

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
Լ.Ա.ՕՐԲԵԼՈՒ ԱՆՎԱՆ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՌՈՏՈՎ ԱԼԵՔՍԱՆԴՐ ՅՈՒՐԻԻ

**ՁՈՂԻԿՆԵՐԻ և ԿՈՆԵՐԻ ԶԳԱՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ և
ԱՐԶԱԳԱՆՔՄԱՆ ԱՐԱԳՈՒԹՅՈՒՆԸ. ԷՎՈԼՅՈՒՑԻՑԻՈՆ
ԱՍՊԵԿՏ**

Գ.00.09 – «Մարդու և կենդանիների ֆիզիոլոգիա»
մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների
թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման
ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2026

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМЕНИ Л.А.ОРБЕЛИ**

РОТОВ АЛЕКСАНДР ЮРЬЕВИЧ

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.09 - «Физиология человека и животных»

ЕРЕВАН – 2026

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվ. ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստում:

Գիտական ղեկավար՝ կենս.գիտ.դոկ., ՌԳԱ թղթ. անդ.
Միխայիլ Լեոնիդի ֆիրսով

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս.գիտ.դոկտոր
Մարինա Նիկոլայի Կարպենկո
կենս.գիտ.թեկնածու
Արմեն Վաղինակի Ոսկանյան
Առաջատար կազմակերպություն՝ ՌԴ ՌԳԱ Ի.Պ.Պավլովի անվ ֆիզիոլոգիայի
ինստիտուտ (Սանկտ-Պետերբուրգ)

Ատենախոսության պաշտպանությունը կկայանա 2026 թվականի սեպտեմբերի 24-ին, ժամը 13:00-ին ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, ֆիզիոլոգիայի 023 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0028, ք. Երևան, Օրբելի եղբ. 22):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գրադարանում և www.physiol.sci.am կայքում:
Սեղմագիրն առաքվել է 2026 թվականի օգոստոսի 21-ին

023 մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, կենս.գիտ.թեկ.  Ն.Է. Թադևոսյան

Тема диссертации утверждена в Институте физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА
докт.биол.наук, чл.-корр. РАН,
Научный руководитель: Михаил Леонидович Фирсов

Официальные оппоненты: докт.биол.наук,
Марина Николаевна Карпенко
канд.биол.наук
Армен Вагинакович Восканян

Ведущая организация: Институт физиологии им. И.П. Павлова
Российской академии наук (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится 24 сентября 2026 года 13⁰⁰ часов на заседании
Специализированного совета 023 по физиологии, действующего в Институте физиологии им.
Л.А. Орбели НАН РА (РА, 0028, г. Ереван, ул. братьев Орбели, 22).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института физиологии им. Л.А. Орбели НАН
РА и на сайте <http://www.physiol.sci.am>.

Автореферат разослан 21 августа
Ученый секретарь специализированного
совета 023, канд.биол.наук



Н.Э. Тадевосян

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 одному или другому типу определялась по специфической морфологии, однако к настоящему времени показано, что функциональная роль рецептора ночного или дневного зрения в значительно большей степени обусловлена биохимией внутриклеточных сигнальных процессов.

Совокупность биохимических реакций, преобразующих энергию поглощенного кванта света в электрический ответ клетки образует сигнальный каскад фототрансдукции. Палочки и колбочки используют принципиально одинаковый каскад, однако большая часть его белков-участников существует в виде палочко- и колбочко-специфичных изоформ, чьи свойства обеспечивают различия в кинетике определенных реакций [Говардовский и др., 2015]. Филогенетические линии палочко- и колбочко-специфичных белков непрерывны и не переходят одна в другую в ходе эволюции, что говорит о том, что разделение фоторецепторов на две функциональные группы произошло один раз, на уровне общего предка позвоночных [Davies et al., 2012; Lamb, 2013; 2020]. С другой стороны, в ходе многолетних морфологических исследований сетчатки позвоночных был описан ряд фоторецепторов, которые невозможно однозначно отнести к палочкам или колбочкам [Walls, 1934; 1935; Underwood, 1970]. Традиционно их рассматривали как результат адаптационных функциональных переходов (трансмутаций) колбочек в палочкоподобные клетки и наоборот, происходивших в отдельных группах позвоночных [Walls, 1942]. При таких переходах, несмотря на морфологические изменения, исходная принадлежность белков каскада фототрансдукции к палочковой или колбочковой линии сохраняется, но их биохимические свойства изменяются за счет точечных аминокислотных замен. В результате на базе колбочковых элементов каскада может быть построен рецептор ночного зрения, и наоборот [Zhang et al., 2006; Kojima et al., 2024].

Таким образом, по морфологии и палочко-колбочковой специфике изоформ белков каскада не всегда возможно определить истинную функциональную роль фоторецептора. Поэтому было предложено определение понятий «палочка» и «колбочка» через их основные физиологические свойства [Walls, 1934; Lamb, 2013]. В такой формулировке типичными палочками считаются фоторецепторы, способные детектировать одиночные кванты света, но насыщающиеся и утрачивающие функциональность при умеренных дневных освещенностях (10-100 лк). Типичные же колбочки могут функционировать, не насыщаясь, при максимальных природных освещенностях (до 10^5 лк и выше), а их ответ на световые стимулы примерно на порядок быстрее, чем у палочек [Lamb, 2016; Ingram et al., 2016]. Приведенные определения основываются на экспериментально наблюдаемых свойствах электрических фотоответов палочек и колбочек, которые напрямую связаны с кинетикой процессов включения и выключения их каскада фототрансдукции [Говардовский и др., 2015; Kawamura, Tachibanaki, 2022]. Следует отметить, что связь некоторых параметров фотоответа, таких, как начальная задержка, с конкретными этапами каскада остается неясной. Поскольку длительность задержки существенно различается для палочек и колбочек [Kawakami, Kawamura, 2014], выявление этапов каскада, определяющих ее, позволило бы использовать этот параметр как дополнительную характеристику функциональной роли фоторецептора как «палочки» или «колбочки».

Важную роль для функции фоторецептора также играют биохимические свойства зрительного пигмента – светочувствительной молекулы, инициирующей активацию каскада фототрансдукции [Kefalov et al., 2003]. Ключевыми характеристиками являются скорость его распада после обесцвечивания (фотолиза) [Golobokova, Govardovskii, 2006] и тесно связанная с ней жесткость связывания хромофора, которая определяет склонность молекулы к спонтанным изомеризациям в темноте [Rieke, Baylor, 2000].

Для большинства фоторецепторов переходного типа функциональные характеристики электрических ответов, определяющие их чувствительность и быстродействие, остаются малоизученными, а анализ биохимии зрительных пигментов дает противоречивые результаты [Говардовский, 1983; Lamb, 2013]. Количественное сравнение их параметров с типичными палочками и колбочками может выявить конкретные физиологические изменения, сопровождающие переход клетки от одного типа к другому. В рамках данной работы были исследованы два типа переходных фоторецепторов – короткие палочкоподобные рецепторы круглоротых [Walls, 1935], и зеленые палочки бесхвостых амфибий [Dartnall, 1967]. Оба этих типа фоторецепторов имеют ряд необычных свойств, не позволяющих однозначно определить их как «палочки» или «колбочки», также неясной остается их эволюционная история. Уточнение функциональной роли и выявление адаптации под нее конкретных белков и реакций каскада фототрансдукции, потенциально позволит уточнить происхождение этих уникальных фоторецепторов.

Цель и задачи исследования

Цель данного исследования – оценка основных параметров каскада фототрансдукции, определяющих чувствительность и кинетику ответов на свет типичных палочек и колбочек позвоночных в сравнении с двумя типами переходных фоторецепторов – палочкоподобных рецепторов речной миноги (*Lampetra fluviatilis*), и зеленых палочек озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*), – с уточнением их функциональной роли.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить задержку фотоответа у разных типов фоторецепторов и определить этапы активации фототрансдукционного каскада, определяющие ее длительность для типичных палочек и колбочек.
2. Оценить чувствительность и кинетические параметры фотоответа для палочкоподобных рецепторов миноги и зеленых палочек лягушки, и сравнить их с соответствующими величинами для типичных палочек позвоночных.
3. Определить скорость распада после обесцвечивания для пигментов палочкоподобных рецепторов миноги и зеленых палочек лягушки, и сравнить ее со значениями для типичных палочек и колбочек позвоночных.
4. Определить константу скорости спонтанной активации зрительного пигмента для пигментов палочкоподобных рецепторов миноги и зеленых палочек лягушки, и сравнить ее со значениями для типичных палочек позвоночных.

Научная новизна исследования

В рамках данной работы впервые изучен вопрос о происхождении задержки фотоответа и выявлены конкретные этапы, определяющие длительность этой стадии. Также впервые оценена минимальная задержка фотоответа для переходных фоторецепторов круглоротых и амфибий в сравнении с типичными палочками и колбочками.

В сетчатке речной миноги имеется два типа фоторецепторных клеток: короткие и длинные рецепторы, функционально близкие к палочкам и колбочкам, соответственно

[Govardovskii, Lychakov, 1984]. Впервые проведено сравнение кинетических параметров фотответа коротких рецепторов миноги с типичными палочками позвоночных и выявлена их низкая в сравнении с типичными палочками абсолютная чувствительность, а также определяющие ее особенности кинетики каскада фототрансдукции. Также впервые на уровне изолированных клеток исследованы свойства зрительного пигмента рецепторов миноги: оценены константа скорости спонтанной изомеризации и кинетика фотоллиза.

