

## ИСТОЧНИКИ ЭЛЕКТРОРЕТИНОГРАММЫ ГОЛОВОНОГИХ

А. Л. Бызов и О. Ю. Орлов

Институт биофизики АН СССР, Москва

Известно, что из всех беспозвоночных головоногие — высшие представители типа моллюсков обладают глазами, по своему строению наиболее близкими к глазам позвоночных. Однако строение их сетчатки, за исключением некоторых особенностей, типично для сложных глаз беспозвоночных. В частности, в сетчатке головоногих, так же как, например, у насекомых и ракообразных, расположен только первый нейрон — зрительная клетка, отросток которой направляется в зрительный ганглий (Grenacher, 1884; Joung, 1961). Следовательно, первый синапс лежит уже вне сетчатки. Известно далее, что электроретинограмма (ЭРГ) некоторых насекомых (Bernhard, 1942; Autrum, 1952), речного рака (Naka, Kuwabara, 1959), рака-отшельника (Stieve, 1960), лимулюса (Hartline, 1948; Hartline a. o., 1952; Tomita, 1956), по своей форме весьма сходная у всех этих животных, состоит, по-видимому, из нескольких компонентов (по меньшей мере двух). Наличие таких же компонентов можно предполагать и у головоногих, ЭРГ которых очень близка к ЭРГ указанных выше беспозвоночных (Piper, 1911; Fröhlich, 1914; Therman, 1940).

Встает вопрос, какие структуры являются источниками этих компонентов? Отсутствие в сетчатке беспозвоночных синапса между первым и вторым нейроном свидетельствует о том, что оба компонента (если их два) возникают в одном и том же нейроне — зрительных клетках. Но зрительная клетка — сложное образование и можно предположить, что источником колебаний являются разные ее части (к примеру, рабдомы, если их считать частью зрительных клеток, и тела клеток). При внутриклеточном отведении потенциалов действия омматидия японского краба (Kikuchi, 1958; Tomita a. o., 1960) и лимулюса (Fuortes, 1959a и 1959b) видно, что оба компонента регистрируются в одной и той же клетке, однако это еще не дает возможности решить, в каких участках клетки эти компоненты возникают. В случае с лимулюсом предполагается, что медленные колебания могут возникать вне самих эксцентрических клеток — в клетках ретикулы (Tomita a. o., 1960).

Если слой сетчатки, в которых регистрируются компоненты ЭРГ, пространственно разделены между собой, то с помощью экстраклеточных микроэлектродов возможно их раздельное отведение. Такой послыйный микроэлектродный анализ, проведенный на лягушке (Бызов, 1959) и черепахе (Бызов, 1961), выявил отдельные компоненты ЭРГ и позволил их отнести к определенным структурам — биполяркам наружной и внутренней зоны внутреннего ядерного слоя.

Задачей настоящей работы было провести такой же послыйный анализ на сетчатке кальмара *Ommastrephes sloani-pacificus* и осьминога *Octopus dofleini* с тем, чтобы попытаться выяснить, какие структуры являются источниками ЭРГ и ее отдельных компонентов. Результаты исследований по адаптации глаз головоногих, а также колориметрические опыты изложены отдельно.

Работа проводилась в августе—сентябре 1960 г. на о. Путятин в Японском море во время пребывания там Тихоокеанской экспедиции Института биофизики АН СССР.

#### МЕТОДИКА

У вырезанного глаза кальмара и осьминога удаляли передние среды: роговицу, хрусталик и стекловидное тело. В большей части опытов удаляли также и зрительный ганглий, непосредственно прилегающий к наружной поверхности склеры. Склеру с сетчаткой помещали в камеру, охлаждаемую до  $10^{\circ}\text{C}$ . В камеру непрерывно подавали кислород. Для того чтобы над сетчаткой не было стекловидного тела, затрудняющего доступ к ней кислорода, препарат клали на парафиновую подставку с выпуклостью в центре (рис. 1, А). Поскольку задняя стенка глазного бокала у кальмара и осьминога мягкая, препарат принимал форму подставки, в результате чего центральная часть сетчатки приподнималась и остатки стекловидного тела стекали к ее краям.

На рис. 1, А показано также расположение электродов. ЭРГ регистрировали в двух отведениях: I — между микроэлектродом (диаметр 2—3 мк, заполнен 3 М KCl), погружаемым сверху со стороны стекловидного тела, и электродом, подведенным к склере; II — между микроэлектродом и электродом, расположенным на внутренней поверхности сетчатки. Левая пара электродов (рис. 1, А), подведенных к склере и к внутренней поверхности сетчатки, служила для пропускания толчков тока с целью измерения сопротивления ее слоев (подробнее о методике измерения сопротивления см.: Бызов, 1958).

