

УДК 159.931

НЕИНВАЗИВНАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ЭЛЕКТРОРЕТИНОГРАММЫ ОТ ОБОИХ СЛОЖНЫХ ГЛАЗ У ТАРАКАНА *PERIPLANETA AMERICANA L.* В ОТВЕТ НА СВЕТОВЫЕ СТИМУЛЫ

© 2024 г. Е. С. Новикова¹, М. Л. Астахова¹, А. Ю. Ротов¹, М. И. Жуковская^{1,*}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН

194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44, Россия

*E-mail: mzhukovskaya@rambler.ru

Поступила в редакцию 22.11.2023 г.

После доработки 18.12.2023 г.

Принята к публикации 22.12.2023 г.

В работе представлен оригинальный метод неинвазивного отведения электроретинограммы от обоих сложных глаз насекомого. Метод показал высокую надежность и повторяемость результатов. Фотоэффект, искажающий амплитуду и форму ответа, был устранен использованием золотого отводящего электрода. С помощью этого метода показано, что величина ответов глаз мутантных тараканов *pearl*, лишенных экранирующего пигмента, на световой стимул примерно в четыре раза превышает ответы насекомых дикого типа. Время до пика ответа снижалось при увеличении интенсивности стимулирующего света для коротковолновых и длинноволновых стимулов. Тараканы *pearl* демонстрировали более быстрое, чем тараканы дикого типа, достижение максимума ответа. Результаты ковариационного анализа свидетельствуют, что эти различия не могут быть полностью объяснены увеличением числа фотонов, достигающих фоторецепторных мембран. Это предполагает дополнительные различия в физиологии сложного глаза мутантов и особей дикого типа. Положительное отклонение потенциала после окончания световой стимуляции зависело от интенсивности света и отражало гиперполяризацию рецепторных клеток.

Ключевые слова: электроретинограмма, таракан, *Periplaneta*, сложные глаза, зрение, насекомое

DOI: 10.31857/S0235009224010048

ВВЕДЕНИЕ

Свет, попадающий в глаз насекомого, запускает в фоторецепторных клетках каскад фототрансдукции, приводящий к изменению мембранного потенциала.

Суммарная реакция многих фоторецепторов, а иногда и постсинаптических нейронов, может быть зарегистрирована с поверхности глаза в виде внеклеточного сигнала — электроретинограммы (ЭРГ) (Schirmer et al., 2014; Dolph et al., 2011; Wu et al., 2022). Основным органом зрения насекомых — сложные (фасеточные) глаза, состоящие из множества омматидиев, включающих несколько фоторецепторных клеток разных спектральных классов, фоторецепторные мембраны которых образуют рабдом, и вспомогательных клеток (Грибакин, 1981). В большинстве работ применялись инвазивные методики отведения ЭРГ, при которых регистрирующий электрод вводится внутрь глаза через отверстие, вырезанное в кутикуле (Kugel, 1977; Gribakin, 1988; French et al., 2015; Crook et al., 2014; 2022; Schirmer et al., 2014). Глаз таракана

имеет сложную форму, нерегулярные ряды фасеток и разную длину фоторецепторов в разных участках глаза (Butler, 1973 a, b), что приводит к регистрации крайне вариабельной по амплитуде и кинетике ЭРГ (French et al., 2015) в зависимости от местоположения электрода. Кроме того, используя инвазивные методы, сложно или вовсе невозможно выполнять длительную или повторную регистрацию электрической активности глаз одного и того же животного, что существенно ограничивает решаемые с помощью этого метода задачи.

Количество фотонов, попадающих на фоторецепторные мембраны, зависит от присутствия и распределения экранирующего пигмента, оптически изолирующего рабдомы друг от друга (Грибакин, 1981). Показано, что амплитуда ЭРГ у белоглазых пчел с мутацией *snow* была примерно в 10 раз больше, чем у пчел дикого типа (Gribakin, 1988), а у синей мясной мухи *Calliphora vicina* (*erythrocephala*) — в 2–5 раз (Chen et al., 1999). Белоглазые мутанты с отсутствующим экранирующим пигментом демонстрируют более узкие пики спектральной чувствительности, чем особи дикого типа

(Gribakin, Ukhanov, 1990; Gribakin, 1988; Gribakin et al., 1996). Ранее было показано, что белоглазые тараканы более чувствительны к свету, избегая его при существенно меньших интенсивностях (Kelly, Mote, 1990). Однако чувствительность отдельных фоторецепторов, измеренная в электрофизиологических экспериментах, оказалась сниженной, предположительно вследствие уменьшения общей площади поверхности фоторецепторных мембран (Saari et al., 2018).

Другая проблема, с которой сталкиваются исследователи при отведении электрических ответов на свет серебряными и, особенно, хлорсеребряными электродами, — фотоэффект, появляющийся при взаимодействии коротковолнового освещения большой интенсивности с материалом электрода. Чтобы минимизировать не связанные с физиологическими ответами артефакты световой стимуляции, предлагались разные решения — от использования ватных фитилей для регистрации биопотенциалов до использования искусственного интеллекта для вычитания артефактов (Sieving et al., 1978; Mikulovic et al., 2016; Fabetti et al., 2021). Однако ватные фитили подсыхают, в результате чего не подходят для длительной и/или многократной регистрации ЭРГ от глаз насекомого, а искусственный интеллект нуждается в большом количестве хорошо определенных примеров для машинного обучения, которые сложно получить из-за вариативности фотоэффекта и ответов глаза.

Мы предлагаем новый неинвазивный метод отведения ЭРГ от сложных глаз таракана *Periplaneta americana* L. и применяем его для записи длительного протокола с предъявлением световых стимулов с максимумами излучения 525 и 365 нм, соответствующим максимумам чувствительности зрительных пигментов этого вида (Mote, Goldsmith, 1970). Для оценки влияния экранирующего пигмента на параметры ЭРГ были использованы белоглазые мутанты *pearl*, у которых такой пигмент отсутствует (Ross et al., 1964). В задачи работы также входило сравнение наиболее часто используемого неполяризуемого хлорсеребряного электрода с поляризуемым золотым электродом, особенно в области высокоинтенсивной УФ-стимуляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Насекомые. Нимф последнего возраста мужского пола таракана *Periplaneta americana* L. (Insecta: Blattodea: Blattellidae) отсаживали от основной колонии и содержали в климатической камере Sanyo MLR-352H при инвертированном фоторежиме 12L:12D, температуре 24–28 °С (ночь—день) и относительной влажности 60%. Камера была оборудована люминесцентными лампами с максимальным излучением при 450, 540, 610 нм, цветовая температура 5 200°К. Пластиковые садки (45 л) с насекомыми

были снабжены картонными укрытиями, кормом и водой. Белоглазые тараканы с мутацией *pearl* (Ross et al., 1964) и тараканы дикого типа содержались в одинаковых условиях. В экспериментах использовали имаго возрастом от двух недель.

Электроретинография. Непосредственно перед началом скотофазы таракана фиксировали в плексигласовом боксе, закрепив шею в вырезе передней стороны бокса, чтобы голова оставалась свободной, аналогично описанному ранее способу (Zhukovskaya, 2012), и оставляли в светонепроницаемой коробке на час для темновой адаптации. Индифферентный электрод из нержавеющей стали был вмонтирован в шейный вырез и контактировал с шеей насекомого через ватный тампон, смоченный в растворе Рингера (Zhukovskaya, 2012). Регистрирующий электрод изготавливали из серебряной проволоки толщиной 0.5 мм и хлорировали в течение 1 мин непосредственно перед экспериментом в растворе следующего состава: $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 10 г; NaCl — 10 г.; H_2SO_4 (концентрированная) — 2.5 мл.; вода — до 100 мл, а затем накладывали на поверхности обоих сложных глаз и фиксировали концы пластилином к боксу. В части экспериментов использовали золотой электрод, изготовленный из проволоки 3л 99.99 диаметром 0.5 мм (SilverSalt, ГОСТ 7222–2014). Ротовые органы и антенны также фиксировали пластилином для уменьшения помех. Для улучшения контакта щель между поверхностью глаза и электродом заполняли электропроводящим гелем Vidisic® Gel (Bausch and Lomb, Сингапур) или Uniagel (Гельтек, Россия). Все манипуляции проводили при темно-красном свете налобного фонаря. Подготовленный препарат оставляли в темноте на 10 мин, а затем начинали отведения.

