

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЗРИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ ГОЛОВОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ

О. Ю. ОРЛОВ, С. Л. КОНДРАШЕВ, В. Ф. ГНЮБКИН

Лаборатория органов чувств Института проблем передачи информации АН СССР, Москва 103051, Группа сравнительной физиологии нервной системы Института биологии моря ДВНЦ АН СССР, Владивосток 690022

Разработана методика нейрофизиологических экспериментов на кальмарах под уретановым наркозом. С поверхности зрительной доли зарегистрированы ответы элементов оп-типа: разряды, длящиеся на протяжении всего времени освещения и имеющие ритмический характер. Размер рецептивных полей этих элементов — 1,5—4°. В более глубоких слоях зрительной доли найдено два типа элементов: с кратким разрядом на включение света; со спонтанной активностью в темноте, тормозящейся включением света.

Visual neurons of cephalopods. O. Ju. Orlov, S. L. Kondrashev, V. F. Gnjubkin (Laboratory of Sense Organs, Institute of Problems of Information Transmission, Moscow 103051; Group of Comparative Physiology of Nervous System, Institute of Marine Biology, Far East Science Center, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok 690022)

A method of neurophysiological investigation of visual system of squid is described. Surgery and experimental procedures were conducted under urethane anaesthesia on the whole animal, maintained alive during more than 10 h. Responses of visual elements were recorded from the optic lobe by means of metal-filled microelectrodes with a Pt-tip. On-type responses were recorded from the surface of the lobe. A sustained discharge of these elements lasted all the time when illumination was on and revealed an increased temporal tendency to rhythmic activity. Elements of this type have small (1.5—4°) receptive fields and are undoubtedly axons of retinal photoreceptors terminating in the optic lobe. Two more types of neurons were found in deeper layers of the lobe. One of them responded only with short on-burst of impulses, and another one revealed spontaneous activity in the darkness which was immediately suppressed by switching on the light. When the light was off frequency of the response rapidly increased from 1—3 to 10 imp/sec. An initial frequency varied inversely with duration and intensity of previous illumination. Testing with a small light spot revealed a non-uniform structure of the receptive field of these units: besides reactions described above, distinct off-responses were recorded when stimulating a periphery of the field.

Головоногие, наряду с позвоночными и членистоногими, являются одной из трех групп животных, достигших высших ступеней развития органов чувств, нервной системы и поведения. По уровню развития зрительного аппарата они безусловно превосходят членистоногих, по крайней мере по таким показателям, как размеры глаз, величина зрительных центров и, вероятно, острота зрения. Полная независимость путей возникновения совершенного зрительного аппарата головоногих делает его изучение исключительно интересным и важным в сравнительном плане. Между тем число работ по зрению головоногих ничтожно в сравнении с обилием литературы не только по позвоночным, но и по членистоногим. Что же касается микроэлектродных исследований импульсной активности зрительных нейронов и их функциональной специализации, то такие работы буквально единичны. Объясняется это не недостатком интереса к головоногим или непониманием важности таких исследований, а скорее значительными методическими трудностями, связанными с выполнением опытов на этих животных (Boycott et al., 1965; Hartline, Lange, 1974).

Задача работы состояла в том, чтобы отработать методику электрофизиологического микроэлектродного эксперимента на целых обездвиженных головоногих моллюсках, в частности методику регистрации одиночных нервных элементов из зрительных долей.

Материал и методика

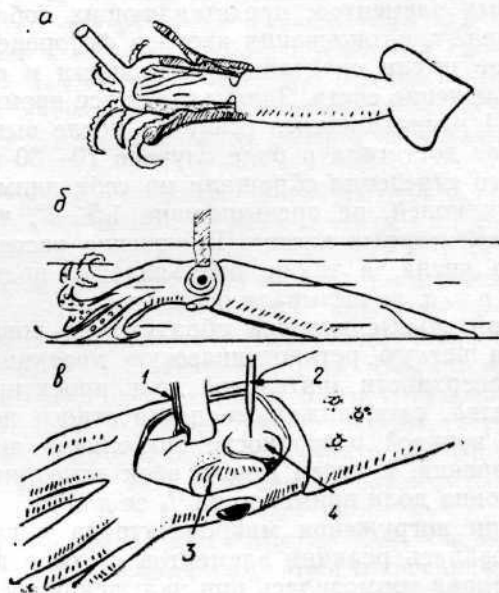
Работа выполнена на Морской экспериментальной станции ТОИ ДВНЦ АН СССР на о-ве Попова. Основная часть опытов проведена на взрослых кальмарах *Todarodes pacificus* в августе-сентябре. Кальмаров добывали удочками на блесны и содержали в садке из крупноячеистой сетки размером $2,5 \times 1,5 \times 1$ м на глубине около 5 м в течение 2 нед без дополнительного подкармливания.

