

Г. Г. ДЕМИРЧОГЛЯН

К ВОПРОСУ ОБ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФОТО- РЕЦЕПТОРОВ ПОЗВОНОЧНЫХ И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ И ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОМ НАЗНАЧЕНИИ*

Экспериментальные, а также офтальмо-физиологические исследования последних лет свидетельствуют об участии фоторецепторов в генерировании электроретинограммы, т. е. электрического ответа сетчатки глаза на освещение [1].

В литературе, однако, формировалось и противоположное мнение об электрической нейтральности фоторецепторов [6, 11, 22]. Наиболее четкое выражение такая точка зрения приобрела, пожалуй, в книге А. Л. Бызова «Электрофизиологические исследования сетчатки», где прямо утверждалось: *«Фоторецепторы вообще не генерируют заметной электрической реакции на световое раздражение. Возбуждение по ним передается каким-то неизвестным механизмом, в котором электрический ток не играет той роли, которая известна для других нервных клеток»* [3, стр. 103]. Мы обращаем на этот вопрос внимание, поскольку и в последующих (1967) статьях этого автора, несмотря на появление к тому времени прямых литературных данных о биоэлектрической активности фоторецепторов и роли ионных механизмов в ее генерации, отсутствовали указания на изменение этой точки зрения или на пересмотр предыдущих экспериментальных данных. Примером может служить его обзорная статья [4], где фоторецепторам позвоночных и рабдомам беспозвоночных не уделено никакого места в общей схеме образования ЭРГ. В статье «Нейрофизиология сетчатки позвоночных» [5] под влиянием экспериментальных данных зарубежных исследователей, хотя и признается наличие электрической активности у колбочек, тем не менее вновь повторяются те же сомнения в отношении палочек («Почему до сих пор не удается отвести потенциал действия изнутри палочек»? [5, стр. 137]).

Только в декабре 1971 г. на Всесоюзном симпозиуме по первичным процессам в органах чувств в Пущино А. Л. Бызов публично заявил об отказе от своих прежних выводов по поводу электронейтральности фоторецепторов. Поскольку эти выводы базировались на ряде опубликованных экспериментальных работ, представляет интерес их рассмотрение в свете генеза ошибок, приведших к неправильным выводам.

* Печатается в порядке дискуссии.

Рассмотрим в этой связи основные экспериментальные данные, послужившие основой для подобного заключения на примере работ А. Л. Бызова. Применяя в своих работах вслед за Томита, Фунаши [38], Бриндли [16], Гурасом [25] и других метод послойного микроэлектродного анализа электроретинограммы лягушки, А. Л. Бызов определял разности потенциалов, возникающие во время освещения на разных глубинах погружения микроэлектрода в сетчатку. Однако далее, с целью определения значения циркулирующих в сетчатке токов, рассчитывал их на основе измерения сопротивлений слоев сетчатки и применения закона Ома. Поскольку, согласно измерениям, сопротивление слоя фоторецепторов в области наружной пограничной мембраны оказалось максимальным (430 ом), то, несмотря на значительную разность потенциалов в этом слое, рассчитанные токи оказывались очень малыми по сравнению с токами в других слоях ретины. Это, собственно, и послужило основой для отрицания участия фоторецепторов в генерации ЭРГ и отнесения ее целиком к биполярным клеткам сетчатки. В связи с этим следует указать, что этот расчет делался на основе произвольного допущения о том, что сопротивление ткани во время опыта остается постоянным. Между тем, сопротивление мембран фоторецепторов при освещении заметным образом падает, как, впрочем, и во всех других мембранах нервных клеток. Об этом свидетельствуют как относительно ранние работы Фуортеса [27], так и более поздние прямые измерения Фалк и Фатта [26] о падении импеданса суспензии внешних сегментов палочек сетчатки лягушки при освещении. Отсюда следует, что во время освещения сопротивление уменьшается, что приводит к росту соответствующих локальных токов, которые оказываются вполне сопоставимыми с токами в других слоях сетчатки. Рассматривая этот момент, совершенно не учтенный в работах А. Л. Бызова, мы не останавливаемся и на другом вопросе, а именно, применимости закона Ома к подобным малым толщинам и соответственно большим электрическим полям, что вытекает из известных физических соображений.

