

На правах рукописи

Ротов Александр Юрьевич

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И БЫСТРОДЕЙСТВИЕ ПАЛОЧЕК И
КОЛБОЧЕК: ЭВОЛЮЦИОННЫЙ АСПЕКТ**

1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2023

Работа выполнена в Лаборатории эволюции органов чувств Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Научный руководитель:

Фирсов Михаил Леонидович, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующий Лабораторией эволюции органов чувств, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Кондрашев Сергей Львович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории физиологии Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

Фельдман Татьяна Борисовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории физико-химических основ рецепции ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Защита состоится « 27 » сентября 2023 г., в 15.30 на заседании Диссертационного совета 24.1.046.01 при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова 5А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН», а также на сайте ИВНД: <https://ihna.ru>

Автореферат разослан « » 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,



д.б.н.

Иерусалимский В.Н.

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 (Каламкаргов, 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 клетки, 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 данного исследования – проведение сравнительного анализа основных физиологических параметров, определяющих чувствительность и кинетику ответов различных фоторецепторов позвоночных.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

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.

Научная новизна исследования

В рамках данной работы впервые изучается вопрос о происхождении задержки фотоответа и выявляются конкретные этапы, определяющие длительность этой стадии. 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, функционально близкие к палочкам и колбочкам, соответственно (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 обладают высокой чувствительностью и насыщаются при умеренных засветках, то есть, функционально, являются рецепторами сумеречного зрения (Matthews, 1983; Matthews, 1984). Однако оценка частоты спонтанных изомеризаций пигмента полученная в ранних работах позднее подвергалась сомнению (Luo et al., 2011). Данное 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 об источнике возникающей задержки в каскаде 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 утерянной зрительной функции.

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, повышая чувствительность за счет замедления выключения в каскаде фототрансдукции.

3. Зрительный пигмент зеленых палочек совмещает высокую стабильность, характерную для родопсина типичных палочек, с высокой скоростью фотолиза, типичной для колбочковых пигментов.

4. Короткие рецепторы миноги представляют собой переходный тип фоторецептора, поскольку эффективность процессов активации фототрансдукционного каскада у них соответствует типичным колбочкам, кинетика выключения – палочкам.

5. Зрительного пигмент коротких рецепторов миноги по стабильности и скорости фотолиза занимает промежуточное положение между типично палочковыми и колбочковыми.

Апробация результатов исследования

Основные результаты исследования были представлены на Российских и Международных конференциях: 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); конференции, посвященной 90-летию со дня рождения академика И.А. Шевелева «Обработка и интеграция информации в сенсорных системах: от внешнего сигнала к сложному образу» (Москва, 2022); XV, XVI, XVII и XX Международном симпозиуме «Visionarium» (Твярминне, Финляндия, 2016, 2017, 2018, 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 работ в печатных изданиях, в том числе: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых международными базами данных научного цитирования Scopus и Web of Science Core Collection; 10 тезисов конференций.

Личный вклад автора

Автор участвовал в планировании экспериментов, поддержании популяции лабораторных животных. Экспериментальные результаты и их анализ,

приведенные в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автором проведена статистическая обработка полученных данных и их обобщение, также он принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования и подготовка препаратов

Для проведения сравнительного анализа в качестве типичных палочек были выбраны родопсин-содержащие («красные») палочки озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*), типичных колбочек – красночувствительные колбочки серебряного карася (*Carassius gibelio*). Также проводились дополнительные эксперименты на палочках стерляди (*Acipenser ruthenus*). В качестве трансмутированных фоторецепторов были выбраны короткие рецепторы речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) и зеленые палочки озерной лягушки как представителя бесхвостых амфибий. Работа с животными проводилась в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества (24.11.1986 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, глаза извлекались, из них выделяли сетчатку и путем ее диссекции получали суспензию изолированных фоторецепторов в растворе Рингера, соответствующем исследуемому виду (Фирсов, Говардовский, 1990; Govardovskii, Lychakov, 1984; Astakhova et al., 2015).

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.

Система световой стимуляции включает в себя три светодиода с максимумами излучения 525 нм (зеленый), 630 нм (красный) и 470 нм (синий), интенсивности которых регулируются изменением подаваемой силы тока и с помощью нейтральных светофильтров. Сравнивая чувствительность клеток к различным стимулам, мы определяли принадлежность фоторецепторов к тому или иному спектральному типу. Калибровка интенсивности, помимо прямых измерений интенсивности, была дополнительно проверена на основе статистики одноквантовых ответов (Baylor et al., 1979b). Фоторецепторы стимулировали вспышками света длительностью 10 мс, и ответы регистрировали с дискретизацией 10 мс, 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, в полосе фильтрации 0 - 300 Гц. Процесс записи данных, интенсивность и длительность световых стимулов контролируются при помощи программ, разработанных в лаборатории эволюции органов чувств на базе программного обеспечения LabView (National Instruments, США).

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, разработанного в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН (Govardovskii & Zueva, 2000). Спектры регистрировались с дискретизацией 1 нм со скоростью 250 нм/с. Полученные спектры описывались с помощью стандартной модели (Govardovskii et al. 2000)

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

Анализ данных

Для того, чтобы выявить этапы активации каскада, определяющие длительность задержки, применяли минимальную модель фотоответа (Astakhova et al., 2015), ранее разработанную в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН. Для анализа использовались нормированные ненасыщенные фотоответы (15-30% от максимального фототока). 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 нисходящего фронта ответа, соответствующего выключению каскада фототрансдукции одноэкспоненциальной функцией. Восходящий фронт (активация каскада) анализировали путем расчета домножающего коэффициента, необходимого для максимального приближения к эталону (усредненный восходящий фронт красных палочек

лягушки). Среднюю частоту дискретных шумовых событий определяли путем стандартного анализа гистограммы распределения тока (Donner et al., 1990; Astakhova et al., 2017). Анализ электрофизиологических записей был реализован в среде MathCad (MathSoft, Cambridge, США).

