.К., Васильев П.П., Шелепин Ю.Е., Соколов А.В., Фокин В.А. Взаимодействие крупномасштабных нейронных сетей при распознавании текстур. В: Нейротехнологии. Под ред. Ю.Е. Шелепина, В.Н. Чихмана. СПб. Изд-во BBM. 244–255. 2018. [*Kharauzov A.K., Vasiliev P.P., Shelepin Yu.E., Sokolov A.V., Fokin V.A.* Interaction of large-scale neural networks in the recognition of textures. In: Neurotechnology. Yu. E. Shelepina, V.N. Chikhman (Eds.) St. Petersburg. VVM Publishing House. 244–255. 2018. (In Russ)].

Reorganization of the Human Brain Neural Networks Activity at the Uncompleted Images Recognition Threshold

K. Yu. Shelepin^{*a*} and Yu. E. Shelepin^{*a*}, *

^a Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia *e-mail: vshelepin@vandex.ru

The general patterns of restructuring the neural networks of the entire human brain are established when the threshold for image recognition in conditions of uncertainty is reached. This result was achieved using a combination of dynamic images and brain dynamics according to BOLD (blood-oxygen-level-dependent) – signal, magnetic resonance imaging. Indicators that when the threshold level of image recognition of objects in humans in the brain is reached, an increase in the BOLD signal occurs, and in other states of the brain, a decrease in the activity of neural networks. All areas of the brain whose activation is maximal in time, and the corresponding recognition thresholds, solutions, and tasks, also showed that this activity is less under subthreshold and even subthreshold conditions for creating dynamic images. Identified areas where this activity is minimal. Interpretation of data carried out in the framework of multichannel and multilevel models of the decision-making system for visual signals.

Keywords: vision, recognition of visual images, incomplete image, threshold, decision making, brain cytoarchitectonics, visualization of brain activity

ЦИТИРОВАТЬ:

Шелепин К.Ю., Шелепин Ю.Е. Перестройка активности нейронных сетей головного мозга человека при достижении порога распознавании фрагментированных изображений. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(4): 504–520. DOI: 10.31857/S086981392004007X

TO CITE THIS ARTICLE:

Shelepin K.Yu., Shelepin Yu.E. Reorganization of the Human Brain Neural Networks Activity at the Uncompleted Images Recognition Threshold. Russian Journal of Physiology. 106(4): 504–520. DOI: 10.31857/S086981392004007X

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ им. И.М. СЕЧЕНОВА 2020, том 106, № 4, с. 521–532

= ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СЕКРЕЦИИ АТР ВКУСОВЫМИ КЛЕТКАМИ ТИПА II

© 2020 г. С.С.Колесников*

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл., Россия *e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

> Поступила в редакцию 29.01.2020 г. После доработки 12.02.2020 г. Принята к публикации 12.02.2020 г.

Функциональной единицей вкусовой системы млекопитающих является вкусовая почка, включающая гетерогенную популяцию 50-80 различных клеток, в том числе, вкусовые клетки типа I, II и III. Помимо распознавания вкусовых молекул, вкусовые клетки кодируют сенсорную информацию в форме стимул-зависимой секреции афферентного нейротрансмиттера, стимулирующего вкусовой нерв. Афферентная нейропередача во вкусовых клетках типа II имеет много особенностей, ставящих их особняком в ряду экстерорецепторных клеток, функционирующих в сенсорных органах позвоночных. Так, клетки типа II в качестве нейротрансмиттера используют АТР, высвобождаемый через АТР-проницаемые ионные каналы. Хотя вкусовые клетки не имеют аксонов, клетки типа II электрически возбудимы и процесс секреции нейротрансмиттера контролируется потенциалом действия. Нами разработана математическая модель секреции АТР через потенциал-зависимый АТР-проницаемый ионный канал и проанализирована потенциал-зависимость секреции в стационарном случае и при импульсной стимуляции клетки. Выявленные закономерности секреции АТР позволяют прийти к заключению, что по сравнению с регуляцией выброса АТР градуальным рецепторным потенциалом, электрическая возбудимость вкусовых клеток расширяет динамический диапазон воспринимаемых вкусовых стимулов, обеспечивает большую надежность синаптической передачи и придает ей квантовый характер.

Ключевые слова: вкусовые клетки, секреция АТР, АТР-проницаемый канал, математическое моделирование

DOI: 10.31857/S0869813920040020

Функциональной единицей периферической вкусовой системы млекопитающих является вкусовая почка, формируемая плотно упакованной группой из 50—80 клеток четырех типов, включая вкусовые клетки типа I, II и III и базальные клетки. Эти клетки отличаются морфологически, функционально и на молекулярном уровне. Базальные клетки рассматриваются как прогениторные клетки вкусовой почки, способные дифференцироваться во взрослые вкусовые клетки различных типов. Клетки типа I выполняют преимущественно поддерживающую функцию подобно глиальным клеткам нервной системы [1]. Вкусовые клетки типа II являются основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, которые специализируются на распознавании горьких и сладких стимулов и стимулов категории умами (аминокислоты, рибонуклеотиды, пептиды). Клетки типа III детектируют кислые [2] и некоторые соленые стимулы [3].