Следует отметить, что условия для измерения сопротивления в настоящих опытах были значительно менее благоприятными, чем в наших прежних опытах на лягушках и черепашках. В этих последних случаях верхний «токовый» электрод был погружен в стекловидное тело, имеющее относительно малое сопротивление и поэтому шунтирующее все точки внутренней поверхности сетчатки. Вследствие этого плотность тока на всех участках сетчатки была приблизительно одинаковой. В опытах же на кальмаре и осьминоге верхний электрод касался сетчатки лишь на ограниченном участке. Поэтому плотность тока под электродом в поверхностных слоях сетчатки была, по-видимому, больше, чем в глубоких, что, естественно, сказывалось на получаемых цифрах. Это обстоятельство необходимо учитывать при оценке действительных величин сопротивления отдельных слоев сетчатки.<sup>1</sup>

Свет в течение всего опыта включался ритмически на 1.5—2 сек. с интервалами между вспышками в 10 сек. Световое пятно покрывало всю центральную (приподнятую) часть сетчатки. Регистрирующая аппаратура состояла из катодного повторителя на входе и усилителя постоянного тока, соединенного с осциллографом ЭНО-1.

На всех кривых отклонение вниз соответствует отрицательности верхнего (ближнего к внутренней поверхности сетчатки) электрода.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ОПЫТОВ

Так же как и в опытах по адаптации (Бызов и Орлов, 1961), результаты, полученные на кальмарах и осьминогах, очень сходны между собой.

На рис. 1, Б показана ЭРГ осьминога, записанная при 3 разных интенсивностях света. В пределах малых интенсивностей ЭРГ имеет вид простого отрицательного отклонения, сохраняющегося в течение всего периода освещения. С увеличением интенсивности света величина отклонения возрастает, а затем появляется начальное быстрое колебание, превышаю-

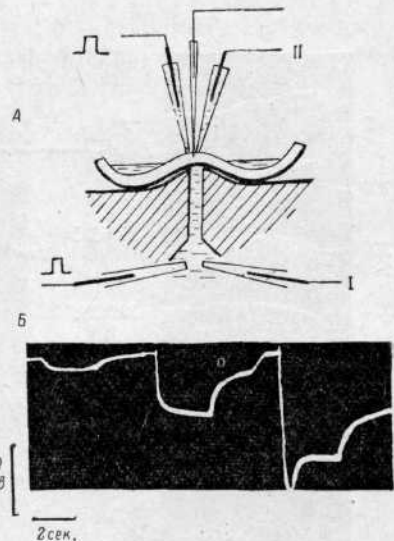


Рис. 1. Схема расположения электродов (А) и ЭРГ осьминога при трех интенсивностях света: 3, 40 и 200 лк (Б).

На А: препарат лежит на парафиновой подставке, в центре которой просверлен канал, заполненный каолином, замешанным на морской воде.

На этом и всех последующих рисунках моменты включения и выключения света отмечены маленькими выбросами вверх на кривых.

Остальные объяснения в тексте.

<sup>1</sup> Кроме того, полученные величины сопротивлений являются лишь относительными, поскольку неясно, к какой площади сетчатки их нужно отнести.

щее уровень последующего плато. Уже из этих кривых можно предположить существование 2 разных компонентов ЭРГ.

Рис. 2 показывает, как изменяются ритмические колебания потенциала на препарате глаза осьминога по мере погружения микроэлектрода в сетчатку. Все приводимые на этом рисунке записи сделаны во II отведении, т. е. между микроэлектродом и электродом, расположенным на внутренней поверхности сетчатки.<sup>1</sup> Справа даны кривые, полученные путем графического вычитания записей, сделанных на разных глубинах ( $V_{a-b}$ ). Из этих кривых, непосредственно показывающих распределение колебаний потенциала по глубинам, четко видно, что ЭРГ складывается из 2 компонентов разной формы, возникающих в разных слоях сетчатки. Верхний (дистальный) компонент (на глубине 250—325 мк) имеет вид относительно круто нарастающего отклонения, которое затем при продолжающемся освещении постепенно спадает. Именно за счет этого компонента в ЭРГ при больших интенсивностях света появляется начальное быстрое колебание, превышающее уровень последующего плато. Для нижнего (проксимального) компонента характерно медленное нарастание потенциала (особенно при малых интенсивностях света), который затем держится в течение всего периода засвета и медленно спадает после выключения света. Этот компонент является основной частью плато, а также следового потенциала, с которым, как предполагается нами, связан механизм адаптации.