Статистическая обработка данных производилась с использованием GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Проверку нормальности распределения проводили по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения параметров чувствительности и кинетики ответов фоторецепторов, а также частоты спонтанных изомеризаций их зрительного пигмента использовался либо однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с post hoc критерием Тьюки, либо дисперсионный анализ Уэлча с post hoc критерием Даннетта (в случае нормального распределения). Для ненормального распределения применялся критерий Краскела-Уоллеса и post hoc критерий Данна. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднее \pm среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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 (опсинами, R), которые, после поглощения кванта света связываются с G-белком трансдуцином (Т) и переводят его в активную форму. Каждая молекула трансдуцина активирует одну каталитическую субъединицу эффекторного фермента – 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 фоторецептора снижается, что приводит к закрытию регулируемых им ионных каналов плазматической мембраны и падению тока, текущему через нее (Arshavsky, Burns, 2012, 2014; Lamb et al., 2018).

Между световой стимуляцией и возникновением экспериментально регистрируемого электрического ответа за счет суммарной длительности этапов активации каскада возникает задержка, которая в фоторецепторах холоднокровных имеет характерное время в несколько миллисекунд. Различные этапы активации каскада имеют разную длительность: так, из литературных данных известно, что собственная активация зрительного пигмента, диффузия сGMP, обеспечивающая снижение концентрации во всем наружном сегменте и закрытие ионных каналов протекают очень быстро и их можно исключить из рассмотрения (Pugh, Lamb, 2000). Таким образом, можно выделить 6 основных этапов, дающих существенный вклад в задержку фотоответа (**Рис. 1**):

1. Молекула обесцвеченного зрительного пигмента R^* встречает неактивный тример трансдуцина ($T_3\beta\gamma\text{GDP}$) и связывается с ним (t_1).

2. Из комплекса $R^*-\text{T}\alpha\beta\gamma\text{GDP}$ освобождается молекула GDP (t_2).
3. С освободившимся сайтом связывания нуклеотида в комплексе связывается молекула GTP (t_3).
4. Молекула R^* освобождается из комплекса $R^*-\text{T}\alpha\beta\gamma\text{GTP}$, после чего возвращается к этапу 1, инициируя новый цикл активации трансдуцина (t_4).
5. Тример $\text{T}\alpha\beta\gamma\text{GTP}$ диссоциирует, освобождая $\text{T}\alpha\text{GTP}$, представляющий собой активную форму трансдуцина (T^*) (t_5).
6. $\text{T}\alpha\text{GTP}$ связывается с PDE и активирует ее. Таким образом, активная фосфодиэстераза (PDE^*) представляет собой комплекс $\text{T}\alpha\text{GTP-PDE}$ (t_6).

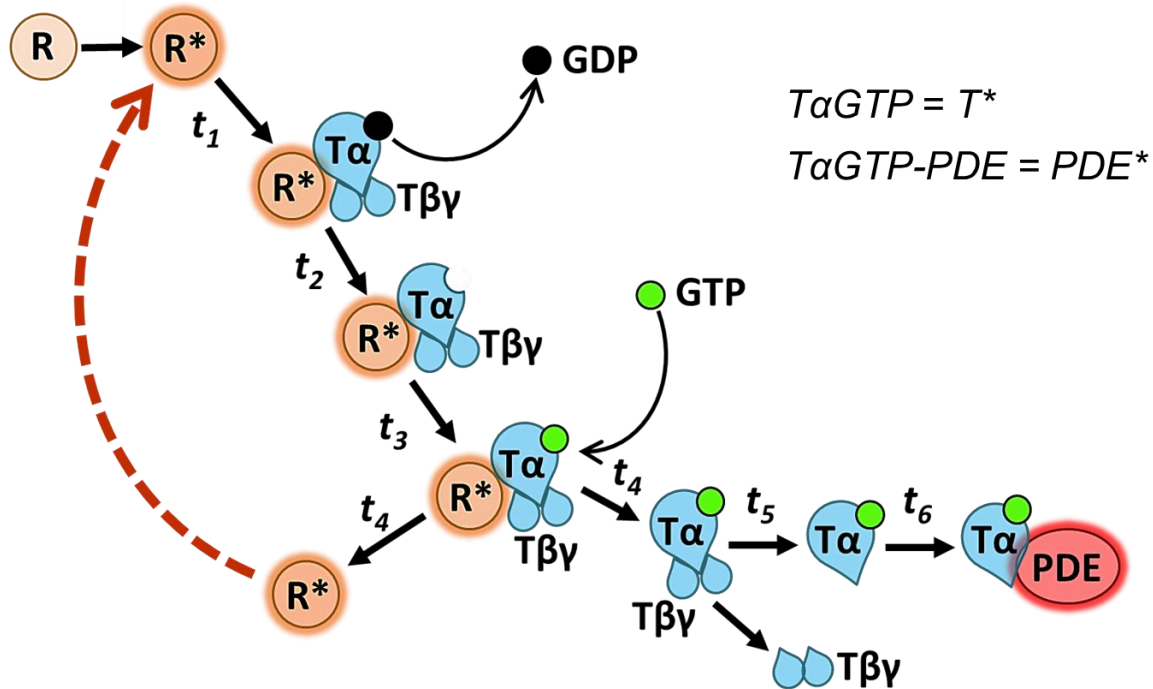


Рисунок 1. Схема начальных этапов каскада фототрансдукции. Номера внутри фигур обозначают промежуточные состояния компонентов каскада. R – родопсин, T – трансдуцин, PDE – фосфодиэстераза, $t_1 \dots t_6$ – времена соответствующих им переходов.

Следует отметить, что в исходной минимальной модели фотосовета (Astakhova et al., 2015) этап от поглощения фотона молекулой пигмента до активации фосфодиэстеразы предполагается одноступенчатым процессом с фиксированной скоростью. Поэтому модель была дополнена дифференциальными уравнениями которые подробно описывают начальные этапы каскада, до образования активного комплекса $\text{T}\alpha\text{GTP-PDE}^*$.

Традиционно считалось, что наибольший вклад в задержку вносит цикл активации трансдуцина, то есть время между связыванием R^* с $\text{T}\alpha\beta\gamma\text{GDP}$ и его высвобождением из комплекса на этапах 1-4 (Pugh, Lamb, 1993; 2000). Для проверки этого факта мы варьировали длительность цикла активации трансдуцина ($t_1+t_2+t_3+t_4$) и этапов, связанных с активацией PDE ($t_5 + t_6$) в расширенной модели фотосовета (Рис. 2). После этого проводилась оценка того, как эти изменения повлияли на форму нормированного модельного

фотоответа. На рисунке 2А видно, что двукратное изменение в большую или 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 восходящей фазы ответа и существенно изменили длительность задержки (Рис. 2Б). 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.