Бесхвостые амфибии имеют уникальный тип фоторецепторов, «зеленые палочки», которые были ранее определены как функциональные рецепторы ночного зрения [Matthews, 1983]. В данной работе впервые показана их более высокая чувствительность по сравнению с типичными палочками и определена обуславливающая ее особенность кинетики каскада фототрансдукции. Также впервые подтверждено измерениями на изолированных клетках одного и того же вида амфибий, что высокая стабильность их пигмента парадоксально сочетается с высокой скоростью фотоллиза.

Теоретическое и практическое значение работы

Идентификация основного источника задержки фотответа разрешает вопрос о том, какая стадия активации каскада фототрансдукции лимитирует ее, но также ставит новую проблему: за счет каких молекулярных механизмов колбочкам удается поддерживать столь короткую (3-5 мс) задержку по сравнению с палочками (10-12 мс)?

Данная работа разрешает давнее противоречие в оценке стабильности зрительного пигмента зеленых палочек разными исследовательскими группами [Matthews, 1984; Luo et al., 2011], однако также ставит новую научную проблему. Сочетание высокой стабильности с высокой скоростью фотоллиза необъяснимо с точки зрения современных представлений о взаимодействии белковой части пигмента и его хромофора.

Использованный в рамках данной работы подход – количественная характеристика параметров, определяющих чувствительность и кинетику ответа фоторецепторов, и их сравнение с типичными палочками и колбочками – позволяет подтвердить или опровергнуть переходный характер рецепторов некоторых позвоночных. С его помощью была успешно определена функциональная роль палочкоподобных рецепторов круглоротых и зеленых палочек бесхвостых амфибий. 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 будут полезны при разработке искусственных трансдукционных каскадов, направленных на протезирование утерянной зрительной функции оптогенетическими методами.

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 еще более специализированными рецепторами ночного зрения, чем типичные палочки, 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 фотоллиза, типичной для колбочковых пигментов.
4. Короткие рецепторы миноги, являясь функционально рецепторами ночного зрения, сохраняют признаки переходной формы, поскольку эффективность активации их

каскада фототрансдукции снижена, а скорость выключения – ускорена, по сравнению с типичными палочками.

5. Зрительный 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 следующих конференциях: XV и XVI Всероссийских совещаниях по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2016, 2020); 9-ой и 11-ой Международных конференциях «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2017, 2021); «Обработка и интеграция информации в сенсорных системах: от внешнего сигнала к сложному образу» (Москва, 2022); XV, XVI, XVII, XX и XXI симпозиумах «Visionarium» (Твярминне, Финляндия, 2016, 2017, 2018, 2022, 2023); «European Retina Meeting 2023» (Тюбинген, Германия, 2023).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, 12 тезисов конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (285 источников) и приложения. Работа включает 38 рисунков и 4 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования и подготовка препаратов

Эксперименты проводились в лаборатории эволюции органов чувств ИЭФБ РАН. В качестве переходных фоторецепторов изучались короткие рецепторы речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) и зеленые палочки озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*). Для проведения сравнительного анализа в качестве типичных палочек были выбраны родопсин-содержащие («красные») палочки озерной лягушки, типичных колбочек – красночувствительные колбочки серебряного карася (*Carassius gibelio*). Дополнительно проводились эксперименты на палочках стерляди (*Acipenser ruthenus*). Работа с животными проводилась в соответствии с директивой Совета Европейского сообщества (24.11.1986, 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 электрических ответов фоторецепторов

Кинетику включения и выключения каскада фототрансдукции анализировали по электрическим ответам одиночных фоторецепторов на световые стимулы. Регистрацию тока клеток, загруженных в камеру с системой протока раствора Рингера, проводили

методом всасывающей микропипетки [Baylor et al. 1979b]. Фоторецепторы стимулировали вспышками света (светодиод, максимум излучения 525 нм) длительностью 10 мс, и регистрировали ответы с дискретизацией 10 мс. Длительные (15-30 минут) записи тока клетки в темноте, необходимые для анализа спонтанных активаций зрительного пигмента, регистрировали с дискретизацией 2 мс. Для анализа задержки фотоответа предъявляли яркие вспышки длительностью 1-2 мс, ответы регистрировали с дискретизацией 1 мс.

Дополнительно, для анализа задержки фотоответов колбочек, регистрировали электроретинограммы препаратов целой сетчатки. Препараты помещали в камеру Уссинга, перфузируемую раствором Рингера с 12 mM аспартата натрия для выделения фоторецепторного ответа, колбочковый компонент изолировали включением фоновой засветки, насыщающей палочки. Стимуляция осуществлялась вспышками света длительностью 1 мс, ответы регистрировались с дискретизацией 0.5 мс на точку.

Микроспектрофотометрия зрительных пигментов

Измерения спектров зрительных пигментов фоторецепторов были выполнены на изолированных наружных сегментах с помощью скоростного дихроичного микроспектрофотометра [Govardovskii, Zueva, 2000]. Спектры регистрировались с дискретизацией 1 нм в диапазоне 330-760 нм. Последующий анализ проводился для спектров, усредненных по нескольким клеткам одного типа. Темновые спектры описывались с помощью стандартной кривой для зрительных пигментов позвоночных [Govardovskii et al., 2000].

Для изучения кинетики фотолиза зрительных пигментов, клеткам предъявляли яркую обесцвечивающую засветку 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]. Скорость фотолиза определяли как время полураспада для суммы метaproдуктов зрительных пигментов I, II и III.

Анализ данных

Для оценки чувствительности фоторецепторов, зависимость амплитуды фотоответов от интенсивности предъявляемого стимула аппроксимировали функцией Хилла. Различия в абсолютной чувствительности определялись по сдвигу параметра полунасыщающей интенсивности, выраженной как число фотоизомеризаций молекул зрительного пигмента на клетку или в единице объема.

Для того чтобы выявить этапы каскада фототрансдукции, определяющие длительность задержки, применяли модель фотоответа, учитывающую многоступенчатый характер его активации, а также процессы выключения [Astakhova et al., 2015]. Сравнительный анализ кинетики проводился для нормированных ненасыщенных (15-30% от максимального фототока) фотоответов коротких рецепторов миноги, зеленых и красных палочек лягушки. Оценку скорости выключения их каскада фототрансдукции проводили путем упрощенного описания нисходящего фронта ответа экспоненциальной функцией. Восходящий фронт, соответствующий активации каскада, анализировали путем расчета домножающего коэффициента, необходимого для максимального приближения начального участка к эталону (усредненный восходящий фронт красных палочек лягушки). Также рассчитывались время до пика фотоответа и его время интегрирования.

Среднюю частоту спонтанных активаций зрительного пигмента определяли путем анализа гистограммы распределения темнового тока, которую можно представить в виде свертки функции Гаусса и одноквантового фотответа, возникающего с определенной частотой [Donner et al., 1990; Astakhova et al., 2017]. Константу скорости спонтанной активации пигмента рассчитывали путем нормировки частоты дискретного шума на количество молекул пигмента в клетке. Анализ электрофизиологических записей был реализован в среде MathCad 15 (MathSoft Cambridge). Качество аппроксимаций данных по методу наименьших квадратов оценивали с помощью коэффициента детерминации R^2 .

Проверку нормальности распределения проводили по критерию Шапиро-Уилка. Для сравнения чувствительности и кинетических параметров фототвевов в случае нормально распределенных данных использовался либо однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с post hoc критерием Тьюки, либо дисперсионный анализ Уэлча с post hoc критерием Даннетта. Для ненормального распределения применялся критерий Краскела-Уоллеса и post hoc критерий Данна. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление этапов активации каскада фототрансдукции, вносящих основной вклад в задержку фотответа

Каскад фототрансдукции опосредует перевод энергии падающего света в электрический ответ фоторецептора, и происходит в специальном компартменте клетки – наружном сегменте. Он запускается светочувствительным зрительным пигментом (R, комплекс белка опсина и хромофора ретиналя), который после поглощения кванта света (R^*) связывается с G-белком трансдуцином (Т) и переводит его в активную форму. Каждая молекула трансдуцина активирует каталитическую субъединицу эффекторного фермента – фосфодиэстеразы 6 типа (PDE), – что ускоряет гидролиз циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), выступающего в роли вторичного посредника сигнального каскада. Концентрация цГМФ в наружном сегменте фоторецептора снижается, что приводит к закрытию регулируемых им ионных каналов плазматической мембраны и падению тока, текущему через них [Arshavsky, Burns, 2014; Abbas, Vinberg, 2021].

