

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской
Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

**«Чувствительность и быстроедействие палочек и колбочек:
эволюционный аспект»**

Ротов Александр Юрьевич

06.06.01 Биологические науки
03.03.01 Физиология

Научный руководитель
д.б.н. Фирсов Михаил Леонидович

ИЭФБ РАН
Санкт-Петербург
2021

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Зрительная система позвоночных способна функционировать в широком диапазоне интенсивностей природного освещения благодаря двум принципиально различным типам фоторецепторов, палочкам и колбочкам. Палочки функционируют при ночных и сумеречных интенсивностях, в то время как колбочки отвечают за дневное зрение. Изначально принадлежность фоторецептора к одной или другой категории определялась в первую очередь по специфической морфологии его наружного сегмента – специализированного клеточного компартмента, в котором происходит преобразование энергии падающего света в электрический ответ (Каламкаров, Островский, 2002). Однако в ходе многолетних исследований накопилось множество примеров, когда морфологию наружного сегмента невозможно однозначно отнести к палочковой или колбочковой (описаны в работе Walls, 1934).

Существование фоторецепторов с промежуточной палочко-колбочковой морфологией хорошо объяснялось в рамках концепции, сформулированной Уоллсом в 1942 г., и получившей название «теория трансмутаций фоторецепторов» (Walls, 1942). Уоллс постулировал, что в ходе эволюции позвоночных палочки и колбочки неоднократно терялись и возникали вновь путем взаимного превращения (трансмутации). Предполагалось, что при смене образа жизни животного с дневного на ночной и обратно, определенные типы фоторецепторов изменяются, функционально подстраиваясь под новые условия. В качестве наиболее ярких примеров трансмутаций Уоллс приводит гекконов и змей, среди которых встречаются виды с преимущественно палочковой или колбочковой сетчаткой, а также с переходными рецепторами (Walls, 1934).

Согласно современным представлениям, фоторецепторы всех изученных позвоночных преобразуют свет в электрический ответ с помощью одного и того же сигнального каскада – каскада фототрансдукции. Большая часть белков этого каскада существуют в палочко- и колбочко-специфичной форме, что говорит о том, что эти два типа рецепторов представляют собой разные эволюционные линии, разделившиеся на уровне общего предка позвоночных (см. обзор Lamb, 2020). Эти линии не прерывались и не переходили одна в другую, как предполагал Уоллс, однако очевидно имеют место отдельные случаи трансмутации колбочек в палочкоподобные клетки и наоборот (Walls, 1934). При таких переходах палочко-колбочковая специфика имеющихся в клетке фототрансдукционных белков сохраняется,

но изменяется уровень их экспрессии и происходят локальные аминокислотные замены в функциональных доменах (Zhang et al., 2006, Kojima et al., 2017).

Таким образом, по морфологии и специфике белков сигнального каскада не всегда возможно определить истинную функциональную роль фоторецептора. Поэтому некоторыми авторами предлагается определение понятий «палочка» и «колбочка» через их физиологические свойства (Lamb, 2013). В такой формулировке типичными палочками считаются фоторецепторы, способные к счету одиночных фотонов, и насыщающиеся при умеренных дневных освещенностях (10 – 100 лк). Типичные же колбочки могут функционировать, не насыщаясь, при максимальных природных освещенностях (до 100000 лк и выше), а их ответ на вспышку света примерно на порядок быстрее, чем у палочек (Говардовский с соавт., 2015). Несомненно, такой подход отражает лишь внешние проявления физиологических и биохимических механизмов, обеспечивающих выполнение фоторецепторами их специфических функций. Наблюдаемые свойства фотоответов палочек и колбочек напрямую связаны с кинетикой процессов включения и выключения их каскада фототрансдукции (Astakhova et al., 2015). Важную роль также играют биохимические свойства зрительного пигмента, в частности скорость его распада после поглощения фотона и частота спонтанных тепловых изомеризаций (Golobokova, Govardovskii, 2006; Baylor et al., 1980).

Перечисленные параметры, определяющие чувствительность и быстродействие, могут быть оценены количественно, что позволит сопоставить известные примеры трансмутированных фоторецепторов позвоночных с типичными палочками и колбочками и подтвердить или опровергнуть их переходный характер. Также такой анализ может выявить конкретные физиологические изменения, сопровождающие переход клетки от одного типа к другому. В рамках данной работы, помимо упомянутых выше характеристик фотоответа, будет рассмотрена физиологическая природа задержки в каскаде фототрансдукции и определены этапы, определяющие ее длительность. Затем, кинетика фотоответов и биохимия пигментов будут описаны для классических палочек и колбочек холоднокровных позвоночных, а также для двух типов фоторецепторов, обладающих переходными свойствами – коротких рецепторов круглоротых, и зеленых палочек бесхвостых амфибий.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Провести сравнительный анализ основных физиологических параметров, определяющих чувствительность и кинетику фотоответов для типичных палочек и колбочек, а также двух представителей переходных фоторецепторов.

Задачи исследования:

1. Определить этапы активации фототрансдукционного каскада, определяющие длительность задержки электрического ответа фоторецепторов.
2. Оценить параметры, определяющие кинетику фотоответа коротких рецепторов миноги и зеленых палочек амфибий и сравнить их с величинами, характерными для палочек и колбочек холоднокровных.
3. Определить скорость фотолиза зрительного пигмента и частоту его спонтанных изомеризаций у коротких рецепторов миноги и зеленых палочек амфибий и сопоставить их со значениями типичных палочковых и колбочковых пигментов.

Положения, выносимые на защиту

1. Задержка в каскаде фототрансдукции определяется кинетикой этапа активации фосфодиэстеразы трансдуцином, причем скорость этого процесса в колбочках оказывается в 10 раз выше, чем в палочках.
2. Зеленые палочки бесхвостых амфибий являются высокоспециализированными рецепторами ночного зрения, поскольку кинетика процессов включения каскада фототрансдукции у них совпадает с таковой у типичных палочек, а выключение происходит в 2 раза медленнее, что делает их еще более эффективными счетчиками одиночных фотонов.
3. Частота спонтанных изомеризаций зрительного пигмента зеленых палочек в 1.5-2 раза выше, чем у родопсина типичных палочек, однако за счет меньшего объема их наружного сегмента, частота изомеризаций в одной клетке у двух типов рецепторов совпадает.
4. Короткие рецепторы миноги представляют собой переходный тип фоторецептора, поскольку Эффективность процессов активации фототрансдукционного каскада у них соответствует типичным колбочкам, кинетика выключения – палочкам, а фотолиз зрительного пигмента протекает с промежуточной скоростью.

5. Низкое усиление в сигнальном каскаде коротких фоторецепторов миноги не позволяет им функционировать в роли детекторов одиночных фотонов, поскольку величина ответов при спонтанной активации одиночных молекул зрительного пигмента оказывается ниже уровня шума клетки.

Научная новизна исследования

Фотоответы палочек и колбочек позвоночных имеют отчетливую фазу задержки, чье происхождение обычно объясняется цепью реакций каскада фототрансдукции, приводящими к образованию активного эффекторного белка – фосфодиэстеразы (Pugh, Lamb, 2000). В нашей работе впервые изучается выявляются конкретные этапы, определяющие ее длительность. Дается оценка скорости активации фосфодиэстеразы G-белком трансдуцином, причем значение для колбочек оказывается необъяснимым в рамках текущих представлений об активации каскада.

В сетчатке речной миноги имеется два типа фоторецепторных клеток, короткие и длинные рецепторы, оба имеющие колбочковую морфологию. Спектрофотометрическими и электрофизиологическими методами было показано, что длинные клетки являются функционально колбочками, а короткие относительно них играют роль сумеречных рецепторов (Govardovskii, Lychakov, 1984; Asteriti et al., 2015). В представленной работе впервые проводится сравнение коротких рецепторов с типичными палочками холоднокровных позвоночных. Также впервые исследуется их способность к спонтанной генерации фотоответов в темноте, и кинетика фотолиза их зрительного пигмента.

Бесхвостые амфибии, помимо типичных палочек и колбочек, имеют уникальный тип фоторецепторов – так называемые «зеленые палочки». Они имеют типично палочковую морфологию наружного сегмента и экспрессируют колбочко-специфичный синечувствительный зрительный пигмент. Ранее, с помощью электрофизиологических методов было показано, что зеленые палочки по ряду признаков являются рецепторами сумеречного зрения (Matthews, 1983; Matthews, 1984). Однако оценка частоты спонтанных изомеризаций пигмента полученная в этих работах позднее подвергалась сомнению (Luo et al., 2011). Наше исследование разрешает данное противоречие. Также мы впервые дали оценку кинетическим параметрам фотоответа зеленых палочек и сравнили их с типичными, «красными» палочками, присутствующими в сетчатке того же вида амфибий.

Теоретическое и практическое значение работы

Разработка вопроса о первопричинах возникающей задержки фототрансдукции разрешает вопрос о том, какая стадия активации каскада лимитирует эту стадию, но также ставит перед научным сообществом новый вопрос: какие отличия на молекулярном уровне позволяют колбочкам поддерживать столь короткую задержку по сравнению с палочками?

Использованный в рамках данной работы подход – количественная характеристика параметров, определяющих чувствительность и кинетику ответа фоторецепторов и сравнение с типичными палочками и колбочками, – позволяет подтвердить или опровергнуть переходный характер рецепторов некоторых позвоночных, традиционно считающихся примерами «трансмутации». Такой анализ также может помочь в определении ключевых перестроек и конкретных значений биохимических параметров, необходимых для функционирования клетки в роли рецептора ночного или дневного зрения. Подобные знания могут оказаться полезными при разработке искусственных трансдукционных каскадов, направленных на протезирование утраченной зрительной функции.

Апробация результатов исследования

Основные результаты исследования доложены и обсуждены на XV и XVI Всероссийском совещании с международным участием по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2016, 2020), 9-ой и 11-ой Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2017, 2021), и XV, XVI и XVII Международном симпозиуме «Visionarium» (Твярминне, Финляндия, 2016, 2017, 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ в печатных изданиях, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки РФ и 7 тезисов конференций.

Материалы и методы

1. Объекты исследования и подготовка препаратов

Для проведения сравнительного анализа в качестве типичных палочек были выбраны родопсин-содержащие («красные») палочки озерной лягушки

(*Pelophylax ridibundus*, ранее *Rana ridibunda*), типичных колбочек – красночувствительные колбочки серебряного карася (*Carassius gibelio*). Фоторецепторы этих животных являются классическими объектами многолетних исследований зрительной трансдукции и многие их физиологические (Astakhova et al., 2008; 2012; 2015) и биохимические (Kolesnikov et al., 2003; Golobokova, Govardovskii, 2006) особенности подробно охарактеризованы. Также, при анализе некоторых параметров проводились дополнительные эксперименты на палочках жабы-аги (*Rhinella marina*, ранее *Bufo marinus*) и стерляди (*Acipenser ruthenus*). В качестве трансмутированных фоторецепторов были выбраны короткие рецепторы речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) и зеленые палочки озерной лягушки и жабы-аги – двух представителей бесхвостых амфибий. Работа с животными проводилась в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества (24 ноября 1986 года, 86/609 / ЕЕС) и протоколом, одобренным комиссией по биоэтике ИЭФБ РАН.