Система световой стимуляции состояла из двух независимых каналов на основе мощных светодиодов с пиками излучения с $\lambda_{\text{max}} = 525$ нм (зеленый) и 365 нм (ультрафиолетовый, УФ). Свет от зеленого светодиода к глазам таракана подавался через программно-переключаемые нейтральные светофильтры (с оптической плотностью (ND — 1, 2, 3.5)) по световоду, интенсивность света дополнительно регулировалась током светодиода. УФ стимул на глаза таракана подавался с УФ-светодиода, расположенного в непосредственной близости от головы животного. Интенсивность УФ-света регулировалась током светодиода и добавлением/удалением одного нейтрального фильтра (ND3.0). Интенсивность света обоих длин волн контролировали с помощью измерителя мощности света 843-R/843-R-USB (Newport, optoelectronic technologies Wuxi Co Ltd, China), помещаемого для измерения на место головы таракана.

Регистрируемый электрический сигнал, проходя через дифференциальный усилитель (модель 3000, A-M Systems, США, входное сопротивление 1 015

Ом), пропусклась через аналоговый фильтр низких частот (3 кГц) и регистрировалась с частотой дискретизации 10 мс/точку. Сбор данных, а также интенсивность, время и длительность стимуляции контролировали с использованием аналого-цифрового преобразователя и программного обеспечения, написанного в среде LabView (National Instruments, Austin, TX) (Goriachenkov et al., 2021).

Протоколы экспериментов. Световые стимулы предъявлялись последовательно с возрастающей интенсивностью, начиная с зеленого света, после чего аналогичным образом выполняли УФ-стимуляцию (чтобы избежать адаптации зеленочувствительных (широкополосных) рецепторов ультрафиолетом (Frolov et al., 2022)) (табл. 1).

Длительность стимула составляла 10 мс для большинства случаев, 1 или 5 мс для УФ-света низкой интенсивности и 50, 100 и 500 мс для

максимальной интенсивности. В случае низкой и средней интенсивности стимулы предъявлялись по 10 раз для последующего усреднения, чтобы улучшить соотношение “сигнал–шум”. Стимулы высокой интенсивности предъявлялись меньшее количество раз для снижения влияния световой адаптации на результаты. Интервал между стимулами составлял не менее 15 с.

Обработка данных и статистика. С использованием специализированной программы, написанной в среде LabView, корректировали нулевую линию и выполняли низкочастотную фильтрацию с применением 8-полосного фильтра Бесселя на частоте 20 Гц. Амплитуда ЭРГ рассчитывалась как минимальное значение потенциала в период 0–0.2 с после начала действия стимула. Время до пика определяли как абсциссу минимального значения потенциала. Выборки проверяли на нормальность распределения с помощью критерия

Таблица 1. Интенсивности световой стимуляции глаз таракана монохроматическим светом при регистрации ЭРГ

№ п/п	525 нм		365 нм	
	Фотоны/мм ² /мс	Стимул, мс	Фотоны/мм ² /мс	Стимул, мс
1	1.7×10^4			1
2	4.3×10^4		2.8×10^6	5
3	1.1×10^5			
4	2.7×10^5		7.1×10^6	
5	2.1×10^6		1.8×10^7	
6	5.3×10^6	10	4.5×10^7	
7	1.3×10^7		1.1×10^8	10
8	3.2×10^7		2.9×10^9	
9	8.2×10^7		7.2×10^9	
10	2.1×10^8		1.8×10^{10}	
11	4.2×10^8		4.5×10^{10}	
12				
13		50		50
14	8.2×10^8	100	1.1×10^{11}	100
15		500		500

Колмогорова–Смирнова. Поскольку большая часть выборок была распределена нормально, использовали параметрическую статистику. Уровень шума рассчитывали на участке от начала записи до начала стимуляции как два стандартных отклонения. Статистические сравнения выполняли в программе IBM SPSS Statistics 22 и онлайн-калькулятора (<http://vassarstats.net/>) с использованием следующих методов: Т-критерия Стьюдента, однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа (one-way and two-way ANOVA) и ковариационного анализа (ANCOVA).

Всего использовано 20 тараканов дикого типа и 15 белоглазых мутантов pearl.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предлагаемый метод регистрации ЭРГ имеет ряд преимуществ перед широко используемым ответением электродом, вводимым в глаз. Стабильная регистрация в течение нескольких часов позволила предъявлять большое количество световых стимулов, варьирующих по интенсивности и длительности, с длинными интервалами между ними, предотвращающими существенную адаптацию фоторецепторов у каждого насекомого. Удалось преодолеть основную проблему классического метода записи ЭРГ (French et al., 2015) — зависимость амплитуды и формы ЭРГ от положения регистрирующего электрода.

Все регистрируемые в ответ на свет ЭРГ были сходной формы, с выраженным отрицательным пиком (рис. 1, а).

При предъявлении УФ-вспышки высокой интенсивности на ответ глаза накладывался фотоэффект на электроде, о котором можно судить по сдвигу пика к концу стимуляции (рис. 1, б). При замене таракана ватным тампоном, смоченным раствором Рингера, можно было наблюдать характерный электрический сигнал, вызванный фотоэффектом, подробно описываемый далее.

Тараканы дикого типа. Амплитуды ответов интактных тараканов на зеленый свет были достоверно выше уровня шума, начиная с 5.3×10^6 фотонов/мм²/мс, а на УФ-излучение — с 2.8×10^6 фотонов/мм²/мс (Т-тест Стьюдента, $p < 0.05$). Достигнуть насыщения амплитуды ответов не удалось ни для зеленого, ни для УФ-стимулов. Удлинение стимуляции приводило к стабилизации амплитуды ответов (рис. 2).

При увеличении длительности стимуляции до 50 мс росла амплитуда, до 100 мс и более на максимальных интенсивностях рост амплитуды уменьшался или прекращался, после пика ответа следовало плато. После выключения светового стимула у некоторых препаратов наблюдался овершут — переход потенциала через нулевую линию в область положительных значений (рис. 3).

Частота встречаемости овершутов не зависела от длины волны предъявляемого света, но росла с увеличением интенсивности сигнала (рис. 4, а). При увеличении длительности стимула максимальной интенсивности, 8.4×10^8 фотонов/мм²/мс для зеленого света и 1.1×10^{11} фотонов/мм²/мс для УФ (см. табл. 1), частота овершутов снижалась (рис. 4, б). Однако при оценке регистрируемого сигнала через 1 с после начала стимуляции ответы на зеленый, но не УФ-свет увеличивающейся длительности не показывали снижения частоты овершутов с удлинением стимула (рис. 4, в).

Поскольку амплитуду овершута сложно оценить из-за того, что в некоторых случаях максимум не наблюдался до конца записи, измеряли величину напряжения в точке 1 с от начала стимуляции. Эти величины показывают монотонное возрастание с ростом интенсивности световых стимулов обеих длин волн (рис. 5).