Нельзя, наконец, не упомянуть также и о том, что А. Л. Бызов делает свои расчеты токов на основе собственных данных о местоположении в сетчатке так называемой R-мембраны с высоким сопротивлением. Дело в том, что, как установлено в ряде работ электрофизиологов, R-мембрана является комплексом мембраны Бруха и пигментного эпителия, а по более поздним данным Бриндли и Хамасаки [17] и Ноэля [33], соответствует слою пигментного эпителия. Это положение является общепринятым в мировой литературе. В противоречии с этим находятся данные А. Л. Бызова [3], доказывающего, что R-мембрана является наружной пограничной мембраной (НПМ). Как объяснить подобное противоречие? Природа его легко вскрывается, если рассмотреть метод, примененный А. Л. Бызовым для определения локализации R-мембраны в сетчатке лягушки. В то время как многие исследователи, уже давно работая с микроэлектродами, применяют для локализации их кончика и определения местоположения в сетчатке гистохимический метод метки, в экспери-

ментах А. Л. Бызова этот необходимый контроль отсутствовал, и все расчеты производились на основании глубины погружения электродов в сетчатку и сопоставления глубины с литературными морфологическими данными. Легко видеть, что подобный подход таит в себе большую возможность ошибок, связанных с неконтролируемым прогибанием ткани сетчатки, ее сдавливанием, повреждением клеток и т. д., не говоря уже о том, что момент соприкосновения кончика микроэлектрода с сетчаткой (т. е. начало отсчета) может вовсе не соответствовать уровню сетчатки, скорее поверхности слоя жидкости, неизбежно остающейся на сетчатке. Отметим также, что в ряде экспериментов по изучению электрической активности фоторецепторов вносилась коррекция в экспериментальные данные [2], учитывающая сжатие препарата при фиксации и прогиб ткани микроэлектродом [3, стр. 124, рис. 68], в других же работах такая коррекция не производилась.

Необходимо указать также, что, анализируя в своих работах данные других авторов, свидетельствующие о существовании электрической активности фоторецепторов, А. Л. Бызов бросал им упреки в методических погрешностях (например, неконтролируемость действительного положения кончика микроэлектрода в работах Светихина, 1958, или затекание токов из соседних слоев сетчатки—работы Томита, 1965), к сожалению, не распространяя подобные, весьма обоснованные сомнения в отношении собственных результатов [22].

В 1968 г. Бызов [23] произвел в лаборатории Т. Томита (Япония) проверку своих данных, пользуясь разработанной в этой лаборатории методикой метки положения микроэлектрода в сетчатке. Было обнаружено, что во всех опытах (всего было поставлено 20 экспериментов) на глазном бокале лягушки R-мембрана соответствовала слою пигментного эпителия, что само по себе противоречит его предыдущим работам [3]. В опытах же на изолированной сетчатке R-мембрана только в 10 случаях (из 40 экспериментов) была обнаружена в рецепторном слое сетчатки. Следовательно, и здесь также была показана ошибочность предыдущих данных, поскольку число положительных ответов не составляет даже 50% всех представленных опытов.

Рассмотрим теперь современные экспериментальные данные, прямо свидетельствующие о существовании электрической активности фоторецепторов. Еще в 1965 г. Бауман [15] показал, что при введении микроэлектрода в изолированную сетчатку лягушки на глубине 25—50 мкм (с рецепторной стороны) обнаруживается потенциал типа РIII, генерируемый, следовательно, фоторецепторами. В исследованиях Томита с сотрудниками [40] были обнаружены и зарегистрированы внутриклеточно от одиночных фоторецепторов (колбочек) электрические реакции в сетчатке карпа. При освещении возникала гиперполяризация. Был использован равноэнергетический спектр $2 \cdot 10^5$ фот/мк² сек и развертка с шагом 20 нм, периодом засвета 0,3 сек, периодом затемнения—0,6 сек. Найдены следующие максимумы чувствительности: 462 ± 15 мкм, 529 ± 94 мкм, 611 ± 23 мкм, которые соответствуют микроспектрофотометрическим дан-

ным Маркса и Макниколя (1965) — 455 ± 15 мкм, 530 ± 5 мкм, 625 ± 5 мкм. В этой работе Томита произвел грубую оценку величины изменения потенциала колбочек при поглощении световой энергии в 1 квант. Было установлено, что отдельная вспышка содержала 10^3 фотон/мкм² и вызывала гиперполяризацию в 1 мв, что соответствует 1 мкв/(фотон/мкм²). Так как площадь поперечного сечения колбочек 10 мкм², то необходимо попадание в колбочку 10 фотонов для вызова гиперполяризации в 1 мв. Коэффициент поглощения колбочкой неизвестен, но он лежит в пределах 0,1—0,01, следовательно, реакция колбочек на попадание 1 фотона составляет 1—10 мкв.