Перед началом эксперимента все животные проходили темновую адаптацию в течение как минимум 12 часов. Все дальнейшие манипуляции проводились при тусклом темно-красном освещении. Животных умерщвляли путем декапитации с последующим разрушением спинного и головного мозга. Глаза извлекались, из них выделяли сетчатку и путем ее диссекции офтальмологическими пинцетами получали суспензию изолированных фоторецепторов. В ходе экспериментов все манипуляции с препаратами производились в растворе Рингера. Для препаратов, полученных от разных животных, использовались соответствующие подходящие по составу растворы, их список приведен в **таблице 1**.

Таблица 1. Состав растворов Рингера для препаратов сетчатки разных животных. Для приготовления использовались реактивы фирмы Sigma Aldrich.

| Животное | Состав раствора (концентрация в мМ) | pH |
|---------------------------|---|-----|
| Озерная лягушка, жаба-ага | NaCl 90, KCl 2.5, MgCl ₂ 1.4, CaCl ₂ 1.05, NaHCO ₃ 5, HEPES 5, D-глюкоза 10, EDTA 0.05 | 7.6 |
| Серебряный карась | NaCl 102, KCl 2.6, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 1, NaHCO ₃ 28, HEPES 5, D-глюкоза 5 | 7.8 |
| Речная минога | NaCl 120, KCl 3.6, MgSO ₄ 1.2, CaCl ₂ 1.1, NaHCO ₃ 22.6, HEPES 10, D-глюкоза 6 | 7.5 |
| Стерлядь | NaCl 90, KCl 2.5, MgCl ₂ 1.0, CaCl ₂ 1.0, NaHCO ₃ 5, HEPES 5, D-глюкоза 10 | 7.6 |

2. Регистрация тока одиночных фоторецепторов

Кинетику включения и выключения каскада фототрансдукции анализировали по токовым ответам одиночных клеток на световые стимулы. Регистрацию тока одиночных фоторецепторов проводили методом всасывающей микропипетки (Baylor et al. 1979a). Суспензия изолированных фоторецепторов загружается в камеру с системой протока раствора, и клетки затягиваются наружным или внутренним сегментом внутрь пипетки. Вся установка расположена в затемненном экранирующем боксе, а визуализация микропипетки и клеток происходит с помощью инфракрасной подсветки и видеокамеры, передающей изображение на экран монитора. Рабочая температура растворов 17-19 °С (для миноги – 12-15 °С).

Система световой стимуляции включает в себя три светодиода с максимумами излучения 525 нм (зеленый), 630 нм (красный) и 470 нм (синий). Сравнивая чувствительность клеток к стимулам с разными длинами волн, мы различали спектральные типы фоторецепторов (красно-, зелено- и синечувствительные колбочки карася; красные и зеленые палочки лягушки). Интенсивности стимулов регулировали, изменяя подаваемую на светодиоды силу тока, и с помощью набора нейтральных светофильтров. Калибровка интенсивности, выраженной как число обесцвеченных молекул зрительного пигмента за вспышку, была выполнена на основе статистики одноквантовых ответов (Baylor et al., 1979b). Фоторецепторы стимулировали вспышками света длительностью 10 мс, и фотоответы регистрировали с дискретизацией 10 мс на точку, в полосе фильтрации 0 - 30 Гц. Записи тока клетки в темноте, необходимые для анализа спонтанных активаций зрительного пигмента, писали с дискретизацией 2 мс на точку, а задержку определяли по записям фотоответов на яркие вспышки длительностью 2 мс, с дискретизацией 1 мс на точку, в полосе фильтрации 0 - 300 Гц.

Процесс запись данных, интенсивность и длительность световых стимулов контролируются при помощи программ, разработанных в лаборатории эволюции органов чувств на базе программного обеспечения LabView (National Instruments)

3. Микроспектрофотометрия зрительных пигментов

Чтобы охарактеризовать свойства зрительных пигментов в различных фоторецепторах, были выполнены измерения спектров с наружных сегментов изолированных фоторецепторов с помощью скоростного дихроичного микроспектрофотометра (Govardovskii & Zueva, 2000). Данный прибор был разработан в лаборатории эволюции органов чувств и позволяет

записывать спектр с дискретизацией 1 нм со скоростью до 1200 нм/с. В качестве препарата выступает суспензия изолированных фоторецепторов в капле раствора Рингера, запечатанная между двумя покровными стеклами и закрепленная на предметном столике прибора. Чтобы определить длину волны максимального поглощения зрительного пигмента, осуществлялся фиттинг записанных спектров с помощью стандартной модели (Govardovskii et al. 2000). Расчеты проводились с помощью программы, написанной в среде Microsoft Visual Basic 96.

Для изучения кинетики фотолиза зрительных пигментов клеткам предъявляли яркую обесцвечивающую вспышку (светодиод, максимум 525 нм) длительностью 1 с, после чего записывали серию спектров через заданные промежутки времени. Запись производилась при двух ортогональных линейных поляризациях света в измерительном луче: перпендикулярном и параллельном относительно оси наружного сегмента. Запись при двух поляризациях позволяет однозначно различать продукты фотолиза, которые имеют схожие спектры поглощения, но различаются по ориентации в фоторецепторной мембране, и таким образом оценить временной ход изменений их концентрации (Kolesnikov et al. 2003).

4. Анализ данных

Для того, чтобы выявить, какие из этапов активации каскада определяют длительность задержки, электрофизиологические записи описывали с помощью минимальной модели фотоответа (Astakhova et al., 2015), ранее разработанной в лаборатории эволюции органов чувств. Для подгонки использовались экспериментальные полунасыщенные фотоответы, нормированные на величину темнового тока данной клетки. Начальные значения большинства параметров модели для типичных палочек и колбочек были взяты из работы Астаховой с соавторами (2015).

Поскольку для рассматриваемых в данной работе трансмутированных фоторецепторов значения ряда параметров неизвестны, для них подробное описание минимальной моделью фотоответа не проводилось. Оценку их кинетики для сравнения с типичными палочками и колбочками осуществляли путем упрощенного описания восходящего фронта ответа (активация) квадратичной параболой, а нисходящего (выключение) – одноэкспоненциальной функцией. Среднюю частоту дискретных темновых волн определяли путем стандартного анализа гистограммы значений темнового тока (Donner et al., 1990). Фиттинг фотоответов той или иной моделью и анализ гистограммы тока были реализованы в среде MathCad (MathSoft).

Статистическая обработка данных производилась с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corp.) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Проверку нормальности значений в выборках проводили по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения чувствительности фоторецепторов, кинетических параметров их ответов и частоты спонтанных изомеризаций зрительного пигмента использовался либо однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с post hoc критерием Брауна-Форсайта для попарного сравнения (для данных, имевших нормальное распределение) непараметрический критерий Краскела-Уоллеса и post hoc критерий Данна (для данных, распределенных не нормально). Различия считались достоверными при уровне значимости нулевой гипотезы $p \leq 0,05$ (с учетом поправок на множественные сравнения групп). В таблицах и на рисунках данные представлены в виде среднее \pm среднеквадратичное отклонение или как медиана и межквартильный интервал.

Результаты и обсуждение

1. Выявление этапов активации каскада фототрансдукции, вносящих основной вклад в задержку фотоответа.

Генерация электрического ответа в фоторецепторах опосредуется многоступенчатым биохимическим каскадом. Он запускается светочувствительными зрительными пигментами (R), которые являются рецепторами, связанными с G-белками. После поглощения кванта света зрительный пигмент переходит в активную конфигурацию, которая связывается с G-белком трансдуцином (Т) и активирует его. Каждый возбужденный трансдуцин активирует одну каталитическую субъединицу эффекторного белка – фосфодиэстеразы 6 типа (PDE). Это приводит к увеличению скорости гидролиза циклического гуанозинмонофосфата (сGMP), выступающего в роли вторичного посредника сигнального каскада. Концентрация сGMP в наружном сегменте падает, что приводит к закрытию регулируемых им ионных каналов плазматической мембраны и падению тока, текущего через плазматическую мембрану (Pugh, Lamb, 2000; Arshavsky, Burns, 2012;). Между световой стимуляцией и возникновением экспериментально регистрируемого электрического ответа за счет суммарной длительности этапов активации каскада возникает некоторая задержка (в фоторецепторах холоднокровных занимает около 10 мс).

Задержка фототрансдукции продолжается от момента поглощения кванта света зрительным пигментом до закрытия ионных каналов в наружном сегменте, и может быть представлена как сумма временных

промежутков, занимаемых различными этапами каскада (Pugh, Lamb, 2000). Этапы имеют разную длительность, поэтому можно отдельно выделить только те из них, что вносят наиболее существенный вклад в задержку. Из литературных данных известно, что собственная активация зрительного пигмента, диффузия cGMP, обеспечивающая снижение концентрации во всем наружном сегменте и закрывание ионных каналов протекают очень быстро и их можно исключить из рассмотрения (Фирсов, Говардовский, 1988; Karpen et al., 1988). Таким образом, можно выделить 6 основных этапов, определяющих задержку фотответа (Рис. 1):