Вкусовая трансдукция достаточно хорошо детализирована для клеток типа II. Специфическая химическая чувствительность этих вкусовых клеток обеспечивается двумя семействами поверхностных рецепторов T1R и T2R, принадлежащих к суперсемейству GPCR (G-protein-coupled receptor)-рецепторов [4]. Группу T1R образуют три рецепторных белка T1R1–T1R3, которые формируют гетеродимерный рецептор сладких соединений (T1R2/T1R3) и рецептор аминокислот (T1R1/T1R3) [4]. Семейство T2R включает порядка 30 GPCR-рецепторов, специализирующихся на распознавании горького [4, 5].

Для обеспечения однозначного кодирования вкусовой информации вкусовые клетки типа II формируют функционально непересекающиеся субпопуляции, каждая из которых распознает стимулы только одной вкусовой модальности, т.е. либо горькие, либо сладкие, либо умами [1, 6]. В остальном вкусовая трансдукция в клетках типа II универсальна. Вкусовые GPCR-рецепторы сопряжены специализированными G-белками с фосфолипазой Cβ2 (PLCβ2) [1, 6], которая катализирует гидролиз ключевого регуляторного/сигнального липида PIP₂ (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate), продуцируя тем самым два вторичных медиатора – IP_3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) и DAG (diacylglycerol) [7]. Роль DAG в физиологии вкусовых клеток неизвестна, а IP₃ обеспечивает активацию IP₃-рецепторов 3-го типа (IP₃R3) [8, 9], являющихся, как и все ІР₃-рецепторы, внутриклеточными, ІР₃-активируемыми Ca²⁺ каналами, функционирующими в эндоплазматическом ретикулуме и ответственными за высвобождение депонированного Ca²⁺ [7]. Важным усилительным элементом в клетках типа II являются Ca²⁺ -активируемые катионные каналы TRPM5 [10, 11], которые конвертируют стимул-зависимый выброс депонированного Ca²⁺ в градуальный рецепторный потенциал, деполяризующий клетку. Последний инициирует активацию потенциал-зависимых (ПЗ) Na⁺ каналов [12] и генерацию серии потенциалов действия (ПД) [13].

Афферентная нейропередача во вкусовых клетках типа II имеет много особенностей, ставящих их особняком в ряду экстерорецепторных клеток, функционирующих в сенсорных органах позвоночных. Так, в ответ на стимуляцию хемосенсорные нейроны главного обонятельного эпителия и вомероназального органа генерируют ПД, которые распространяются по аксонам и вызывают секрецию глутамата по экзоцитозному механизму в гломерулах обонятельной луковицы [14]. Фоторецепторные клетки и волосковые клетки в органе Корти не имеют аксонов, электрически невозбудимы и используют градуальный рецепторный потенциал для контроля входа Ca^{2+} и Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза афферентного нейротрансмиттера глутамата [15].

Вкусовые клетки типа II, в которых классические пресинаптические структуры отсутствуют, коммуницируют с афферентным вкусовым нервом, используя неканонический и во многом уникальный механизм нейропередачи. В качестве афферентного нейротрансмиттера используется ATP [16], который секретируется Ca²⁺-независимым образом при участии потенциал-зависимых ATФ-проницаемых ионных каналов [17, 18]. Ключевой субъединицей этого ATФ-проницаемого канала является канальный белок CALHM1 [19], функционирующий в комплексе с CALHM3 [20]. На данный момент неясно, какие эволюционные причины предопределили выбор данного механизма афферентной нейропередачи сенсорной информации во вкусовой клетке типа II. В частности, неясна физиологическая целесообразность генерации ПД вкусовыми клетками, поскольку у них нет аксона, а значит нет необходимости дистантной передачи сенсорной информации к ганглиозным нейрональным клеткам.

В настоящей работе представлена модель секреции ATP через ATP-проницаемый ионный канал, которая описывает потенциал-зависимость выброса ATP вкусовыми клетками и объясняет преимущества импульсной секреции, регулируемой ПД, в сравнении с градуальной, управляемой рецепторным потенциалом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ионный канал, проницаемый для молекулы ATP, должен иметь водную пору достаточно большого диаметра. Действительно, оценки минимального диаметра поры ионного канала, формируемого канальным белком CALHM1, дали величину 14 Å [21], что соответствует характерной размерности ATP. Поскольку при такой относительно большой поре ионные потоки через этот канал можно считать независимыми, нами было получено следующее транспортное уравнение для нестационарного потока анионов ATP $J_{ATP}(V, t)$ (см. приложение):

$$J_{\text{ATP}}(V, t) = L[ATP]_{in} \frac{V}{V_0} \frac{G(V, t)}{\exp(V/V_0) - 1},$$
(1)

где [*ATP*]_{in} – внутриклеточная концентрация ATP, *V* – трансмембранный потенциал, $V_0 = RT/zF$, G(V, t) – суммарная проводимость ATP-проницаемых каналов (далее ATP-проводимость) в момент времени *t* при потенциале *V*, *L* – константа. Следует отметить, что ATP может формировать комплексы с различными соединениями, включая основные моно- и дивалентные катионы цитоплазмы. Так, в случае простейшего внутриклеточного раствора, содержащего 1 мМ MgATP и 145 мМ KCl, при pH 6.8 и температуре 25°C концентрации основных ATP-ионов будут: [ATP⁻⁴] = 170 мкМ, [KATP⁻³] = 270 мкМ, [HATP⁻³] = 90 мкМ и [MgATP⁻²] = 460 мкМ. Как видно из приведенных оценок, основным ATP-анионом является комплекс MgATP⁻². Для простоты дальнейшего анализа будем считать, что ATP-проницаемый канал транспортирует ATP в форме MgATP⁻² [18]. В этом случае в уравнении (1) для *z* = 2*V*₀ = *R*T/*zF* ≈ 13 мВ при 25°C.