При увеличении длительности ярких стимулов 8.4×10^8 фотонов/мм²/мс для зеленого света и 1.1×10^{11} фотонов/мм²/мс для УФ повышенное значение потенциала сохраняется для зеленого

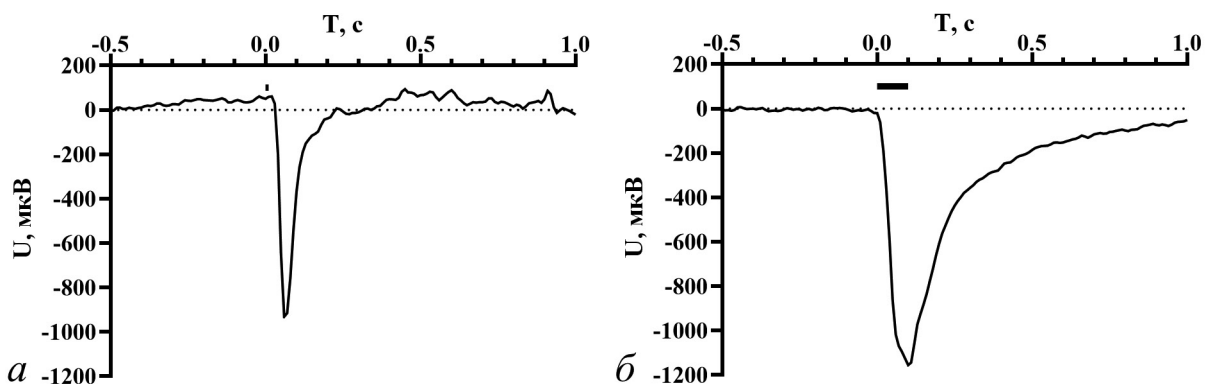


Рис. 1. Оригинальная запись ЭРГ интактного таракана дикого типа. а — таракан № 2 (26.05.2021), ответ на 10 мс вспышку зеленого (525 нм) света средней интенсивности (2.1×10^8 фотонов/мм²/мс); б — таракан № 8 (19.05.2022), ответ на 100 мс вспышку УФ (365 нм) света высокой интенсивности (1.1×10^{11} фотонов/мм²/мс). Отметка стимула показана над кривыми. Смещение минимального значения напряжения к концу стимуляции свидетельствует о существенном вкладе фотоэффекта.

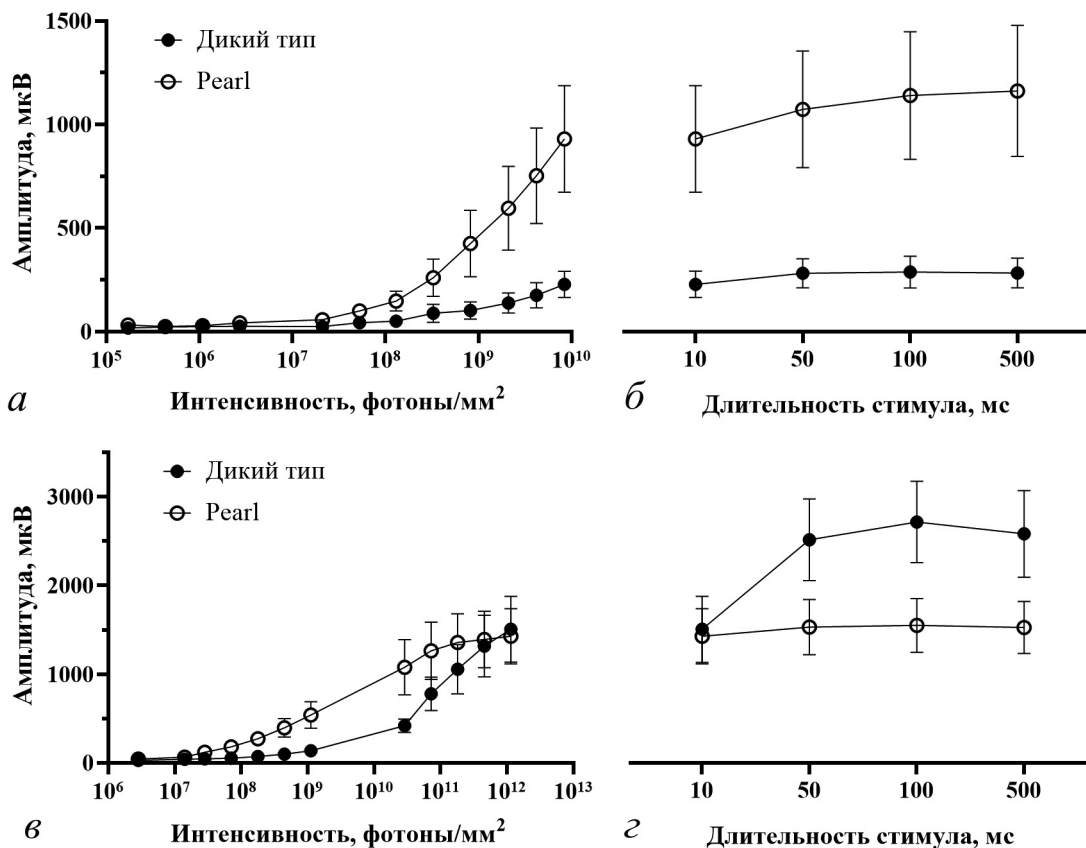


Рис. 2. Амплитуды ответов на короткие (1–10 мс) вспышки возрастающей интенсивности зеленого (а, б) и УФ (в, г) света. Амплитуды ответов на стимулы длительностью 10–500 мс (б, г). Показаны средние и ошибки среднего.

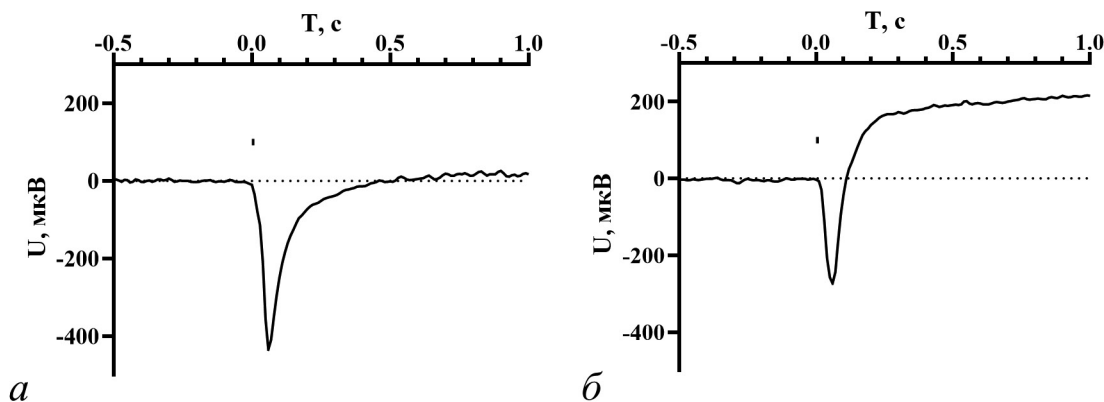


Рис. 3. Оригинальная запись ЭРГ интактного таракана дикого типа в ответ на 10 мс вспышку УФ (365 нм) света средней интенсивности (4.5×10^{10} фотонов/мм²/мс). а — таракан № 9 (19.05.2022), овершута нет; б — таракан № 12 (06.06.2022), овершут есть. Отметка стимула показана над кривыми.

света, но уменьшается для УФ, снижаясь до отрицательных значений для вспышек длительностью 500 мс (см. рис. 5).

Время достижения пика ответа (минимум) было наибольшим в ответ на слабый световой стимул и сокращалось при увеличении интенсивности

света в пределах стимулов обеих длин волн, не вызывающих существенного фотоэффекта (зеленый one-way ANOVA, $F_{8/149} = 5.31, p < 0.001$; УФ, $F_{11/198} = 14.71, p < 0.001$ (рис. 6). При ярком УФ-свете время до пика хотя бы отчасти росло, по-видимому, вследствие фотоэффекта.