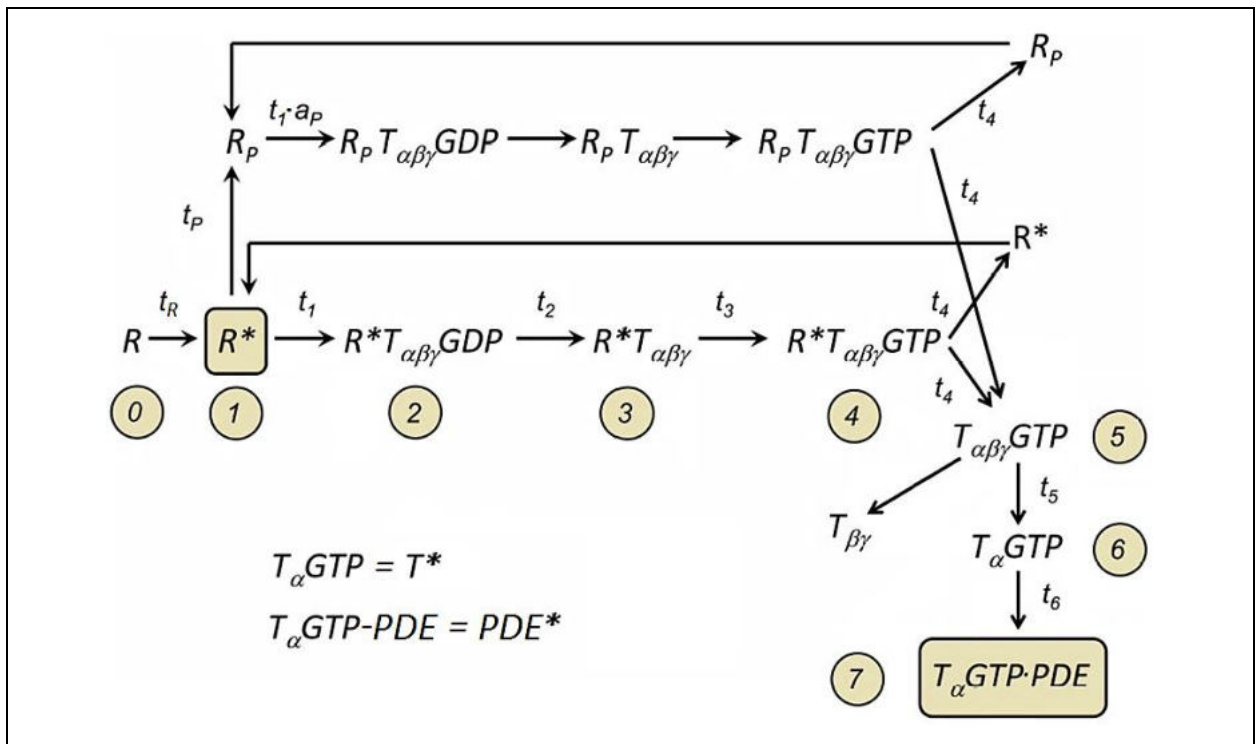


Рисунок 1. Схема начальных этапов каскада фототрансдукции. Номера в кружках обозначают промежуточные состояния компонентов каскада. R – родопсин, T – трансдуцин, PDE – фосфодиэстераза. $t_1 \dots t_6$, t_p , t_R – времена соответствующих им переходов. Вскоре после активации происходит фосфорилирование R^* , которое снижает, но не подавляет полностью его активность. Поэтому сверху дополнительно указана цепь реакций, приводящая к активации PDE фосфорилированными молекулами зрительного пигмента R_p . Здесь, a_p – коэффициент, отражающий сниженную активность фосфорилированного пигмента по сравнению с R^*

1. Молекула активного зрительного пигмента R^* встречает неактивный тример трансдуцина ($T_{\alpha\beta\gamma}GDP$) и связывается с ним, образуя комплекс (t_1).
2. Из комплекса $R^*-T_{\alpha\beta\gamma}GDP$ освобождается молекула GDP (t_2).
3. С освободившимся сайтом связывания нуклеотида в комплексе $R^*-T_{\alpha\beta\gamma}$ связывается GTP (t_3).

4. Молекула зрительного пигмента освобождается из комплекса $R^*T_{\alpha\beta\gamma}GTP$. После этого R^* возвращается к этапу 1, инициируя новый цикл активации трансдуцина (t_4).
5. Комплекс $T_{\alpha\beta\gamma}GTP$ диссоциирует на $T_{\beta\gamma}$ и $T_{\alpha}GTP$, представляющий собой активную форму трансдуцина (T^*) (t_5).
6. $T_{\alpha}GTP$ связывается с фосфодиэстеразой и активирует ее. Таким образом, активная фосфодиэстераза (PDE^*) представляет собой комплекс $T_{\alpha}GTP-PDE$ (t_6).

Следует отметить, что в исходной минимальной модели фотосовета (Astakhova et al., 2015) этап от поглощения фотона молекулой пигмента до активации фосфодиэстеразы считается одноступенчатым процессом с фиксированной скоростью. Поэтому модель была дополнена дифференциальными уравнениями которые подробно описывают 6 перечисленных начальных этапов каскада (Hamer et al., 2005).

Традиционно считается, что наибольший вклад в задержку вносит цикл активации трансдуцина молекулой активного зрительного пигмента ($t_1...t_4$), то есть время между связыванием R^* с $T_{\alpha\beta\gamma}GDP$ на этапе 1, до его высвобождения на этапе 4 (Pugh, Lamb, 1993; 2000). Для проверки этого факта мы варьировали временные параметры в «расширенной» минимальной модели фотосовета (Рис. 2А, Б). При этом значения длительности цикла активации трансдуцина ($t_1+t_2+t_3+t_4$) и этапов, связанных с активацией PDE трансдуцином ($t_5 + t_6$) увеличивались и уменьшались в 2 раза. После этого проводилась оценка того, как эти изменения повлияли на форму модельного фотосовета.

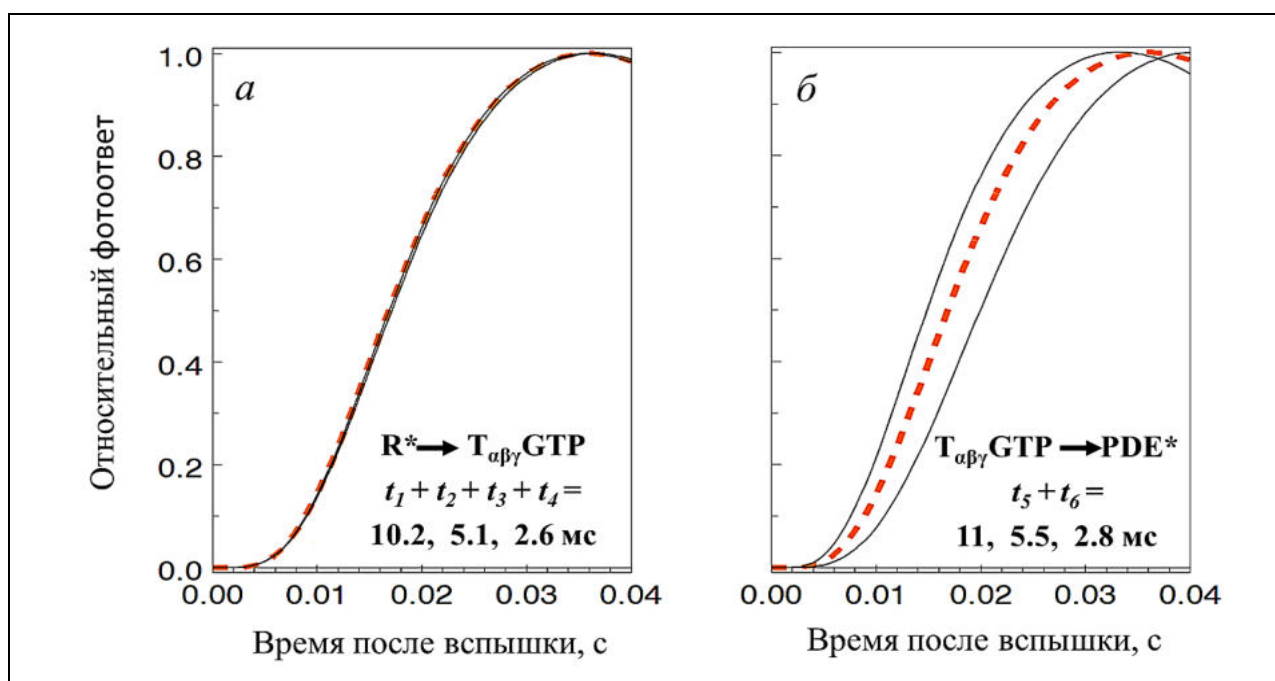


Рисунок 2. Влияние различных этапов активации на задержку фотоответа. На обоих графиках пунктирная красная линия показывает наилучшую подгонку фотоответа типичной колбочки математической моделью. *a* – продолжительность цикла активации трансдуцина изменялась в два раза в обе стороны от оптимального значения. Это не привело к заметному изменению задержки. *б* – двукратное изменение времени активации PDE сильно изменяет задержку.

Двукратное изменение в большую и меньшую сторону длительности цикла активации трансдуцина не оказало заметного влияния на форму начальной фазы ответа и, как следствие, на задержку. Аналогичные изменения времени активации PDE привели к сдвигу начальной части ответа и существенно изменили длительность задержки. Таким образом, вопреки текущим представлениям, средняя продолжительность цикла активации трансдуцина не имеет существенного влияния на задержку фотоответа. Вместо этого основная задержка происходит позже, на этапе активации PDE.

2. Оценка и сравнительный анализ длительности задержки в различных фоторецепторах позвоночных.

Задержка экспериментальных ответов зависит от интенсивности стимула, так как при этом изменяется крутизна переднего фронта фотоответа (**Рис. 3А**). Однако при достаточно высокой интенсивности крутизна фронта насыщается, а задержка достигает своего минимума (Hestrin, Korenbrot, 1990). Мы определяли именно минимальную задержку и в дальнейшем сравнивали ее длительность для разных типов фоторецепторов. Для единообразной оценки за начало фотоответа мы принимали первую точку экспериментальной записи после стимула, которая находится за пределами интервала среднее значение тока до стимула \pm удвоенное среднеквадратичное отклонение (см. **Рис. 3Б**).

Средние значения задержки в палочках и колбочках приведены в **таблице 2**. Попарное сравнение минимальной длительности задержки для разных типов фоторецепторов показало, что задержка в колбочках карася составляет 4.8 ± 1.3 мс, что примерно в 2.5 раза короче, чем в типичных палочках лягушки и жабы ($p < 0.01$, критерий Брауна-Форсайта). Задержка в обоих трансмутированных фоторецепторах, рассматриваемых в нашем исследовании, статистически не отличается от задержки в типичных палочках ($p > 0.3$) и варьирует в пределах от 10 до 17 мс. Таким образом, кинетика начальных стадий фотоответа, отвечающих за возникновение задержки в зеленых палочках амфибий и коротких рецепторах миноги соответствует палочковой.