Между предъявлением светового стимула и возникновением экспериментально регистрируемого фотответа, за счет суммарной длительности этапов активации каскада возникает задержка длительностью несколько миллисекунд. Не все этапы активации вносят существенный вклад в задержку: собственная активация зрительного пигмента, диффузия цГМФ и закрытие ионных каналов протекают очень быстро и их длительностью можно пренебречь [Pugh, Lamb, 2000]. Таким образом, остается 6 этапов, потенциально вносящих существенный вклад в задержку фотответа (Рис. 1А):

1. R^* встречает неактивный тример трансдуцина ($Ta\beta\gamma GDF$) и связывается с ним, образуя комплекс $R^*-Ta\beta\gamma GDF$ (t_1).
2. Из комплекса $R^*-Ta\beta\gamma GDF$ освобождается молекула ГДФ (t_2).
3. ГДФ связывается с освободившимся сайтом связывания в комплексе $R^*-Ta\beta\gamma$ (t_3).
4. Молекула зрительного пигмента освобождается из комплекса $R^*-Ta\beta\gamma GDF$ (t_4). После этого R^* возвращается к этапу 1, инициируя следующий цикл активации трансдуцина.
5. Комплекс $Ta\beta\gamma GDF$ диссоциирует на $T\beta\gamma$ и $TaGDF$, представляющий собой активную форму трансдуцина (T^*) (t_5).
6. $TaGDF$ связывается с фосфодиэстеразой и активирует ее (t_6). Таким образом, активная форма фосфодиэстеразы (PDE*) – это комплекс $TaGDF-PDE$.

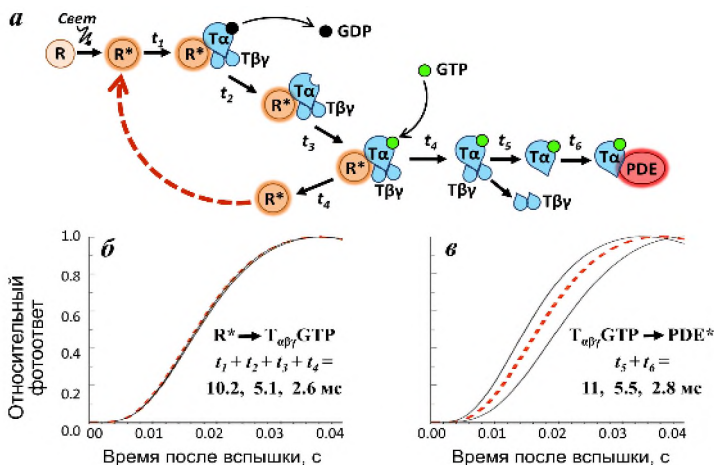


Рис. 1. Влияние различных этапов активации каскада фототрансдукции на задержку фотоответа. (а) Схема начальных этапов каскада. $t_1 \dots t_6$ – времена переходов между этапами, R – зрительный пигмент, T – трансдуцин, PDE – фосфодиэстераза, GDP – ГДФ, GTP – ГТФ. (б) Эффект изменения длительности цикла активации трансдуцина в два раза в обе стороны от оптимального значения на начальную задержку фотоответа типичной колбочки. (в) Аналогично, эффект изменения времени активации PDE. Пунктирная красная линия показывает наилучшую подгонку фотоответа математической моделью.

Зарегистрированные ответы палочек и колбочек аппроксимировались минимальной модель фотоответа [Astakhova et al., 2015], дополненной дифференциальными уравнениями, описывающими начальные этапы каскада (t_1 – t_6) до образования активного комплекса $T\alpha\text{GTP-PDE}^*$. После этого проводилась оценка того, как изменения длительности отдельных этапов влияют на длительность задержки модельной кривой. Для этого варьировали длительность цикла активации трансдуцина ($t_1 + t_2 + t_3 + t_4$) и этапов с активации PDE ($t_5 + t_6$) в расширенной модели фотоответа.

Ранее считалось, что цикл активации трансдуцина, то есть этапы 1–4 между связыванием R^* с $T\alpha\text{GTP}$ и его высвобождением из комплекса, вносит наибольший вклад в задержку [Pugh, Lamb, 1993; 2000]. Однако двукратное изменение его длительности в большую или меньшую сторону не оказало заметного влияния на форму начальной фазы ответа после нормировки и, как следствие, на длительность задержки (Рис. 1Б). С другой стороны, изменение времени активации PDE на этапах 5–6 привело к сдвигу восходящей фазы фотоответа и существенно изменило начальную задержку (Рис. 1В). Таким образом, вопреки текущим представлениям, средняя продолжительность цикла активации трансдуцина не имеет существенного влияния на задержку фотоответа. Вместо этого длительность задержки лимитируется более поздним этапом активации PDE.

Сравнительный анализ длительности задержки в различных фоторецепторах

При предъявлении стимулов высокой яркости возникает множество молекул R^* , запускающих активацию каскада фототрансдукции. В результате, появление первой активной молекулы PDE происходит почти мгновенно, а наблюдаемая в эксперименте «кажущаяся» задержка фотоответа определяется возможностью обнаружить начальное отклонение тока клетки от темнового уровня. Сравнительный анализ между различными

типами фоторецепторов проводили по значениям минимальной задержки, наблюдаемой для ответов на яркую вспышку при насыщении крутизны восходящего фронта [Hestrin, Korenbrot, 1990]. Для ее оценки, за начало фотоответа принимали первую точку экспериментальной записи после стимула, которая находится за пределами интервала: среднее значение тока до стимула $\pm$ удвоенное среднеквадратичное отклонение.

Анализ фотоответов показал, что минимальная наблюдаемая задержка в колбочках очень мала и составляет 3-5 мс против 10-12 мс в типичных палочках (Табл.1). Задержка в переходных фоторецепторах – зеленых палочках лягушки и коротких рецепторах миноги – статистически не отличается от задержки в палочках и варьирует в пределах 10-15 мс. Таким образом, кинетика начальных стадий активации каскада фототрансдукции, отвечающих за возникновение задержки в этих рецепторах соответствует палочковой.

Табл. 1. Сравнительный анализ минимальной задержки фотоответа. Данные по красным и зеленым палочкам лягушки, и рецепторам миноги были получены методом всасывающей микропипетки, по красночувствительным колбочкам лягушки – методом регистрации рецепторного потенциала, по красночувствительным колбочкам караса – обоими методами. Данные приведены как медиана (квартили), n – число экспериментальных фотоответов, для которых вычислялась длительность задержки. * – достоверные отличия от колбочек караса и лягушки по критерию Данна ($p < 0.001$).

	Колбочки лягушки	Колбочки караса	Красные палочки лягушки	Зеленые палочки лягушки	Короткие рецепторы миноги
Минимальная задержка, мс	3.5 (3; 4.5) (n = 35)	4 (4; 4.6) (n = 20)	12 (11; 12.5) (n = 15) *	13 (13; 14) (n = 5) *	12 (12; 13) (n = 5) *

Анализ параметров математической модели фотоответа показывает, что экспериментальная задержка в типичных палочках может быть воспроизведена при задании времени активации PDE трансдуцином в десять раз большем, чем длительность цикла активации трансдуцина молекулой R*. Поскольку скорость взаимодействия двух типов молекул прямо пропорциональна частоте их диффузионных столкновений в мембране фоторецептора, этот результат хорошо согласуется с тем фактом, что концентрация каталитических субъединиц PDE в 12 раз меньше чем у трансдуцина [Pugh, Lamb, 2000]. Значительно более короткая задержка колбочек может быть воспроизведена моделью только при времени активации PDE трансдуцином, занимающим не более 5 мс, что совпадает с длительностью цикла активации трансдуцина. Однако имеющиеся данные указывают на то, что отношение концентраций PDE/T в колбочках близко к таковому в палочках, и поэтому не в состоянии объяснить высокую скорость активации PDE [Tachibanaki et al., 2001; Zhang et al., 2003].

По-видимому, быстрая активация PDE в колбочках связана с высокой эффективностью взаимодействия их молекул трансдуцина и PDE. Пока неясно, какие особенности их структуры и/или упаковки в фоторецепторной мембране могут обеспечить такую эффективность. Результаты данной работы показывают, что колбочковая структура мембранных дисков наружного сегмента (являются складками плазматической мембраны, а не отделены от нее, как у палочек) не влияет на скорость активации PDE, поскольку у коротких рецепторов миноги, обладающих такой же морфологией [Öhman, 1976], задержка оказывается типично палочковой. Можно предположить, что у колбочковой PDE неэффективная для взаимодействия с трансдуцином поверхность скрыта внутри димерной

структуры в большей степени, чем у палочковой. Другим возможным объяснением может быть существование в колбочках молекул трансдуцина и PDE в форме «предварительных комплексов», еще до активации трансдуцина зрительным пигментом. Однако экспериментальные свидетельства в пользу этих гипотез отсутствуют. Разрешение выявленной в ходе данной работы проблемы представляет интерес для уточнения молекулярных свойств и структурной организации участников каскада.