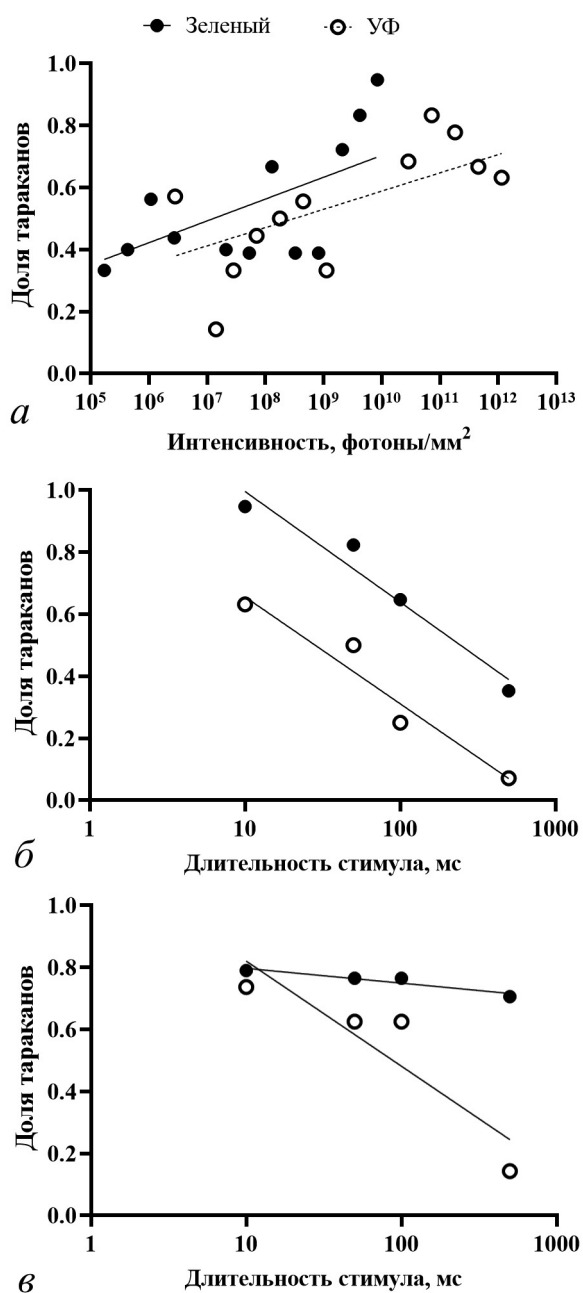


Рис. 4. Доля тараканов с положительным значением напряжения в точке 0.5 (а, б) и 1 (в) секунд после стимуляции (частота встречаемости овершутов). Для максимальной интенсивности света, использованного для стимуляции (б, в) приведены величины в ответ на вспышки длительностью 10–500 мс. Логарифмическая аппроксимация.

Основным недостатком хлорсеребряного электрода был фотоэффект, который искажал форму ответов на УФ-световые стимулы высокой интенсивности, начиная с 50 мс вспышек интенсивностью 1.1×10^{11} фотон/мм²/мс, поэтому были выполнены эксперименты по оценке фотоэффекта на ватном препарате с хлорсеребряным и золотым электродами.

При замене таракана на ватный тампон, смоченный раствором Рингера, наблюдалось характерное отклонение потенциала, нарастающего к концу стимуляции и спадающего после выключения света (рис. 7).

Стимулы зеленого света высокой интенсивности и длительностью 500 мс иногда также вызвали сходные электрические сигналы, но их величина была пренебрежимо мала (даже на ватном препарате не превышала 30 мкВ, см. рис. 7). К сожалению, особенно на живых препаратах, величина фотоэффекта, оцениваемая по смещению пика, была крайне вариабельной, что делает невозможным его вычитание из записей ЭРГ. Оказалось, что форма регистрируемого электрического сигнала в ответ на свет отличается от динамики ЭРГ, что становится особенно заметным с увеличением длительности стимула, а именно максимальное отклонение наблюдается в конце стимуляции. Зеленый свет вызывал небольшой фотоэффект на хлорсеребряном электроде даже при максимальных стимулах, а на золотом электроде не выделялся из шума (данные не показаны). УФ приводил к заметному фотоэффекту порядка 0.1 мВ уже на интенсивности 4.5×10^{10} фотон/мм²/мс для 10 мс стимулов и далее достигал нескольких милливольт. Фотоэффект, зарегистрированный с золотого электрода, не достигал 0.1 мВ даже при максимальной засветке (см. рис. 7).

Мутанты *pearl*. Белоглазые тараканы демонстрировали большую чувствительность к свету, чем насекомые дикого типа (см. рис. 2). Ответы на зеленый и УФ-свет у мутантов *pearl* появляются на стимулы меньшей интенсивности, чем у дикого типа, а соотношение амплитуд ответов достигает четырех для обеих длин волн (для зеленого света $p < 0.001$; two-way ANOVA, $F_{1/275} = 31.79$; для УФ $p < 0.01$, $F_{1/368} = 7.02$). Используемые нами максимальные интенсивности зеленого света не позволили достичь насыщения ответов, однако при ответах на УФ белоглазые тараканы демонстрировали насыщение ответа, начиная с интенсивности 1.8×10^{10} фотон/мм²/мс (см. рис. 2). Таким образом, кривые зависимости амплитуды ответа от интенсивности у белоглазых мутантов оказываются сдвинуты влево по отношению к тараканам дикого типа.

Время до пика у белоглазых тараканов было существенно короче, чем у черноглазых, при ответах как на зеленый, так и УФ-свет во всем диапазоне интенсивностей, вызывающих ответы, превышающие уровень шума (зеленый two way ANOVA, $F_{1/275} = 54.38$, $p < 0.001$; УФ, $F_{1/366} = 170.40$, $p < 0.001$; см. рис. 6).

Величина положительного отклонения потенциала после выключения стимуляции зависела от интенсивности света как для тараканов дикого типа, так и для мутантов, при этом величина овершута у белоглазых

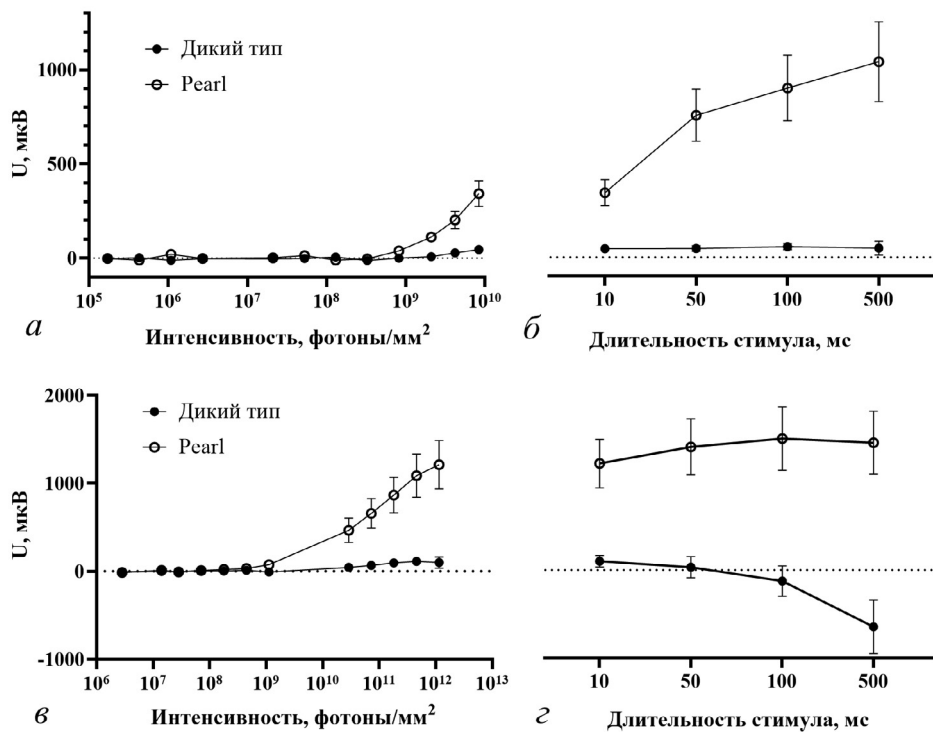


Рис. 5. Зарегистрированное напряжение через 1 с после начала стимуляции для 10 мс стимулов увеличивающейся интенсивности (а, б) и стимулов максимальной интенсивности при увеличении длительности (б, з). Стимуляция зеленым (а, б) и УФ (в, з) светом. Показаны средние и ошибки среднего.