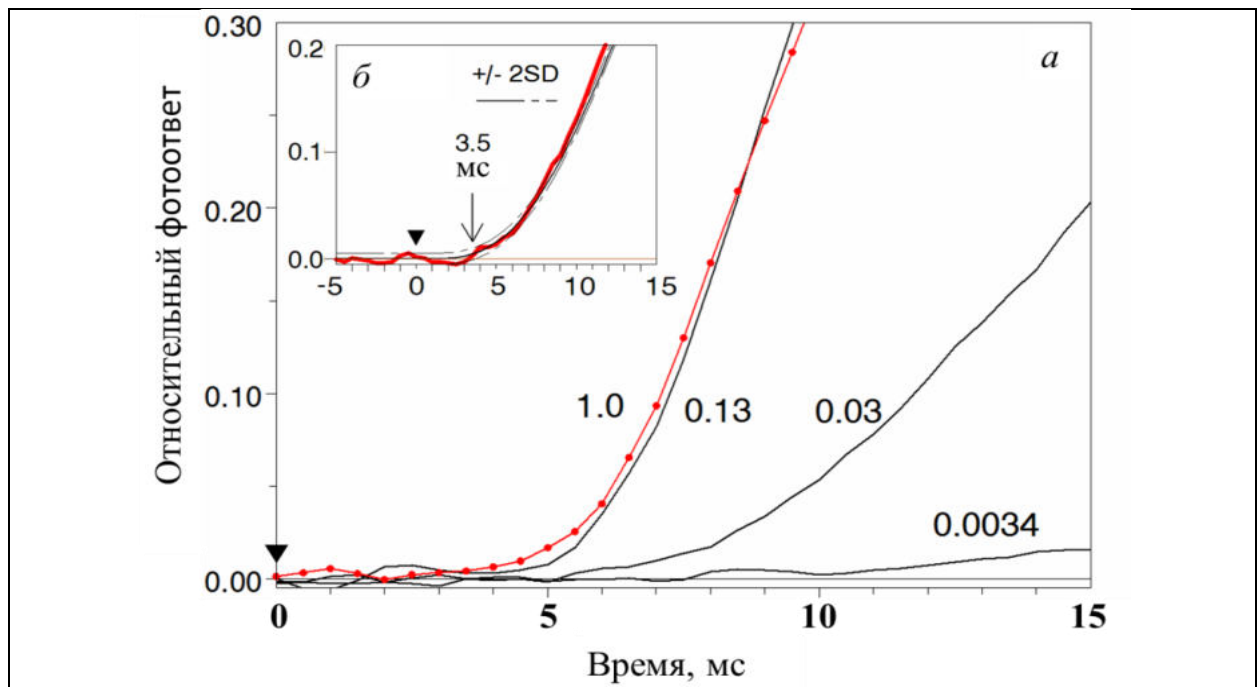


Рисунок 3. Оценка задержки фотоответа. *a* – Зависимость задержки от интенсивности стимула. Приведены записи колбочек карася. Каждая линия представляет собой усреднение 100 накопленных фотоответов. Числа вблизи линий показывают относительную интенсивность вспышки. Интенсивность 1.0 соответствует вспышке $30.5 \cdot 10^3$ фотонов/мкм². *б* – Оценка задержки фотоответа. Запись тока колбочек карася, интенсивность стимула – $14.8 \cdot 10^3$ фотонов/мкм². Штриховые линии отмечают интервал: среднее значение тока до стимуляции \pm удвоенное среднеквадратичное отклонение ($2 \cdot SD$).

Таблица 2. Средние значения задержки фотоответа в фоторецепторах холоднокровных позвоночных. Данные приведены как среднее \pm среднеквадратичное отклонение. В скобках указано число усредненных по многим фотоответам экспериментальных записей, для которых вычислялась длительность задержки. * – достоверные отличия от колбочек карася по критерию Брауна-Форсайта с поправкой на множественные сравнения ($p \leq 0.005$)

| | Колбочки карася | Красные палочки лягушки | Зеленые палочки лягушки | Красные палочки жабы | Зеленые палочки жабы | Короткие рецепторы миноги |
|--------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
| Задержка, мс | 4.8 ± 1.3 (5) | 11.9 ± 1.5 (15)* | 13.2 ± 0.8 (5)* | 12.7 ± 2.2 (6)* | 14.6 ± 2.7 (5)* | 12.4 ± 1.1 (5)* |

Известно, что колбочках скорость активации трансдуцина, в среднем в несколько раз ниже, чем в палочках (Astakhova et al., 2015; Tachibanaki et al., 2012). Поэтому следует ожидать что задержка фотоответа в колбочках будет более длительной. Однако наши результаты говорят об обратном – в колбочках задержка оказалась короче, чем в палочках, что вступает в противоречие с современными представлениями о реакциях каскада.

Скорость активации трансдуцина и PDE пропорциональна поверхностной плотности их молекул в мембране фоторецепторных дисков, и показано, что плотность поверхностной упаковки PDE примерно в 12 раз меньше чем у трансдуцина. Из этого следует, что при одинаковой эффективности взаимодействия T*-PDE и R*-T $\alpha\beta\gamma$ GDP, скорость активации PDE должна быть на порядок ниже скорости активации трансдуцина (Calvert et al., 2001). Анализ параметров минимальной модели фотоответа показывает, что задержка в палочках, соответствующая экспериментально измеренной (11-14 мс) действительно может быть воспроизведена моделью при значении $t_1 \approx 5$ мс, и $t_6 \approx 50$ мс.

Однако в колбочках задержка трансдукции оказывается в 2.5 раза короче, чем в палочках. Анализ параметров модели показывает, что такая длительность задержки возможна при значениях t_6 не более 5 мс, из чего следует, что в колбочках скорость взаимодействия T* с PDE должна быть на порядок быстрее, чем в палочках. Биохимические данные о содержании PDE в колбочках показывают, что ее концентрация не отличается от таковой в палочках (Zhang et al., 2003), и, по-видимому, высокая скорость активации связана с повышенной эффективностью взаимодействия T*-PDE. Данные об особенностях структуры колбочковых изоформ трансдуцина и PDE, которые могли бы обеспечить такую эффективность, отсутствуют, и их выявление представляет интерес для дальнейших исследований.

3. Сравнение чувствительности трансмутированных фоторецепторов с типичными палочками.

Ранее было показано, что зеленые палочки амфибий и короткие рецепторы миноги обладают примерно в 40-60 раз большей чувствительностью, чем типичные колбочки (Asteriti et al., 2015; Ma et al., 2001). С типичными палочками холоднокровных сравнивались только зеленые палочки жабы, однако полученные данные имели достаточно большой разброс, что позволило лишь дать оценку, что их чувствительность сопоставима с таковой у красных палочек. Мы записали наборы ответов фоторецепторов нескольких типов на короткие вспышки возрастающей яркости (зеленый светодиод, 525 нм), и построили зависимости амплитуды ответов от интенсивности стимула. Экспериментальные точки аппроксимировали функцией Хилла, и различие в чувствительности между двумя типами палочек рассчитали по сдвигу значений полунасыщающих интенсивностей (**Рис. 4**).

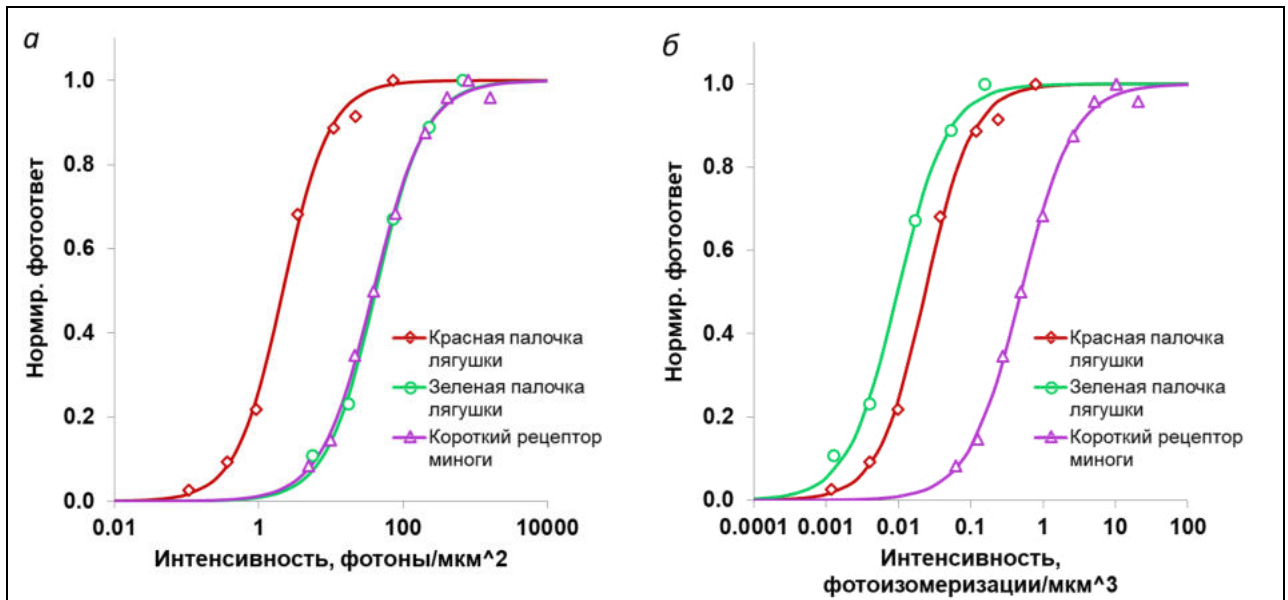


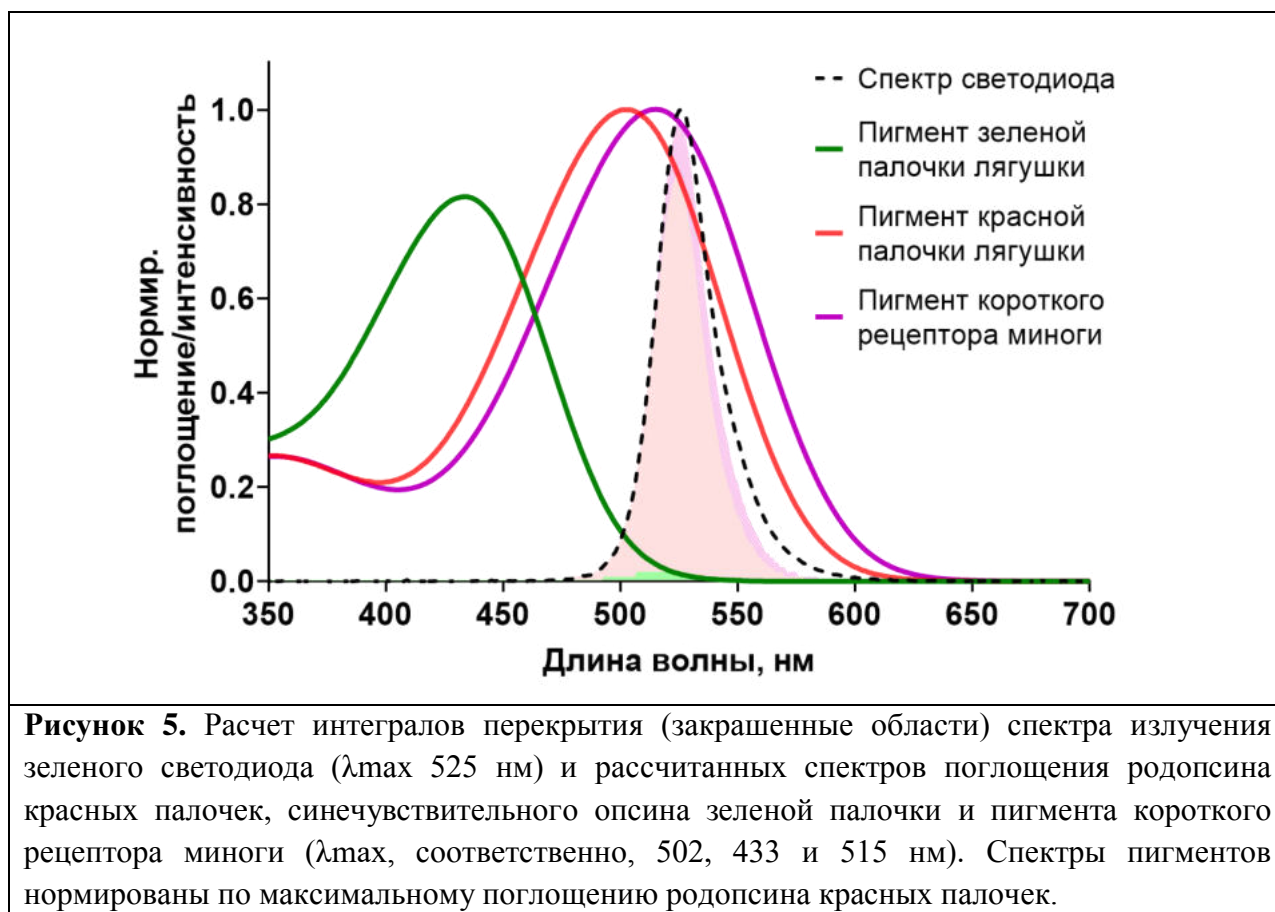
Рисунок 4. Зависимости нормированной амплитуды фотоответа от интенсивности стимула. В виде отдельных точек приведены данные по репрезентативной красной и зеленой палочке лягушки, а также короткому рецептору миноги. Сплошные линии – описание зависимости ответ-интенсивность для каждого типа клеток с помощью функции Хилла. *а* – Зависимость для интенсивности стимула, выраженной в физических единицах, не зависящих от типа стимулируемой клетки – в фотонах, падающих на единицу площади. Полунасыщающие интенсивности клеток равны, соответственно (фотоны/мкм²): красная палочка – 2.2, зеленая палочка – 41.8, короткий рецептор – 38.7. *б* – Зависимость для интенсивности стимула, выраженной в единицах, учитывающих спектральные свойства фоторецептора – как число изомеризаций в единице объема. Полунасыщающие интенсивности клеток равны, соответственно (R*/мкм³): красная палочка – 0.023, зеленая палочка – 0.01, короткий рецептор – 0.492.