Опыты проводились под общим уретановым наркозом. Из всех испробованных препаратов (тубокурарин, миорелаксин, флакседил, листенон) уретан оказался наилучшим для опытов с кальмарами и осьминогами. Животное помещали в плоский аквариум емкостью 10—20 л с 2%-ным раствором уретана на морской воде и постепенно повышали концентрацию уретана до уровня, при котором исчезали активные движения в ответ на болевое раздражение (около 3%). Температуру воды поддерживали в пределах 13—18°С. В течение опыта воду не меняли. Дополнительную аэрацию воды производили одним-двумя микрокомпрессорами.

Для проведения электрофизиологических экспериментов зрительную долю обнажали следующим образом: двумя зажимами кальмара закрепляли за дорзальный передний край мантии и удаляли кожу на голове (рис. 1). Эти операции не мешали

Рис. 1. Крепление кальмара для нейрофизиологических экспериментов.

а — кальмар удерживается зажимами за края мантии (вид сверху); б — после обнажения зрительной доли кальмар фиксируется зажимом за дорзальную часть головного хряща, в — операционное поле (кожа и мягкие ткани удалены): 1 — зажим, 2 — микроэлектрод, 3 — глаз, 4 — зрительная доля



дыхательным движениям кальмара и не вызывали кровотечения. У обнажившегося межглазничного хряща удаляли горизонтально ориентированные крылья; в результате хрящ образовывал достаточно жесткую «балку», которую закрепляли в зажим. Таким образом кальмар фиксировался в аквариуме на все время эксперимента. Зрительная доля открывалась после аккуратного (чтобы не вызывать кровотечения перерезкой сосудов) удаления надглазничного хряща.

Использовались металлические микроэлектроды (стеклянный капилляр, заполненный сплавом Вуда) с платинированным кончиком (Gesteland et al., 1959) и транзисторный усилитель (полоса пропускания 0,1—3 кГц, входное сопротивление 5—10 МОм, коэффициент усиления 900), соединенный с осциллографом и магнитофоном.

Результаты

При правильной дозировке уретана кальмары сохраняли нормальную дыхательную активность без замены раствора в течение 6—10 ч. Импульсная активность, регистрируемая из зрительной доли, оставалась в течение этого времени неизменной.

В зрительной доле можно было регистрировать реакции, вызванные зрительными стимулами, и спонтанную активность. Амплитуда импульсов не превышала 200—400 мкв. В качестве стимулов служили: микролампочка диаметром 3 мм, фотовспышка с энергией 36 Дж и включение общего освещения. Применение оформленных стимулов (контрастных дисков, полос и т. п.), столь плодотворное в опытах, например с амфибиями и рыбами (Lettvin et al., 1959; Зенкин, Пигарев, 1969; Максимова и др., 1971; Орлов, Кондрашев, 1978), не было эффективным. Кроме микролампочки, ни один стимул не вызывал достаточно четкой реакции регистрируемых нейронов.

Результаты, изложенные ниже, получены в опытах на шести кальмарах, причем во всех случаях наблюдаемый характер ответов был одинаковым. Два эксперимента были проведены на осьминоге *Octopus dofleini*. Работать с осьминогом гораздо сложнее из-за большей мягкости его головного хряща, что ведет к заметной нестабильности ответа вследствие дыхательных движений. Этот факт в числе прочих трудностей отмечали также Бойкот с соавторами (Boycott et al., 1965). Дыхательные движения могут вносить некоторые помехи даже в опыты с кальмарами (рис. 2, а, см. вкл. I).

