

К. А. Судоплатов, А. В. Сычёв

СПЕКТРАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ТЕНЕВОГО РЕФЛЕКСА У ПОЛОВОЗРЕЛЫХ ОСОБЕЙ
ПРУДОВИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*LYMNAEA STAGNALIS* L.)

*Сравнительное исследование спектральной зависимости проявления теневого оборонительного рефлекса у интактных и обезглавленных половозрелых особей прудовика обыкновенного (*Lymanaea stagnalis* L.) показало запускающую роль кожной и тормозящую роль глазной фоторецепции. Форма кривой и уточненный спектральный максимум поглощения кожного светочувствительного пигмента, соответствующий 490 нм, позволяют предположить присутствие родопсинаподобного пигмента в кожных фоторецепторах.*

*Comparative research on spectral dependence between the appearance of shadow defensive reflex in intact and eyeless adults of *Lymanaea stagnalis* proved the excitatory role of dermal photoreception and the inhibitory role of the ocular one. The shape of the curve and the modified spectral maximum of the absorption of dermal light-sensitive pigment (490 nanometers) allow the authors to suppose the presence of rhodopsin-like pigment in dermal photoreceptors.*

Ключевые слова: теневой рефлекс, фоторецепция, темновая стимуляция, *Lymanaea stagnalis* (L.), спектральный максимум.

Key words: shadow reflex, photoreception, dark stimulation, *Lymanaea stagnalis* (L.), spectral maximum.

Введение

Свет — как один из основных экологических факторов — играет важную роль в жизни всех живых организмов на Земле. Его физические свойства обуславливают протекание множества биохимических процессов как в животных, так и в растительных организмах [2]. Простейшей формой влияния световой стимуляции на поведение может служить реакция положительного фототаксиса, например у моллюсков [4; 6; 7].

Отсутствие света — как не менее важный фактор — становится источником формирования разнообразных защитных поведенческих механизмов у различных видов животных.

Комплекс двигательных реакций брюхоногих моллюсков на резкое снижение освещенности кожи, включающий втягивание тела животного в раковину и сокращение щупалец, известен под названием теневого оборонительного рефлекса [5]. Принципиальные черты его проявления у *L. stagnalis* сохраняются после удаления глаз, что послужило основанием для заключения о ведущей роли кожной фоторецепции в осуществлении этой реакции [1; 4].

Цель данной работы — сравнительное исследование спектральной зависимости проявления теневого оборонительного рефлекса у интактных и обезглавленных половозрелых особей прудовика обыкновенного *L. stagnalis* и уточнение максимума поглощения кожного светочувствительного пигмента при использовании современных компьютерных технологий для регистрации темновой двигательной активности животных при минимальном нежелательном воздействии на последних.

Материалы и методы

Исследования проводились на половозрелых особях прудовика обыкновенного *L. stagnalis*, выловленных в прудах Калининграда. Из особей с высотой раковины около 30–35 мм были сформированы 2 группы по 10 особей в каждой: 1) интактные животные, 2) животные с удаленными глазами. Обезглаживание (экстрипацию) осуществляли после анестезии животного в растворе ультракаина.

Для изучения влияния спектральной характеристики света на динамику проявления теневого рефлекса *L. stagnalis* была собрана экспериментальная установка (рис. 1).

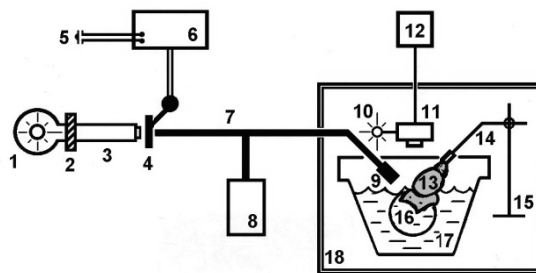


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для наблюдения и регистрации поведенческой активности *L. stagnalis* (пояснения в тексте)