Разница в чувствительности, рассчитываемая подобным образом, обусловлена двумя факторами. Первый связан со спектральными свойствами фоторецептора относительно стимулирующего света, второй – различиями в механизмах фототрансдукции. Для того, чтобы перейти к абсолютной чувствительности, зависящей только от кинетики сигнального каскада, выражать интенсивность стимула следует не в фотонах, падающих на единицу площади ($I(\lambda)$), а как число изомеризаций молекул зрительного пигмента в единице объема ($I_e(\lambda)$), т.е. не зависящее от размера клетки. Пересчет происходит по следующей формуле:

$$I_e(\lambda) = 2.303 * I(\lambda) * q * f * a_{max} * S(\lambda) \quad (12)$$

Здесь, $q = 0.67$ квантовый выход реакции обесцвечивания зрительного пигмента, a_{max} – удельное поглощение в максимуме зрительного пигмента при поперечной поляризации света относительно оси наружного сегмента. По оценкам из наших микроспектрофотометрических записей, $a_{max} = 0.015 \text{ мкм}^{-1}$ для красных палочек лягушки и жабы, а также для коротких

рецепторов миноги. Для зеленых палочек лягушки и жабы $a_{max} = 0.012 \text{ мкм}^{-1}$. Коэффициент f определяется дихроизмом зрительного пигмента в мембранах дисков и для известных типов фоторецепторов составляет 0.625 (Astakhova et al., 2015). $S(\lambda)$ – относительная спектральная чувствительность пигмента по отношению к используемому световому стимулу. Эта величина была определена для всех исследуемых типов клеток по перекрытию спектра излучения зеленого светодиода и рассчитанных спектров поглощения пигментов (Рис. 5, приведены данные по лягушке и миноге), полученных на основе микроспектрофотометрических записей (результаты согласуются с литературными данными Govardovskii et al., 2000).



Относительная эффективность зеленого светодиода в качестве стимула для красных и зеленых палочек, и коротких рецепторов дает соотношение 1 : 0.03 : 1.17, соответственно. После пересчета интенсивностей оказалось, что зеленые палочки лягушек и жаб имеют в среднем в несколько раз большую абсолютную чувствительность, чем красные, а короткие рецепторы миноги напротив, более, чем на порядок менее чувствительные, в сравнении с типичными палочками. Сводные результаты по оценке чувствительности приведены в **таблице 3**. Следует отметить, что из-за большого разброса чувствительностей зеленых палочек жабы, оказалось, что их

чувствительность статистически не отличается от красных палочек ($p=0.008$, критерий Брауна-Форсайта), хотя «лучшие» из записанных клеток имели чувствительность в 4 раза выше, чем в среднем у типичных палочек. Несмотря на то, что абсолютная чувствительность палочек жабы обоих типов примерно в 2 раза превышает таковую у соответствующих им фоторецепторов лягушки, и тем самым подчеркивает высокую вариабельность этого параметра среди различных видов, сдвиг чувствительности между красными и зелеными палочками сохраняется как характерная черта сетчатки амфибий. При этом сохраняется достаточно широкий диапазон для совместной работы зеленых и красных палочек, что согласуется с данными о наличии у амфибий уникального среди позвоночных сумеречного цветового зрения (Yovanovich et al., 2017).

Таблица 3. Параметры чувствительности различных фоторецепторов. Полунасыщающие интенсивности выражены в независимых от типа клетки, и в абсолютных единицах. Данные приведены как среднее \pm среднеквадратичное отклонение. В скобках указано число клеток, для которых вычислялась зависимость ответ-интенсивность с помощью функции Хилла. * – достоверные отличия от соответствующих виду красных палочек по критерию Брауна-Форсайта с поправкой на множественные сравнения ($p \leq 0.01$), ** - достоверные отличия коротких рецепторов от всех остальных типов ($p < 0.01$). # - сдвиг чувствительности для клеток жабы считался относительно красных палочек этого вида, а не лягушки.

| | Красные палочки лягушки | Зеленые палочки лягушки | Красные палочки жабы [#] | Зеленые палочки жабы [#] | Короткие рецепторы миноги |
|---|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Максимум поглощения зрительного пигмента, нм | 502 | 433 | 503 | 432 | 515 |
| Полунасыщающая интенсивность, фотоны/мкм² | 2.1 \pm 0.8 (12) | 47 \pm 22 * (11) | 0.9 \pm 0.4 (8) | 22 \pm 9 * (9) | 60 \pm 19 ** (13) |
| Полунасыщающая интенсивность, R*/мкм³*10⁻³ | 22 \pm 8 (12) | 10 \pm 4 * (11) | 10 \pm 5 (8) | 5 \pm 2 (9) | 763 \pm 241 (13) |
| Средний сдвиг абсолютной чувствительности относительно красных палочек лягушки, лог. единицы | – | 0.34 | – | 0.27 | -1.54 |

4. Кинетика ответов различных фоторецепторов позвоночных на этапах включения и выключения каскада фототрансдукции

Процессы включения и выключения каскада фототрансдукции неизбежно накладываются друг на друга во времени, поэтому используемая нами оценка кинетики с помощью аппроксимации экспоненциальными и квадратичными функциями дает значения лишь неких условных параметров, пригодных для сравнительного анализа различных типов фоторецепторов, но не описывающих конкретные физиологические и биохимические процессы, происходящие в клетке. Ранее считалось, что квадратичное описание нормированного фотоответа позволяет дать надежную оценку величине коэффициента усиления в каскаде (Pugh, Lamb, 2000):

$$\frac{r(t)}{r_{max}} = I_e(\lambda) * A * (t - t_{eff})^2 \quad (13)$$

Здесь, r_{max} – темновой ток клетки, t_{eff} – некая эффективная задержка (модельный параметр, не связанный с обсуждавшейся ранее истинной задержкой фотоответа), A – предполагаемый коэффициент усиления. Однако было показано, что такой расчет ведет к недооценке усиления примерно в 4 раза в колбочках, и в 1.5 раза в палочках (Astakhova et al., 2015). В рамках данной работы этот параметр будет обозначаться как коэффициент усиления, для сохранения устоявшейся терминологии.

Выключение каскада представляет собой многоступенчатый процесс, включающий отдельные механизмы выключения зрительного пигмента, трансдуцина и PDE, дополнительно регулируемые кальциевой обратной связью (Astakhova et al., 2008). Экспоненциальное описание нисходящего фронта фотоответа позволяет оценить кинетику только лимитирующих стадий выключения, в то время как вклад других этапов останется вне рассмотрения. Решить перечисленные проблемы и определить все основные параметры фотоответа, и их однозначную связь с биохимией фототрансдукционного каскада возможно только с помощью подробной математической модели, которую в настоящее время подробные модели возможно составить лишь для ограниченного круга фоторецепторов (палочки амфибий, колбочки рыб, см. Astakhova et al., 2015).

Рассчитанное ранее различие в абсолютной чувствительности между короткими рецепторами миноги, зелеными и красными палочками лягушки позволяет прошкалировать нормированные полунасыщенные ответы, и визуально сопоставить их кинетику включения (**Рис. 6**). Видно, что при пересчете на одинаковую абсолютную интенсивность стимула, передние фронты ответов зеленых и красных палочек практически совпадают, в то время, как фронт скорректированного ответа короткого рецептора миноги оказывается значительно медленнее. Оценка усиления в каскаде согласно формуле (13) показала, что эта величина статистически не различается между

красными и зелеными палочками лягушки ($p > 0.999$, критерий Данна), в то время как у клеток миноги усиление оказывается примерно в 10 раз ниже ($p < 0.05$, см. **Рис. 7А**).

Далее, была оценена кинетика выключения фотоответов. Оказалось, что у зеленых палочек выключение в среднем происходит медленнее, чем у красных палочек (постоянные времени составили 1.8 ± 1.0 и 0.74 ± 0.32 , соответственно, значимые различия по критерию Данна, $p < 0.005$). Выключение каскада в коротких фоторецепторах миноги статистически не отличалось по скорости от красных палочек (постоянная времени 1.05 ± 0.29 , **Рис. 7Б**).