Пенн и Хейгинз [36] провели интересное исследование на срезах темноадаптированных сетчаток крыс, содержащих слой фоторецепторов. Погружением микроэлектрода удалось выяснить продольное распределение величин плотности фототока вдоль палочек, которые оказались, как и следовало ожидать, активными источниками тока при освещении препарата. Кроме того, оказалось, что в таком срезе сетчатки можно регистрировать компонент RIII электроретинограммы (α -волна ЭРГ). Таким образом, данные о наличии электрической активности палочек имелись еще до появления в свет статьи Бызова [15], в которой этот вопрос представлялся неясным.

Наконец, Тойода, Хироми и Томита [41] сумели осуществить внутриклеточную регистрацию потенциалов одиночных палочковых фоторецепторов. При освещении возникала гиперполяризация до 5 мв у протей и 3—15 мв у геккона. Была снята и вольтамперная характеристика: внутриклеточная поляризация рецепторов увеличивала их ответы при гиперполяризации и уменьшала или извращала при деполяризации, т. е. возникал типичный эффект выпрямления.

За последнее время выполнен и ряд важных исследований, вскрывающих ионную природу фоторецепторного потенциала в связи с фотоиндуцированным перераспределением потенциалобразующих ионов Na и K [12, 14, 19]. Характерно, что в последней работе Островского с соавторами [1] делается вывод о важном значении фотоиндуцированного поглощения Na в механизме возникновения фоторецепторного «потенциала», что отражает изменение взглядов тех же авторов, ранее присоединявшихся к мнению об электронейтральности фоторецепторов.

Большой интерес представляет также ультраструктура сложного глаза насекомых и других беспозвоночных, механизмы возникновения фотовозбуждения этих систем. Что касается фоторецепторной системы беспозвоночных животных, то в настоящее время вряд ли в этом отношении можно сомневаться в наличии электрической активности рабдомеров—аналогов внешних сегментов палочек и колбочек позвоночных. Достаточно упомянуть ряд исследований, показавших (при помощи внутриклеточного микроэлектрода), что по крайней мере некоторые компоненты рецепторного потенциала возникают в мембранах чувствительной клетки, и не исключена возможность непосредственного участия рабдомеров в формировании ЭРГ [28]. Шоу [25], например, пишет: «Мембра-

ны рабдомеров или часть их также представляются вероятным кандидатом в происхождении электрического ответа, поскольку миграционная энергия свыше некоторого расстояния была показана невозможной, по крайней мере для палочек позвоночных». В ряде работ [29, 30 35] указывается, что в глазе кальмара происхождение рецепторного тока ограничивалось частью клетки, которая была локально освещена. Недавно Хейгинзом и МакГауфи [31] было установлено, что как рецепторный потенциал, так и ранний рецепторный потенциал проявляют сходные характеристики спада вдоль длины палочки кальмара. Ранний рецепторный потенциал (РРП), по всей вероятности, возникает вследствие обратимого сдвига зарядов в ориентированных молекулах родопсина рабдомеров [31]; это указывает на то, что рецепторный потенциал может иметь аналогичное происхождение т. е. в рабдомерических мембранах. В одной из наших работ с соавторами [8] было показано, что ранний рецепторный потенциал глаза саранчи сохраняется даже при его помещении в вакуумные условия (проявляясь в виде фотоэлектронной эмиссии) и отражает первичные фотоэлектронные превращения в рабдомах.

В свете перечисленных работ и ряда других исследований кажутся неубедительными утверждения об электрической нейтральности рабдомеров [3, 10], тем более, что доводы, приводимые авторами в пользу подобных выводов, основываются на рассуждениях и методических приемах, недостатки которых рассматривались выше при анализе вопроса об электрической активности фоторецепторов позвоночных животных. Для иллюстрации степени категоричности делавшихся выводов приведем ряд примеров: *«При этом результаты послойного анализа ЭРГ высших головоногих, ввиду особенностей строения их сетчатки, показали, что рабдомеры не принимают участия в генерации электрических колебаний, составляющих ЭРГ»* [3, стр. 133]. Там же на стр. 125: *«В слое рабдомеров или зрительных палочек никакой заметной разности потенциалов не наблюдается... здесь не течет сколько-нибудь заметных токов».*

Рассматриваемые в настоящей дискуссионной статье вопросы тесно связаны с проблемой выявления первичных механизмов зрительного возбуждения и возможной роли электрических процессов. Хотя на сегодня и не совсем ясно, какие именно стадии первичных процессов вызывают возбуждение рецепторов, тем не менее очевидно, что это состояние возникает еще до обесцвечивания, да и собственно, фотохимическое разложение зрительных пигментов *in vivo* оказалось крайне незначительным. Все это привело к отказу от фотохимической теории зрения в ее первоначальном виде и выдвижению на первое место «твердотельных» моделей и концепций.