СТАЦИОНАРНЫЙ СЛУЧАЙ

Для установившегося потока ATP транспортное уравнение имеет вид:

$$J_{\rm ATP}(V) = L[ATP]_{in} \frac{V}{V_0} \frac{G_{\rm s}(V)}{\exp(V/V_0) - 1}.$$
(2)

В стационарном состоянии вероятность открытого состояния как функция мембранного потенциала во многих случаях подчиняется уравнению Больцмана [22]

$$P_{\rm o}(V) = P_{\rm max} / (1 + \exp(-(W - QV)/kT)), \tag{3}$$

где $P_{o}(V)$ — вероятность найти канал в открытом состоянии при потенциале V, P_{\max} — максимальная вероятность открытого состояния, W — свободная энергия канала в отсутствие электрического поля, Q — эффективный воротный заряд. Поскольку интегральная проводимость $G = P_{o}N\gamma$, где N — число каналов проводимости γ , то для стационарной проводимости $G_{s}(V)$ как функции потенциала справедливо выражение

$$G_s(V) = G_0 / (1 + \exp(-(V - V_g) / V_{g0})),$$
(4)

где $G_0 = P_0 N\gamma$, $V_g = W/Q$, $V_{g0} = kT/Q$. Параметры V_g и V_{g0} определяют положение зависимости на оси потенциалов и крутизну перехода от минимальной к максимальной проводимости в области физиологических потенциалов. Оценки для Q, полученные для различных каналов варьируют в пределах от 2 до 13 элементарных зарядов [22–24]. Поскольку kT/e = 25.7 мВ при 25°С, то $V_{\rm g0}$ варьирует в пределах 2–13 мВ. Таким образом, для стационарного потока АТР можно записать

$$J_{\text{ATP}}(V) = L[ATP]_{in} \frac{V}{V_0} \frac{1}{\exp\left(\frac{V}{V_0}\right) - 1} \frac{G_0}{\exp\left(\frac{V - V_g}{V_{g0}}\right) + 1}.$$
(5)

В этом выражении множитель, назовем его фактор Гольдмана $F_{\rm G}$,

$$F_G = \frac{V}{V_0} \frac{1}{\exp\left(\frac{V}{V_0}\right) - 1} \tag{6}$$

получен из весьма общих соображений, отражает пренебрежимо малый уровень АТР во внеклеточном растворе и характеризует транспортные свойства большой водной порой, которые фактически не зависит от молекулярной организации остальной части канала. Иными словами, F_G фактически является физическим инвариантом и зависимость $J_{ATP}(V)$ от молекулярной организации ATP-проницаемого канала проявляется в вариабельности параметров второго множителя, описываемого уравнением (4). Следует отметить, что уравнение (3) является адекватным приближением для вероятности открытого состояния лишь в частном случая ионного канала с двумя состояниями. Тем не менее, производное уравнение (4) хорошо аппроксимирует экспериментальную потенциал-зависимость интегральной проводимости, формируемую самыми разнообразными ионными каналами. В частности, стационарная интегральная проводимость изолированных вкусовых клеток, определяемая в эксперименте [18] (рис. 1А, кружочки) в среднем адекватно аппроксимируется уравнением (3) при $V_{\rm g}$ = 31 мВ и $V_{\rm g0}$ = 11 мВ (рис. 1, черная кривая). Следует отметить, что в условиях диализа внутриклеточным раствором CsCl, выходящие ПЗ токи в клетках типа II (рис. 1А) преимущественно переносятся АТР-проницаемыми каналами [18], поэтому далее будем считать, что интегральная ПЗ-проводимость является адекватным приближением для АТР-проводимости.

Как проиллюстрировано на рис. 1A, фактор F_G (синяя кривая) уменьшается, а стационарная АТР-проводимость G_s увеличивается с ростом потенциала V. При значениях параметров $V_{\rm g}$ = 31 мВ и $V_{\rm g0}$ = 11 произведение $F_{\rm G}$ и $G_{\rm s}$ дает колоколообразную зависимость, представленную черной кривой на рис.1Б. Следует отметить, что активность рекомбинантного АТР-проницаемого канала САLHM1 сильно зависит от экстраклеточного Ca^{2+} , так что в терминах уравнения (4) параметры интегральной проводимости, детерминируемой CALHM1, варьируют от $V_{\rm g} = -76$ мВ и $V_{\rm g0} = 40$ мВ в отсутствие Ca²⁺ до $V_{\rm g} = 82$ и $V_{\rm g0} = 16$ мВ в присутствии 5 мМ Ca²⁺ [25]. Поскольку в условиях плотно упакованной популяции клеток вкусовой почки электрическая активность клеток может приводить к заметным изменениям концентрации экстраклеточных ионов, включая Ca²⁺, то потенциал-зависимость АТР-проводимости в клетках типа II может заметно варьировать. Мы проиллюстрировали эту возможность, используя транспортную модель в форме уравнения (5) и внося относительно небольшие "Са²⁺-индуцируемые" отклонения параметров уравнения (4). Так, при $V_g = 25$ мВ и $V_{g0} = 14$ мВ, а также $V_g = 40$ мВ и $V_{g0} = 9$ мВ, уравнение (4) дает зависимости, отображенные красной и зеленой кривыми соответственно (рис. 1А). Для этих параметров уравнение (5) дает для потока АТР-зависимости, представленные на рис. 1B красной и зеленой кривыми. Эти зависимости показывают, что, относительно небольшие девиации потенциал-зависимости про-