С поверхности зрительной доли регистрировались только ответы нервных элементов, представляющих собой, по-видимому, зрительные волокна, т. е. окончания аксонов фоторецепторов глаза (Young, 1971). Они не имели спонтанной активности и отвечали залпом импульсов на включение света. Залп длился все время засвета (рис. 2, а, б, г, см. вкл. I) и прекращался сразу же после выключения света. Частота импульсов достигала в ряде случаев 70—80 имп/с. При достижении однократного отведения обращали на себя внимание малые размеры рецептивных полей, не превышавшие 1,5—4°, что совершенно естественно для рецепторных клеток. Включение рассеянного света, большого светового пятна, а также предъявление подвижных контрастных полос, пятен и т. п. не вызывали реакции.

Зрительные волокна образуют на поверхности зрительной доли весьма четкую ретинотопическую проекцию. В передний конец верхней поверхности зрительной доли проектируются точки внешнего пространства, расположенные почти строго позади животного. В задний конец верхней поверхности зрительной доли проектируется боковое поле зрения, а почти строго вбок «смотрит» точка, отстоящая от заднего конца доли примерно на $\frac{1}{4}$ ее длины.

При погружении микроэлектрода в глубь зрительной доли регистрировалась реакция элементов со спонтанной активностью в темноте, которая тормозилась при включении света (рис. 2, в, д, см. вкл. I). После выключения света частота импульсации постепенно нарастала, достигая 35—40 имп/с. При этом начальная плотность импульсов (частота) зависит от яркости и длительности предшествующей засветки: при большей длительности и яркости плотность меньше. У элементов такого типа, имеющих сравнительно большие рецептивные поля (около 10°), удается наблюдать некоторые черты функциональной организации рецептивного поля. Например, один из элементов с оп-центром при смещении микролампочки в сторону от центра рецептивного поля стал давать короткий разряд импульсов в момент выключения лампочки (off-ответ), который сменялся описанным выше нарастающим длительным разрядом (спонтанной импульсацией) (рис. 2, д).

Из приповерхностных слоев зрительной доли была зарегистрирована довольно своеобразная реакция на мощную короткую засветку глаза фотовспышкой. Эта реакция представляет собой ряд медленных колебаний потенциала, организованных в виде «веретен» (рис. 2, е, см. вкл. I). Наш усилитель рассчитан главным образом на регистрацию

быстрых импульсных реакций, и поэтому он заметно искажал такой суммарный сигнал и делал невозможным определение его точных параметров. Тем не менее хорошо видно, что максимальная амплитуда колебаний в последовательном ряду «веретен» при периодической стимуляции имеет явно выраженную тенденцию к снижению. Кроме того, в этом ряду уменьшается и количество периодов колебаний в каждом из «веретен». Возможно, что эта медленная активность представляет собой особым образом организованную суперпозицию сигналов от многих фоторецепторов.

Разработанная методика позволяет успешно регистрировать активность зрительных нейронов нескольких типов из зрительной доли кальмара с сохранением устойчивого и неизменного ответа в течение многих часов. Интересно сравнить наши результаты с полученными другим методом: на препарате изолированного глаза и зрительной доли.

Ленге и Хартлайн (Lange, Hartline, 1974) описали два типа зрительных элементов, регистрируемых в зрительном нерве кальмара, — так называемые «быстрые» и «медленные» афферентные элементы. Судя по малым размерам рецептивных полей, не превышающих единиц градусов, и целому ряду характеристик ответа, «быстрые» афференты — это волокна, ответы которых зарегистрированы нами с поверхности зрительной доли, т. е. аксоны фоторецепторов. Элементов, сходных по своим свойствам с «медленными» афферентами, мы не обнаружили. Иногда встречались элементы, различающиеся по своей латентности, однако это вполне могли быть вариации одного и того же типа «быстрых» афферентов. Возможно, что «медленные» элементы труднее регистрируются микроэлектродом из-за своей малочисленности (Lange, Hartline, 1974).

«Быстрые» элементы и описанные нами поверхностные элементы не имеют антагонистического окружения (показана только оп-реакция в рецептивном поле) и спонтанной активности на свету и в темноте.

В отличие от поверхностных элементов нейроны, регистрируемые из глубоких областей зрительной доли, обладают ярко выраженной спонтанной активностью. Последние вряд ли представляют собой элементы эфферентной цепи, которые осуществляют свое влияние из зрительной доли на сетчатку (Young, 1971) и очень близки по свойствам к «медленным» элементам (Lange, Hartline, 1974). Кроме того, для «медленных» элементов характерна «вялость» реакции и весьма заметная латентность (Hartline, Lange, 1974), чего нельзя сказать о нейронах, описанных нами.