Животное (13) неподвижно фиксировали за вершину раковины на стержне (14), зажатом в штативе (15) таким образом, чтобы моллюск мог свободно открывать пневмомом и дышать, а также ползать на шарике (16), плавающем в стеклянном сосуде (17). Тело улитки оставалось покрытым водой из аквариума, где содержались животные. От сторонних источников света животное изолировала светонепроницаемая камера (18). Световой пучок от лампы (1) подается через диафрагму (2) на входную щель монохроматора МСД-1 (3), по световолоконным жгутам (7) в экспериментальную камеру (18) и на фотодиод фотометра (8), значения интенсивности стимулирующего света с которого в относительных единицах считывались вольтметром. Пучок света подавался на головной отдел тела прудовика с помощью конденсора (9). Необходимое значение длины волны выставлялось блоком управления монохроматора МСД-1 (3). Постоянство интенсивности света для разных длин волн устанавливалось диафрагмой (2). Инфракрасный светодиод (10) ($\lambda = 800$ нм), доказанно не оказывающий никакого влияния на животное, позволял фиксировать состояние последнего в полной темноте (темновой стимул) посредством веб-камеры Creative Web Cam Pro (11), подключенной к персональному компьютеру (12). Животное стимулировалось в течение 1 мин светом заданной длины волны, а затем на 10 с свет выключался. В это время и производилась запись реакции моллюска. На каждой длине волны подавалось 20 стимулов. Периодичность подачи световых и темновых стимулов производилась при помощи запирающей шторки (4), регулируемой электростимулятором ЭС-50–1 (6) через выносную кнопку (5).

Запись видеоданных поведения животного при световой и темновой стимуляции производилась на жестком диске персонального компьютера в программе «Pc Cam Center» со следующими параметрами видеозаписи: размер кадра 320×240 пикселей, формат сжатия IR45, скорость передачи данных 16 кбит/с, размер видеобразца 24 бит, качество Quality 70. Просматривались и анализировались видеоматериалы в программе Media Player Classic Homecinema v.1.0.9.0.

Для выявления максимумов проявления теневого рефлекса были выбраны следующие значения длин волн видимого света (нм): 1) 410, 450, 490, 530, 570, 610 – для группы интактных животных; 2) 400, 440, 480, 490, 500, 540, 560, 580, 620 – для животных с удаленными глазами. Несовпадение выбранных длин волн у интактных и оперированных моллюсков давало возможность отследить процессы привыкания у животных при различных шагах выбранных диапазонов видимой части спектра.

Оценка двигательного компонента теневого рефлекса, а также силы проявления реакции осуществлялась по восьмибалльной шкале, предложенной Столом [5], где крайние варианты: 0 – соответствует полному отсутствию реакции животного на затенение, 8 – максимальному втягиванию тела и обоих щупалец животного. По этой шкале оценивалась как сила проявления реакции, так и начальное положение моллюска перед применением теневого стимула.

По результатам экспериментов вычислялась сила реакции (F_λ):

$$F(\lambda) = \frac{1}{20R_{\max}} \sum_{i=1}^{20} (R_1 - R_2), \quad (1)$$

где $\sum(R_2 - R_1)_{20}$ – сумма разности силы проявления (R_2) реакции и начального положения моллюска (R_1) перед стимуляцией, число 20 соответствует количеству темновых стимулов; $20R_{\max}$ – число стимулов, умноженное на значение максимально выраженной реакции в ответ на стимул – 8 (в соответствии со шкалой оценки по Столу [5]).

На основе полученных значений (F_λ) рассчитывалась средняя сила реакции 10 моллюсков для каждой исследуемой длины волны (λ):

$$F(\lambda)_{av} = \frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} F(\lambda), \quad (2)$$

где: $\Sigma F\lambda_{10}$ — сумма силы реакции каждой длины волны для каждого из 10 экспериментальных животных, число 10 — количество животных.