Именно за счет этого компонента в ЭРГ при больших интенсивностях света появляется начальное быстрое колебание, превышающее уровень последующего плато. Для нижнего (проксимального) компонента характерно медленное нарастание потенциала (особенно при малых интенсивностях света), который затем держится в течение всего периода засвета и медленно спадает после выключения света. Этот компонент является основной частью плато, а также следового потенциала, с которым, как предполагается нами, связан механизм адаптации.

При прохождении микроэлектродом слоя, в котором регистрируется проксимальный компонент ЭРГ, всегда наблюдался заметный сдвиг потенциала в отрицательную сторону (вниз). По-видимому, этот потенциал является следовым потенциалом, сохранившимся после предыдущих раздражений. При повторном погружении микроэлектрода на соседнем участке того же препарата колебания потенциала, а также глубины, на которых наблюдаются их изменения, хорошо воспроизводятся. Цифры крайней правой колонки на рис. 2 показывают примерное сопротивление слоев, измеренное с помощью толчков тока (среднее из из-

При прохождении микроэлектродом слоя, в котором регистрируется проксимальный компонент ЭРГ, всегда наблюдался заметный сдвиг потенциала в отрицательную сторону (вниз). По-видимому, этот потенциал является следовым потенциалом, сохранившимся после предыдущих раздражений.

При повторном погружении микроэлектрода на соседнем участке того же препарата колебания потенциала, а также глубины, на которых наблюдаются их изменения, хорошо воспроизводятся.

Цифры крайней правой колонки на рис. 2 показывают примерное сопротивление слоев, измеренное с помощью толчков тока (среднее из из-

<sup>1</sup> Колебание потенциала, записанное с поверхности сетчатки, (глубина погружения 0) является, по-видимому, следствием «затекающего» тока из глубже лежащих слоев и регистрируется потому, что второй электрод располагался в данном опыте несколько в стороне (на расстоянии  $\sim 1$  мм) от микроэлектрода. Для послойного анализа интересующих нас компонентов ЭРГ это несущественно, поскольку разности между кривыми (в противоположность самим кривым) не зависят от положения второго электрода «макроэлектрода» (см., например, рис. 3, а также: Бызов, 1959).

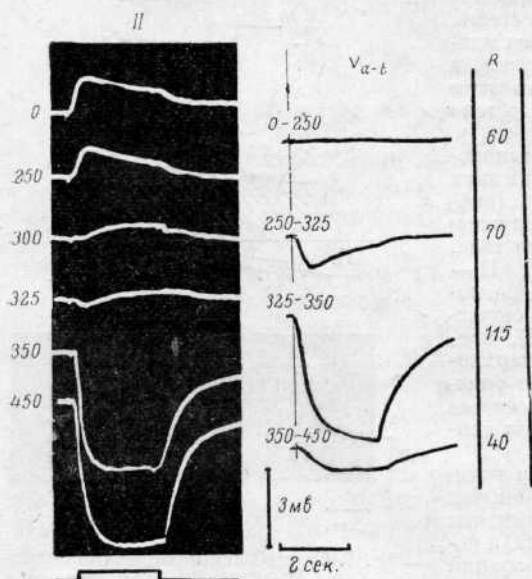


Рис. 2. ЭРГ осьминога при разных глубинах погружения микроэлектрода.

Цифры слева — глубина погружения (в мк). Внизу — отметка раздражения. Осциллограммы записаны во II отведении. Интенсивность света 700 лк. В столбце  $V_{a-b}$  даны графические разности между кривыми, записанными на разной глубине (цифры около кривых). Справа (столбец R) — примерное сопротивление соответствующих слоев сетчатки по измерениям с помощью толчков тока.

мерений в двух последовательных погружениях). В общем по результатам всех опытов можно сказать, что высота толчка, регистрируемого при пропускании тока, нарастает довольно круто лишь в слое, который соответствует месту возникновения проксимального компонента ЭРГ (глубина 325—350 мк на рис. 2). В остальных слоях толчок нарастает более или менее равномерно и, следовательно, в пределах сравнительно небольшой точности измерений распределение сопротивлений в разных слоях сетчатки довольно равномерно.

Один из опытов на кальмаре, показывающий распределение потенциалов по слоям, приведен на рис. 3. Здесь записи сделаны как в I, так и во II отведениях.<sup>1</sup> Справа даны разности  $V_{a-b}$ , причем они объединены так, чтобы колебания, близкие по форме, суммировались: разности 140—150 и 150—200 мк представлены как разность 140—200 мк, а 225—265 и 265—300 мк как разность 225—300 мк. Видно, что компоненты ЭРГ (кривые столбца  $V_{a-b}$ ) у кальмара в общем такие же, как и у осьминога (сравните с рис. 2).