Медленные колебания потенциала неоднократно описаны в работах, выполненных на кальмарах и осьминогах. Многие исследователи наблюдали спонтанные и «зрительные» медленные реакции как в сетчатке, так и в зрительном нерве головоногих (Бызов, Орлов, 1962; Boycott et al., 1965; Daw, Pearlman, 1974; Lange, Hartline, 1974). Медленные ответы из поверхностных слоев зрительной доли кальмара (рис. 2, е) очень похожи на один из трех типов медленных колебаний потенциала, зарегистрированных у осьминога (Tsukahara et al., 1973). Несмотря на то, что синхронные разряды волокон зрительного нерва считаются источниками подобных медленных ритмических ответов, многое в их формировании остается не ясным.

Л и т е р а т у р а

- Бызов А. Л., Орлов О. Ю. 1962. Источники ретинограммы головоногих. Физiol. ж., 48: 16—23.
- Зенкин Г. М., Пигарев И. Н. 1969. Детекторные свойства ганглиозных клеток сетчатки шкуи. Биофизика, 14: 722—730.
- Макимова Е. М., Орлов О. Ю., Диментман А. М. 1971. Исследование зрительной системы нескольких видов морских рыб. Вopr. ихтиол., 11: 892—899.

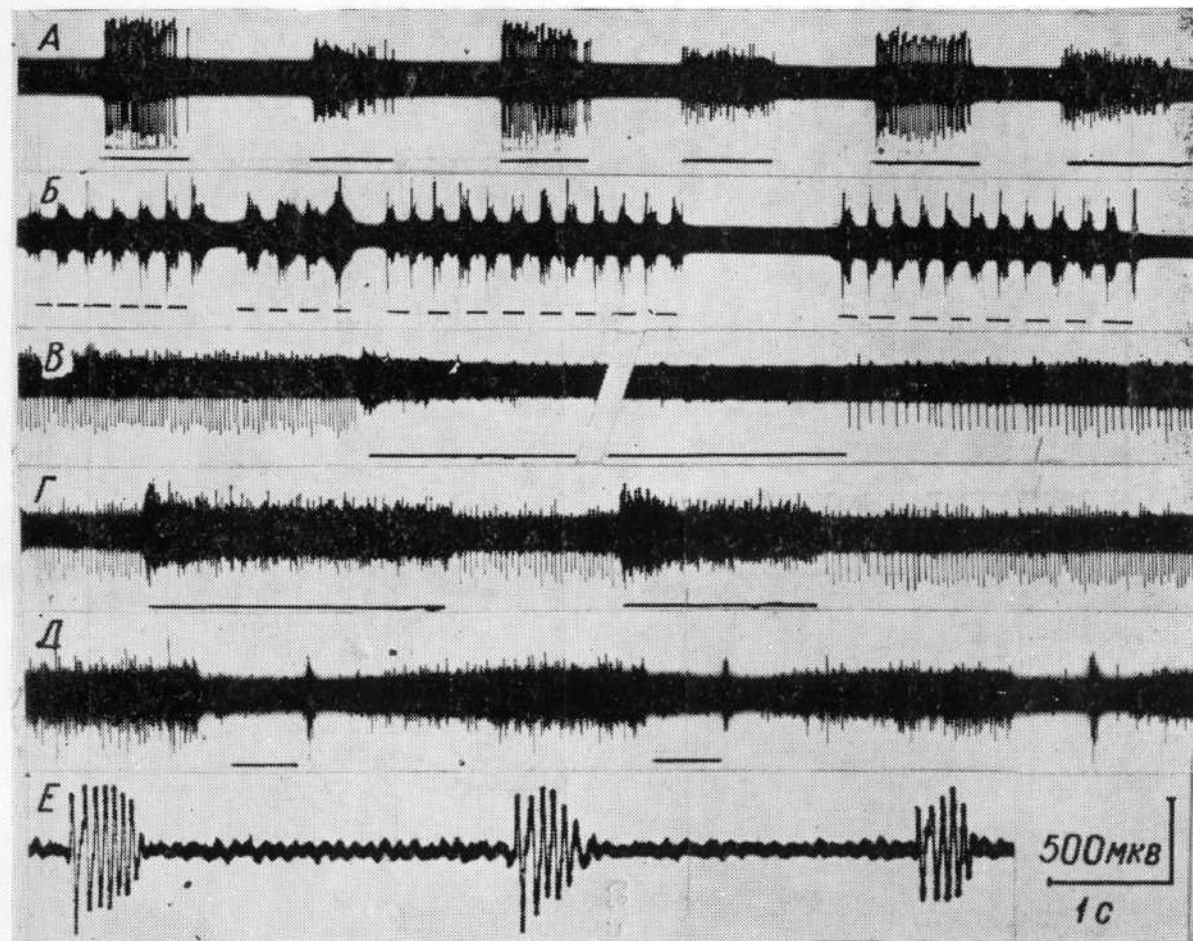


Рис. 2. Импульсная и медленная активность в зрительной доле кальмара.

Отметка раздражения соответствует включенному свету. А — одиночное зрительное волокно, разница амплитуд серий импульсов вызвана смещением электрода во время дыхательных движений; Б — волокно типа «А», частота вспышек задается от руки; В — нейрон со спонтанной активностью в темноте и торможением на свету, включение света вызывает залп волокон из другого слоя доли; Г — суммарный ответ волокон типа «А» и нейрона типа «В»; Д — ответ нейрона типа «В» при эксцентричном положении источника света в рецептивном поле; Е — медленные колебания при стимуляции глаза фото-вспышкой

- Орлов О. Ю., Кондрашев С. Л. 1978. Цветоразличительные функции зрительных проекций лягушки. В сб.: Механизмы зрения животных, М., «Наука»: 135—165.
- Boycott B. B., Lettvin J. Y., Maturana H. R., Wall P. D. 1965. Octopus optic responses. *Exp. Neurol.*, 12: 247—256.
- Daw N. W., Pearlman A. L. 1974. Pigment migration and adaptation in the eye of the squid, *Loligo pealei*. *J. Gen. Physiol.*, 63: 22—36.
- Gesteland R. C., Howland B., Lettvin J. Y., Pitts W. H. 1959. Comments on microelectrodes. *Proc. Inst. Radio Eng.*, 47: 1856—1862.