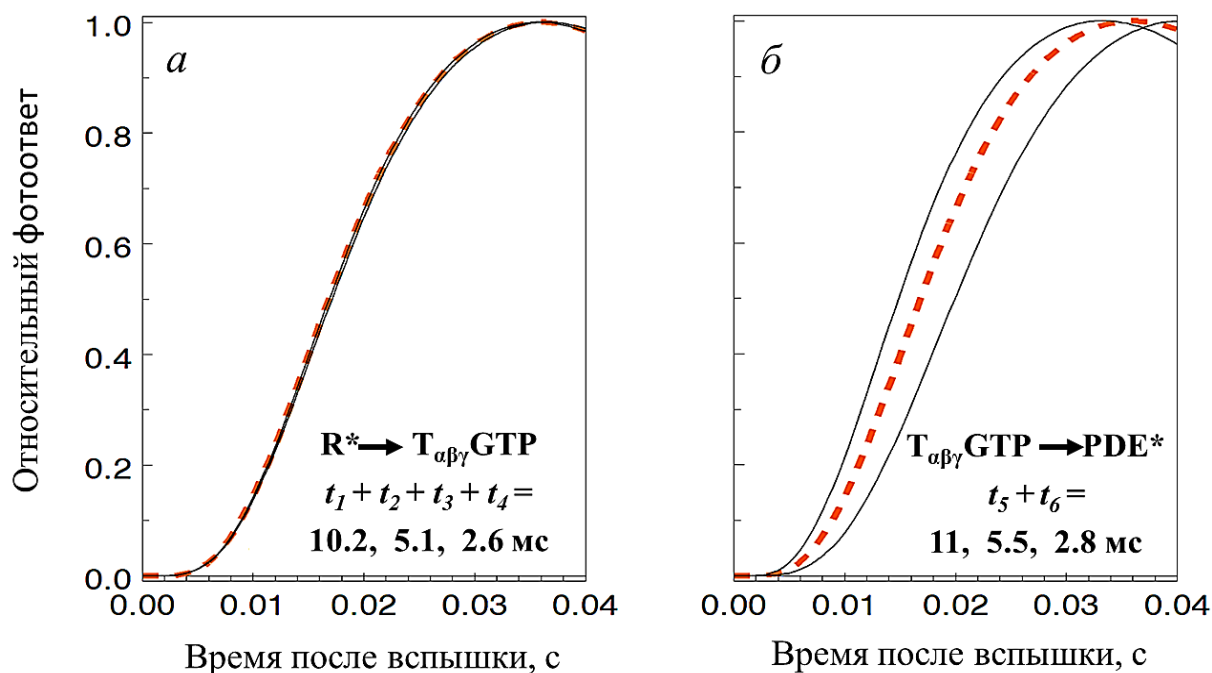


Рисунок 2. Влияние различных этапов активации на задержку фотоответа. На обоих графиках пунктирная красная линия показывает наилучшую подгонку фотоответа типичной колбочки математической моделью. А – продолжительность цикла активации трансдуцина изменялась в два раза в обе стороны от оптимального значения.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

Оценка и сравнительный анализ длительности задержки в различных фоторецепторах

Следует отметить, что согласно результатам анализа модели фотоответа, существует только «кажущаяся» задержка, зависящая от возможности обнаружить начальный момент отклонения тока фоторецептора от его темнового уровня. Задержка экспериментальных ответов также зависит от интенсивности стимула, так как при этом изменяется крутизна переднего фронта фотоответа (Рис. 3А). Однако при достаточно высокой интенсивности крутизна насыщается, а задержка достигает своего минимума (Hestrin, Korenbrot, 1990). Именно минимальную задержку оценивалась и в дальнейшем сравнивалась для разных типов фоторецепторов. Чтобы надежно

оценить эту величину, за начало фотосовета 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 1.

Сравнение минимальной длительности задержки для разных типов фоторецепторов показало, что задержка в колбочках карася составляет менее 5 мс, что примерно в 2.5 раза короче, чем в типичных палочках лягушки ($p < 0.01$). Задержка в обоих трансмутированных фоторецепторах, рассматриваемых в нашем исследовании – зеленых палочках лягушки и коротких рецепторах миноги – статистически не отличается от задержки в типичных палочках и варьирует в пределах 10-15 мс. Таким образом, кинетика начальных стадий фотосовета, отвечающих за возникновение задержки в трансмутированных рецепторах соответствует палочковой.