Рис. 1. Зависимость фактора $F_{\rm G}$, стационарной ATP-проводимости и потока ATP от потенциала. $A - F_{\rm G}(V)$ рассчитывался по уравнению (6) при $V_0 = 13$ мВ и нормировался на значение фактора при V = -100 мВ (синяя кривая). Стационарная ATP-проводимость $G_{\rm S}(V)$ рассчитывалась по уравнению (4) и нормировалась на значение проводимости при V = 80 мВ. Черная кривая, полученная при $V_{\rm g} = 31$ мВ, $V_{\rm g0} = 11$ мВ, удовлетворительно описывает экспериментальную зависимость (символы). Красная и зеленая кривые генерировались при $V_{\rm g} = 25$ мВ и $V_{\rm g0} = 14$ мВ и при $V_{\rm g} = 40$ мВ и $V_{\rm g0} = 9$ мВ соответственно. B - Поток ATP, нормированный на максимальное значение, рассчитывался по уравнению (5) при различных $G_{\rm s}(V)$, показанных в (A).

Fig. 1. Factor $F_{\rm G}$, steady-state ATP-conductance, and ATP efflux as functions of membrane voltage. $A - F_{\rm G}(V)$ was calculated by using Eq. 6 at $V_0 = 13$ mV and normalized on its value at V = -100 MB (blue curve). The steady-state ATP-conductance $G_{\rm S}(V)$ was calculated based on Eq.4 and normalized on its value at V = 80 mV. The black curve, which was obtained at $V_{\rm g} = 31$ mV, $V_{\rm g0} = 11$ mV, satisfactorily fits the experimental dependence (symbols). The red and green lines were generated at $V_{\rm g} = 25$ mV and $V_{\rm g0} = 14$ mV and $V_{\rm g} = 40$ mV and $V_{\rm g0} = 9$ mV, respectively. *B*-ATP efflux normalized on the maximal values was calculated at variable $G_{\rm S}(V)$ shown in (*A*) by using Eq. 5.

водимости за счет крутой зависимости фактора $F_{\rm G}$ от потенциала конвертируются в существенные изменения потенциал-зависимости потока ATP. В частности, для зависимости, иллюстрируемой зеленой кривой, невозможен выброс ATP в области физиологических потенциалов, а значит регуляция секреции этого нейротрансмиттера градуальным рецепторным потенциалом. Эти вычислительные эксперименты показывают, что квази-стационарный поток ATP через ATP-проницаемый канал вряд ли может быть надежным носителем сенсорной информации.

НЕСТАЦИОНАРНЫЙ СЛУЧАЙ

Поскольку в реальности выброс нейротрансмиттера АТР в клетках типа II регулируется стимул-зависимой серией ПД, ниже в рамках транспортного уравнения (1) мы рассмотрим нестационарный поток через АТР-проницаемый канал и проанализируем связь его кинетических параметров и параметров импульсной стимуляции с количеством секретируемого АТР.

Характерной особенностью ATP-проницаемых каналов является их медленная активация в ответ на деполяризацию и медленная деактивация при реполяризации мембраны [18, 25]. Поскольку во вкусовых клетках типа II преимущественно эти каналы ответственны за ПЗ выходящие токи [18, 19], мы на основе экспериментов,



Рис. 2. Кинетические характеристики выходящих ПЗ токов. A – типичное семейство ПЗ выходящих токов, стимулируемых деполяризацией клетки типа II 100 мс импульсами до -10...50 мВ. Реполяризация мембраны к -70 мВ инициирует хвостовые токи, обусловленные деактивацией ATP-проницаемых каналов. Черные кружочки соответствуют уравнению (7). B – потенциал-зависимость характерных времен активации и деактивации ATP-проницаемых каналов. Символы – экспериментальные данные из работы (18), толстая и тонкая линии получены из уравнения (10) и (11) соответственно.

Fig. 2. Kinetics of outward VG currents A – Typical family of VG outward currents stimulated 100-ms pulses depolarizing a type II cell from –10 to 50 mV. The membrane repolarization to –70 mV initiated inward tail currents resulted from inactivation of ATP-permeable channels. The black circles correspond to Eq. 7. B – Characteristic times of activation and deactivation of ATP-permeable channels versus membrane voltage. The symbols represent experimental data from the work (18); the thin and thick lines correspond to Eq. 10 and Eq. 11, respectively.

проводившихся ранее [18], анализировали аналитически кинетические характеристики ATP-проницаемых каналов, ответственных за выходящие ПЗ токи в клетках типа II в условиях диализа внутриклеточным раствором CsCl (рис. 2). Деполяризация этих клеток, поддерживаемых при –70 мВ, вызывала быстро инактивирующиеся входящие ПЗ Na⁺ токи и медленно активирующиеся выходящие токи [18] (рис. 2*A*). Последние удовлетворительно аппроксимировались уравнением (рис. 2*A*, кружечки):

$$I(V, t) = I_{1}(V) + (I_{s}(V) - I_{1}(V))(1 - \exp(-t/\tau_{a})),$$

$$I_{1}(V) = G_{1}(V - V_{1}),$$

$$I_{s}(V) = G_{s}(V)(V - V_{VG}),$$
(7)

где I_1 и I_s – ток утечки и стационарный выходящий ПЗ ток соответственно; G_1 , и V_1 – проводимость утечки и потенциал реверсии тока утечки; G_s , и V_{VG} – стационарная ПЗ проводимость и потенциал реверсии ПЗ тока. Как было оценено [18], V_{VG} = 4.2 ± ± 1.5 мВ (n = 9) и G_0 = 55 ± 7 нСм (n = 9) для стационарной проводимости в уравнении Больцмана (4) для G_s .