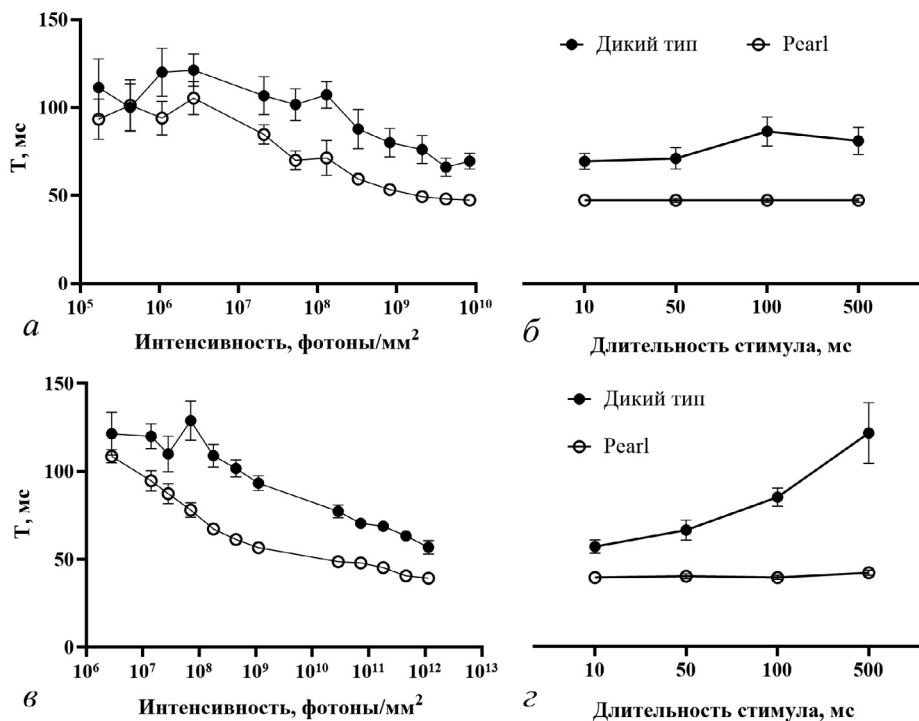


Рис. 6. Время до пика ЭРГ тараканов в ответ на короткие вспышки (1–10 мс) зеленого (а, б) и УФ (в, з) света возрастающей интенсивности. Для максимальной интенсивности света приведены времена для стимулов возрастающей длительности (б, з). Показаны средние и ошибки среднего.

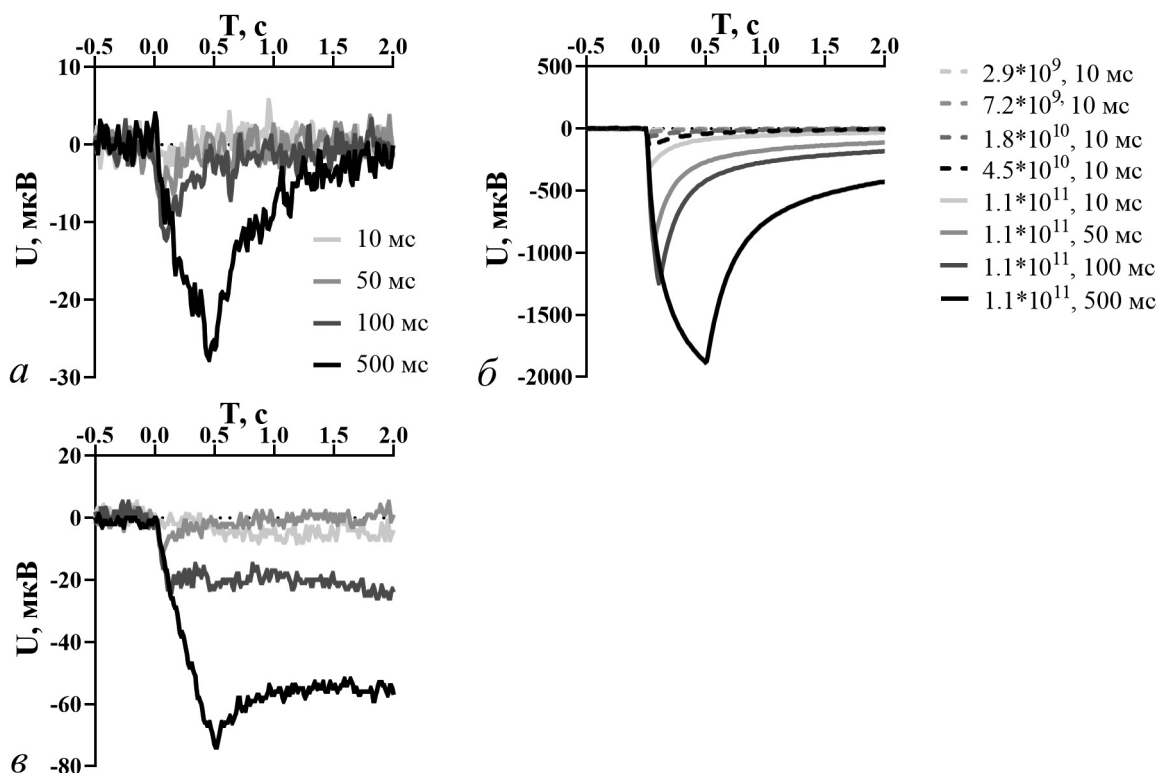


Рис. 7. Фотоэффект. Таракан заменен на ватный тампон, смоченный раствором Рингера. *а, б* — хлорсеребряный электрод; *в* — золотой электрод; *а* — зеленый, *б, в* — УФ световой стимул.

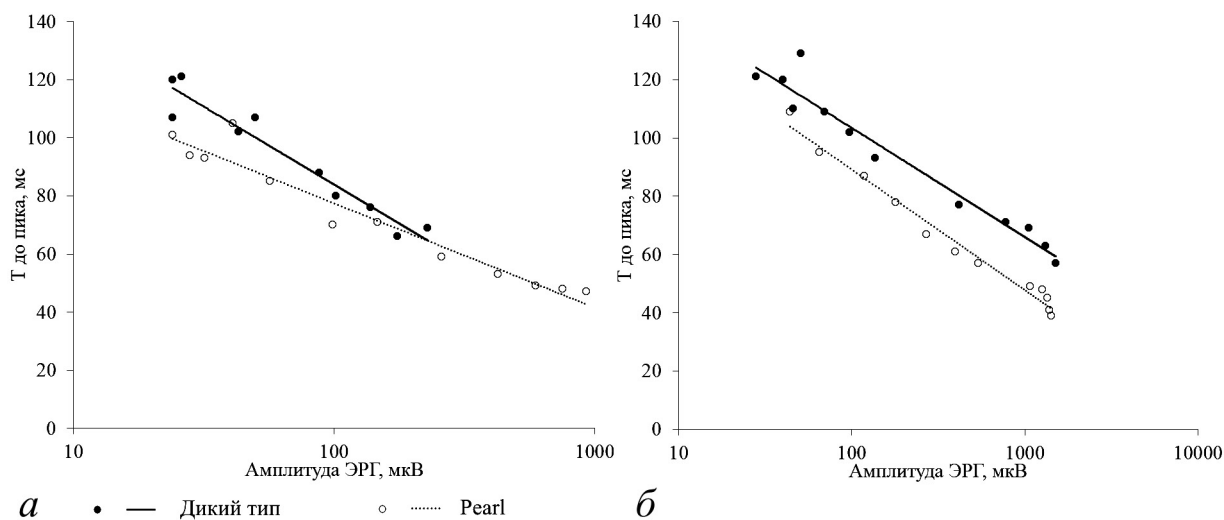


Рис. 8. Зависимость времени до пика от амплитуды ответа: *а* — зеленый, *б* — УФ свет. Приведены средние значения для ответов на 10 мс вспышки света и логарифмическая аппроксимация.