Сравнительный анализ чувствительности переходных фоторецепторов

Ранее было показано, что зеленые палочки тигровой амбистомы (*Ambystoma tigrinum*) [Ma et al., 2001] и короткие рецепторы морской (*Petromyzon marinus*) и речной миноги [Asteriti et al., 2015; Morshedjian, Fain, 2015] обладают примерно в 40-60 раз большей чувствительностью, чем типичные колбочки, и поэтому оба типа фоторецепторов были определены как функциональные рецепторы ночного зрения. Однако, в данных работах проводилось сравнение чувствительностей к падающему свету, зависящих от спектральных свойств зрительных пигментов. В рамках данной работы для перехода к абсолютной чувствительности, зависящей только от биохимии сигнального каскада, интенсивность световых стимулов была выражена как число фотоизомеризаций молекул зрительного пигмента в единице объема клетки ($I_e(\lambda)$) по следующей формуле:

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

Здесь, $I(\lambda)$ – интенсивность стимула в фотонах на единицу площади, $q = 0.67$ – квантовый выход реакции обесцвечивания зрительного пигмента, a_{max} – удельное поглощение в максимуме соответствующего пигмента при поляризации света, поперечной относительно оси наружного сегмента, f_D – коэффициент дихроизма зрительного пигмента в мембранах дисков, $S(\lambda)$ – относительная спектральная чувствительность пигмента к излучению стимулирующего зеленого светодиода. Параметры a_{max} , f и $S(\lambda)$ были определены для каждого типа фоторецепторов на основе микроспектрофотометрических записей темновых спектров зрительных пигментов (Табл. 2). Чувствительность фоторецепторов оценивали по значению полунасыщающей интенсивности при аппроксимации экспериментальных данных функцией Хилла (Рис. 2) Также для пересчета абсолютной чувствительности на целую клетку, на основе микрофотографий оценивали объем наружного сегмента фоторецепторов.

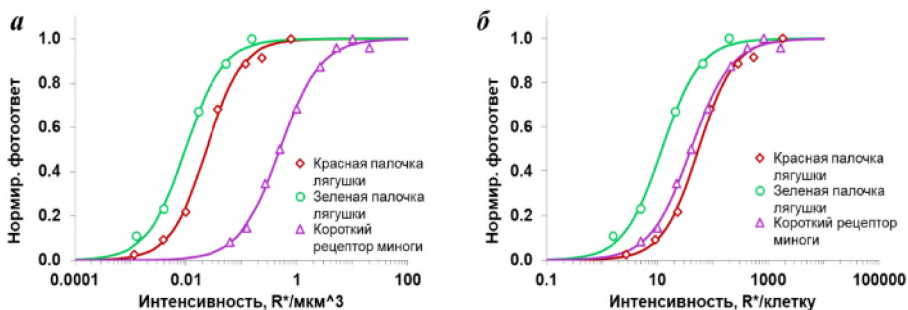


Рис. 2. Оценка абсолютной чувствительности различных фоторецепторов при пересчете интенсивностей светового стимула в число фотоизомеризаций молекул зрительного пигмента на единицу объема (а), и на целую клетку (б). Точки – данные по репрезентативным клеткам, сплошные линии – аппроксимация с помощью функций Хилла.

Анализ значений полунасыщающей интенсивности (Табл. 2) показал, что зеленые палочки лягушки имеют в среднем в 2 раза большую абсолютную чувствительность, чем типичные красные палочки того же вида, а короткие рецепторы миноги, напротив, более чем на порядок менее чувствительны по сравнению с типичными палочками. Однако абсолютная чувствительность коротких рецепторов оказалась сопоставима с палочками мыши [Nikonov et al., 2005; Wang et al., 2018], чей каскад фототрансдукции также функционирует в сравнительно малом объеме наружного сегмента.

Табл. 2. Параметры чувствительности различных фоторецепторов. Здесь, $a_{\max}$ – максимальное поглощение зрительного пигмента, f_D – коэффициент поправки на дихроизм, $S(\lambda_{LED})$ – относительная чувствительность пигмента к стимулирующему светодиоду (525 нм) V – объем наружного сегмента, $I_{e0.5}$ – полунасыщающая интенсивность, выраженная как число фотоизомеризаций на клетку или на единицу ее объема. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, n – число клеток, для которых производились расчеты. * – достоверные отличия $I_{e0.5}$ от красных палочек лягушки по критерию Даннетта ($p < 0.01$). # – данные по палочкам мыши из [Nikonov et al., 2005; Wang et al., 2018], приведены для сравнения.

	Красные палочки лягушки	Зеленые палочки лягушки	Короткие рецепторы миноги	Палочки мыши [#]
$a_{\max}$, мкм ⁻¹	0.014 $\pm$ 0.003 (n=75)	0.012 $\pm$ 0.002 (n=90)	0.014 $\pm$ 0.003 (n=20)	-
f_D	0.62 $\pm$ 0.02 (n=20)	0.64 $\pm$ 0.03 (n=20)	0.68 $\pm$ 0.08 (n=17)	-
$S(\lambda_{LED})$	0.749	0.025	0.876	-
V , мкм ³	2339 $\pm$ 622 (n=8)	1242 $\pm$ 397 (n=8)	81 $\pm$ 38 (n=20)	37
$I_{e0.5}$, R*/мкм ³	0.021 $\pm$ 0.008 (n=12)	0.011 $\pm$ 0.003 (n=12) *	0.85 $\pm$ 0.46 (n=13) *	0.57
$I_{e0.5}$, R*/клетку	48.4 $\pm$ 18.0 (n=12)	13.4 $\pm$ 3.4 (n=12) *	68.6 $\pm$ 37.4 (n=13)	22.8

При пересчете чувствительности на целую клетку, короткие рецепторы миноги, как и палочки мыши, ввиду малых размеров наружного сегмента, оказываются сопоставимы с красными палочками лягушки, поскольку даже низкоэффективный сигнальный каскад может значительно снижать концентрацию внутриклеточного цГМФ внутри небольшого объема. Повышенная же чувствительность зеленых палочек лягушки при расчете на клетку оказывается еще более выраженной, несмотря на то, что в более раннем исследовании на фоторецепторах жабы-аги (*Rhinella marina*) [Matthews, 1983], различий в чувствительности между зелеными и красными палочками не наблюдалось.

Таким образом, анализ чувствительности подтверждает переходный характер коротких фоторецепторов миноги, указывая на низкую эффективность их каскада фототрансдукции по сравнению с типичными палочками, несмотря на то, что благодаря малым размерам они способны регистрировать единичные фотоизомеризации в объеме наружного сегмента. Зеленые палочки лягушки, напротив, оказались даже более чувствительными детекторами одиночных квантов света, чем красные палочки, и потенциально способны совместно с ними обеспечивать сумеречное цветное зрение [Yovanovich et al., 2017].

Кинетика ответов переходных фоторецепторов на этапах включения и выключения каскада фототрансдукции

Для того, чтобы определить, какие процессы в каскаде фототрансдукции определяют обнаруженную разницу в чувствительности между типичными палочками, зелеными палочками лягушки и короткими рецепторами миноги, был проведен сравнительный анализ кинетики их фотоответов. Учет комплексного характера выключения каскада, дополнительно регулируемого кальциевой обратной связью и искажения восходящего фронта наложением активирующих и выключающих механизмов друг на друга возможен только с помощью подробной математической модели ответа, требующей предварительного знания ряда электрических и биохимических параметров фоторецептора [Astakhova et al., 2008; 2015]. Построение подобных моделей для зеленых палочек амфибий и фоторецепторов круглоротых не представляется возможным ввиду их недостаточной изученности, поэтому в рамках данной работы был применен упрощенный анализ, характеризующий общую скорость активации и выключения каскада.

Рассчитанное ранее различие в абсолютной чувствительности между короткими рецепторами миноги, зелеными и красными палочками лягушки позволяет прошкалировать ненасыщенные ответы, приведя их к одной абсолютной интенсивности стимула в $R^*/\mu\text{км}^3$, и визуальнo сопоставить крутизну их восходящих фаз, соответствующую кинетике активации каскада (Рис. 3). С учетом сдвига чувствительности, начальные участки ответов зеленых и красных палочек лягушки практически совпадают, в то время, как восходящая фаза ответа короткого рецептора миноги развивается примерно в 5 раз медленнее, чем у типичных палочек.

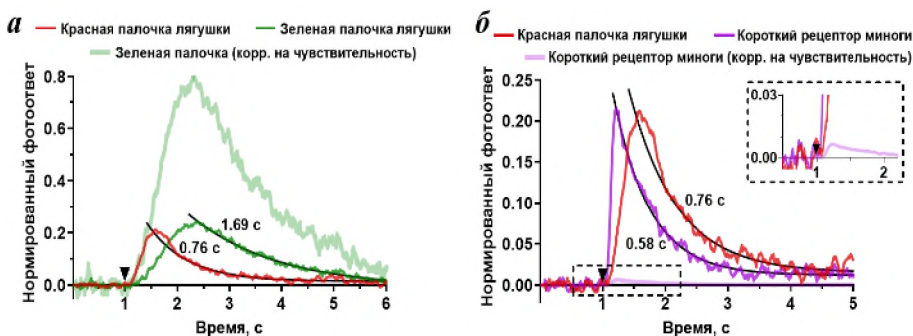


Рис. 3. Оценка кинетических параметров ненасыщенных фотоответов зеленых палочек лягушки (а) и коротких рецепторов миноги (б) в сравнении с типичными красными палочками лягушки. Для оценки эффективности активации каскада фототрансдукции восходящие фронты ответов переходных фоторецепторов были скорректированы на сдвиг в абсолютной чувствительности относительно эталона – красных палочек. Затем производилась их подгонка к эталону путем домножения на числовой коэффициент. Черные линии показывают наилучшие аппроксимации нисходящих фронтов фотоответов экспоненциальными функциями, значения постоянных времени приведены рядом. Момент вспышки отмечен треугольником.