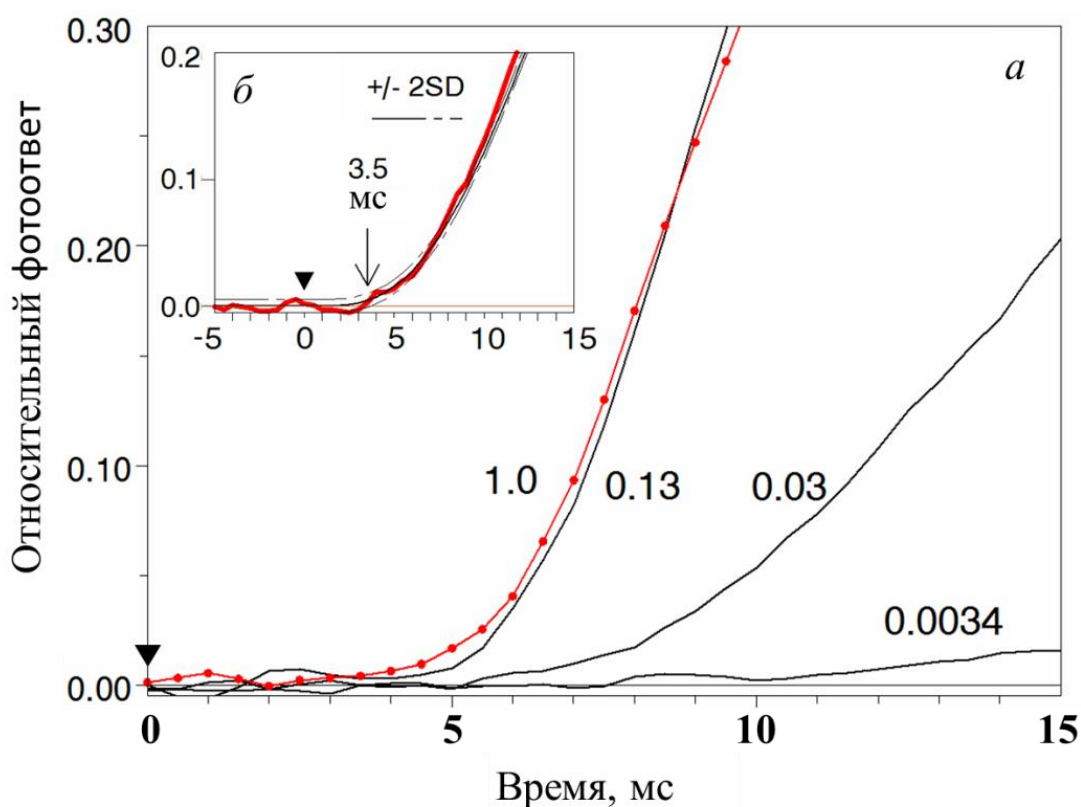


Рисунок 2. Оценка задержки фотосовета. А – Зависимость задержки от интенсивности стимула. Приведены записи колбочек карася. Каждая линия представляет собой усреднение 100 накопленных фотосоветов. Числа вблизи линий показывают относительную интенсивность вспышки (525 нм). Интенсивность 1.0 соответствует вспышке $30.5 \cdot 10^3$ фотонов/ мкм^2 Б – Оценка задержки фотосовета. Запись тока колбочек карася, интенсивность стимула – $14.8 \cdot 10^3$ фотонов/ мкм^2 . Штриховые линии отмечают интервал: среднее значение тока до стимуляции \pm удвоенное среднеквадратичное отклонение ($2 \cdot SD$).

Известно, что колбочках скорость активации трансдуцина, а также суммарная скорость образования PDE* 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 результаты Kawakami и Kawamura, полученные на фоторецепторах карпа, говорят об обратном: в колбочках задержка оказалась короче, чем в палочках (Kawakami, Kawamura, 2014), и наши данные подтверждают это. Более короткая задержка фототрансдукции в колбочках вступает в противоречие с современными представлениями о реакциях каскада.

Таблица 1. 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 Данна с поправкой на множественные сравнения ($p < 0.005$).

	Колбочки карася	Красные палочки лягушки	Зеленые палочки лягушки	Короткие рецепторы миноги
Задержка, мс	4.8 \pm 1.3 (5)	11.9 \pm 1.5 (15)*	13.2 \pm 0.8 (5)*	12.4 \pm 1.1 (5)*

Скорость активации PDE определяется как произведение частоты диффузионных столкновений молекул активного трансдуцина и PDE в мембранах дисков и эффективности их взаимодействия, то есть доли столкновений, которые приводят к образованию активных комплексов. Очевидно, что скорость активации пропорциональна поверхностной плотности PDE 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^* с PDE и R^* с $Ta\beta\gamma GDP$, скорость активации PDE должна быть на порядок ниже скорости активации трансдуцина. Анализ параметров расширенной модели фотоответа показывает, что задержка в палочках, соответствующая экспериментально измеренной (10-15 мс) действительно может быть воспроизведена моделью при значении $t_1 \approx 5$ мс, и $t_6 \approx 50$ мс (Calvert et al., 2001; Sokolov et al., 2002). Однако в колбочках задержка трансдукции оказывается в 2.5 раза короче, чем в палочках (**Табл. 1**). 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 PDE с T^* должна быть на порядок быстрее, чем в палочках.

Сравнительный анализ чувствительности различных фоторецепторов

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; Morshedjan, Fain, 2015; Ma et al., 2001). С типичными палочками холоднокровных ранее сравнивались только

зеленые палочки жабы-аги, однако полученные данные имели достаточно большой разброс, что позволило лишь дать оценку, что их чувствительность сопоставима с таковой у красных палочек (Matthews, 1983). Мы записали наборы ответов фоторецепторов нескольких типов на короткие вспышки (зеленый светодиод, 525 нм) возрастающей яркости 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. Для того, чтобы перейти к абсолютной чувствительности, зависящей только от кинетики сигнального каскада (но не от спектральных свойств зрительных пигментов), интенсивность стимула выражена как число изомеризаций молекул зрительного пигмента на клетку или в единице объема ($I_e(\lambda)$), т.е. не зависимо от размера клетки. Пересчет происходит по следующей формуле:

$$I_e(\lambda) = 2.303 * I(\lambda) * q * f * a_{max} * S(\lambda) \quad (1)$$

Здесь, $I(\lambda)$ – интенсивность стимула в фотонах, падающих на единицу площади, $q = 0.67$ – квантовый выход реакции обесцвечивания зрительного пигмента, a_{max} – удельное поглощение в максимуме соответствующего пигмента при поперечной относительно оси наружного сегмента поляризации света. По оценкам из наших микроспектрофотометрических записей, $a_{max} = 0.015$ мкм⁻¹ для красных палочек лягушки, а также для коротких рецепторов миноги. Для зеленых палочек лягушки $a_{max} = 0.012$ мкм⁻¹. Коэффициент f определяется дихроизмом зрительного пигмента в мембранах дисков и необходим для пересчета на освещение неполяризованным светом, и для большинства 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 модельных спектров поглощения пигментов, полученных на основе микроспектрофотометрических записей.

Оказалось, что зеленые палочки 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. Следует отметить, что рецепторы миноги, однако, существенно превосходят по чувствительности типичные колбочки карася, а при пересчете чувствительности на целую клетку, ввиду малых размеров наружного сегмента, оказываются сопоставимы с красными палочками лягушки. Повышенная же чувствительность зеленых палочек при расчете на клетку оказывается еще более выраженной, что подтверждает их сверхспециализированность в роли рецепторов ночного зрения. Сводные результаты по оценке чувствительности приведены в **таблице 2**.

Кинетика ответов различных фоторецепторов 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 включения путем совмещения восходящего фронта с эталоном (Рис. 4А, Б) дает значение лишь некоего условного параметра, пригодного для сравнительного анализа различных фоторецепторов, но не описывающего конкретные физиологические и биохимические процессы, происходящие в клетке. Ранее считалось, что надежную оценку величине коэффициента усиления в каскаде позволяет дать описание начальной фазы фотоответа квадратичной параболой (Pugh, Lamb, 2000). Однако в дальнейшем 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).