особей была существенно выше (см. рис. 5). Интересно отметить, что величина овершута, регистрируемого при удлиняющихся ярких УФ-стимулах, уменьшалась у тараканов дикого типа, но не менялась у белоглазых мутантов для стимулов 50–500 мс.

ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенный в нашей работе неинвазивный метод отведения ЭРГ показал значительные преимущества перед традиционно используемым инвазивным методом с введением микроэлектрода

внутри глаза (French et al., 2015). Форма ответа была одинаковой у всех препаратов, в отличие от экспериментов с электродами, вводимыми в глаз, что позволило обнаружить связь параметров ЭРГ с характеристиками стимулов и состоянием глаза. Отрицательный пик ЭРГ характеризует суммарный ответ (деполяризацию) фоторецепторных клеток на свет, его амплитуда растет, а время до пика падает с увеличением интенсивности стимуляции. При использовании хлорсеребряного электрода ответы на УФ-свет высокой интенсивности искажаются артефактом, вызванным фотоэффектом, однако эта проблема может быть решена заменой хлорсеребряного электрода на золотой (см. рис. 7). Небольшой фотоэффект, наблюдаемый на искусственном препарате (ватный тампон, смоченный раствором Рингера), с золотым электродом был примерно на два порядка меньше, чем с хлорсеребряным и, по-видимому, вызван небольшим количеством серебра, содержащимся в золотой проволоке (ГОСТ 6835–2002). Отведение от обоих глаз таракана оказалось удобным, поскольку позволяет легко закрепить электрод на голове насекомого.

Белоглазые тараканы демонстрировали существенно более высокую чувствительность к свету, а именно ответы, превышающие уровень шума, обнаруживались в ответ на меньшие интенсивности света обеих длин волн, при этом амплитуды ответов были в несколько раз больше, чем у особей дикого типа. Таким образом, полученные данные подтверждают ранее наблюдавшееся кратное увеличение амплитуды ЭРГ у белоглазых мутантов (Gribakin, 1988; Chen et al., 1999). Кажущееся противоречие с данными, полученными при внутриклеточных отведениях (Saari et al., 2018), которые демонстрируют более низкие ответы на свет фоторецепторов из глаз мутантов *pearl* по сравнению с диким типом, объясняется увеличением потока света, достигающего фоторецепторных мембран и, соответственно, вкладом большего числа фоторецепторов в суммарный электрический ответ глаза.

Вследствие технических ограничений по яркости предъявляемых вспышек, увеличения числа фотонов в стимуле достигали увеличением его длительности (см. табл. 1). Удлинение стимуляции позволяет увеличить ответ фоторецептора с сохранением его динамики только в очень небольшом временном диапазоне, пока не заработали механизмы выключения в каскаде фототрансдукции. Это время задержки перед фотоответом и первые 10–15 мс ответа, далее часть падающих фотонов возбуждает каскад в уже адаптирующейся к свету клетке, в которой усиление в каскаде снижено. Как следствие, искажается форма переднего фронта — он оказывается более пологим, а время до пика не меняется или удлиняется с увеличением числа фотонов в стимуле. Тем не менее временное окно для стимула, который будет приводить к увеличению амплитуды, несколько шире — до момента, когда клетка полностью адаптируется к текущей

плотности потока фотонов (несколько десятков миллисекунд). Еще более длительная стимуляция будет поддерживать клетку в некоем стационарном состоянии, так как механизмы активации и выключения будут в равновесии. Наши данные демонстрируют, что стимулы зеленого света 8.4×10^8 фотон/мм²/мс при увеличении их длительности воспринимаются глазом таракана не как одномоментные вспышки, а как светлые периоды. Мы не можем с уверенностью утверждать, что это же верно и для УФ-света из-за фотоэффекта.

Особый интерес представляет положительная волна потенциала (овершут), наблюдавшийся у части препаратов. Поскольку выраженность овершута растет с интенсивностью световых стимулов обеих длин волн, можно предположить, что он связан с гиперполяризацией фоторецепторных клеток. Это предположение не противоречит данным, полученными на белоглазых тараканах *pearl* (более выраженные овершуты), у которых фоторецепторы получают больше света из-за отсутствия экранирующего пигмента.

Положительные овершуты, наблюдаемые после окончания стимуляции, были описаны у некоторых видов ночных и дневных насекомых. Так, для богомолы *Tenodera aridifolia sinensis*, *Sphodromantis lineola* и *Popa spurca* описана медленная положительная волна, которую авторы трактуют как гиперполяризацию фоторецепторов (Popkiewicz, Prete, 2013) и связывают с работой электрогенного катионного насоса (Jansonius, 1990; Schirmer et al., 2014). Внутриклеточные отведения от фоторецепторов мясной мухи *Calliphora vicina (erythrocephala)* и светляка *Photinus pyralis* демонстрируют волну медленной гиперполяризации после выключения стимула, величина которой растет с интенсивностью стимула (Hochstrate, 1989; Cronin et al., 2000).

Для длительных УФ-стимулов овершуты исчезали, вероятно, вследствие медленного восстановления мембранного потенциала фоторецепторов.

Время до пика снижалось при увеличении интенсивности стимулирующего света для обеих длин волн. Такая же зависимость наблюдалась для белоглазых мутантов. Однако полученные значения времени до пика были меньше, чем для черноглазых тараканов дикого типа. Дополнительный ковариационный анализ (ANCOVA) для амплитуд ответов и времени достижения пиков ответов показал достоверные различия между белоглазыми мутантами и черноглазыми особями дикого типа (для зеленого света $F = 4.35$, $df = 1$, $p = 0.05$; для УФ $F = 65.28$; $df = 1$, $p < 0.0001$, рис. 8).

Таким образом, уменьшение времени до пика у белоглазых мутантов связано не только с увеличением количества света, достигающего фоторецепторов, но и с каким-то дополнительным фактором, возможно, более короткими фоторецепторными клетками (Saari et al., 2018), но это предположение требует дальнейшей проверки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный нами метод отведения ЭРГ от поверхности обоих сложных глаз насекомого показал высокую надежность и позволяет регистрировать ответы глаза в течение длительного времени.

Амплитуда ЭРГ белоглазых тараканов в несколько раз превышала значения, полученные для черноглазых, как для зеленого, так и для УФ-стимулов средних интенсивностей динамического диапазона.

Время до пика было меньше у белоглазых тараканов, и эти различия невозможно полностью объяснить увеличением света, достигающего фоторецепторов. Это, по-видимому, связано с изменениями свойств фоторецепторных клеток при потере экранирующего пигмента.

Волна положительного потенциала, наблюдаемая после выключения стимула, увеличивается с интенсивностью стимуляции и, по-видимому, отражает гиперполяризацию рецепторных клеток.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-24-00806.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят чл.-корр. М. Л. Фирсова за предоставленную возможность использования созданной им установки и программного обеспечения.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ

Содержание и подготовка насекомых, проведение экспериментов, обработка данных, подготовка таблицы и рисунков выполнено Е. С. Новиковой; отработка протоколов экспериментов, калибровка источников света и светофильтров — А. Ю. Ротовым и Л. А. Астаховой. Идея метода регистрации ЭРГ, обработка данных, написание статьи реализованы М. И. Жуковской. Все авторы участвовали в обсуждении и редактировании текста статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Грибакин Ф. Г. *Механизмы фоторецепции насекомых*. Л.: Наука, 1981. 213 с.