Для полученных максимумов спектральной чувствительности двух групп экспериментальных моллюсков, соответствующих 490 нм, теоретически вычислялась кривая поглощения светочувствительного родопсиноподобного пигмента для $\lambda_{max} = 490$ нм по следующей формуле [3]:

$$S(x) = \frac{1}{\exp[A(a-x)] + \exp[B(b-x)] + \exp[C(c-x)]}, \quad (3)$$

где $A = 69,7, a = 0,88, B = 28, b = 0,922, C = -14,9, c = 1,104, D = 0,674;$

$x = \lambda_{max}/\lambda$, максимальное значение для рассчитываемого диапазона,

λ_{max} соответствует 490 нм; λ — значение вычисляемой длины волны.

По вычисленным значениям $S(x)$ была построена кривая поглощения светочувствительного пигмента родопсина (A_1) $\lambda_{max} = 490$ нм, которая затем накладывалась на графики спектральной чувствительности.

Результаты и обсуждение

Для всех улиток характерно сходство динамики рефлекса на повторную теньевую стимуляцию, когда наблюдается «выпадение» отдельных ответов (рис. 2). Полученные флуктуации, по-видимому, отражают колебания порога чувствительности животного к темновому стимулу, а также изменение функционального состояния центральных звеньев управления реакцией. Кроме того, эти периодические «выпадения» ответов можно связать со степенью готовности животного к рефлексу [1].

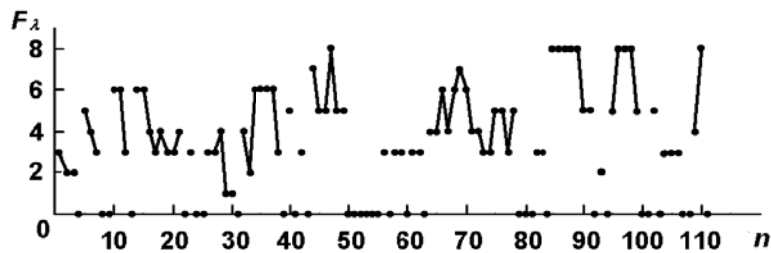


Рис. 2. Динамика проявления теневого рефлекса *L. stagnalis*. Данные получены от интактной особи после теневого стимулирования для фонового освещения $\lambda \approx 490$ нм. Ось абсцисс — номер стимула n , ось ординат — сила реакции F_λ

Кривая зависимости силы реакции от спектральной характеристики светового пучка, применяемого для стимуляции *L. stagnalis*, обнаруживает спектральный максимум поглощения светочувствительного пигмента для $\lambda = 490$ нм (рис. 3), совпадающий для обеих групп моллюсков.

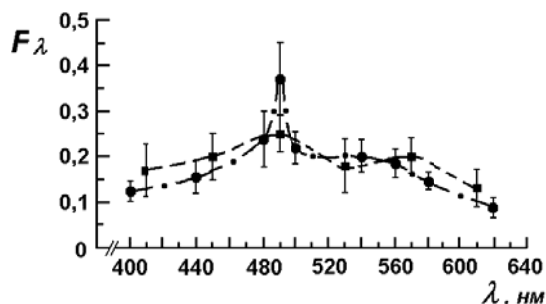


Рис. 3. Изменение силы проявления теневого рефлекса у интактных (- -) и ослепленных (- · -) *L. stagnalis* при разных длинах волн фонового освещения одной интенсивности. Ось абсцисс — длина волны λ (нм); ось ординат — сила реакции F_λ ; вертикальные линии — стандартное отклонение

Кроме того, полученная кривая совпадает со спектром поглощения родопсиноподобных пигментов, в частности родопсина A_1 для $\lambda_{max} = 490$ нм (рис. 4) [3].

При сравнении значений силы ответов интактных и безглазых моллюсков по t-критерию Стьюдента ($p \leq 0,05$) для независимых выборок получили достоверные различия для максимальных ответов у этих двух групп животных. Для зависимых выборок в диапазоне 440–540 нм значения максимальных ответов внутри каждой группы также статистически достоверно отличны.