- Hartline P. H., Lange G. D. 1974. Optic nerve responses to visual stimuli in squid. *J. Comp. Physiol.*, A 93: 37—54.
- Lange G. D., Hartline P. H. 1974. Retinal responses in squid and octopus. *J. Comp. Physiol.*, A 93: 19—36.
- Lettvin J. Y., Maturana H. R., McCulloch W. S., Pitts W. H. 1959. What the frog's eye tells the frog's brain? *Proc. Inst. Radio Eng.*, 40: 1940—1951.
- Tsukahara Y., Tamai M., Tasaki K. 1973. Oscillatory potentials of the octopus retina. *Proc. Jap. Acad.*, 49: 57—62.
- Young J. Z. 1971. The anatomy of the nervous system of *Octopus vulgaris*. Oxford, Clarendon Press: 1—690.

Поступила 16 V 1980

ELECTROPHYSIOLOGICAL INVESTIGATION OF VISUAL NEURONS OF CEPHALOPODS

O. Yu. Orlov, S. L. Kondrashev,
and V. F. Gnyubkin

UDC 612.84:594.5
PHYSIOLOGY

The authors describe a method of neurophysiological experiments on squid under urethane anesthesia. Responses of on-type elements are recorded from the surface of the optic lobe. Discharges of a rhythmic character were present throughout the entire illumination period. The receptive fields of these elements were 1.5–4°. Two types of elements were found in the deeper layers of the optic lobe. One responded with a short discharge when the light was turned on, the other revealed spontaneous activity in the dark which was suppressed by light.

Cephalopods, together with vertebrates and arthropods, are one of the three groups of animals with the highest stage of development of the sense organs, nervous system, and behavior. In the level of development of the visual apparatus cephalopods are, without doubt, far superior to arthropods, at least in such indicators as size of the eyes, magnitude of visual centers, and, probably, visual acuity. The completely independent origin of a perfect

Laboratory of Sense Organs, Institute of Problems of Information Transmission, Academy of Sciences of the USSR, Moscow 103051. Group of Comparative Physiology of the Nervous System, Institute of Marine Biology, Far East Science Center, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok 690022. Translated from *Biologiya Morya*, No. 3, pp. 50–54, May–June, 1981. Original article submitted May 16, 1980.

Soviet Journal of Marine Biology, 1981, v 7.