- Butler R. The anatomy of the compound eye of *Periplaneta americana* L. 1. General features *J. Comp. Physiol.* 1973a. V. 83. P. 223–238. <https://doi.org/10.1007/BF00693676>
- Butler R. The anatomy of the compound eye of *Periplaneta americana* L. 2. Fine structure. *J. Comp. Physiol.* 1973b. V. 83. P. 239–262. <https://doi.org/10.1007/BF00693677>
- Chen B., Meinertzhagen I. A., Shaw S. R. Circadian rhythms in light-evoked responses of the fly's compound eye, and the effects of neuromodulators 5-HT and the peptide PDF. *J. Comp. Physiol. A.* 1999. V. 185. P. 393–404. <https://doi.org/10.1007/s003590050400>
- Cronin T. W., Järvilehto M., Weckström M., Lall A. B. Tuning of photoreceptor spectral sensitivity in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *J. Comp. Physiol. A.* 2000. V. 186. P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s003590050001>
- Crook D. J., Hull-Sanders H. M., Hibbard E. L., Mastro V. C. A comparison of electrophysiologically determined spectral responses in six subspecies of *Lymantria*. *J. Econ. Entomol.* 2014. V. 107. P. 667–674. <https://doi.org/10.1603/EC13464>
- Crook D. J., Chiesa S. G., Warden M. L., Nadel H., Ioriatti C., Furtado M. Electrophysiologically determined spectral responses in *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 2022. V. 115(5). P. 1499–1504. <https://doi.org/10.1093/jeet/toac124>
- Dolph P., Nair A., Raghu P. Electroretinogram recordings of *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011. V. 2011(1). P. pdb-prot5549. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5549>
- Fabietti M., Mahmud M., Lotfi A., Kaiser M. S., Aversa A., Guggenmos D. J., Nudo R. J., Chiappalone M., Chen J. SANTI: a Matlab-based open-source toolbox for artifact detection and removal from extracellular neuronal signals. *Brain Informatics.* 2021. V. 8. P. 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40708-021-00135-3>
- French A. S., Meisner S., Liu H., Weckström M., Torkkeli P. H. Transcriptome analysis and RNA interference of cockroach phototransduction indicate three opsins and suggest a major role for TRPL channels. *Frontiers in physiology.* 2015. V. 6. P. 207. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00207>
- Frolov R. V., Severina I., Novikova E., Ignatova I. I., Liu H., Zhukovskaya M., Torkkeli P. H., French A. S. Opsin knockdown specifically slows phototransduction in broadband and UV-sensitive photoreceptors in *Periplaneta americana*. *J. Comp. Physiol. A.* 2022. V. 208(5–6). P. 591–604. <https://doi.org/10.1007/s00359-022-01580-z>
- Goriachenkov A. A., Rotov A. Y., Firsov M. L. Developmental dynamics of the functional state of the retina in mice with inherited photoreceptor degeneration. *Neuroscience and Behavioral Physiology.*

2021. V. 51. P. 807–815. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01137-8>
- Gribakin F. G. Photoreceptor optics of the honeybee and its eye colour mutants: the effect of screening pigments on the long-wave subsystem of colour vision. *J. Comp. Physiol. A*. 1988. V. 164. P. 123–140. <https://doi.org/10.1007/BF00612726>
- Gribakin F. G., Ukhanov K. Y. Is the white eye of insect eye-color mutants really white? *J. Comp. Physiol. A*. 1990. V. 167. P. 715–721. <https://doi.org/10.1007/BF00192666>
- Gribakin F. G., Alekseyev Y. N., Ukhanov K. Y. Spectral sensitivity of white-eyed insect mutants in the UV, blue and green. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1996. V. 35(1–2). P. 13–18. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(96\)07313-7](https://doi.org/10.1016/1011-1344(96)07313-7)
- Hochstrate P. Lanthanum mimicks the trp photoreceptor mutant of *Drosophila* in the blowfly *Calliphora*. *J. Comp. Physiol. A*. 1989. V. 166. P. 179–187. <https://doi.org/10.1007/BF00193462>
- Jansonius N. M. Properties of the sodium pump in the blowfly photoreceptor cell. *J. Comp. Physiol.* 1990. V. 167. P. 461–467. <https://doi.org/10.1007/BF00190816>
- Kelly K. M., Mote M. I. Avoidance of monochromatic light by the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of insect physiology*. 1990. V. 36(4). P. 287–291. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(90\)90113-T](https://doi.org/10.1016/0022-1910(90)90113-T)
- Kugel M. The time course of the electroretinogram of compound eyes in insects and its dependence on special recording conditions. *Journal of Experimental Biology*. 1977. V. 71(1). P. 1–6. <https://doi.org/10.1242/jeb.71.1.1>
- Mikulovic S., Pupe S., Peixoto H. M., Do Nascimento G. C., Kullander K., Tort A. B., Leão R. N. On the photovoltaic effect in local field potential recordings. *Neurophotonics*. 2016. V. 3(1). P. 015002. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.1.015002>
- Mote M. I., Goldsmith T. H. Spectral sensitivities of color receptors in the compound eye of the cockroach *Periplaneta*. *J. Exp. Zool.* 1970. V. 173. P. 137–145. <https://doi.org/10.1002/jez.1401730203>
- Popkiewicz B., Prete F. R. Macroscopic characteristics of the praying mantis electroretinogram. *Journal of insect physiology*. 2013. V. 59(8). P. 812–823. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.05.002>
- Ross M. H., Cochran G., Smyth D. T. Eye-color mutations in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1964. V. 57. P. 790–792. <https://doi.org/10.1093/aesa/57.6.790>
- Saari P., Immonen E. V., Kemppainen J., Heimonen K., Zhukovskaya M., Novikova E., French A. S., Torkkeli P. H., Liu H., Frolov R. V. Changes in electrophysiological properties of photoreceptors in *Periplaneta americana* associated with the loss of screening pigment. *J. Comp. Physiol. A*. 2018. V. 204. P. 915–928. <https://doi.org/10.1007/s00359-018-1290-0>
- Schirmer A. E., Prete F. R., Mantes E. S., Urdiales A. F., Bogue W. Circadian rhythms affect electroretinogram, compound eye color, striking behavior and locomotion of the praying mantis *Hierodula patellifera*. *Journal of Experimental Biology*. 2014. V. 217(21). P. 3853–3861. <https://doi.org/10.1242/jeb.102947>
- Sieving P. A., Fishman G. A., Maggiano J. M. Corneal wick electrode for recording bright flash electroretinograms and early receptor potentials. *Archives of Ophthalmology*. 1978. V. 96(5). P. 899–900. <https://doi.org/10.1001/archophth.1978.03910050501024>
- Wu J., Tian Y., Dong W., Han J. Protocol for electroretinogram recording of the *Drosophila* compound eye. *STAR protocols*. 2022. V. 3(2). P. 101286. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101286>
- Zhukovskaya M. I. Modulation by octopamine of olfactory responses to nonpheromone odorants in the cockroach, *Periplaneta americana* L. *Chemical senses*. 2012. V. 37(5). P. 421–429. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr121>

Non-invasive recording of electroretinogram from both compound eyes in the cockroach *Periplaneta americana* L. in response to light stimuli

E. S. Novikova^a, L. A. Astakhova^a, A. Yu. Rotov^a, M. I. Zhukovskaya^{a*}

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

104223, St. Petersburg, Thorez Ave, 44, Russia

**E-mail: mzhukovskaya@rambler.ru*

The paper presents an original method of non-invasive registration of electroretinogram from both compound eyes of an insect. The method demonstrated high reliability and repeatability of the results. Using this method, it was shown that the magnitude of the light responses obtained from mutant cockroaches devoid of screening pigment, pearl, was about 4 times greater than those of wild-type insects. The time to peak of the response decreased with increasing light intensity, both for short-wavelength and long-wavelength stimuli. The pearl cockroaches exhibited a faster time to peak response than wild-type cockroaches; the results of covariance analysis indicate that these differences cannot be fully explained by an increase in the number of photons reaching the photoreceptor membranes and suggest additional differences in the compound eye physiology of mutant and wild-type insects. The positive voltage wave after the end of light stimulation depends on light intensity and reflects hyperpolarization of receptor cells. The photovoltaic effect, which distorts the amplitude and the shape of the response can be eliminated by using a gold wire as a recording electrode.