Таблица 2. Параметры чувствительности различных фоторецепторов. Средние значения полунасыщающих интенсивностей выражены 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 красных палочек по критерию Даннетта с поправкой на множественные сравнения ($p < 0.01$). # - данные по колбочкам карася из работы Astakhova et al., 2015.

	Максимум поглощения зрительного пигмента, нм	Полунасыщ. интенсивность, R*/клетку	Полунасыщ. интенсивность, R*/мкм ³ *10 ⁻³
Красные палочки лягушки	502	48 \pm 18 (12)	21 \pm 8 (12)
Зеленые палочки лягушки	433	14 \pm 4 * (11)	11 \pm 3 * (12)
Короткие рецепторы миноги	515	60 \pm 19 (13)	763 \pm 241 * (13)
Красночувств. колбочки карася [#]	614	-	~ 81 000

Выключение каскада также 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 (Рис. 4В) 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. Однако построение такой модели требует знания ряда параметров клетки, величины которых можно получить только экспериментально. Подобные эксперименты часто сопряжены с помещением клетки в стрессовые условия (например, метод кальциевого клампа), и лишь наиболее устойчивые фоторецепторы способны переносить такой протокол. Поэтому в настоящее время подробные модели возможно составить лишь для ограниченного круга фоторецепторов (палочки мыши и лягушки, колбочки рыб), в который трансмутированные фоторецепторы не входят.

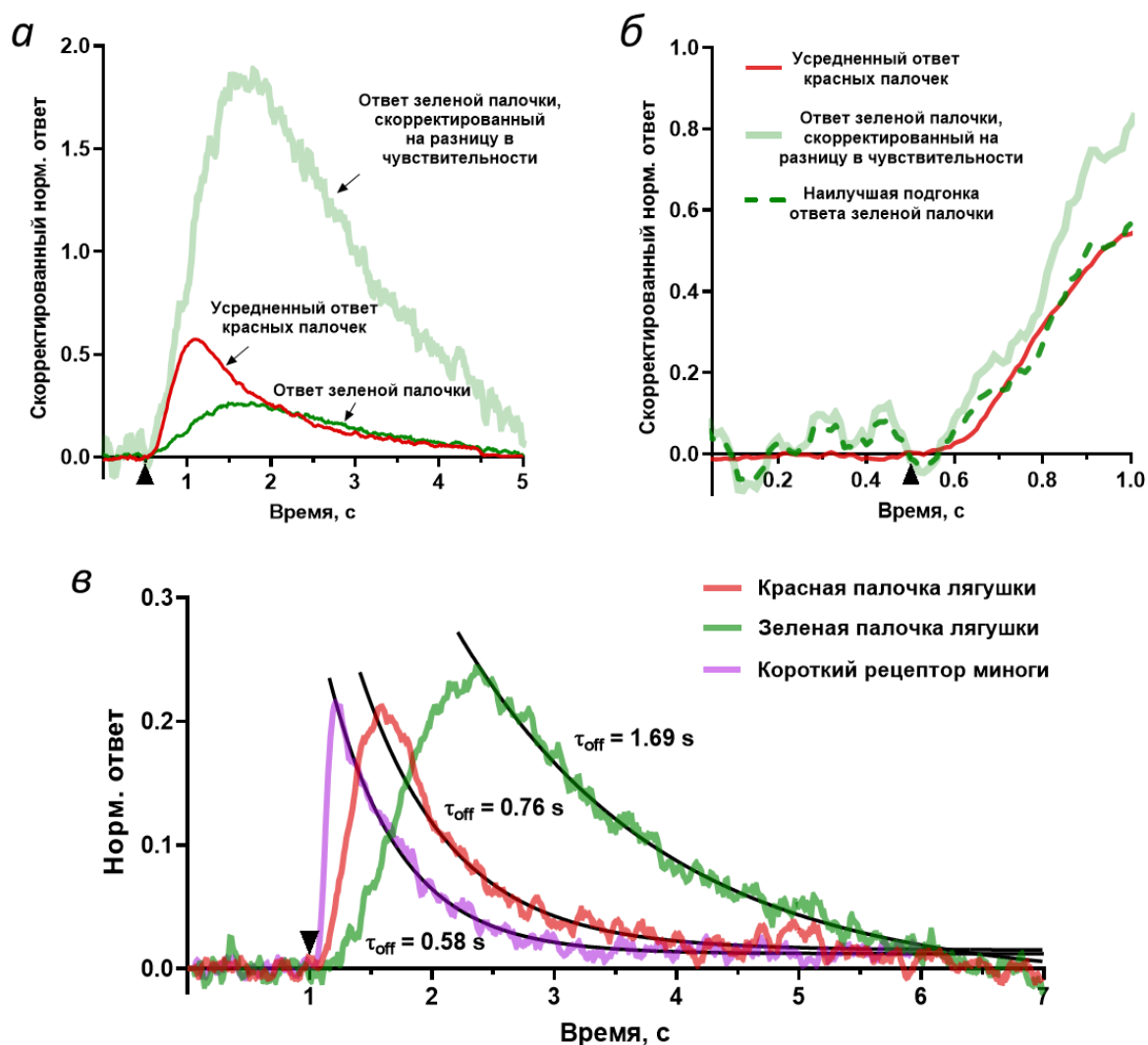


Рисунок 4. Оценка кинетических параметров ненасыщенных фотоответов коротких рецепторов миноги, зеленых и красных палочек лягушки. *А* – методика расчета параметра для оценки эффективности активации каскада фототрансдукции на примере зеленой палочки. Сначала ответ клетки корректируется на сдвиг в абсолютной чувствительности относительно эталона – красных палочек. Затем производится подгонка восходящего фронта к эталону путем домножения на числовой коэффициент. Наилучшая подгонка определялась методом наименьших квадратов. *Б* – аппроксимации нисходящих фронтов фотоответов одноэкспоненциальными функциями с различными постоянными времени для оценки кинетики выключения каскада фототрансдукции.

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. 4А**). 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 показала, что эта величина статистически не различается между красными и зелеными палочками лягушки, в то время как у клеток миноги усиление оказывается примерно в 5 раз ниже ($p < 0.05$, см. **Рис. 5А**).