Оценка кинетики нисходящей фазы фотоответа по постоянной времени экспоненциальной функции (Рис. 3) показала, что у зеленых палочек выключение каскада фототрансдукции происходит медленнее, чем у красных палочек, и, по-видимому, именно

это различие обуславливает их повышенную чувствительность. Процессы выключения каскада в коротких фоторецепторах миноги, напротив, протекают быстрее, чем в типичных палочках, что совместно с замедленной активацией обеспечивает сравнительно низкую абсолютную чувствительность.

Дополнительно был проведен анализ времени до пика фотоответа и его времени интегрирования. В соответствии с различиями в кинетике процессов активации и выключения каскада фототрансдукции, время интегрирования и время до пика у зеленых палочек лягушки оказалось выше, чем у красных палочек. У коротких рецепторов миноги в свою очередь, оба параметра оказались ниже, чем у типичных палочек, что связано с более быстрым выключением в каскаде фототрансдукции, прерывающим развитие фотоответа до того, как успеет закрыться значительное число цГМФ-управляемых каналов. Результаты анализа кинетики фотоответов приведены в Табл.3.

Табл. 3. *Параметры кинетики фотоответа различных фоторецепторов. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, n – число клеток, для которых производились расчеты. * – достоверные отличия от красных палочек лягушки по критерию Тьюки ($p < 0.05$). # - данные по палочкам мыши из работ [Raport et al., 1994; Lamb, Pugh, 2006; Wang et al., 2018]. Все измерения для палочек мыши выполнены при температуре 37 °C, усиление рассчитано по отношению к красным палочкам жабы-аги.*

	Красные палочки лягушки	Зеленые палочки лягушки	Короткие рецепторы миноги	Палочки мыши [#]
Относительная скорость активации в единице объема	1.02 $\pm$ 0.39 (n=8)	1.02 $\pm$ 0.49 (n=10)	0.19 $\pm$ 0.11 (n=12) *	3.2
Постоянная времени выключения, с	0.89 $\pm$ 0.32 (n=8)	1.27 $\pm$ 0.38 (n=10) *	0.57 $\pm$ 0.10 (n=12) *	0.21
Время до пика, с	0.55 $\pm$ 0.08 (n=8)	0.97 $\pm$ 0.22 (n=11) *	0.21 $\pm$ 0.04 (n=12) *	0.13
Время интегрирования, с	1.17 $\pm$ 0.41 (n=8)	1.68 $\pm$ 0.29 (n=11) *	0.73 $\pm$ 0.13 (n=12) *	0.26

Анализ кинетики фотоответа позволяет сделать вывод о том, что зеленые палочки бесхвостых амфибий адаптированы к роли рецепторов ночного зрения даже в большей степени, чем типичные красные палочки того же вида за счет более медленной кинетики выключения. В результате увеличивается время интегрирования, что позволяет клетке более эффективно собирать статистику фотонов в условиях низкой освещенности. Исследование Мэттьюза на жабе-аге с применением упрощенной модели фотоответа не выявило различий в кинетике ее зеленых палочек в сравнении с красными [Matthews, 1983]. Более поздняя работа на том же виде показала, что выключение их каскада фототрансдукции также замедлено, однако сдвиг чувствительности проявляется только для ответов на длительные засветки, но не короткие вспышки света, в отличие от озерной лягушки [Astakhova et al., 2021].

Низкая абсолютная чувствительность коротких рецепторов миноги по сравнению с типичными палочками связана с пониженным усилением в каскаде и одновременно его ускоренным выключением. Несмотря на то, что палочки мышей имеют абсолютную чувствительность, близкую к рецепторам миноги (Табл. 2), их скорость активации

существенно выше, и даже превышает таковую для палочек лягушки, за счет более высокой температуры тела [Lamb, Pugh, 2006] (Табл. 3). Пониженное относительно палочек усиление в каскаде фототрансдукции является типичной чертой колбочек рыб [Kawakami, Kawamura, 2014; Astakhova et al., 2015], что свидетельствует о переходном характере коротких рецепторов миноги. Кинетика выключения коротких рецепторов с одной стороны быстрее, чем у типичных палочек лягушки, с другой стороны – медленнее, чем у палочек мыши. В результате, длительность их ответов ближе к типично палочковой, чем к колбочковой (время интегрирования красночувствительных колбочек караса 0.15 с, [Astakhova et al., 2015]), что ожидаемо для функциональных рецепторов ночного зрения.

Способность типичных колбочек избегать насыщения при высоких дневных освещенностях обеспечивается в основном ускоренными реакциями выключения каскада фототрансдукции и кальциевой обратной связи [Говардовский и др., 2015; Kawamura, Tachibanaki, 2022]. Считая короткие рецепторы миноги примером трансмутации из колбочки в функциональную палочку, можно предположить, что при сохранении колбочковой скорости активации, увеличение их чувствительности произошло за счет замедления процессов выключения. Аналогичным образом происходит увеличение чувствительности зеленых палочек относительно красных. По-видимому, повышение эффективности активации является более поздним дополнительным эволюционным приобретением палочек, а основным механизмом увеличения чувствительности является медленный процесс инактивации каскада.

Стабильность зрительных пигментов переходных фоторецепторов по сравнению с пигментами палочек и колбочек

Собственные биохимические свойства зрительного пигмента также важны для функциональной роли фоторецептора. Одной из ключевых характеристик пигмента для рецепторов ночного зрения, является его склонность к спонтанным тепловым изомеризациям. Тепловые флуктуации молекулы ретиналя внутри хромофорного кармана опсина могут приводить к спонтанной активации пигмента и последующему запуску каскада фототрансдукции [Barlow et al., 1993; Bocchero, Pahlberg, 2023]. В результате, в полной темноте фоторецепторы генерируют случайные однонаправленные волны тока, идентичные по форме одноквантовым ответам (ОКО) – дискретный темновой шум, составляющий неснижаемый источник шума клетки и ограничивающий ее предельную чувствительность [Baylor et al., 1979a; 1980].

Оценка частоты дискретных темновых событий в различных фоторецепторах проводилась путем аппроксимации гистограмм распределения тока следующей функцией:

$$p(i) = A \cdot \int_0^{1/f} \exp\left(-\frac{(i - k \cdot r(t))^2}{2\sigma^2}\right) dt \quad (2)$$

Здесь, A — нормировочный коэффициент, σ — дисперсия гауссова распределения, описывающего непрерывный шум клетки, $r(t)$ — ОКО фоторецептора, определяемый на основе статистики Пуассона ответов на слабые вспышки света [Baylor et al., 1979a], f — частота ОКО-подобных дискретных темновых событий, k — масштабирующий коэффициент для корректировки амплитуды ОКО в ходе аппроксимации. Примеры записей темнового тока фоторецепторов и их анализа приведены на Рис. 4.

Коэффициент k при расчетах позволяет учесть вариабельность амплитуды отдельных дискретных событий и то, что ее усредненное значение не всегда соответствует рассчитанному ОКО [Astakhova et al., 2017]. Скорректированная средняя амплитуда дискретного события составляет 2.3 ± 0.8 % от темнового тока клетки для красных палочек

лягушки, 4.1 ± 1.5 % для зеленых палочек, и 8 ± 6 % для коротких рецепторов миноги. Поправочный коэффициент k для большинства клеток миноги был больше 1, поэтому их среднее дискретное событие больше по амплитуде, чем ОКО, что может затруднять детектирование одиночных фотоизомеризаций. В результате, величина дискретного события для короткого рецептора миноги в среднем более чем в 3 раза превосходит таковую для красных палочек лягушки, в то время как относительные амплитуды их ОКО почти совпадают, в соответствии с их чувствительностью.

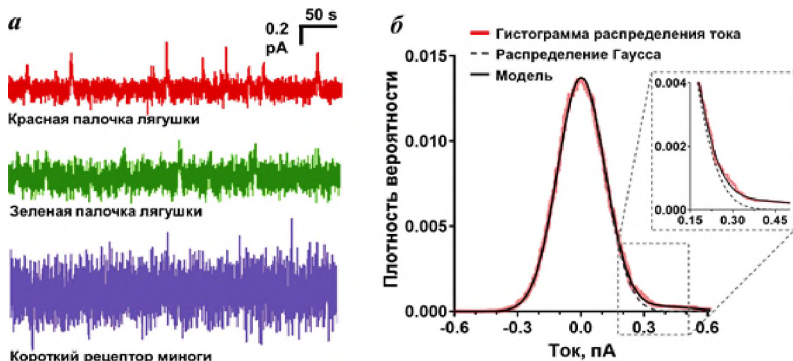


Рис. 4. Анализ частоты дискретных темновых событий фоторецептора. (а) Примеры записей темнового тока красной и зеленой палочки лягушки, и короткого рецептора миноги. (б) Пример анализа частоты темновых событий красной палочки. Красная линия – гистограмма плотности вероятности исходной записи темнового тока, пунктирная линия – функция Гаусса для записи с вырезанными темновыми событиями ($\sigma = 0.112$ пА), сплошная линия – наиточная аппроксимация гистограммы плотности вероятности функцией (2) (частота дискретных темновых событий 0.017 с⁻¹).