Деактивация ПЗ тока в ответ на реполяризацию была практически моноэкспоненциальной, и хвостовые токи (рис. 2*A*) хорошо аппроксимировалась уравнением:

$$I_{t}(V, t) = I_{1}(V) + I_{tp}(V) \exp(-t/\tau_{d}),$$
(8)

где $I_{\rm tp}(V) = G_{\rm s}(V)(V_{\rm h} - V_{\rm VG}).$

Полагая физиологически целесообразным отсутствие секреции ATP при потенциале покоя, из уравнений (7) и (8) следует, что при импульсной стимуляции эволюцию ATP-проницаемости во времени можно описать следующим образом:

$$0$$
при $t < 0,$
 $G(V, t) = G_{s}(V)[1 - \exp(-t/\tau_{a})]$ при $0 \le t \le T,$ (9)
 $G_{s}(V)[1 - \exp(-T/\tau_{d})]\exp((T-t)/\tau_{d})$ при $t > T.$

Отметим, что характерные времена активации τ_a и деактивации τ_d ПЗ выходящего тока зависели от потенциала, и для дальнейшего анализа мы аппроксимировали экспериментальные данные аналитическими зависимостями. Экспериментальная зависимость τ_a (рис. 2*B*, треугольники) аппроксимировалась выражением (рис. 2*B*), толстая линия):

$$\tau_{\rm a}(V) = \tau_{\rm a0} + \tau_{\rm a1}/(1 + \exp((V - V_{\rm a})/V_{\rm a0}))$$
(10)

где $\tau_{a0} = 10$ мс, $\tau_{a1} = 15$ мс, $V_{a0} = 12.7$ мВ, $V_a = 15$ мВ. Аналогичная аналитическая зависимость (Fig. 2*B*, тонкая линия) использовалась для аппроксимации экспериментальных значений τ_d (Fig. 2*B*, квадраты):

$$\tau_{\rm d}(V) = \tau_{\rm d0} - \tau_{\rm d1} / (1 + \exp((V - V_{\rm d}) / V_{\rm d0}))$$
(11)

при $\tau_{d0} = 5.4$ мс, $\tau_{d1} = 4.0$ мс, $V_{d0} = 12.7$ mV, $V_d = 32$ mV.

Используя уравнения 1, 7–11 при указанных параметрах, можно вычислить количество ATP, высвобождаемое клеткой через ATP-проницаемые каналы в ответ на импульсную стимуляцию длительностью *T*, деполяризующую мембрану от поддерживаемого потенциала V_h до потенциала *V*. Следует отметить, что в период активации канала в ответ на деполяризацию поток ATP детерминируется потенциалом *V*. Последний определяет как кинетику активации ATP-проводимости, так и движущую силу для ATP потока, который за время *T* переносит количество ATP Q_a . В период деактивации канала, вызванной реполяризацией мембраны к поддерживаемому потенциалу (рис. 2*A*), соответствующий поток ATP происходит при постоянном потенциале V_h , высвобождая количество ATP Q_d . В результате импульсной стимуляции общее количество выброшенного ATP $Q_{ATP} = Q_a + Q_d$, где

$$Q_{\rm a} = \int_{0}^{T} J_{\rm ATP}\left(t, V\right) dt, \quad Q_{\rm d} = \int_{T}^{\infty} J_{\rm ATP}\left(t, V\right) dt. \tag{12}$$

Комбинируя уравнения 7-12, можно получить следующие соотношения:

$$Q_{a}(T, V) = L[ATP]_{in} \frac{V}{V_{0}} \frac{1}{\exp\left(\frac{V}{V_{0}}\right) - 1} \frac{G_{0}}{\exp\left(-\frac{V - V_{g}}{V_{g0}}\right) + 1} K_{a}(T),$$
(13)

$$Q_{\rm d}(T, V) = L[ATP]_{in} \frac{V_{\rm h}}{V_0} \frac{1}{\exp\left(\frac{V_{\rm h}}{V_0}\right) - 1} \frac{G_0}{\exp\left(-\frac{V - V_g}{V_{g0}}\right) + 1} K_{\rm d}(T).$$
(14)

где факторы времени стимуляции $K_{a}(T)$ и $K_{d}(T)$ определяются как:

$$K_{\mathrm{a}}(T) = T - \tau_{\mathrm{a}} \left(1 - \exp\left(-T/\tau_{\mathrm{a}}\right) \right), \tag{15}$$

$$K_{\rm d}\left(T\right) = \tau_{\rm d}\left(1 - \exp\left(-T/\tau_{\rm a}\right)\right). \tag{16}$$

Поскольку уравнение (13) с точностью до множителя $K_a(T)$ совпадает с уравнением (5), $Q_a(T, V)$ является колоколообразной функцией потенциала V (рис. 3A, B, красные кривые) при любой длительности стимуляции T. В то же время, в выражении для $Q_a(T, V)$ переменным по V является лишь множитель, описывающий стационарную ATP-проводимость, и в целом $Q_d(T, V)$ является монотонной функцией с насыщением типа изотермы Ленгмюра (рис. 3A, B, синие кривые). Отношение

$$Q_{\rm d}/Q_{\rm a} = \frac{V_{\rm h}}{V} \frac{\exp(V/V_0) - 1}{\exp(V_{\rm h}/V_0) - 1} \frac{\tau_{\rm d} \left(1 - \exp\left(-T/\tau_{\rm a}\right)\right)}{T - \tau_{\rm a} \left(1 - \exp\left(-T/\tau_{\rm a}\right)\right)}$$