Далее, была оценена кинетика выключения фотоответов. Оказалось, что у зеленых палочек выключение в среднем происходит медленнее, чем у красных палочек (постоянные времени составили 1.3 ± 0.4 и 0.9 ± 0.3 , соответственно, значимые различия по критерию Тьюки, $p < 0.05$). Выключение каскада в коротких фоторецепторах миноги оказалось было существенно быстрее, чем у зеленых палочек, более того, статистически значимо отличалось по скорости от красных палочек (постоянная времени 0.6 ± 0.1 , значимые различия по критерию Тьюки, $p < 0.05$, **Рис. 5Б**). За счет разницы в кинетике выключения зеленые палочки обладают увеличенным временем интегрирования фотоответа, а рецепторы миноги, напротив – уменьшенным за счет ускорения процессов деактивации каскада.

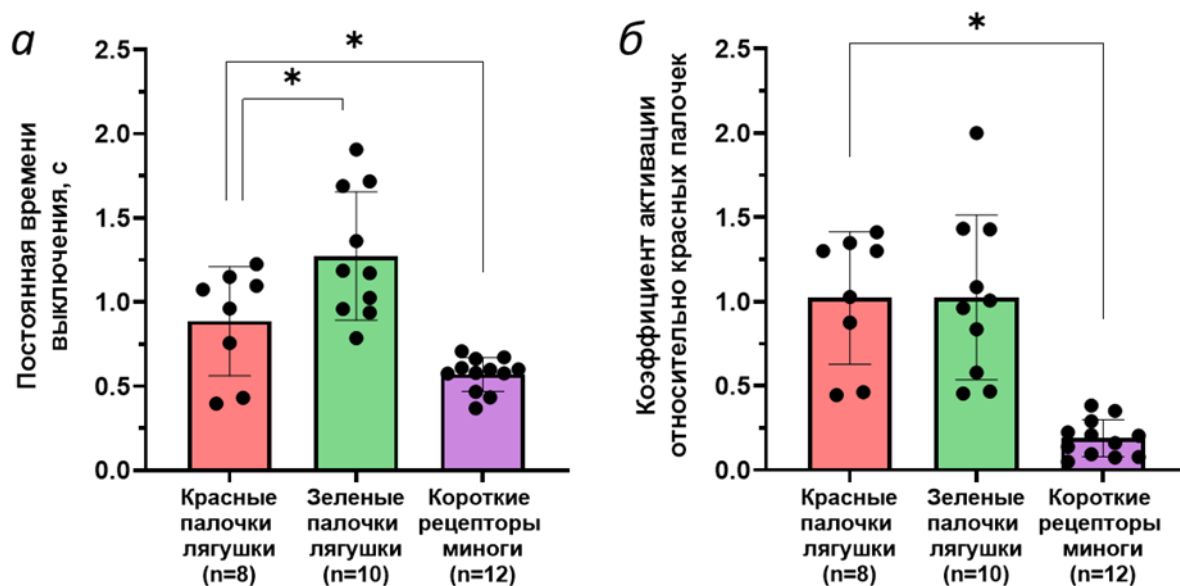


Рисунок 5. Кинетические параметры полунасыщенных фотоответов коротких рецепторов миноги, и зеленых и красных палочек лягушки. *А* – Сравнение значений постоянных времени фазы выключения фотоответа для 3 типов рецепторов. *Б* – Сравнение эффективности процессов активации фототрансдукции для 3 типов рецепторов. * – статистически значимые отличия от красных палочек по критерию Тьюки с поправкой на множественные сравнения ($p < 0.05$). Данные приведены в виде среднее \pm среднеквадратичное отклонение.

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.

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. С другой стороны, короткие рецепторы имеют сравнительно медленную кинетику выключения, которая, несмотря на то, что быстрее таковой у типичных палочек, все еще значительно медленнее, чем у типичных колбочек (Astakhova et al., 2015). Таким образом, их суммарная кинетика занимает промежуточное положение между типичными палочками и колбочками, что подтверждает их переходный характер.

Кинетика фотолиза зрительных пигментов трансмутированных фоторецепторов, по сравнению с типичными палочками и колбочками

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 установление 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 освещенности. В данной работе был проанализирован фотолиз коротких рецепторов миноги и зеленых палочек лягушки и сопоставлен с уже известными данными о типично палочковых и колбочковых пигментах.

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). Затем смесь Мета I /Мета II распадается и частично превращается в Мета III (пик около 480 нм примерно через 50 с после обесцвечивания), одновременно продолжая высвобождать транс-ретиаль. Метапродукты надежно отличимы от ретиналя и его производных по наличию дихроизма спектров. Таким образом, можно однозначно рассчитать ход изменения суммарной концентрации всех метaproдуктов, после обесцвечивания, используя значения оптической плотности при двух поляризациях (см. методику Kolesnikov et al., 2003).

Метародопсины в коротких рецепторах миноги разлагаются в 5 раз быстрее, чем в типичных палочках карася и травяной лягушки (*Rana*

temporaria). Время полураспада метaproдуктов 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 (**Рис. 6**). Таким образом, пигмент коротких рецепторов миноги занимает промежуточное положение по скорости фотолитза между типичными пигментами палочек и колбочек, что приближает его к колбочковому опсину геккона (*Gekko gekko*), экспрессирующемся в трансмутированных палочкоподобных рецепторах (Kolesnikov et al., 2007).