Оценка частоты дискретных темновых событий в зеленых палочках лягушки очень близка к таковой для родопсина красных палочек (Табл. 4). Такая высокая стабильность неожиданна, поскольку зеленые палочки экспрессируют колбочковый синечувствительный SWS2-пигмент, для которых характерна существенно более низкая стабильность, чем у палочковых пигментов [Luo et al., 2011, Yanagawa et al., 2015]. Для коротких рецепторов миноги частота дискретных темновых событий на клетку также оказывается близка к таковой у типичных красных палочек лягушки.

Константа скорости спонтанной активации является собственной характеристикой зрительного пигмента, не связанной с размерами клетки. Расчеты показали, что ее значения для пигментов красных и зеленых палочек лягушки статистически не различаются, в то время как для пигмента коротких рецепторов миноги она оказывается на 1.5 порядка выше, чем у типично палочковых пигментов (Табл. 4). В то же время, пигмент коротких рецепторов существенно стабильнее, чем типично колбочковые (константа для красночувствительного пигмента колбочек человека $13400 \cdot 10^{-11}$ с⁻¹ [Donner, 1992; Fu et al., 2008]). Можно предположить, что низкая стабильность пигмента миноги связана со сдвигом его чувствительности на 13 нм в длинноволновую область относительно родопсина лягушки [Govardovskii, Lychakov, 1984]. Согласно современным представлениям, уровень дискретного темнового шума при этом должен увеличиваться, поскольку энергия длинноволновых фотонов ниже, чем у коротковолновых, что снижает

энергетический барьер для спонтанной активации пигмента [Barlow, 1957]. Для проверки этой гипотезы была рассчитана константа активации пигмента палочек стерляди с максимумом поглощения, сдвинутым на 43 нм в длинноволновую область относительно родопсина лягушки. Она оказалась существенно ниже, чем у пигмента коротких рецепторов миноги, что доказывает промежуточную палочко-колбачковую природу последнего. Однако, благодаря малому размеру наружного сегмента, частота дискретных событий на клетку у коротких рецепторов оказывается такой же, как у типичных палочек, то есть низкая стабильность пигмента не ограничивает их предельную чувствительность.

Табл. 4. *Параметры дискретного темнового шума фоторецепторов. $\lambda_{\max}$ – длина волны максимума поглощения зрительного пигмента (на основе микроспектрофотометрических записей), f – частота темновых событий в клетке, K_A – константа скорости спонтанной активации зрительного пигмента. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, n – число клеток, для которых производились расчеты. * – достоверные отличия от красных палочек лягушки по критерию Тьюки ($p < 0.001$), * – достоверные отличия от красных палочек лягушки по критерию Тьюки/Даннетта ($p < 0.001$), # – достоверные отличия коротких рецепторов миноги от палочек стерляди по критерию Даннетта ($p < 0.001$).*

	Красные палочки лягушки	Зеленые палочки лягушки	Короткие рецепторы миноги	Палочки стерляди
$\lambda_{\max}$, нм	502	433	515	545
f , с ⁻¹	0.03 $\pm$ 0.01 (n = 9)	0.02 $\pm$ 0.01 (n = 13)	0.04 $\pm$ 0.01 (n = 12)	0.08 $\pm$ 0.02 * (n = 11)
K_A , с ⁻¹ *10 ⁻¹¹	0.7 $\pm$ 0.1 (n = 8)	0.9 $\pm$ 0.3 (n = 12)	29.1 $\pm$ 6.7 *.# (n = 12)	7.8 $\pm$ 2.0 * (n = 11)

Попытки провести оценку стабильности зрительного пигмента зеленых палочек бесхвостых амфибий предпринимались ранее, однако результаты двух независимых исследований различаются в 400 раз [Matthews, 1984; Luo et al., 2011]. Наша работа разрешает это противоречие, показывая, что пигмент зеленых палочек лягушки близок по стабильности к родопсину красных палочек, что соответствует результату Мэттьюза для пигмента жабы-аги [Matthews, 1984]. Это сильно расходится с результатом Луо с соавт. [Luo et al., 2011], получивших экстремально высокую константу скорости спонтанной активации для пигмента зеленых палочек, аналогов которой среди других пигментов не обнаружено. Луо с соавт. не проводили анализ гистограммы распределения тока, а подсчитывали темновые события вручную, что могло привести к недооценке их числа и, как следствие, к неверной оценке склонности пигмента к спонтанным изомеризациям. Также результаты нашей работы хорошо соответствуют экспериментам на пигментах *in vitro*, в которых было показано, что SWS2-пигменты бесхвостых амфибий имеют стабильность, близкую к палочковым родопсинам [Kojima et al., 2017], что говорит об их стабилизации в ходе адаптации зеленых палочек к роли рецепторов ночного зрения.

Кинетика фотолиза зрительных пигментов переходных фоторецепторов по сравнению с пигментами палочек и колбочек

Другим важным биохимическим параметром зрительного пигмента является скорость его распада после обесцвечивания (фотолиза). Поглощение кванта света зрительным пигментом инициирует последовательность конформационных превращений, в результате

которых он переходит в активное состояние, а затем распадается на свободный ретиналь и опсин. Скорость этого процесса у колбочковых пигментов существенно выше, чем у палочковых [Golobokova, Govardovskii, 2006; Yanagawa et al., 2015], что определяется жесткостью связывания ретиналя в хромофорном кармане, и, как следствие, связано со стабильностью пигмента. У колбочковых пигментов хромофор легко высвобождается после обесцвечивания, что позволяет фоторецептору сопротивляться высоким уровням освещенности, при которых активация каскада поддерживается остаточной активностью большого числа промежуточных продуктов фотолиза [Firsov et al., 2005; 2007]. Обратной стороной высокой стабильности родопсинов палочек становится их низкая скорость фотолиза, способствующая накоплению долгоживущих фотопродуктов и не позволяющая быстро восстанавливать чувствительность при дневных освещенностях. Поскольку в результате фотолиза хромофорный карман освобождается для повторного связывания ретиналя, скорость этого процесса также определяет более быструю регенерацию зрительного пигмента в колбочках по сравнению с палочками [Shichida et al., 1994].

В данной работе методом микроспектрофотометрии были исследованы процессы фотолиза зрительных пигментов коротких рецепторов миноги и зеленых палочек лягушки, и сопоставлены с уже известными данными о типично палочковых и колбочковых пигментах. Фотолиз всех изученных пигментов протекал по схожей схеме: сразу после обесцвечивающей вспышки в спектре фотопродуктов наблюдался основной пик на 380 нм и дополнительный на 475 нм, соответствующие образованию метапродуктов II и I, соответственно (Мета I и II, см. Рис. 5А, Б, В). Затем смесь Мета I/Мета II частично превращается в метапродукт III (пик около 475 нм через десятки секунд после обесцвечивания). Метапродукты I, II и III высвобождают ретиналь, продукты которого вносят основной вклад в спектр на конечных этапах распада. Метапродукты надежно отличимы от ретиналя и его производных по наличию дихроизма спектров. Таким образом, можно однозначно рассчитать ход изменения суммарной концентрации всех метапродуктов после обесцвечивания (аппроксимируются суммой/разностью нескольких экспонент), используя значения оптической плотности около 380 и 475 нм при двух поляризациях (поперечной Т и продольной L, см. методику [Kolesnikov et al., 2003]).

Зрительный пигмент зеленых палочек озёрной лягушки демонстрирует очень высокую скорость распада, более близкую к типично колбочковой, чем к палочковой (Рис. 5Г). Суммарная концентрация его метапродуктов I, II и III снижается со временем полураспада 20 с против 260 с у родопсина красных палочек, что хорошо согласуется с более ранними данными для травяной лягушки (*Rana temporaria*) [Голобокова и др., 2003]. Однако полученные данные противоречат текущим представлениям о влиянии открытости хромофорного кармана на биохимические свойства зрительного пигмента. В соответствии с ними, высокостабильный пигмент зеленых палочек озёрной лягушки должен иметь низкую скорость фотолиза, что показано для пигментов *in vitro* [Kojima et al., 2017]. С другой стороны, высокая скорость фотолиза согласуется с результатами экспериментов по регенерации пигмента зеленых палочек [Maupre, Говардовский, 2013] и его обесцвечиванию гидроксиламином [Dartnall, 1967; Darden et al., 2003]. Таким образом, в интактных клетках зрительный пигмент зеленых палочек парадоксальным образом сочетает низкую склонность к спонтанным изомеризациям с высокой скоростью распада. Можно предположить, что в наружном сегменте зеленой палочки присутствуют некие вспомогательные белки, ускоряющие процесс фотолиза. Физиологическая роль быстрого распада пигмента не ясна, и возможно является рудиментарным свойством, отражающим его колбочковое происхождение, однако не ограничивающее функционирование зеленых палочек в роли сверхспециализированных рецепторов ночного зрения.