показывает, что относительный вклад потоков АТР в процессе активации АТР-проводимости и ее деактивации является функцией потенциала и длительности стимуляции. При относительно продолжительной стимуляции ($T \gg \tau_a > \tau_d$, $Q_a(T, V)$ доминирует при физиологических потенциалах, и общее количество высвободившегося АТР $Q_{ATP} = Q_a + Q_d$ является колоколообразной функцией (рис. 3*A*). При относительно кратковременной стимуляции ($T < \tau_a$) модель предсказывает доминантный вклад $Q_d(T, V)$, и общее Q_{ATP} является монотонной функцией потенциала (рис. 3*B*). Следует отметить, что оба предсказания модели подтверждаются в экспериментах (рис. 3*C*, *D*), в которых потенциал-зависимость секреции АТР вкусовыми клетками типа II исследовалась методом биосенсора [18].

Теперь рассмотрим физиологические последствия потенциал-зависимости секреции АТР при разных стимуляциях. Следует отметить, что потенциал покоя вкусовых клеток оценивался в нескольких работах и полученные величины лежат в диапазоне -65...-45 мВ [26, 27]. Учитывая электрическую возбудимость вкусовых клеток типа II, физиологически целесообразно поддерживать потенциал покоя V_r не выше -50 мB, чтобы обеспечить достаточно большую фракцию не инактивированных потенциал-зависимых (ПЗ) Na⁺ каналов. Это также целесообразно, чтобы минимизировать утечку АТР из покоящихся клеток. Поэтому в качестве достаточно правдоподобной оценки примем $V_r = -55$ мВ. Как следует из анализа выброса АТР в ответ на 2-секундную деполяризацию (рис. 4А), имитирующей действие рецепторного потенциала, градуальная регуляция секреции АТР создает ряд проблем для афферентной синаптической передачи. Во-первых, рецепторный потенциал во вкусовых клетках типа II генерируется при участии катионных каналов TRPM5, примерно в равной степени проницаемых для ионов Na⁺ и K⁺ и поэтому потенциал реверсии генераторного тока близок к нулю [28]. В силу этого рецепторный потенциал может деполяризовать вкусовую клетку не более чем до 0 мВ (рис. 4A), Потенциал-зависимость секреции АТР такова, что в области градуальных потенциалов -55...-30 мМ она пренебрежимо мала, это означает, что рецепторные потенциалы, вызванные малыми и средними по интенсивности вкусовыми стимулами фактически не могли бы инициировать афферентную передачу сенсорной информации. Кроме того, как уже обсуждалось выше, поток АТР, регулируемый градуальным потенциалом, должен быть весьма вариабельным при незначительных сдвигах активационной кривой АТР-проницаемого канала, вызванных изменениями в микроокружении (рис. 1).

Более целесообразной выглядит стратегия кодирования вкусовой информации посредством импульсной секреции АТР при участии ПД. Действительно, порог генерации ПД во вкусовых клетках лежит в области –45 мВ [18] и поэтому пороговому вкусовому стимулу достаточно сдвинуть мембранный потенциал на величину порядка 10 мВ. Важной особенностью ПД-регулируемой секреции является то, что потенциал-зависимость выброса АТР описывается кривой с насыщением (рис. 4*B*), с плато в области характерных величин ПД [18]. Для такой зависимости небольшие



Рис. 3. Зависимость количества секретируемого АТР от величины деполяризующего импульса и его длительности. *А*, *B* – черные кривые, теоретическое значение $Q_{ATP} = Q_a + Q_d$ при деполяризации в течение 2 с (*A*) и 100 мс (*B*) импульсом потенциала от -70 мB до -60... 90 мВ; красная и синяя кривые – Q_a и Q_d как функции деполяризующего потенциала. Величины Q_a и Q_d вычислялись с использованием уравнений (13) и (14) соответственно. *С*, *D* – экспериментально оцененное [18] количество АТР (символы), выброшенное вкусовой клеткой типа II при данном потенциале при импульсной деполяризации в течение 2 с (*C*) и 100 мс (*D*). В (*C*) темно-серая полоса обозначает область деполяризующих потенциалов, в которой секреция АТР пренебрежимо мала.

Fig. 3. ATP release depending on a value and duration of a depolarizing pulse. *A*, *B* – Black curves represent $Q_{ATP} = Q_a + Q_d$ calculated at 2-s (A) μ 100-ms (B) depolarization from -70 mV to -60... 90 MB mV; the red and blue curves represent Q_a and Q_d calculated at different membrane voltages by using Eq. 13 and Eq. 14, respectively. *C*, *D* – Voltage dependence of experimentally evaluated [18] quantity of ATP (symbols) released by taste cells of the type II upon 2-s (*C*) and 100-ms (*D*) pulse depolarization. In (*C*), the dark-gray strip highlights the range of membrane voltages, wherein ATP secretion is negligible.

сдвиги активационной кривой ATP-проницаемого канала практически не скажутся на секреции ATP. Кроме того, в силу своей кратковременности и универсальности формы, каждый ПД должен инициировать выброс лишь незначительного, но одинакового количества ATP, детерминируя квантовый характер секреции нейротрансмиттера, как это имеет место в классических химических синапсах. В этом случае сенсорная информация кодируется количеством ПД, генерируемых пропорционально интенсивности вкусового стимула.