Значительную роль в изменении наших представлений о природе зрения сыграли, в частности, и прижизненные исследования ранних фотоэлектрических явлений с очень малым (микросекунды) скрытым периодом (ранний рецепторный потенциал сетчатки—РРП). Уже отмечалось, что РРП принципиально отличен от всех других известных биологических потенциалов: он устойчив к аноксии, блокаторам метабо-

лизма, сохраняется в фиксированных сетчатках и даже сразу после охлаждения ее до температуры жидкого азота. РРП в виде фотоэлектронной эмиссии обнаружен также в высушенных сетчатках глаз позвоночных и беспозвоночных животных (насекомые), помещенных в высокий вакуум [7, 9].

В настоящее время не вызывает сомнений то обстоятельство, что РРП отражает смещение зарядов молекул фотопигментов сетчатки или их дериватов [18—34]. Наиболее вероятной основой для положительной фазы РРП считается образование или распад прелюмиродопсина, период полураспада которого составляет 20 мсек при 10°C, ибо последующие светочувствительные продукты являются более долгоживущими и не соответствуют временным характеристикам РРП. По мнению Ардена, Брайджеса, Икеда и Зигеля [13], в основе генерации отрицательной фазы РРП, которая более чувствительна к температуре и имеет большую длительность, также должен быть прелюмиродопсин, ибо любой другой фотопродукт из цикла родопсина отличается по своим временным и температурным характеристикам. Кон [24] считает, однако, что отрицательный компонент РРП генерируется в процессе образования метародопсина I в метародопсин II.

Существующие гипотезы о происхождении РРП признают за его основу перемещение зарядов в фоторецепторе. Бриндли и Гарден-Медвин [18] считают, что две фазы РРП возникают благодаря двум последовательным движениям зарядов в противоположных направлениях. Арден, Брайджес, Икеда и Зигель [13] рассматривали три возможные эквивалентные электрические схемы фоторецептора, которые могут образовать РРП. Хейгинз и МакГауфи [32] предполагают, что регистрируемый РРП является следствием пассивного распространения мембранного тока вдоль внешнего сегмента фоторецептора.

В недавно опубликованной нашей работе [9] экспериментально показано, что основным генератором РРП являются внешние сегменты фоторецепторов. Установлено, что РРП возникает в хаотически ориентированной суспензии фоторецепторов и перерастает в α -волну ЭРГ. Мы допускаем [9], что содержащиеся в фоторецепторах диски образованы приведенными в тесный контакт друг с другом слоями с п- и р-типами проводимости (даже сама молекула родопсина, состоящая из двух как бы вложенных друг в друга частей—белка и хромофора—может быть рассмотрена как биологический п—р переход), находящимися в довольно высоком электрическом поле (10^5 в/см) и разделенными между собой изолирующим слоем липидов и водной прослойкой. При этом нам представляется, что в фоторецепторах осуществляется использование основных достоинств гетероперехода — малого темнового тока, сравнительно малой инерционности фотоответов при высокой светочувствительности. В палочках имеется дополнительная прослойка между мембранами в дисках, поэтому можно допустить существование системы типа «фототриодов» (п—р—п или р—п—р области), обладающих, как известно, еще большей чувствительностью за счет происходящего в них усиления фото-

тока (с коэффициентом усиления до нескольких сотен). В колбочках же, где нет необходимости в сверхвысокой чувствительности, процессы, вероятно, реализуются в фотодиодных дисках рецептора. Особенности соединений элементарных дисков в фоторецепторах (палочках и колбочках) должны быть подвергнуты специальному рассмотрению и не являются предметом настоящей статьи. Вместе с тем, они указывают на возможную важную роль электрических изменений в деятельности внешнего сегмента фоторецептора и его аналога—рабдома.

Итак, рассмотренные выше данные отвергают представления об электронейтральности фоторецепторов и служат основанием для использования ЭРГ (по крайней мере, компонента RIII) и РРП для изучения функциональных свойств фоторецепторов и начальных этапов зрительного возбуждения в норме и патологии. Вместе с тем, следует отметить, что вопрос о функциональном значении рецепторных потенциалов в механизмах возникновения и распространения возбуждения в фоторецепторах остается еще далеко неясным. Он требует дальнейшего экспериментального и теоретического анализа.

Лаборатория зрительной рецепции
АН АрмССР

Поступило 10.III 1971 г.