В ряде опытов на осьминогах после длительной темновой адаптации можно было наблюдать ритмические колебания потенциала до 100 мкв, имеющие иногда вид периодических веретен (рис. 4, А). При слабом освещении амплитуда этих колебаний уменьшалась, а частота несколько возрастала. В других опытах в зависимости от интенсивности освещения ритмические колебания наблюдались то во время слабого освещения, то после его выключения (рис. 4, Б).

Сходные ритмические колебания на глазе каракатицы были подробно описаны еще Фрëлихом (Fröhlich, 1914) и Терманом (Therman, 1940). Они известны также и на других беспозвоночных (см., например, Adrian, 1937, и др.).

На рис. 4, В показан опыт по выяснению места возникновения этих колебаний. ЭРГ регистрировалась в I и во II отведениях. Видно, как по мере погружения микроэлектрода в сетчатку из I во II отведение переходит сначала дистальный быстро нарастающий компонент (имеющий при небольшой интенсивности света вид стола), а затем (на глубине 500 мк) и медленно нарастающий, проксимальный компонент. Дальнейшее погружение микроэлектрода еще на 400 мк существенно не изменило отводимых потенциалов; при этом ритмические колебания остались в I отведении. Следовательно, они возникают где-то проксимальнее места возникновения обоих компонентов ЭРГ.

Сопоставим теперь приведенные выше электрофизиологические данные со структурой сетчатки головоногих. Рис. 5 сделан с гистологического препарата сетчатки осьминога, на котором был проведен опыт,

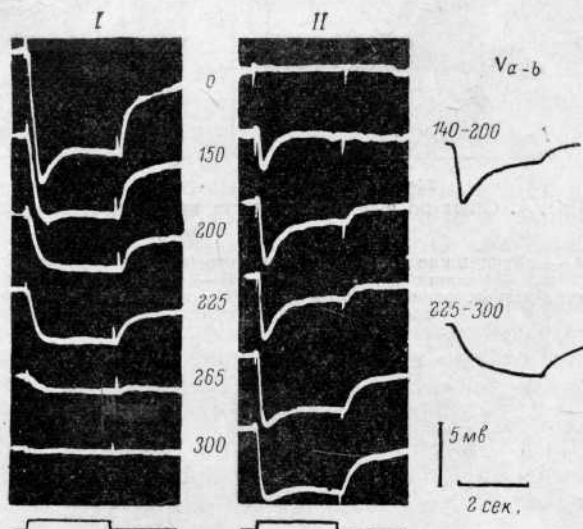


Рис. 3. ЭРГ кальмара при разных глубинах погружения микроэлектрода.

Интенсивность света 300 лк. Цифры в середине — глубина погружения (в мк). Записи сделаны в I и во II отведениях. Справа ( $V_{a-b}$ ) — графические разности, показывающие два компонента ЭРГ.

<sup>1</sup> На рис. 3 отсутствуют кривые, зарегистрированные на глубине 140 мк; они почти ничем не отличались от верхних кривых.

Проксимальный компонент ЭРГ регистрируется в районе нейропиля. Ток выходит в экстраклеточную среду где-то в слое нервных волокон и входит в клетки, по-видимому, на уровне немного ниже клеточных тел. Такое распределение тока может соответствовать как деполяризации начального сегмента аксона зрительной клетки, так и гиперполяризации участков аксона, расположенных в нейропиле (например, под синапсами, образованными отростками соседних аксонов). На эксцентрических клетках сетчатки лимулюса, сходной с сетчаткой головоногих в отношении как формы ЭРГ, так и ряда черт строения, Томита с соавторами (Tomita a. o., 1960) с помощью внутриклеточных микроэлектродов наблюдали как деполяризацию (при освещении всей сетчатки, в том числе и данного омматидия), так и гиперполяризацию (при латеральном торможении или торможении, вызванном антидромными импульсами). Возможно, что у головоногих также имеет место и то, и другое. К сожалению, на основании имеющегося материала трудно делать более определенные суждения.

