

DOI: 10.7868/S2658655X26030095  
УДК 612

Экспериментальная статья

## Роль цАМФ в адаптации красночувствительных колбочек рыб данио рерио: электрофизиологическое исследование на уровне одиночных клеток и всей сетчатки

Я.С. Веселов<sup>1</sup>, Г.Е. Громова<sup>1</sup>, А.Д. Калита<sup>1</sup>, Д.А. Николаева<sup>1</sup>,  
Л.А. Астахова<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Российская Федерация

\*E-mail: lubkins@yandex.ru

**Аннотация.** Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), хотя и не является ключевым участником каскада фототрансдукции, потенциально может его модулировать. Эффекты цАМФ широко исследованы на палочках; однако его роль в фоторецепторах дневного зрения – колбочках изучена недостаточно. Целью настоящего исследования было оценить влияние повышенного уровня цАМФ на кинетические параметры фотоответа и чувствительность к свету красночувствительных (КЧ) колбочек сетчатки взрослых рыб *Danio rerio*. В работе были использованы два электрофизиологических метода: *ex vivo* электроретинография с выделением ответа КЧ-колбочек и регистрация тока одиночных фоторецепторов при помощи всасывающей пипетки. Для повышения внутриклеточного уровня цАМФ использовали активатор аденилатциклазы форсколин. Исследование характеристик ответов выявило, что форсколин не влияет на чувствительность КЧ-колбочек при сравнении с контрольными группами. Детальный анализ кинетики ненасыщенных ответов КЧ показал, что форсколин, подобно его эффектам на палочки амфибий, а также сине- и зеленочувствительные колбочки рыб данио, замедляет процесс выключения каскада фототрансдукции и одновременно увеличивает время интегрирования ответа. При активации каскада они остаются неизменными при воздействии форсколина. В то же время анализ восходящей фазы фотоответа ближе к своему пиковому значению показал, что более быстрый этап выключения каскада ускоряется еще больше под действием форсколина. В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что повышение внутриклеточного уровня цАМФ способно модулировать каскад фототрансдукции КЧ-колбочек *Danio rerio*, однако, в отличие от других исследованных спектральных типов колбочек, это не приводит к изменению их чувствительности к свету. Модуляция же процессов выключения каскада в КЧ-колбочках является наиболее выраженной.

**Ключевые слова:** фоторецептор, колбочка, цАМФ, данио рерио, адаптация

*Финансирование.* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-00260).

*Соблюдение этических стандартов.* Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокол № 1-1/2024 от 31.01.2024 г.).

*Конфликт интересов.* Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

*Вклад авторов в публикацию.* АЛА – идея работы; АЛА, ВЯС, НДА – планирование экспериментов; ВЯС, ГГЕ, КАД, НДА – сбор данных; ВЯС, ГГЕ, КАД, НДА, АЛА – обработка данных; ВЯС, ГГЕ, КАД, НДА, АЛА – написание и редактирование рукописи.

*Благодарности.* Авторы благодарят Андрея Александровича Жердера за создание некоторых функций анализа фотоответа в пакете Python, Михаила Леонидовича Фирсова за техническую помощь и за предоставленную возможность работы на установке для регистрации тока одиночных фоторецепторов, Максима Владимировича Николаева за техническую помощь, Александра Юрьевича Ротова за плодотворную дискуссию по результатам, представленным в рукописи.

*Ссылка для цитирования:* Веселов Я.С., Громова Г.Е., Калита А.Д., Николаева Д.А., Астахова Л.А. Роль цАМФ в адаптации красночувствительных колбочек рыб данио рерио: электрофизиологическое исследование на уровне одиночных клеток и всей сетчатки. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова / Russian Journal of Physiology.* 2026. Т. 112. № 3. С. 795–818.  
<https://doi.org/10.7868/S2658655X26030095>

DOI: 10.7868/S2658655X26030095

Experimental Article

## The Involvement of cAMP in the Adaptation of Red-Sensitive Cones in Zebrafish: An Electrophysiological Study at the Level of Single Cells and the Entire Retina

Ya.S. Veselov<sup>1</sup>, G.E. Gromova<sup>1</sup>, A.D. Kalita<sup>1</sup>, D.A. Nikolaeva<sup>1</sup>, L.A. Astakhova<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation*

\*E-mail: [lubkins@yandex.ru](mailto:lubkins@yandex.ru)