Таким образом, рассмотренные выше закономерности секреции ATP через ATP-проницаемый ионный канал позволяют прийти к заключению, что по сравнению с регуляцией выброса ATP градуальным рецепторным потенциалом, электрическая возбудимость вкусовых клеток обеспечивает более надежную синаптическую передачу и более широкий динамический диапазон воспринимаемых вкусовых стимулов.

Приложение

Ионный канал, проницаемый для молекулы ATP, должен иметь водную пору, достаточно большого диаметра. Действительно, оценки минимального диаметра поры ионного канала, формируемого канальным белком CALHM1, дали величину 14 Å (21), что соответствует характерной размерности ATP. При такой относительно большой поре ионные потоки через канал CALHM1 можно описывать в приближении независимых потоков, используя уравнение GHK (Goldman–Hodgkin–Katz):

$$I_{\rm S} = P_{\rm S} z_{\rm S}^2 \frac{F^2 V}{RT} \frac{[S]_{\rm in} - [S]_{\rm out} \exp\left(-z_{\rm S} F V/RT\right)}{1 - \exp\left(-z_{\rm S} F V/RT\right)}.$$
(111)

Где *R*, *T*, и *F* – газовая постоянная, абсолютная температура и число Фарадея, соответственно; $I_{\rm S}$ – ионный ток переносимый ионом S, $P_{\rm S}$ – проницаемость канала для этого иона, $z_{\rm S}$ – заряд иона, *V* – трансмембранный потенциал, $[S]_{\rm in}$ и $[S]_{\rm out}$ – внутриклеточная и внеклеточная концентрация иона. С учетом уравнения (1П) ток аниона ATP через одиночный ATP-проницаемый канал будет иметь вид

$$i_{\rm ATP} = P_{\rm ATP} z^2 \frac{F^2 V}{RT} \frac{[ATP]_{\rm in} - [ATP]_{\rm out} \exp(zFV/RT)}{1 - \exp(zFV/RT)},$$
(211)

Тогда для нестационарного потока ATP $J_{ATP}(V, t)$ получаем следующее выражение:

$$J_{\text{ATP}}(V, t) = -I_{\text{ATP}}/ze = -i_{\text{ATP}}NP(V, t)/ze, \qquad (3\Pi)$$

где I_{ATP} — величина интегрального тока, переносимого анионами ATP; e — элементарный заряд; z — абсолютный заряд аниона ATP, N — число ATP-проницаемых каналов; P(V, t) — нестационарная вероятность открытого состояния канала при данном потенциале V. Поскольку при физиологических условиях ATP-анионы переносят небольшую фракцию ионного тока через ATP-проницаемые каналы, уравнение (3П) преобразовывается к виду:

$$J_{\rm ATP}(V, t) = L[ATP]_{in} \frac{V}{V_0} \frac{1 - r \exp(V/V_0)}{\exp(V/V_0) - 1} G(V, t), \tag{4\Pi}$$

где $L = P_{ATP}F/\gamma e$, γ – проводимость одиночного ATP-проницаемого канала; $V_0 = =RT/zF$; $r = [ATP]_{out}/[ATP]_{in}$, $G(V, t) = \gamma NP(V, t)$ – интегральная проводимость N

АТР-проницаемых каналов. Учитывая, что внутриклеточная концентрация АТР превышает внеклеточную на 3–4 порядка, величина $r = [ATP]_{out}/[ATP]_{in}$ близка к нулю, и получаем следующее окончательное выражение для потока ATP:

$$J_{\rm ATP}(V, t) = L[ATP]_{in} \frac{V}{V_0} \frac{G(V, t)}{\exp(V/V_0) - 1}.$$
(511)