Ритмические колебания, иллюстрируемые рис. 4, возникают проксимальнее обоих компонентов ЭРГ. Их источником могут быть пучки нервных волокон, проходящих сквозь склеру, или же нервные элементы, находящиеся вне сетчатки, — остатки неполностью удаленного зрительного ганглия. Вывод о внесетчаточном происхождении этих колебаний соответствует наблюдениям Мак Николы и Вагнера (Mac Nichol, Wagner, 1960), которые недавно регистрировали их на каракатице с помощью микроэлектрода, вводимого в слой нервных волокон вблизи от их выхода из глаза. Сходные колебания, накладывающиеся на ЭРГ, наблюдал на глазе кальмара Терман (Therman, 1940) при помещении одного из электродов на зрительный ганглий; при этом кокаинизация ганглия полностью снимала ритмические колебания, оставляя ЭРГ неизменной.

Величина ЭРГ головоногих обычно составляет несколько милливольт, а при больших интенсивностях света достигает 20 мв, что значительно больше ЭРГ лягушки (~ 1 мв) и черепахи (200—300 мкв). Чем объяснить такую большую разницу?

Хотя измерения сопротивления в настоящей работе, по причинам, изложенным ранее, не могут дать точных абсолютных цифр, они показывают, что у головоногих сопротивление слоев сетчатки, в которых образуется ЭРГ, в несколько раз больше, чем у лягушки и особенно у черепахи (Бызов, 1958, 1959, 1961а и б). По-видимому, именно в этом основная причина различной величины ЭРГ. Отсюда понятно, что при сравнении ЭРГ этих животных по токам разница окажется много меньше, чем при сравнении по потенциалам.

## ВЫВОДЫ

1. ЭРГ кальмара и осьминога складывается из двух основных компонентов, возникающих в разных слоях: а) дистальный компонент имеет вид относительно круто нарастающего отклонения, постепенно спадающего при продолжающемся освещении; он возникает в слое зрительных клеток и, по-видимому, является результатом деполяризации дистальных участков этих клеток; б) проксимальный компонент состоит из относительно медленно нарастающего отклонения, сохраняющегося в течение всего периода засвета (плато) и постепенно спадающего после выключения света («следовой» потенциал); этот компонент возникает, по-видимому, в районе нейропиля — нервного сплетения, расположенного проксимальнее клеточных тел.

2. Ритмические колебания потенциала, накладывающиеся на ЭРГ и регистрировавшиеся у осьминогов в темноте и при слабом освещении, возникают проксимальнее обоих компонентов ЭРГ — вероятно, на склере (в пучках нервных волокон) или даже за ней — в зрительном ганглии.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бызов А. Л., Биофизика, 3, 658, 1958; 4, 689, 1959; 5, 284, 1960; 6, 620, 1961а; Физиол. журн. СССР, 47, № 1, 71, 1961б.
- Adrian E. D., Journ. Physiol., 91, 66, 1937.
- Autrum H. J., Naturwissensch., 39, 290, 1952.
- Bernhard C. G., Journ. Neurophysiol., 5, 32, 1942.
- Fröhlich F. W., Zs. Sinnesphysiol., 48, 28, 1914.
- Fuortes M. G. F., Journ. Physiol., 148, 14, 1959a, Arch. ital. biol., 97, 243, 1959b.
- Grenacher H. Abhandlungen zur vergleichenden Anatomie des Auges. I. Die Retina der Cephalopoden. Halle, 1884.
- Hartline H. K., Feder. Proc., 7, 51, 1948.
- Hartline H. K., H. G. Wagner, E. F. MacNichol, Cold Spring Harbor Symposia, 17, 125, 1952.
- Hartline H. K., H. G. Wagner, F. Ratliff, Journ. Gen. Physiol., 39, 651, 1956.
- Kikuchi R., Med. Sci., 9, № 4, 254, 1958.
- MacNichol E. F., L. E. Wagner, Science, 131, 737, 1960.
- Naka K., M. Kuwabara, Journ. Exptl. Biol., 36, 51, 1959.
- Piper H. Arch. Anat. Physiol., Leipzig, 85, 1911.
- Stieve H., Helgoländer wiss. Meeresuntersuch., 7, № 4, 149, 1960.
- Therman P. O., Am. Journ. Physiol., 130, 239, 1940.
- Tomita T., Japan. Journ. Physiol., 6, 327, 1956; Journ. Neurophysiol., 21, 419, 1958.
- Tomita T., R. Kikuchi, J. Tanaka. Electrical activity of single cells, 11, 1960.
- Wolken I. J., Journ. Biophys. a. Biochem. Cytol., 4, 835, 1958.
- Young I. Z., Biol. Rev., 36, 32, 1961.

Поступило 5 IV 1961

## SOURCES OF THE RETINOGRAM IN CEPHALOPODA

By A. L. Byzov and O. Y. Orlov

From the Institute of Biophysics, Moscow