*Abstract.* Although cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is not a primary component of the phototransduction cascade, it can modulate it. The effects of cAMP have been widely studied in rods, but its role in the photoreceptors responsible for daytime vision, the cones has not been thoroughly investigated. The aim of this study was to examine the effect of elevated intracellular cAMP levels on

the photoresponse kinetics and light sensitivity of red-sensitive cones (RCs) in the retinas of adult zebrafish (*Danio rerio*). Two electrophysiological methods were employed in this study: ex vivo electroretinography with isolating the responses of RCs, and single photoreceptor current recordings performed using a suction pipette. The adenylyl cyclase activator forskolin was used to increase intracellular cAMP levels. The investigation of response characteristics revealed that forskolin did not affect the sensitivity of RCs compared to controls. A detailed analysis of the kinetics of non-saturating responses revealed that forskolin, similarly to its effects on amphibian rods and zebrafish blue- and green-sensitive cones, slows the shutoff of the phototransduction cascade while simultaneously increasing response integration time. The activation stages of the cascade remained unaffected by forskolin. At the same time, analysis of the rising phase of the photoresponse near its peak indicated that the faster component of cascade deactivation was further accelerated by forskolin. Collectively, these data suggest that increased intracellular cAMP levels modulate the phototransduction cascade in zebrafish RCs; however, unlike other cone spectral types, this modulation does not lead to changes in light sensitivity. The most pronounced effect of cAMP is observed in the cascade shutoff processes in RCs.

*Keywords:* photoreceptor, cone, cAMP, zebrafish, adaptation

*Funding.* This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-25-00260).

*Ethics declarations.* The animal experiments were conducted in accordance with international guidelines for biomedical research with laboratory animals and were approved by the Ethics Committee of the Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. 1-1/2024 dated January 31, 2024).

*Conflict of interests.* The authors declare that there are no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

*Authors contribution.* ALA – idea of the work; ALA, VYaS, NDA – planning of experiments; VYaS, GGE, KAD, NDA – data collection; VYaS, GGE, KAD, NDA, ALA – data processing; VYaS, GGE, KAD, NDA, ALA – writing and editing of the manuscript.

*Acknowledgements.* The authors thank Andrey Aleksandrovich Zherder for creating some of the functions for analyzing the photoresponse in the Python package, Mikhail Leonidovich Firsov for technical assistance and for providing the opportunity to work on the setup for recording the current of single photoreceptors, Maxim Vladimirovich Nikolaev for technical assistance, and Alexander Yurievich Rotov for valuable discussion of the results presented in the manuscript.

*For Citation:* Veselov Ya.S., Gromova G.E., Kalita A.D., Nikolaeva D.A., Astakhova L.A. The involvement of cAMP in the adaptation of red-sensitive cones in zebrafish: an electrophysiological study at the level of single cells and the entire retina. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova / Russian Journal of Physiology*. 2026;112(3):795–818. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S2658655X26030095>

## ВВЕДЕНИЕ

Фототрансдукция в сетчатке представляет собой процесс преобразования светового сигнала в электрический ответ фоторецепторов. Регуляция этого процесса в фоторецепторах дневного зрения — колбочках играет ключевую роль в их адаптации к изменяющимся световым условиям внешней среды и поддержании стабильности зрительного восприятия при дневном свете. Ранее регуляция фототрансдукции традиционно рассматривалась преимущественно в контексте кальций-зависимых обратных связей. Согласно общепринятым представлениям, снижение уровня кальция в цитозоле наружных сегментов фоторецепторов, которое возникает вследствие закрытия цГМФ-зависимых катионных каналов плазматической мембраны при воздействии света, влияет одновременно на несколько этапов каскада фототрансдукции и существенно, однако не полностью объясняет наблюдаемую степень световой адаптации [1]. Этот факт послужил стимулом для начала исследований, направленных на обнаружение новых, пока еще не изученных механизмов, обеспечивающих тонкую подстройку каскада фототрансдукции в ответ на изменение освещенности. Эти поиски сохраняют свою актуальность и значимость и в настоящее время. В последнее десятилетие накоплены убедительные данные о том, что внутриклеточный вторичный мессенджер — циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) играет значимую роль в регуляции зрительных процессов [2, 3]. Для фоторецепторов сумеречного зрения — палочек — показано, что повышение внутриклеточного уровня цАМФ заметно увеличивает их чувствительность к свету, а также улучшает соотношение сигнал/шум [4, 5]. Кроме того, содержание цАМФ в сетчатке демонстрирует выраженные циркадные колебания: его уровень повышается в темное время суток и снижается в дневное время, что согласуется с ролью цАМФ в регуляции суточных изменений чувствительности сетчатки [6, 7]. Наиболее изученные мишени цАМФ в фоторецепторных клетках — G-белок-сопряженные рецепторные киназы GRK1 и GRK7. Фосфорилирование этих белков под действием протеинкиназы А (РКА) снижает их каталитическую активность, замедляя фосфорилирование опсина и, следовательно, инактивацию зрительного пигмента [8]. Тем самым цАМФ, вероятно, способен опосредованно влиять на кинетику фотответа и чувствительность фоторецепторов к свету, что ранее было продемонстрировано на палочках. Колбочки, как фоторецепторы дневного зрения, обладают значительно более низкой чувствительностью к свету, чем палочки, что позволяет им не насыщаться даже при самых ярких, существующих в природе уровнях освещенности. цАМФ-опосредованные регулирующие механизмы в колбочках могут существенно отличаться от таковых в палочках, в том числе и по причине другого профиля экспрессии GRKs. Однако влияние цАМФ на фототрансдукцию в колбочках изучено не в полной мере, а существующие результаты зачастую противоречивы, что диктует необходимость дальнейших исследований для понимания роли цАМФ и его возможных адаптивных функций.