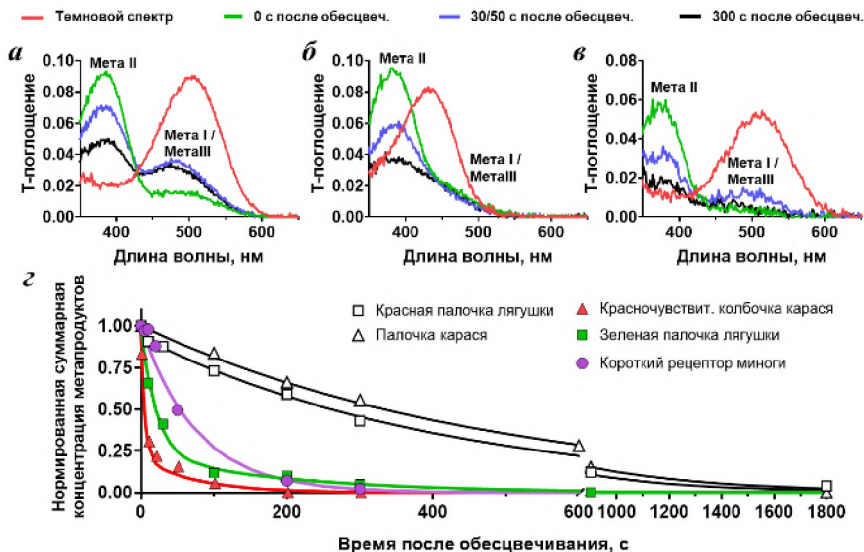


Рис. 5. Фотолиз зрительных пигментов различных фоторецепторов. Последовательность спектров при поперечной поляризации света после обесцвечивающей вспышки для красных (а) и зеленых (б) палочек озёрной лягушки и коротких рецепторов миноги (в). (г) Динамика распада суммы метaproductов различных зрительных пигментов. Разрыв временной оси внесен для демонстрации поздних продуктов фотолиза пигментов палочек. Данные по красным и зеленым палочкам лягушки и рецепторам миноги получены в рамках данной работы, также приведены данные других авторов по фотолизу тигмента палочек и красночувствительных колбочек карася [Golobokova, Govardovskii, 2006].

Суммарная концентрация метaproductов I, II и III в коротких рецепторах миноги снижается со временем полураспада 53 с, что в 5-6 раз быстрее, чем в типичных палочках лягушки и карася [Golobokova, Govardovskii, 2006] (Рис. 5Г). С другой стороны, у пигментов красночувствительных колбочек карася и амбистомы время полураспада еще короче, и составляет около 5 с [Ala-Laurila et al., 2006; Golobokova, Govardovskii, 2006]. Промежуточное положение пигмента коротких рецепторов как по скорости фотолиза, так и по стабильности между типичными пигментами палочек и колбочек поддерживает основанное на генетических данных предположение о том, что родопсин-подобные пигменты круглоротых формируют самостоятельную эволюционную линию, отдельную от родопсинов челюстноротых позвоночных [Collin et al., 2003b; Lamb, 2013]. Таким образом, не только кинетика фотоответов коротких рецепторов миноги, но и свойства их зрительного пигмента являются промежуточными между палочками и колбочками. Можно предположить два возможных эволюционных пути происхождения такого фоторецептора: (1) В результате незавершенной трансмутации типичных колбочек в параллельной челюстноротым ветви позвоночных; (2) От предкового фоторецептора с невыраженной дифференцировкой. В первом случае промежуточные свойства коротких рецепторов являются следствием неполного функционального перехода к роли рецептора ночного зрения, во втором – сохранившимися архаичными чертами фоторецептора, существовавшего до разделения эволюционных линий палочек и колбочек.

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 палочках, что может быть связано с особенностями 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 («красных») палочек, а выключение происходит значительно медленнее, что делает их еще более эффективными детекторами одиночных фотонов.
3. Зрительный пигмент зеленых палочек имеет высокую темновую стабильность, что позволяет клетке надежно регистрировать одиночные фотоизомеризации. Одновременно пигмент сохраняет типичную для колбочек высокую скорость фотоллиза, что противоречит современным представлениям о механизмах связывания ретиналя в хромоформном кармане опсина.
4. Короткие рецепторы миноги представляют собой переходный по кинетике фотответа тип фоторецептора. Эффективность процессов активации фототрансдукционного каскада у них соответствует типичным колбочкам, а кинетика выключения – палочкам.
5. Зрительный пигмент коротких рецепторов миноги по частоте спонтанных изомеризаций и скорости фотоллиза занимает промежуточное положение между типично палочковыми и колбочковыми. Таким образом дополнительно подтверждается переходный характер рецепторов миноги.
6. Поскольку оба исследованных нами типа переходных рецепторов оказываются способны регистрировать одиночные фотоизомеризации, функционально они являются палочками. Однако, функция рецептора ночного зрения в них реализуется различным образом: за счет высокоэффективной системы активации каскада в большом объеме (зеленые и красные палочки бесхвостых амфибий) или менее эффективной активации в малом объеме (короткие рецепторы миноги).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Rotov A.Y., Astakhova L.A., Firsov M.L., Govardovskii V.I. Origins of the phototransduction delay as inferred from stochastic and deterministic simulation of the amplification cascade // *Molecular Vision*, 2017, v. 23. p. 416. <http://www.molvis.org/molvis/v23/416>
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 // *Journal of General Physiology*, 2019, v. 151, № 7, p. 887-897. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812317>
3. Govardovskii V.I., Rotov A.Y., Astakhova L.A., Nikolaeva D.A., Firsov M.L. Visual cells and visual pigments of the river lamprey revisited // *Journal of Comparative Physiology A*, 2020, v. 206, № 1, p. 71-84. <https://doi.org/10.1007/s00359-019-01395-5>
4. Astakhova L.A., Novoselov A.D., Ermolaeva M.E., Firsov M.L., Rotov A.Y. Phototransduction in anuran green rods: origins of extra-sensitivity // *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, v. 22, № 24, p. 13400. <https://doi.org/10.3390/ijms222413400>
5. Rotov A.Y. From rod to cone: functional transformations in the evolution of vertebrate photoreceptors // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2025, v. 55, № 8, p. 1531–1551. <https://doi.org/10.1007/s11055-025-01914-9>

Тезисы докладов

1. Ротов А.Ю., Астахова Л.А., Говардовский В.И. Фоторецепторы и зрительные пигменты сетчатки речной миноги *Lampetra fluviatilis* // XV Всероссийское Собрание с международным участием и восьмая Школа по эволюционной физиологии. Сборник материалов, 2016, с. 204-205.
2. Rotov A.Y., Astakhova L.A., Firsov M.L., Govardovskii V.I. 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 V.I., Rotov A.Y., Astakhova L.A., Firsov M.L. Paradoxes in phototransduction: sources of the transduction delay // Visionarium XVI, 2017, p. 17.
5. Rotov A.Y., Astakhova L.A., Govardovskii V.I. Photoreceptors and visual pigments of river lamprey: reconsideration // Visionarium XVI, 2017, p. 29-30.
6. Govardovskii V.I., Astakhova L.A., Rotov A.Y., Firsov M.L. Biophotons and photoreceptor dark noise // Visionarium XVII, 2018, p. 9-10.
7. Rotov A.Y., Astakhova L.A., Nikolaeva D.A., Firsov M.L., Govardovskii V.I. Photoreceptors of River Lamprey *L. fluviatilis*: the “Color Vision” Paradox // XVI Всероссийская конференция с международным участием «Собрание 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 А.Ю., Астахова Л.А., Новоселов А.Д., Ермолаева М.Э., Фирсов М.Л. 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. Шувалова, 2022, с. 90-93.
10. Rotov A.Y., Astakhova L.A., Novoselov A.D., Ermolaeva M.E., Firsov M.L. Comparative analysis of anuran green and red rods: response kinetics and sensitivity // Visionarium XX, 2022, p. 9-10.
11. Rotov A.Y., Astakhova L.A., Novoselov A.D., Ermolaeva M.E., Firsov M.L. Sensitivity and response kinetics of anuran green and red rods: a comparative study // European Retina Meeting 2023, 2023, p. 233.
12. Rotov A.Y., Astakhova L.A., Firsov M.L. Photoreceptors of river lamprey: evidence for an intermediate rod-cone nature // Visionarium XXI, 2023, p. 27-28.