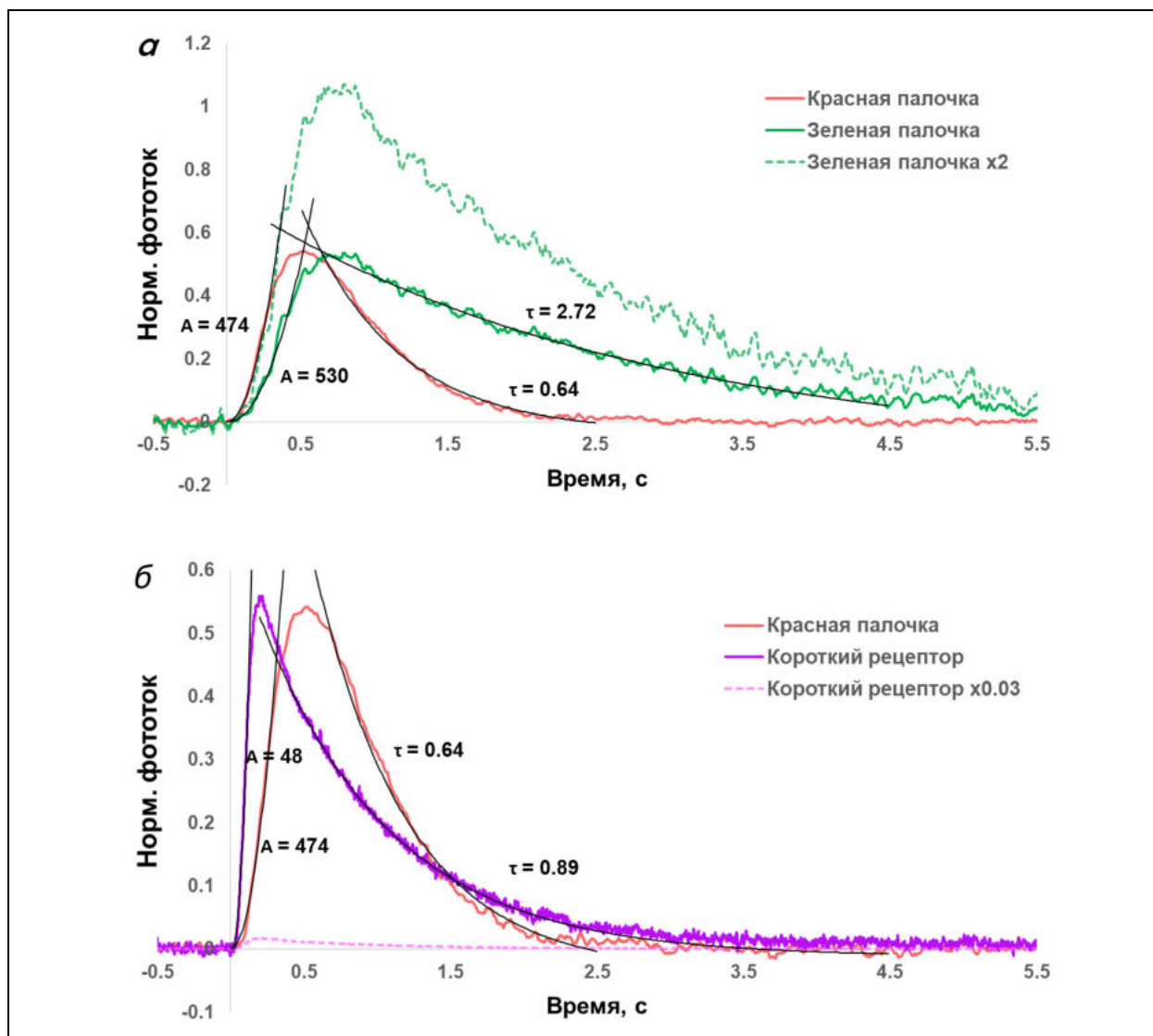


Рисунок 6. Сравнение кинетики полунасыщенных фотоответов коротких рецепторов миноги, и зеленых и красных палочек лягушки. *а* – Примеры нормированных ответов красной и зеленой палочки, а также ответ зеленой палочки, скорректированный на сдвиг в абсолютной чувствительности между двумя типами рецепторов. Приведены и квадратичные аппроксимации начальных участков ответов с указанием коэффициента усиления, и аппроксимации нисходящих фронтов ответов одноэкспоненциальными

функциями с постоянными времени. \bar{b} – Те же аппроксимации приведены для короткого рецептора миноги и красной палочки лягушки. Также приведен ответ короткого рецептора, скорректированный на сдвиг в абсолютной чувствительности ним и красной палочкой.

Сопоставление спектральных и электрофизиологических данных позволяет сделать вывод о том, что зеленые палочки амфибий обладают более высокой чувствительностью, чем красные палочки соответствующего вида. При этом усиление в каскаде фототрансдукции у двух типов рецепторов не различается, а разница в чувствительности связана с более медленной кинетикой выключения зеленых палочек, что увеличивает время интегрирования их фотоответов.

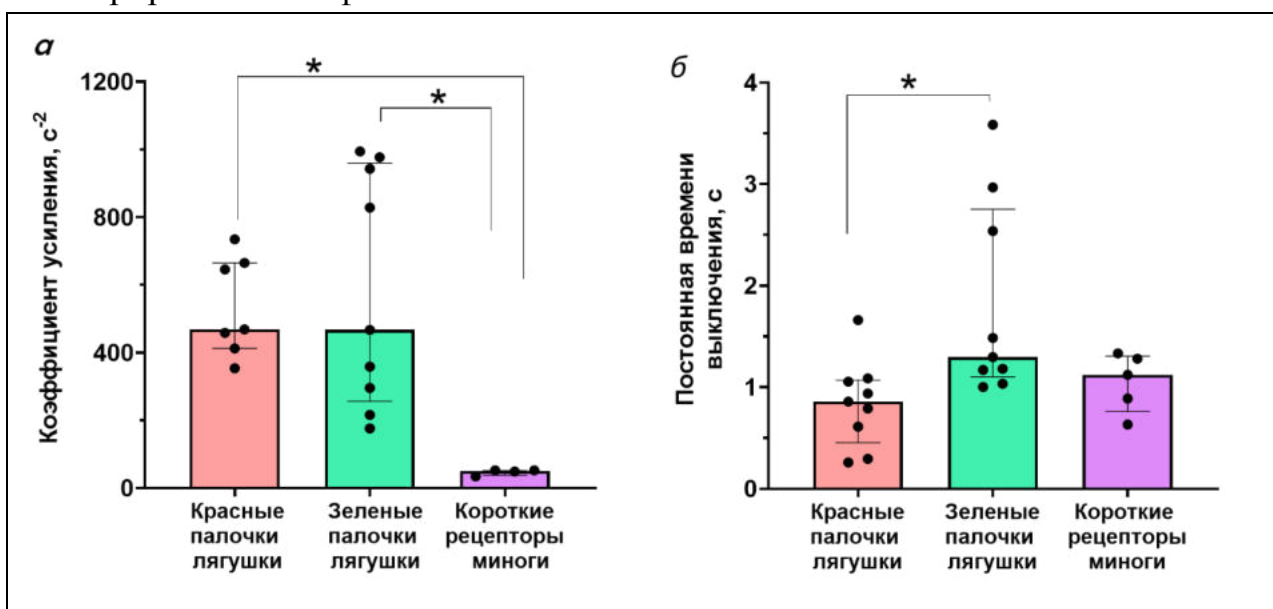


Рисунок 7. Кинетические параметры полунасыщенных фотоответов коротких рецепторов миноги, и зеленых и красных палочек лягушки. *а* – Сравнение значений постоянных времени фазы выключения фотоответа для 3 типов рецепторов ($n = 7, 9$ и 4 , соответственно). *б* – Сравнение значений постоянных времени фазы выключения фотоответа для красных и зеленых палочек для 3 типов рецепторов ($n = 8, 9$ и 5 , соответственно). * – статистически значимые различия по критерию Данна с поправкой на множественные сравнения ($p < 0.005$). Данные приведены в виде медиан и межквартильных интервалов.

Короткие рецепторы миноги имеют крайне низкую абсолютную чувствительность, по сравнению с типичными палочками холоднокровных, что связано с низким усилением в каскаде. У типичных колбочек рыб коэффициент усиления в среднем также ниже, чем у палочек (Astakhova et al., 2015), и известные для них значения близки к таковым для фоторецепторов миноги. Короткие рецепторы, помимо низкого, колбочкоподобного усиления в каскаде, также имеют медленную кинетику

выключения, соответствующую типично палочковой. Таким образом, их суммарная кинетика занимает промежуточное положение между типичными палочками и колбочками, что подтверждает их переходный характер.

5. Особенности биохимии зрительных пигментов трансмутированных фоторецепторов в сравнении с пигментами типичных палочек и колбочек

5.1. Скорость распада продуктов обесцвечивания зрительного пигмента

Фотолиз зрительных пигментов многих типов фоторецепторов уже был ранее исследован с применением микроспектрофотометрии (Kolesnikov et al., 2003; Golobokova, Govardovskii, 2006, Kolesnikov et al., 2007). Итогом многолетних исследований стало понимание того факта, что пигменты палочек и колбочек четко разделяются на две группы, различающиеся скоростью распада метaproдуктов после обесцвечивания, примерно на 2 порядка. Повышенная скорость распада пигмента в колбочках, предположительно помогает им избегать насыщения при высоких уровнях, поскольку он быстрее выводится из трансдукционного оборота и оказывается готов к регенерации.

Сразу после вспышки в спектре фотопродуктов обычно наблюдаются основной пик на 380 нм и дополнительный на 480 нм, соответствующие образованию метародопсинов I и II (Мета I и II, **Рис. 8А, Б**). Затем смесь Мета I /Мета II распадается и частично превращается в Мета III (пик около 480 нм через 50 с после обесцвечивания).