Key words: electroretinogram, cockroach, *Periplaneta*, compound eyes, insect vision

REFERENCES

- Gribakin F. G. *Mehanizmy fotorepcii nasekomyh* [Mechanisms of photoreception in insects]. Leningrad. Nauka, 1981. 213 p. (in Russian).
- Butler R. The anatomy of the compound eye of *Periplaneta americana* L. 1. General features *J. Comp. Physiol.* 1973a. V. 83. P. 223–238. <https://doi.org/10.1007/BF00693676>.
- Butler R. The anatomy of the compound eye of *Periplaneta americana* L. 2. Fine structure. *J. Comp. Physiol.* 1973b. V. 83. P. 239–262. <https://doi.org/10.1007/BF00693677>.
- Chen B., Meinertzhagen I. A., Shaw S. R. Circadian rhythms in light-evoked responses of the fly's compound eye, and the effects of neuromodulators 5-HT and the peptide PDF. *J. Comp. Physiol. A.* 1999. V. 185. P. 393–404. <https://doi.org/10.1007/s003590050400>
- Cronin T. W., Järvilehto M., Weckström M., Lall A. B. Tuning of photoreceptor spectral sensitivity in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *J. Comp. Physiol. A.* 2000. V. 186. P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s003590050001>.
- Crook D. J., Hull-Sanders H.M., Hibbard E. L., Mastro V. C. A comparison of electrophysiologically determined spectral responses in six subspecies of *Lymantria*. *J. Econ. Entomol.* 2014. V. 107. P. 667–674. <https://doi.org/10.1603/EC13464>.
- Crook D. J., Chiesa S. G., Warden M. L., Nadel H., Ioriatti C., Furtado M. Electrophysiologically determined spectral responses in *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 2022. V. 115(5). P. 1499–1504. <https://doi.org/10.1093/jeet/toac124>
- Dolph P., Nair A., Raghu P. Electroretinogram recordings of *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011. V. 2011(1). P. pdb-prot5549. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5549>
- Fabiatti M., Mahmud M., Lotfi A., Kaiser M. S., Aversa A., Guggenmos D. J., Nudo R. J., Chiappalone M., Chen J. SANTI: a MATLAB-based open-source toolbox for artifact detection and removal from extracellular neuronal signals. *Brain Informatics.* 2021. V. 8. P. 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40708-021-00135-3>.
- French A. S., Meisner S., Liu H., Weckström M., Torkkeli P. H. Transcriptome analysis and RNA interference of cockroach phototransduction indicate three opsins and suggest a major role for TRPL channels. *Frontiers in physiology.* 2015. V. 6. P. 207. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00207>.
- Frolov R. V., Severina I., Novikova E., Ignatova I. I., Liu H., Zhukovskaya M., Torkkeli P. H., French A. S. Opsin knockdown specifically slows phototransduction in broadband and UV-sensitive photoreceptors in *Periplaneta americana*. *J. Comp. Physiol. A.* 2022. V. 208(5–6). P. 591–604. <https://doi.org/10.1007/s00359-022-01580-z>
- Goriachenkov A. A., Rotov A. Y., Firsov M. L. Developmental dynamics of the functional state of the retina in mice with inherited photoreceptor degeneration. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2021. V. 51. P. 807–815. <https://doi.org/10.1007/s11055-021-01137-8>
- Gribakin F. G. Photoreceptor optics of the honeybee and its eye colour mutants: the effect of screening pigments on the long-wave subsystem of colour vision. *J. Comp. Physiol. A.* 1988. V. 164. P. 123–140. DOI: 10.1007/BF00612726.
- Gribakin F. G., Ukhanov K. Y. Is the white eye of insect eye-color mutants really white? *J. Comp. Physiol. A.* 1990. V. 167. P. 715–721. <https://doi.org/10.1007/BF00192666>.
- Gribakin F. G., Alekseyev Y. N., Ukhanov K. Y. Spectral sensitivity of white-eyed insect mutants in the UV, blue and green. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1996. V. 35(1–2). P. 13–18. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(96\)07313-7](https://doi.org/10.1016/1011-1344(96)07313-7)
- Hochstrate P. Lanthanum mimicks the TRP photoreceptor mutant of *Drosophila* in the blowfly *Calliphora*. *J. Comp. Physiol. A.* 1989. V. 166. P. 179–187. <https://doi.org/10.1007/BF00193462>
- Jansonius N. M. Properties of the sodium pump in the blowfly photoreceptor cell. *J. Comp. Physiol.* 1990. V. 167. P. 461–467. <https://doi.org/10.1007/BF00190816>
- Kelly K. M., Mote M. I. Avoidance of monochromatic light by the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of insect physiology.* 1990. V. 36(4). P. 287–291. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(90\)90113-T](https://doi.org/10.1016/0022-1910(90)90113-T).
- Kugel M. The time course of the electroretinogram of compound eyes in insects and its dependence on special recording conditions. *Journal of Experimental Biology.* 1977. V. 71(1). P. 1–6. <https://doi.org/10.1242/jeb.71.1.1>
- Mikulovic S., Pupe S., Peixoto H. M., Do Nascimento G. C., Kullander K., Tort A. B., Leão R. N. On the photovoltaic effect in local field potential recordings. *Neurophotonics.* 2016. V. 3(1). P. 015002. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.1.015002>
- Mote M. I., Goldsmith T. H. Spectral sensitivities of color receptors in the compound eye of the cockroach *Periplaneta*. *J. Exp. Zool.* 1970. V. 173. P. 137–145. <https://doi.org/10.1002/jez.1401730203>
- Popkiewicz B., Prete F. R. Macroscopic characteristics of the praying mantis electroretinogram. *Journal of insect physiology.* 2013. V. 59(8), P. 812–823. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.05.002>
- Ross M. H., Cochran G., Smyth D. T. Eye-color mutations in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1964. V. 57. P. 790–792. <https://doi.org/10.1093/aesa/57.6.790>

- Saari P., Immonen E. V., Kemppainen J., Heimonen K., Zhukovskaya M., Novikova E., French A. S., Torkkeli P. H., Liu H., Frolov R. V. Changes in electrophysiological properties of photoreceptors in *Periplaneta americana* associated with the loss of screening pigment. *J. Comp. Physiol. A*. 2018. V. 204. P. 915–928. <https://doi.org/10.1007/s00359-018-1290-0>
- Schirmer A. E., Prete F. R., Mantes E. S., Urdiales A. F., Bogue W. Circadian rhythms affect electroretinogram, compound eye color, striking behavior and locomotion of the praying mantis *Hierodula patellifera*. *Journal of Experimental Biology*. 2014. V. 217(21). P. 3853–3861. <https://doi.org/10.1242/jeb.102947>
- Sieving P. A., Fishman G. A., Maggiano J. M. Corneal wick electrode for recording bright flash electroretinograms and early receptor potentials. *Archives of Ophthalmology*. 1978. V. 96(5). P. 899–900. <https://doi.org/10.1001/archophth.1978.03910050501024>
- Wu J., Tian Y., Dong W., Han J. Protocol for electroretinogram recording of the *Drosophila* compound eye. *STAR protocols*. 2022. V. 3(2). P. 101286. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101286>
- Zhukovskaya M. I. Modulation by octopamine of olfactory responses to nonpheromone odorants in the cockroach, *Periplaneta americana* L. *Chemical senses*. 2012. 37(5). P. 421–429. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr121>