Ниже (рис. 4) представлены аппроксимированные к единице графики динамики силы проявления теневого рефлекса реакции F_λ при разных длинах волн фонового освещения одной интенсивности, рассчитанные по формуле (2), наложенные на кривую поглощения родопсина (A_1), рассчитанную для $\lambda_{\max} = 490$ нм по формуле (3).

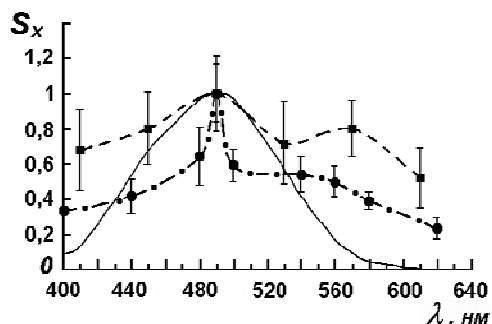


Рис. 4. Аппроксимированная к единице динамика проявления силы теневого рефлекса для разных длин волн фонового освещения одной интенсивности у интактных (- -) и ослепленных (- · -) *L. stagnalis*; графики наложены на кривую поглощения родопсина (A_1), рассчитанную для $\lambda_{\max} = 490$ нм (—); вертикальные линии — стандартное отклонение

Оценивая графики спектральной чувствительности для интактных и безглазых моллюсков, можно сделать предположения относительно роли глаз в проявлении теневого рефлекса. Во-первых, проявление теневого рефлекса осуществляется неглазной фоторецепцией, что ранее было доказано Столом [5]. Во-вторых, менее ярко выраженный максимум спектральной чувствительности у интактных животных свидетельствует в пользу того, что глаза, обеспечивая ориентационное поведение *L. stagnalis* наряду с положительным фототаксисом, не влияют на сам факт проявления теневого рефлекса, а лишь изменяют силу его проявления, оказывая тормозное влияние.

Зауженный диапазон максимумов спектральной чувствительности у моллюсков с удаленными глазами (рис. 3, 4), возможно, объясняется наличием в коже *L. stagnalis* экранирующего пигмента, который поглощает в определенном диапазоне длин волн.

Авторы выражают благодарность В.В. Жукову за оказанную помощь в проведении расчетов и сделанные замечания.

Список литературы

1. Жуков В.В., Король Е.В. Исследование теневого рефлекса брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* // Ж. эвол. биохим. и физиол. 1994. Т. 30. С. 198–207.
2. Шилов И.А. Экология. М., 1997.
3. Govardovskii Victor I., Fyhrquist N., Reuter T. et al. In search of the visual pigment template // Visual Neuroscience. 2000. №17. P. 509–528.
4. Stoll C.J. On the role of eyes and non-ocular light receptors in orientational behaviour of *Lymnaea stagnalis* (L.) // Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. 1973. Vol. C76, P. 204–214.
5. Stoll C.J. Sensory systems involved in the shadow response of *Lymnaea stagnalis* as studied with the use of habituation phenomena // Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. 1972. Vol. 75C, №4. P. 342–351.
6. Vakoljuk I.A., Zhukov V.V., Makarenko T.P. Spectral investigations of photoorientational behaviour of *Lymnaea stagnalis* L. // Abstr. Reg. Meet. Int. Soc. Inv. Neurobiol., Pushchino. 1994. P. 49.
7. Duivenboden Y.A. van. Non ocular photoreceptors and photoorientation in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.) // J. Comp. Physiol. 1982. Vol. 149. P. 363–368.

Об авторах

К.А. Судоплатов — ст. преп., РГУ им. И. Канта, ksudoplatov@mail.ru
 А.В. Сычѳв — студ., РГУ им. И. Канта.

Authors

K. A. Sudoplatov, Assistant Professor, IKSUR, ksudoplatov@mail.ru
A. V. Sychov, student, IKSUR.