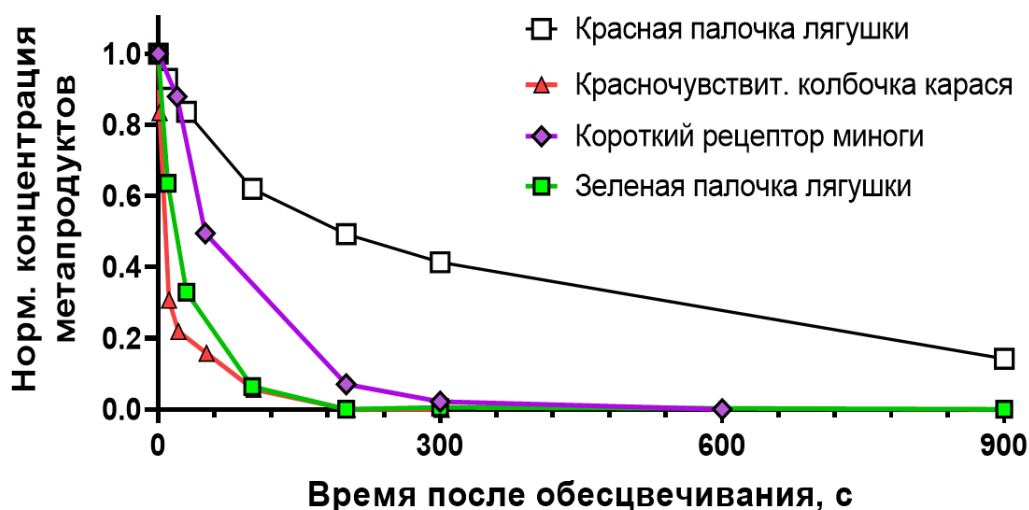


Рисунок 6. Динамика распада суммы метaproдуктов (Мета I + II + III) в различных фоторецепторах. Также приведены данные других авторов по фотолитзу пигмента красночувствительных колбочек карася (Golobokova and Govardovskii, 2006), красных (Kolesnikov et al., 2003) и зеленых (Голобокова с соавт., 2003) палочек травяной лягушки.

Ранее в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН было показано, что фотолитз зрительного пигмента зеленых палочек травяной лягушки (*Rana temporaria*) протекает с той же скоростью, что и у типично колбочковых пигментов (Голобокова с соавт., 2003). Проведенные эксперименты подтвердили, что в клетках озерной лягушки наблюдается аналогичная картина. Предположительно, высокая скорость распада метaproдуктов у этих фоторецепторов сохранилась благодаря тому, что помимо зеленых палочек, он также экспрессируется в синечувствительных колбочках – типичных рецепторах дневного зрения.

Стабильность зрительных пигментов трансмутированных фоторецепторов, по сравнению с типичными палочками и колбочками

Другой характеристикой зрительного пигмента, принципиально важной для рецепторов ночного зрения, является его способность к спонтанным тепловым изомеризациям. Известно, что палочки позвоночных в полной темноте генерируют случайные однонаправленные волны тока достаточно большой амплитуды, идентичные по форме ответам палочки на единичные

фотоны – дискретный темновой шум (Baylor et al., 1979). В настоящее время считается, что активация вызывается внутренними тепловыми флуктуациями в молекуле зрительного пигмента (Baylor et al., 1980; Barlow et al., 1993; Luk et al., 2016), приводящими к ее активации и запуску каскада фототрансдукции без поглощения фотона. Из этого следует, что свойства зрительного пигмента будут определять характер и частоту дискретного темнового шума. Поскольку при низкой освещенности темновые события невозможно отличить от реальных фотоответов, они составляют неснижаемый источник шума и ограничивают предельную чувствительность фоторецептора.

В экспериментах *in vitro* показано, что частота спонтанных изомеризаций колбочковых пигментов примерно на 2 порядка превышает палочковую. В тех же экспериментах было показано, 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 этих фоторецепторов при регистрации клеточного тока, должна быть сопоставима с таковой для частотой событий в красных палочках. Попытки провести такие измерения уже предпринимались ранее, однако оценки в двух независимых исследованиях различаются в 400 раз (Matthews, 1984; Luo et al., 2011).

В таблице 3 приведены полученные в ходе анализа гистограмм плотности распределения тока оценки частоты дискретных темновых событий в различных фоторецепторах. Константа спонтанной активации пигмента определялась путем нормировки частоты темновых событий на количество молекул зрительного пигмента в клетке (оценивается по размерам клетки и плотности поглощения пигмента, измеренной микроспектрофотометрически).

Таблица 3. Параметры дискретного темнового шума фоторецепторов. Данные приведены как среднее \pm среднеквадратичное отклонение. В скобках указано число клеток, для которых проводились расчеты. * – достоверные отличия от палочек стерляди по критерию Тьюки с поправкой на множественные сравнения ($p < 0.01$). # - данные по пигменту колбочек человека из работы Luo et al., 2011.

	Частота темновых событий в клетке, $c^{-1} * 10^{-3}$	Объем наружного сегмента, $мкм^3$	Константа скорости спонтанной активации зрительного пигмента, $c^{-1} * 10^{-11}$
Красные палочки лягушки	30 ± 6 * (9)	2339 ± 662 (9)	0.7
Зеленые палочки лягушки	24 ± 9 * (13)	1292 ± 347 (13)	0.9
Короткие рецепторы миноги	42 ± 10 * (12)	81 ± 38 (20)	29.2

Палочки стерляди	82 ± 21 (11)	1087 ± 542 (11)	4.1
Красночувств. пигмент колбочек человека (в палочках мыши)[#]	~ 3 000	-	4140

Короткие рецепторы миноги, несмотря на низкую чувствительность, также генерируют дискретные темновые события. Частота событий на одну клетку оказывается такой же, как у типичных палочек амфибий, и, таким образом, не является препятствием для детекции этими клетками одиночных фотонов. Однако, расчет константы скорости спонтанной активации зрительного пигмента показал, что для пигмента миноги она на 1.5 порядка выше чем для родопсинов палочек амфибий. Согласно современным представлениям, уровень дискретного темнового 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). Можно ожидать, что с этим же связана низкая стабильность пигмента миноги, т.к. его пик поглощения на сдвинут на 13 нм относительно родопсинов амфибий (Govardovskii, Lychakov, 1984). Однако, расчеты константы активации пигмента в палочках стерляди с максимумом поглощения 545 нм оказались на порядок выше, чем у красных палочек лягушки (максимум поглощения 502 нм), однако существенно ниже, чем у пигмента коротких рецепторов миноги. Таким образом, стабильность пигмента миноги оказывается не связанной с его длинноволновым сдвигом и является промежуточной между типично палочковыми и колбочковыми пигментами.