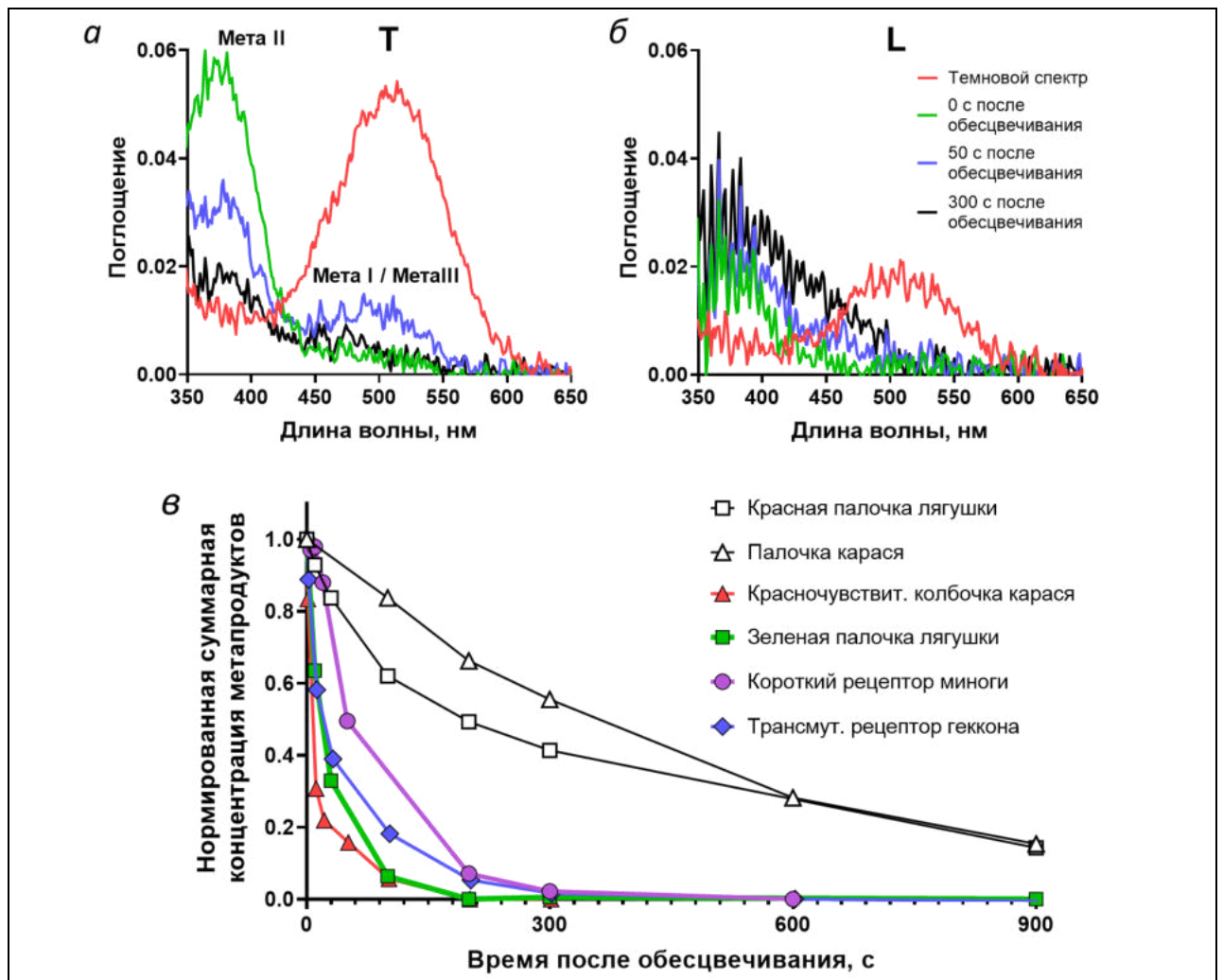


Рисунок 8. Сравнение скорости фотолиза зрительного пигмента коротких рецепторов миноги с другими позвоночными. *а, б* – Спектры поглощения фотопродуктов в коротких рецепторах до (темновой спектр) и после обесцвечивания, через 0, 50 и 300 с. Т - поляризация измерительного луча перпендикулярно оси наружного сегмента, L – поляризация вдоль оси. *в* – Динамика распада суммы метaproductов (Мета I + II + III) в коротких рецепторах миноги. Также приведены данные других авторов по фотолизу пигмента палочек и колбочек карася (Golobokova and Govardovskii, 2006), красных (Kolesnikov et al., 2003) и зеленых (Голобокова с соавт., 2003) палочек травяной лягушки, и трансмутированных фоторецепторов геккона (Kolesnikov et al., 2007)

Мы рассчитали ход изменения суммарной концентрации всех метaproductов после обесцвечивания (см. методику Kolesnikov et al., 2003) для пигмента короткого рецептора миноги и сопоставили результат с уже известными данными о типично палочковых и колбочковых пигментах (**Рис. 8В**). Оказалось, что время полураспада метaproductов в клетках миноги составляет примерно 50 с против 200–300 с у типичных палочек, однако у колбочек карася, а также у колбочкового пигмента зеленых палочек лягушки оно составляет всего 5 с. Таким образом, пигмент коротких рецепторов миноги занимает промежуточное положение по скорости фотолиза между типичными пигментами палочек и колбочек. Ближе всего по этой

характеристике к пигменту миноги оказывается колбочковый опсин геккона (*Gekko gekko*), экспрессирующийся в трансмутированном палочкоподобном рецепторе (Kolesnikov et al., 2007).

Как было указано выше, фотолиз зрительного пигмента зеленых палочек амфибий протекает с той же скоростью, что и у типично колбочковых пигментов (Golobokova and Govardovskii, 2006; Голобокова с соавт., 2003). Предположительно, высокая скорость распада метапродуктов у этих фоторецепторов сохранилась благодаря тому, что помимо зеленых палочек, он также экспрессируется в синечувствительных колбочках – типичных рецепторах дневного зрения. Колбочкам необходима высокая скорость обмена обесцвеченного зрительного пигмента, поэтому сохранение быстрого распада метапродуктов оказалось эволюционно более выгодным.

5.2. Частота спонтанных изомеризаций зрительного пигмента

Известно, что палочки позвоночных в полной темноте генерируют случайные колебания тока – дискретный темновой шум. Он состоит из случайно возникающих однонаправленных волн тока достаточно большой амплитуды, идентичных по форме ответам палочки на единичные фотоны (Baylor et al., 1979b). В настоящее время считается, что активация вызывается внутренним тепловыми флуктуациями в молекуле зрительного пигмента (Baylor et al., 1980; Donner et al., 1990; Barlow et al., 1993), приводящими к ее активации и запуску каскада фототрансдукции без поглощения фотона. Из этого следует, что свойства зрительного пигмента будут определять частоту дискретных темновых событий. При низкой освещенности они неотличимы от реальных фотоответов и составляют неснижаемый источник шума, ограничивающий предельную чувствительность фоторецептора.

В экспериментах *in vitro* показано, что частота спонтанных изомеризаций колбочковых пигментов на 2 порядка превышает палочковую, а также что синечувствительный колбочковый пигмент зеленых палочек амфибий должен быть более стабилен, чем аналогичный пигмент, экспрессирующийся в колбочках других позвоночных (Kojima et al., 2017). Исходя из этого, можно ожидать, что частота дискретных темновых событий зеленых палочек при регистрации клеточного тока, должна быть сопоставима с таковой для красных палочек. Попытки провести такие измерения уже предпринимались ранее, однако оценки в двух независимых исследованиях различаются в 400 раз (Matthews, 1984; Luo et al., 2011).

Мы проанализировали длительные (15-30 мин.) записи темнового тока красных и зеленых палочек лягушек и жаб, а также палочек стерляди и коротких рецепторов миноги. Константу спонтанной активации пигмента

определяли путем нормировки частоты темновых событий на количество молекул зрительного пигмента в клетке (оценивался по размерам клетки и плотности поглощения пигмента, измеренной микроспектрофотометрически). Результаты измерений приведены в **таблице 4**.

Таблица 4. Параметры дискретного темнового шума фоторецепторов. Результаты для коротких рецепторов миноги не приведены, т.к. амплитуда их темновых волн оказалась ниже порога обнаружения. Данные приведены как среднее \pm среднеквадратичное отклонение. В скобках указано число клеток, для которых проводились расчеты. * – достоверные отличия от палочек стерляди по критерию Брауна-Форсайта с поправкой на множественные сравнения ($p \leq 0.001$),

| | Красные палочки лягушки | Зеленые палочки лягушки | Красные палочки жабы | Зеленые палочки жабы | Палочки стерляди |
|--|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Частота темновых событий в клетке, $\text{с}^{-1} * 10^{-3}$ | 30 \pm 6 * (9) | 24 \pm 9 * (13) | 27 \pm 8 * (4) | 21 \pm 8 * (8) | 82 \pm 21 (11) |
| Объем наружного сегмента, мкм^3 | 2339 \pm 662 (9) | 1292 \pm 347 (13) | 2605 \pm 1098 (4) | 1519 \pm 571 (8) | 1087 \pm 542 (11) |
| Константа скорости спонтанной активации зрительного пигмента, $\text{с}^{-1} * 10^{-11}$ | 1.1 | 1.9 | 1.2 | 1.4 | 7.6 |

На темновых записях, сделанных на 5 проанализированных коротких рецепторах миноги, отсутствуют видимые невооруженным глазом дискретные темновые события, а анализ гистограммы показал, что она полностью симметрична. Таким образом, у рассмотренных в ходе работы клеток миноги дискретный компонент темнового шума оказывается ниже порога обнаружения. Вероятно, в связи с низким усилением в каскаде коротких рецепторов, одиночные молекулы активного пигмента не могут вызвать фотоответ, превышающий уровень непрерывного шума клетки до того, как их инактивируют механизмы выключения.

Согласно современным представлениям, уровень дискретного темного шума должен увеличиваться по мере сдвига максимума поглощения зрительного пигмента в длинноволновую область. Это связано с тем, что энергия длинноволновых фотонов ниже, чем у коротковолновых, что снижает энергетический барьер для активации пигмента, и спонтанные

изомеризации происходят чаще (Barlow et al., 1993). Наши результаты согласуются с этими представлениями, поскольку константа активации пигмента в палочках стерляди с максимумом поглощения на 545 нм оказалась в 7 раз выше (критерий Брауна-Форсайта, $p < 0.001$), чем у красных палочек амфибий (максимум поглощения 502 нм).

Зеленые палочки содержат исходно колбочковый пигмент, для гомологов которого характерна гораздо более высокая частота изомеризаций. Наша оценка частоты дискретных темновых событий в зеленых палочках лягушки и жабы сильно расходится с результатом Луо с соавт. которые получили экстремально низкое значение частоты изомеризаций, соответствующее сверхстабильному пигменту, аналогов которому у других видов не обнаружено (Luo et al., 2011). Однако, она хорошо соответствует данным Мэттьюза на клетках жабы (Matthews, 1984), и показывает, что константа скорости изомеризации в зеленых палочках в 1.5-2 раза выше, чем в красных. Это различие гораздо меньше, чем 2 порядка, которых можно было бы ожидать для типичного колбочкового пигмента, что подтверждает гипотезу о том, что в ходе адаптации к работе в рецепторах ночного зрения произошли аминокислотные замены, способствовавшие стабилизации пигмента. Более того, поскольку объем наружного сегмента зеленых палочек в среднем в 1.5-2 раза меньше, чем у красных, частота изомеризаций в пересчете на клетку оказывается одинаковой для двух типов рецепторов. Этот результат, вкупе с данными о кинетике фотоответов подтверждает высокую специализацию зеленых палочек к функции сумеречных рецепторов при отсутствии каких-либо типично колбочковых признаков.

Выводы

1. Задержка ответов фоторецепторов определяется кинетикой этапа связывания фосфодиэстеразы с активированным трансдуцином. Скорость этого процесса в колбочках оказывается в 10 раз выше, чем в типичных палочках и палочкоподобных рецепторах, что необъяснимо в рамках современных представлений о фототрансдукции.
2. Зеленые палочки бесхвостых амфибий являются высокоспециализированными рецепторами ночного зрения. Кинетика процессов включения каскада фототрансдукции у них совпадает с таковой у типичных палочек, а выключение происходит в 2 раза медленнее, что делает их еще более эффективными счетчиками одиночных фотонов.
3. Свойства зрительного пигмента зеленых палочек позволяют им сохранять высокий порог чувствительности. Спонтанные изомеризации этого пигмента происходят в 1.5-2 раза чаще, чем для родопсина типичных

палочек, однако за счет меньшего объема наружного сегмента, частота изомеризаций в одной клетке у двух типов рецепторов совпадает.