ՈՌՏՈՎ ԱՆԵՔՍԱՆԴՐ ՅՈՒՐԻՏԻ

ՀՈՂԻԿՆԵՐԻ և ԿՈՆԵՐԻ ԶԳԱՅՈՒՆՈՒԹՅՈՒՆԸ և ԱՐՁԱԳԱՆՔՄԱՆ ԱՐԱԳՈՒԹՅՈՒՆԸ. ԷՎՈԼՅՈՒՑԻՈՆ ԱՄՊԵԿՏ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Որոշ ողնաշարավորներ, բացի բնորոշ ձողիկներից և կոներից՝ համապատասխանաբար գիշերային և ցերեկային տեսողության լուսաընկալիչներից, ունեն նաև անցումային ընկալիչներ, որոնք, հավանաբար, տեսողական համակարգի Էվոյուցիայի ընթացքում ֆունկցիոնալ դերի փոփոխության՝ տրանսմուտացիայի արդյունք են: Այս ուսումնասիրության նպատակն էր վերլուծել երկու տեսակի անցումային լուսաընկալիչների՝ անուրանների կանաչ ձողիկների և լամպրեյների ձողանման կարծ ընկալիչների՝ լուսաարձագանքների զգայունությունը և կինետիկան որոշող պարամետրերը՝ համեմատած բնորոշ ձողիկների և կոների հետ: Նաև, էլեկտրաֆիզիոլոգիական և սպեկտրալ տվյալների հիման վրա ուսումնասիրվել են դրանց տեսողական գունանյութերի կենսաքիմիական հատկությունները, որոնք սերտորեն կապված են ցերեկային կամ գիշերային տեսողության ընկալիչի գործառնությո՜հ հետ:

Ապացուցված է, որ ֆոտոռեցեպտորի էլեկտրական արձագանքի սկսվելուց առաջ սկզբնական ուշացման տևողությունը որոշվում է ֆոտոփոխանցման կասկադի փուլերով, որոնք կապված են ֆոսֆորիլեյթերազի տրանսդուցիոնի կողմից ակտիվացման հետ, և տիպիկ կոների մոտ այս փուլը տեղի է ունենում մեծության կարգի ավելի արագ, քան ձողերի մոտ, ինչը անհասկանալի է կասկադային ակտիվության ժամանակակից հասկացությունների շրջանակներում: Երկու տեսակի անցողիկ լուսաընկալիչներում էլ ուշացումը բնորոշ էր ձողիկներին, ինչը համապատասխանում է նրանց գիշերային տեսողության ընկալիչների ֆունկցիոնալ դերին:

Ֆոտոփոխակերպման կասկադի ակտիվացման արագության և դրա անջատման կինետիկայի համեմատական վերլուծությունը ցույց տվեց, որ անալոչ երկկենցաղների կանաչ ձողիկները գիշերային տեսողության բարձր մասնագիտացված ընկալիչներ են, որոնք զգայունությամբ գերազանցում են նույնիսկ բնորոշ «կարմիր» ձողիկներին: Սա հնարավոր է դառնում ֆոտոփոխանցման կասկադի անջատումը դանդաղեցնելու և, որպես հետևանք, ֆոտոարձագանքի ինտեգրման ժամանակը մեծացնելու միջոցով: Լամպրեյի կարծ ընկալիչները բացարձակ զգայունությամբ զբաղեցնում են միջանկյալ դիրք բնորոշ ձողիկների և կոների միջև: Լամպրեյ ընկալիչների կասկադում ուժեղացումը զգալիորեն ցածր է, քան ձողերին և մոտ է կոնածև արժեքներին: Ֆոտոռեակցիայի անջատման կինետիկան, ընդհակառակը, մոտ է բնորոշ ձողիկների կինետիկային, ինչը հաստատում է ֆոտոռեցեպտորի անցողիկ բնույթը:

Անցումային լուսաընկալիչների տեսողական գունանյութերի համար գնահատվել են սպիտակեցումից հետո դրանք քայքայման արագությունը և ինքնաբուխ իզոմերիզացիաների հաճախականությունը: Ժամանակակից հասկացությունների համաձայն, այս երկու պարամետրերը սերտորեն փոխկապակցված են և որոշվում են քրոմոֆորի գրպանի բացության աստիճանով: Անալոչ երկկենցաղների կանաչ ձողիկների կոնածև գունանյութը կայունությամբ համեմատելի էր ձողիկավոր ռոդոպսինի հետ, ինչը, հավանաբար, այս բջիջների գիշերային տեսողության ընկալիչների դերի Էվոյուցիոն անցման հետևանք է: Կանաչ ձողիկավոր գունանյութի մետամթերքների քայքայման արագությունը անսովոր բարձր էր, քանի որ կայուն գունանյութի համար ակնկալվում էր ֆոտոլիզի ցածր արագություն՝ քրոմոֆորի գրպանում ցանցաթաղանթի մոլեկուլի սերտ կապի պատճառով: Գունանյութի կենսաքիմիական հատկությունների նման երկվության պատճառները և ֆիզիոլոգիական դերը մնում են անհասկանալի: Կարծ լամպրեյի ընկալիչների գունանյութը զբաղեցնում է միջանկյալ ձողաձողային կոնածև դիրք՝ թե՛ կայունության, թե՛ ֆոտոլիզի արագության առումով: Լամպրեյի կարծ ընկալիչ գունանյութ

կայունության և ֆոտոլիզի արագության առումով զբաղեցնում է միջանկյալ դիրք ձողիկների և կոների միջև: Զանի որ, գենետիկական տվյալների հիման վրա, ցիկլոստոմների կարճ ընկալիչների գոլանայությունը կարող են առանձնացվել գլատոստոմների ռոդոպսիններից առանձին խմբի մեջ, դրա միջանկյալ հատկությունները կարող են մեկնաբանվել որպես Նախնիների ֆոտոընկալիչի հնագույն առանձնահատկություն, որը պահպանվել է գուգաիեռ էվոլյուցիոն գծով:

Այսպիսով, անալիզ երկկենցաղների կանաչ ձողիկների կինետիկան և զգայունությունը հստակ ցույց են տալիս գիշերային տեսողության ընկալիչների դերի բարձր մասնագիտացումը, և կոնի միակ բնորոշ հատկանիշը՝ տեսողական գոլանայութի ֆոտոլիզի արագությունը, խոչընդոտ չէ բարձր զգայունությունը պահպանելու համար: Մյուս կողմից, լամպրեյների կարճ ընկալիչները, չնայած ունակ են գրանցելու եզակի ֆոտոլիզմերացումներ, պահպանում են մի շարք միջանկյալ առանձնահատկություններ՝ ինչպես ֆոտոարձագանքի կինետիկայի, այնպես էլ տեսողական գոլանայութի հատկությունների մեջ: Սա վկայում է դրանց անցումային բնույթի մասին, որտեղ գիշերային տեսողության ընկալիչների դերի մասնագիտացման մակարդակը ցածր է, քան գլատոստոմների բնորոշ ձողիկներինը:

ROTOV A.Y.

THE SENSITIVITY AND RESPONSE KINETICS OF ROD AND CONE PHOTORECEPTORS: AN EVOLUTIONARY PERSPECTIVE

SUMMARY

Besides typical rods and cones – the photoreceptors of night and day vision, respectively – the transitional-type receptors were identified in the retina of some vertebrates. They are likely the result of a change in functional role – a transmutation – during the evolution of the visual system. This study aim was to perform an analysis of the parameters determining the sensitivity and kinetics of photoreponse in two types of transitional photoreceptors – the green rods of anuran amphibians and the rod-like short receptors of lampreys – in comparison with typical rods and cones. Additionally, the biochemical properties of their visual pigments, which are closely related to the function of the diurnal or nocturnal photoreceptor, were investigated based on electrophysiological and spectral data.

It was shown that the duration of the initial delay before the onset of the photoreceptor's electrical response is determined by stage of the phototransduction cascade associated with the activation of phosphodiesterase by transducing. In typical cones this stage is an order of magnitude faster than in rods, which cannot be explained within the framework of current understanding of the cascade's mechanisms. In both types of transitional photoreceptors, the delay was rod-like, which is consistent with their functional role as night-vision receptors.

A comparative analysis of the phototransduction cascade activation rate and its quenching kinetics has shown that the green rods of anuran amphibians are super-specialised night-vision receptors, surpassing even typical “red” rods in sensitivity. This is due to slower quenching of the phototransduction cascade and, consequently, the increased photoreponse integration time. The lamprey short receptors occupy an intermediate position in terms of absolute sensitivity between typical rods and cones. The activation gain in the lamprey receptor cascade is significantly lower than that of rods and is closer to that of cones. By contrast, the kinetics of photoreponse decay, is close to those of typical rods, confirming the transitional nature of this photoreceptor.

The rate of decay after photobleaching and the frequency of spontaneous isomerisations were assessed for the visual pigments of transitional photoreceptors. According to current paradigm, these two parameters are tightly related and are determined by the openness of the chromophore pocket. The cone-type pigment of the anurans green rods was shown to be comparable in stability to rod rhodopsin, which is likely a consequence of these cells' evolutionary transition to the role of nocturnal photoreceptors. The rate of the green rod pigment's metaproducts decay was unexpectedly high, since for a stable pigment one would expect a low rate of photolysis due to the tight binding of the retinal molecule within the chromophore pocket. The origins and physiological role of this ambiguity in the pigment's biochemical properties remain unclear. The pigment of lamprey short receptors occupies an intermediate rod-cone position in terms of both stability and photolysis rate. Since, according to genetic data, the pigments of cyclostomes short receptors can be classified into a separate group from the rhodopsins of jawed vertebrates, its intermediate properties can be interpreted as an archaic feature of the ancestral photoreceptor that has been preserved in a parallel evolutionary lineage.

Therefore, the kinetics and sensitivity of anuran amphibians green rods clearly indicate their high specialisation for the role of night-vision receptors, and the only cone-like characteristic – the rate of visual pigment photolysis – does not prevent them from maintaining high sensitivity. On the other hand, the short receptors of lampreys, although capable of registering single photoisomerisations, retain a number of intermediate rod-cone features, both in photoresponse kinetics and in the properties of their visual pigment. This indicates their transitional nature, with a degree of specialisation for the role of nocturnal photoreceptor lower than that of typical jawed vertebrates' rods.



A.I.O. ПОТОБ