Зеленые палочки содержат исходно колбочковый пигмент, для гомологов которого характерна гораздо более высокая частота изомеризаций (Kojima et al., 2017). Наша оценка частоты дискретных темновых событий в зеленых палочках лягушки сильно расходится с результатом Luo с соавт. которые получили экстремально низкое значение частоты изомеризаций для клеток жабы-аги, соответствующее сверхстабильному пигменту, аналогов которому у других видов не обнаружено (Luo et al., 2011). Однако, она хорошо соответствует данным Matthews на клетках жабы-аги (Matthews, 1984), и очень близка к таковой для родопсина красных палочек. Такая высокая стабильность является неожиданной для типичного колбочкового пигмента, и говорит о его дополнительной стабилизации в ходе эволюции. Более того, поскольку объем наружного сегмента зеленых палочек в среднем в 2 раза меньше, чем у красных, частота изомеризаций в пересчете на клетку у зеленых палочек оказывается еще ниже, чем у типичных палочек, что подтверждает высокую степень их специализации к роли рецепторов ночного зрения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данного исследования были определены этапы активации каскада фототрансдукции, определяющие длительность задержки перед началом электрического ответа рецептора. Применение подробной модели фотоответа и варьирование ее параметров показало, что традиционное представление о том, что ключевым этапом задержки является цикл активации трансдуцина зрительным пигментом, является ошибочным. Оказалось, что истоки задержки лежат в более поздних этапах каскада, связанных с активацией фосфодиэстеразы трансдуцином.

Минимальная длительность задержки оказывается существенно различной у типичных палочек и колбочек, что не находит объяснения в современных представлениях об активации каскада фототрансдукции. Согласно литературным данным, концентрация фосфодиэстеразы в колбочках не отличается от таковой в палочках (Zhang et al., 2003), поэтому можно предположить, что высокая скорость активации связана с повышенной эффективностью взаимодействия колбочковых изоформ трансдуцина и фосфодиэстеразы. У трансмутированных фоторецепторов – коротких рецепторов миноги и зеленых палочек лягушки – задержка оказалась типично палочковой, что согласуется с их ролью рецепторов сумеречного зрения.

Для трансмутированных фоторецепторов были оценены и другие параметры, определяющие кинетику фотоответа: эффективность активации каскада и скорость его выключения. Сравнительный анализ этих величин с характерными для палочек и колбочек холоднокровных показал, что зеленые палочки бесхвостых амфибий являются сверхспециализированными рецепторами ночного зрения, превосходя в чувствительности даже типичные красные палочки. Это становится возможным за счет замедленного выключения каскада фототрансдукции и, как следствие, увеличенного времени интегрирования фотоответа. Короткие рецепторы миноги занимают промежуточное положение по абсолютной чувствительности между типичными палочками и колбочками. Усиление в каскаде рецепторов миноги существенно ниже, чем у палочек и приближено к колбочковым значениям (Astakhova et al., 2015). Кинетика выключения фотоответа, напротив, близка к таковой для типичных палочек, что указывает на переходный характер данного типа фоторецепторов.

Также для характеристики особенностей биохимии зрительных пигментов трансмутированных фоторецепторов, была оценена скорость их фотолиза и частота спонтанных изомеризаций. Колбочковый по происхождению пигмент зеленых палочек оказался сопоставим по стабильности с палочковым родопсином, что, вероятно, является следствием эволюционного перехода этих клеток к роли рецепторов ночного зрения. Необычным результатом оказалась высокая скорость распада метaproдуктов в зеленых палочках: согласно современным представлениям, этот параметр тесно связан с темновой стабильностью пигмента, при этом у стабильных

пигментов ретиналь более жестко зафиксирован в комплексе с опсином, что приводит к более медленному распаду метапродуктов (Yanagawa et al., 2015). Вместе с тем, физиологическая роль такой двойственности представляется очевидной: помимо зеленых палочек, этот пигмент также экспрессируется в синечувствительных колбочках – типичных рецепторах дневного зрения. Поскольку колбочкам необходима высокая скорость обмена хромофора для обесцвеченного зрительного пигмента, сохранение быстрого распада метапродуктов оказалось эволюционно выгодным.

Зрительный пигмент коротких рецепторов миноги занимает промежуточное положение как по уровню темновой стабильности, так и скорости фотолиза, что укладывается в представление о его трансмутированной природе. Однако следует отметить, что некоторыми авторами на основе молекулярного филогенетического анализа пигмент коротких рецепторов круглоротых выделяется в отдельную от пигментов палочек группу (Collin et al., 2003). Принимая это во внимание, промежуточную скорость фотолиза можно трактовать не как признак трансмутации, а как сохранившуюся в параллельной эволюционной линии архаичную черту предкового неспециализированного фоторецептора.

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 трансмутированных рецепторах, что может быть связано с особенностями взаимодействия колбочковых изоформ белков 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. Зрительного пигмента зеленых палочек имеет высокую темновую стабильность, что позволяет им сохранять высокий порог чувствительности. Одновременно пигмент сохраняет типичную для колбочек высокую скорость фотолиза, что противоречит современным представлениям о взаимодействии опсина с ретиналем.

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.

5. Зрительный пигмент коротких рецепторов миноги по частоте спонтанных изомеризаций и скорости фотолиза занимает промежуточное

положение между типично палочковыми и колбочковыми. Таким образом дополнительно подтверждается переходный характер рецепторов миноги.

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 VI, Astakhova LA, Rotov AY, Firsov ML. 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. Astakhova LA, Novoselov AD, Ermolaeva ME, Firsov ML, Rotov AY. Phototransduction in Anuran Green Rods: Origins of Extra-Sensitivity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22(24) – P. 13400.

Тезисы докладов

1. Ротов А.Ю., Астахова Л.А., Говардовский В.И. Фоторецепторы и зрительные пигменты сетчатки речной миноги *Lampetra fluviatilis* // XV Всероссийское Совещание с международным участием и восьмая Школа по эволюционной физиологии. Сборник материалов. – 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. Rotov AY, Astakhova LA, Nikolaeva DA, Firsov ML, Govardovskii VI. Photoreceptors of River Lamprey *L. fluviatilis*: the “Color Vision” Paradox // XVI Всероссийская конференция с международным участием «Совещание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели». Сборник материалов. – 2020. – С. 792.

8. 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

9. Ротов АЮ, Астахова ЛА, Новоселов АД, Ермолаева МЭ, Фирсов МЛ. Анализ функциональных различий зеленых и красных палочек бесхвостых амфибий // Обработка и интеграция информации в сенсорных системах: от внешнего сигнала к сложному образу: тезисы докладов научной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения академика И.А. Шевелева – 2022. – С. 90-93

10. Rotov AYu, Astakhova LA, Novoselov AD, Ermolaeva ME, Firsov ML. Comparative analysis of anuran green and red rods: response kinetics and sensitivity // Visionarium XX. – 2022. – P. 9-10