2. Գ. ԿԵՄԻՐԶՈՂԱՅԱՆ

ՈՂՆԱՇԱՐԱՎՈՐ ԵՎ ԱՆՈՂՆԱՇԱՐԱՎՈՐ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ ՖՈՏՈՌԵՑԵՊՏՈՐՆԵՐԻ ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՀԱՐՑԻ ԵՎ ՆՐԱ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԿ ՆՇԱՆԱԿՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ու մ

Հոդվածում դիտարկվում է ֆոտոռեցեպտորների էլեկտրական ակտիվության հարցը, քննադատվում է ֆոտոռեցեպտորների էլեկտրաշեղորուքյան տեսակետը և առաջ են քաշվում նոր գործոններ ֆոտոռեցեպտորների պոտենցիալների ֆունկցիոնալ դերի օգտին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Антонов В. Ф., Афанасьев А. А., Островский М. А., Федорович И. Б. Биофизика, 12, 877, 1967.
2. Бызов А. А., Орлов О. Ю. Физиологический журнал СССР, 48, 16, 1962.
3. Бызов А. Л. Электрофизиологические исследования сетчатки. М., 1966.
4. Бызов А. Л. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, III, 5, 432, 1967.
5. Бызов А. Л. В сб. Физиология сенсорных систем. 1, 137, Л., 1971.
6. Винников Я. А. В сб. Бионика, М., 1965.
7. Демирчоглян Г. Г. Физиология и патология сетчатки глаза. Первичные зрительные процессы. М., 1964.
8. Демирчоглян Г. Г., Нагапетян Х. О., Оганесянц М. А. Международный энтомологический конгресс. (Тезисы докладов), М., 1964.

9. Демирчоглян Г. Г., Нагапетян Х. О., Гаспарян Л. А. Биофизика, XVI, 3, 462, 1971.
10. Мазохин-Поршняков Г. А. Зрение насекомых. Изд. «Наука», 1965.
11. Островский М. А., Федорович И. Б., Голубев И. Н. Биофизика, XII, 5, 877, 1967.
12. Эттингер Р. Н., Берман А. Л., Леонтьев В. Г., Говардовский В. Н. ДАН СССР, 1809, 1407, 1969.
13. Arden G. B., Bridges C. D., Hsako, Ikeda and Slegel J. M. Vision Res, 8, 3, 1968.
14. Arden G. E., Ernest N. Nature, 223, 528, 1969.
15. Baumann Ch. Pflügers Arch. 282, 92, 1965.
16. Brindly G. S. J. Physiol., 134, 360, 1956.
17. Brindly G. S., Hamasaki D. J. J. Physiol., London, 163, 599, 1964.
18. Brindly G. S., Garden-Medvin A. R. J. Physiol. London, 182, 185, 1963.
19. Bonting S. L., Bingham A. D. Exptl Eye Res., 6, 400, 1967.
20. Brown K. T., Vlesel T. N. J. Physiol. London, 149, 537, 1959.
21. Brown K. T., Tasaki J. Physiol. London, 158, 281—295, 1961.
22. Byson A. L. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., XXX, 547, 1965.
23. Byson A. L. Vision Res., 8, 697, 1968.
24. Cone R. A. Science, 155, 1128, 1967.
25. Gouras P. Amer. J. Ophthalmol., 46, 3, 59, 1958.
26. Falk G., Fatt P. J. Physiol., 198, 647, 1968.
27. Fourtes M. G. P. Amer. J. Ophthalmol., 46, 5, 1958.
28. Goldsmith T. H. Vision Res., 1, 398, 1964.
29. Hagins W. A., Jennings W. H. Discuss. Faraday Soc., 27, 180, 1959.
30. Hagins W. A., Zonana H. V., Adams R. G. Nature, 194, 844, 1962.
31. Hagins W. A., McGaughy R. E. J. Biophys. J., 8, A—158 (Abstract), 1968.
32. Hagins W. A., McGaughy R. E. Science, 159, 3811, 219, 1968.
33. Noell N. K. J. Opt. Soc. Am., 53, 36, 1963.
34. Pak W. Z., Helmrich G. Vision Res., 8, 585, 1968.
35. Pak W. Z. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 30, 559, 1965.
36. Penn H. B., Hagins W. A. Nature, 223, 201, 1969.
37. Shaw S. R. Vision Res., 9, 999, 1969.
38. Tomita T., Funaiishi A. J. Neurophysiol., 15, 75, 1952.
39. Tomita T., Murakami M., Hashimoto J. J. Gen. Physiol., 43, 6, pt. 2, suppl. 81—94.
40. Tomita T., Kaneko A., Murakami M., Pantler B. Z. Vision Res., 7, 519, 1967.
41. Toyoda J., Wasaki H., Tomita T. Vision Res., 2, 453, 1969.