4. Короткие рецепторы миноги представляют собой переходный по физиологическим характеристикам тип фоторецептора. Эффективность процессов активации фототрансдукционного каскада у них соответствует типичным колбочкам, а кинетика выключения – палочкам, что приводит к сдвигу диапазона чувствительности рецептора в мезопический диапазон. Также, фотолиз зрительного пигмента у них протекает с промежуточной скоростью между типично палочковыми и колбочковыми значениями.
5. У коротких фоторецепторов миноги величина спонтанных темновых фотоответов оказывается ниже порога обнаружения, что вероятно связано с низким усилением в сигнальном каскаде, не позволяющим волне тока превысить уровень шума до срабатывания механизмов выключения. Таким образом дополнительно подтверждается, что короткие рецепторы миноги не являются специализированными детекторами одиночных фотонов.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Rotov AY, Astakhova LA, Firsov ML, Govardovskii VI. Origins of the phototransduction delay as inferred from stochastic and deterministic simulation of the amplification cascade // *Molecular vision*. – 2017. – V.23. – P. 416
2. Govardovskii V.I., Astakhova L.A., Rotov A.Y., Firsov M.L. Rejection of the biophoton hypothesis on the origin of photoreceptor dark noise // *The Journal of general physiology*. – 2019. – V. 151(7) – P. 887-897.
3. Govardovskii VI, Rotov AY, Astakhova LA, Nikolaeva DA, Firsov ML. Visual cells and visual pigments of the river lamprey revisited // *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. – 2020. – V. 206(1) – P.71-84.
4. Rotov AY, Astakhova LA, Nikolaeva DA, Firsov ML, Govardovskii VI. Photoreceptors of River Lamprey *L. fluviatilis*: the “Color Vision” Paradox // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. – 2020. – Т. 56. – №. 7. – С. 792.

Тезисы

1. Ротов А.Ю., Астахова Л.А., Говардовский В.И. Фоторецепторы и зрительные пигменты сетчатки речной миноги *Lampetra fluviatilis* // Пятнадцатое Всероссийское Собрание с международным участием и

- восьмая Школа по эволюционной физиологии. Сборник материалов. — СПб: ВВМ. — 2016. — С. 204-205
2. Rotov AY, Astakhova LA, Firsov ML, Govardovskii VI. Origins of the phototransduction delay // *Visionarium XV*. — 2016. — P. 26-27
 3. Ротов А.Ю., Астахова Л.А., Фирсов М.Л., Говардовский В.И. Происхождение задержки в каскаде фототрансдукции // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник статей. — 2017. — Т. 1 — С. 387-392
 4. Govardovskii VI, Rotov AY, Astakhova LA, Firsov ML. Paradoxes in phototransduction: sources of the transduction delay // *Visionarium XVI*. — 2017. — P. 17
 5. Rotov AY, Astakhova LA, Govardovskii VI. Photoreceptors and visual pigments of river lamprey: reconsideration // *Visionarium XVI*. — 2017. — P. 29-30
 6. Govardovskii VI, Astakhova LA, Rotov AY, Firsov ML. Biophotons and photoreceptor dark noise // *Visionarium XVII*. — 2018. — P. 9-10
 7. Ротов А.Ю., Новоселов А.Д., Ермолаева М.Э., Астахова Л.А., Фирсов М.Л. Сравнительный анализ чувствительности зеленых и красных палочек сетчатки лягушки // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник статей. — 2021. — Т. 2 — С. 480-484

Список цитируемой литературы

1. Говардовский В. И., Астахова Л. А., Фирсов М. Л. Специфика физиологических и биохимических механизмов возбуждения и адаптации колбочек сетчатки // *Сенсорные системы*. — 2015. — Т. 29. — №. 4. — С. 296-308.
2. Голобокова Е. Ю., Колесников А. В., Говардовский В. И. Медленные стадии фотолиза зрительного пигмента зеленых палочек лягушки *Rana temporaria* // *Сенсорные системы*. — 2003. — Т. 17. — №. 2. — С. 134-143.
3. Каламкар Г. Р., Островский М. А. Молекулярные механизмы зрительной рецепции. // М: Наука. — 2002.
4. Фирсов М. Л., Говардовский В. И. Кинетика перехода метародопсин I-метародопсин II при фотолизе палочковых и колбочковых зрительных пигментов холоднокровных и теплокровных животных // *Сенсорные системы*. — 1988. — Т. 2. — №. 1. — С. 10-16.
5. Arshavsky V. Y., Burns M. E. Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities // *Journal of Biological Chemistry*. — 2012. — V. 287. — №. 3. — P. 1620-1626.

6. Astakhova L. A. et al. cAMP controls rod photoreceptor sensitivity via multiple targets in the phototransduction cascade //Journal of General Physiology. – 2012. – V. 140. – №. 4. – P. 421-433.
7. Astakhova L., Firsov M., Govardovskii V. Activation and quenching of the phototransduction cascade in retinal cones as inferred from electrophysiology and mathematical modeling //Molecular vision. – 2015. – V. 21. – P. 244.
8. Astakhova L. A., Firsov M. L., Govardovskii V. I. Kinetics of turn-offs of frog rod phototransduction cascade //The Journal of general physiology. – 2008. – V. 132. – №. 5. – P. 587-604.
9. Asteriti S., Grillner S., Cangiano L. A Cambrian origin for vertebrate rods //Elife. – 2015. – V. 4. – P. e07166.
10. Barlow R. B. et al. On the molecular origin of photoreceptor noise //Nature. – 1993. – V. 366. – №. 6450. – P. 64-66.
11. Baylor D. A., Lamb T. D., Yau K. W. The membrane current of single rod outer segments //The Journal of physiology. – 1979a. – V. 288. – №. 1. – P. 589-611.
12. Baylor D. A., Lamb T. D., Yau K. W. Responses of retinal rods to single photons //The Journal of physiology. – 1979b. – V. 288. – №. 1. – P. 613-634.
13. Baylor D. A., Matthews G., Yau K. W. Two components of electrical dark noise in toad retinal rod outer segments //The Journal of physiology. – 1980. – V. 309. – №. 1. – P. 591-621.
14. Calvert, P. D. et al. Membrane protein diffusion sets the speed of rod phototransduction //Nature. – 2001. – V. 411. – №. 6833. – P. 90-94.
15. 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 //The Journal of physiology. – 1990. – V. 428. – №. 1. – P. 673-692.
16. Govardovskii V. I. et al. In search of the visual pigment template //Visual neuroscience. – 2000. – V. 17. – №. 4. – P. 509-528.
17. Govardovskii V. I., Lychakov D. V. Visual cells and visual pigments of the lamprey, *Lampetra fluviatilis* //Journal of Comparative Physiology A. – 1984. – V. 154. – №. 2. – P. 279-286.
18. Golobokova E. Y., Govardovskii V. I. Late stages of visual pigment photolysis in situ: cones vs. rods //Vision research. – 2006. – V. 46. – №. 14. – P. 2287-2297.
19. Hamer R. D. et al. Toward a unified model of vertebrate rod phototransduction //Visual neuroscience. – 2005. – V. 22. – №. 04. – P. 417-436.
20. Hestrin S., Korenbrot J. I. Activation kinetics of retinal cones and rods: response to intense flashes of light //Journal of Neuroscience. – 1990. – V. 10. – №. 6. – P. 1967-1973.

21. Karpen, J. W. et al. Gating kinetics of the cyclic-GMP-activated channel of retinal rods: flash photolysis and voltage-jump studies //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – V. 85. – №. 4. – P. 1287-1291.
22. Kojima K. et al. Adaptation of cone pigments found in green rods for scotopic vision through a single amino acid mutation //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – V. 114. – №. 21. – P. 5437-5442.
23. Kolesnikov A. V. et al. Visual cycle and its metabolic support in gecko photoreceptors //Vision research. – 2007. – V. 47. – №. 3. – P. 363-374.
24. Kolesnikov A. V., Golobokova E. Y., Govardovskii V. I. The identity of metarhodopsin III //Visual neuroscience. – 2003. – V. 20. – №. 3. – P. 249-265.
25. Lamb T. D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina //Progress in retinal and eye research. – 2013. – V. 36. – P. 52-119.
26. Lamb T. D. Evolution of the genes mediating phototransduction in rod and cone photoreceptors //Progress in retinal and eye research. – 2020. – V. 76. – P. 100823.
27. Luo D. G. et al. Activation of visual pigments by light and heat //Science. – 2011. – V. 332. – №. 6035. – P. 1307-1312.
28. Ma J. et al. A visual pigment expressed in both rod and cone photoreceptors //Neuron. – 2001. – V. 32. – №. 3. – P. 451-461.
29. Matthews G. Dark noise in the outer segment membrane current of green rod photoreceptors from toad retina //The Journal of physiology. – 1984. – V. 349. – №. 1. – P. 607-618.
30. Matthews G. Physiological characteristics of single green rod photoreceptors from toad retina //The Journal of physiology. – 1983. – V. 342. – №. 1. – P. 347-359.
31. Pugh Jr E. N., Lamb T. D. Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 1993. – V. 1141. – №. 2-3. – P. 111-149.
32. Pugh Jr E. N., Lamb T. D. Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation //Handbook of biological physics. – North-Holland, 2000. – V. 3. – P. 183-255.
33. Tachibanaki S. et al. Low activation and fast inactivation of transducin in carp cones //Journal of Biological Chemistry. – 2012. – V. 287. – №. 49. – P. 41186-41194.
34. Walls G. L. The Reptilian Retina: I. A new concept of visual-cell evolution //American journal of ophthalmology. – 1934. – V. 17. – №. 10. – P. 892-915.
35. Walls G. L. The Vertebrate Eye and Its Adaptive Radiation //Bloomfield Hills, Mich.: Cranbrook Institute of Science. – 1942. – 785 PP.

36. Yovanovich C. A. M. et al. The dual rod system of amphibians supports colour discrimination at the absolute visual threshold //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2017. – V. 372. – №. 1717. – P. 20160066.
37. Zhang X., Wensel T. G., Kraft T. W. GTPase regulators and photoresponses in cones of the eastern chipmunk //Journal of Neuroscience. – 2003. – V. 23. – №. 4. – P. 1287-1297.
38. Zhang X., Wensel T. G., Yuan C. Tokay gecko photoreceptors achieve rod-like physiology with cone-like proteins //Photochemistry and photobiology. – 2006. – V. 82. – №. 6. – P. 1452-1460.