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант 18-14-00347).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Roper S.D., Chaudhari N.* Taste buds: cells, signals and synapses. Nat. Rev. Neurosci. 18: 485–497. 2017.
- Huang Y.A., Maruyama Y., Stimac R., Roper S.D. Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. J. Physiol. 586: 2903–2912. 2008.
- Oka Y., Butnaru M., von Buchholtz L., Ryba N.J., Zuker C.S. High salt recruits aversive taste pathways. Nature. 494: 472–475. 2013.
- 4. *Chandrashekar J., Hoon M.A., Ryba N.J., Zuker C.S.* The receptors and cells for mammalian taste. Nature. 444: 288–294. 2006.
- Behrens M., Meyerhof W. Vertebrate bitter taste receptors: Keys for survival in changing environments. J. Agric. Food Chem. 66: 2204–2213. 2018.
- Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Mueller K.L., Cook B., Wu D., Zuker C.S., Ryba N.J.P. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. Cell. 112: 293–301. 2003.
- 7. *Berridge M.J.* The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. Physiol. Rev. 96: 1261–1296. 2016.
- 8. *Clapp T.R., Stone L.M., Margolskee R.F., Kinnamon S.C.* Immunocytochemical evidence for coexpression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. BMC Neurosci. 2: 6. 2001.
- 9. *Miyoshi M.A., Abe K., Emori Y.* IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. Chem. Senses. 26: 259–265. 2001.
- Perez C.A., Huang L., Rong M., Kozak J.A., Preuss A.K., Zhang H., Max M., Margolskee R.F. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. Nat. Neurosci. 5: 1169– 1176. 2002.
- Hofmann T., Chubanov V., Gudermann T., Montell C. TRPM5 is a voltage-modulated and Ca²⁺activated monovalent selective cation channel. Curr. Biol. 13: 1153–1158. 2003.
- 12. Gao N., Lu M., Echeverri F., Laita B., Kalabat D., Williams M.E., Hevezi P., Zlotnik A., Moyer B.D. Voltage-gated sodium channels in taste bud cells. BMC Neurosci. 10: 20. 2009.
- 13. Yoshida R., Sanematsu K., Shigemura N., Yasumatsu K., Ninomiya Y. Taste receptor cells responding with action potentials to taste stimuli and their molecular expression of taste related genes. Chem. Senses. 30 (suppl 1): i19–i20. 2005.
- Wilson R.I., Mainen Z.F. Early events in olfactory processing. Annu. Rev. Neurosci. 29: 163–201. 2006.
- 15. *Matthews G., Fuchs P.* The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. Nat. Rev. Neurosci. 11: 812–822. 2010.
- Finger T.E., Danilova V., Barrows J., Bartel D.L., Vigers A.J., Stone L., Hellekant G., Kinnamon S.C. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. Science 310: 1495–1499. 2005.
- 17. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jiang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. EMBO J. 26: 657–667. 2007.
- Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Kolesnikov S.S. Voltage dependence of ATP secretion in mammalian taste cells. J. Gen. Physiol. 132: 731–744. 2008.
- Taruno A., Vingtdeux V., Ohmoto M., Ma Z., Dvoryanchikov G., Li A., Adrien L., Zhao H., Leung S., Abernethy M., Koppel J., Davies P., Civan M.M., Chaudhari N., Matsumoto I., Hellekant G., Tordoff M.G., Marambaud P., Foskett J.K. CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. Nature. 495: 223–226. 2013.
- 20. Ma Z., Taruno A., Ohmoto M., Jyotaki M., Lim J.C., Miyazaki H., Niisato N., Marunaka Y., Lee R.J., Hoff H., Payne R., Demuro A., Parker I., Mitchell C.H., Henao-Mejia J., Tanis J.E., Matsumoto I.,

Tordoff M.G., Foskett J.K. CALHM3 is essential for rapid ion channel-mediated purinergic neurotransmission of GPCR-mediated tastes. Neuron. 98: 547–561. 2018.

- Ma Z., Tanis J.E., Taruno A., Foskett J.K. Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. Pflugers Arch. 468: 395–403. 2016.
- 22. *Hille B*. Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates. Sunderland. Massachusetts. USA, 3rd edition. 2001.
- 23. Gonzalez D., J.M. Gomez-Hernandez L.C. Barrio. 2007. Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: An integrative appraisal. Prog. Biophys. Mol. Biol. 94: 66–106.
- 24. *Bezanilla F.* The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. Physiol. Rev. 80: 555–592. 2000.
- 25. Ma Z., Siebert A.P., Cheung K.H., Lee R.J., Johnson B., Cohen A.S., Vingtdeux V., Marambaud P., Foskett J.K. Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) is the pore-forming subunit of an ion channel that mediates extracellular Ca²⁺ regulation of neuronal excitability. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 109: E1963–E1971. 2012.
- Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. Electrical excitability of taste cells. Mechanisms and possible physiological significance Biochemistry (Moscow). Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology. 6: 169–185. 2012.
- 27. *Ma Z., Saung W.T., Foskett J.K.* Action potentials and ion conductances in wild-type and CALHM1-knockout Type II taste cells. J. Neurophysiol. 117: 1865–1876. 2017.
- Zhang Z., Zhao Z., Margolskee R., Liman E. The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. J. Neurosci. 27: 5777–5786. 2007.

Mathematical Model of ATP Secretion in Taste Cells of the Type II

S. S. Kolesnikov*

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, Russia *e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

The taste bud, a functional unit of the peripheral mammalian taste system, consists of 50–80 densely packed cells of several types, including taste cells of the type I-III. Apart from identifying tastant molecules, taste cells encode sensory information in the form of stimulus-dependent release of an afferent neurotransmitter stimulating the taste nerve. The afferent neurotransmission in type II cells is rather peculiar compared to exteroreceptors operating in other sensory organs of vertebrates. In particular, taste cells of the type II employ ATP as an afferent neurotransmitter and release it via ATP- permeable ion channels. Although taste cells are axonless, type II cells are electrically excitable, and neurotransmitter secretion is controlled by action potentials. Here we elaborated a mathematical model of ATP release with a voltage-gated ATP-permeable channel as a conduit of ATP efflux. Based on this model, we analyzed a voltage dependence of steady-state ATP release as well as transient ATP secretion stimulated by a voltage pulse. These computer simulations revealed certain features of channel-mediated ATP secretion that led us to the following inference. Compared to ATP release mediated by gradual receptor potential, the electrical excitability of type II cells provides the higher reliability of synaptic transmission, renders it quantal, and widens a dynamic range of detectable taste stimuli.

Keywords: taste cells, ATP secretion, ATP-permeable channel, mathematical modeling

ЦИТИРОВАТЬ:

Колесников С.С. Математическая модель секреции АТР вкусовыми клетками типа II. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(4): 521–532. DOI: 10.31857/S0869813920040020

TO CITE THIS ARTICLE:

Kolesnikov S.S. Mathematical Model of ATP Secretion in Taste Cells of the Type II. Russian Journal of Physiology. 106(4): 521–532. DOI: 10.31857/S0869813920040020