Рыбы данио (*Danio rerio*) представляют собой оптимальную модель для исследования особенностей модуляции каскада фототрансдукции в дневных фоторецепторах: у них хорошо охарактеризован спектральный состав колбочек (УФ-, сине-, зелено- и красночувствительные) и доказана экспрессия GRK1b/GRK7a, аналогичная таковой у человека [9, 10]. Недавние электрофизиологические исследования на одиночных колбочках показали, что активация аденилатциклазы форсколином у взрослых рыб данио повышает уровень цАМФ и приводит к увеличению

их чувствительности и значительному замедлению выключения фототрансдукционного каскада в зелено- и синечувствительных колбочках [11]. В то же время исследование на целых сетчатках личинок этих рыб не выявило значимых сдвигов в параметрах фотоответов под действием форсколина [12], что может быть связано с возрастными особенностями развития сетчатки и/или совокупным влиянием колбочек разных спектральных типов целой сетчатки. Вопрос о существовании возможной зависимости эффекта цАМФ на каскад фототрансдукции от спектральной специализации колбочек остается открытым и требует дальнейшего системного анализа. При этом роль цАМФ в регуляции функций красночувствительных (КЧ) колбочек, ответственных за восприятие длинноволнового диапазона, до сих пор не изучена.

Таким образом, цАМФ-зависимая регуляция может быть важным звеном модуляции фототрансдукции, дополняющим кальций-зависимые механизмы световой адаптации. Цель настоящей работы – изучить влияние повышения внутриклеточного уровня цАМФ, вызванное форсколином (активатором аденилатциклазы), на чувствительность и кинетику фотоответов красночувствительных колбочек сетчатки взрослых рыб *Danio rerio*.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Экспериментальные животные*

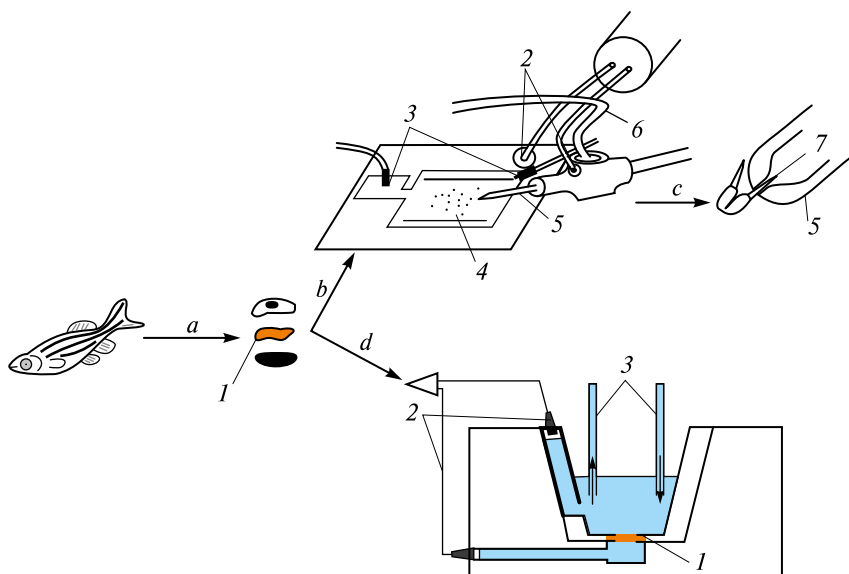
Работа проводилась на взрослых рыбах *Danio rerio* дикого типа, которые приобретались в зоомагазинах Санкт-Петербурга. В лаборатории рыб содержали в аквариумах объемом 15 литров по 6 особей в каждом. Животных кормили сухим кормом и замороженным мотылем и содержали в условиях смены дня и ночи 12 : 12 ч. Перед экспериментом животные проходили темновую адаптацию в течение ночи в рамках установленного светового цикла, чтобы не нарушать их обычный суточный цикл.

### *Используемые растворы*

В качестве основного раствора для препарирования, приготовления и перфузии препаратов одиночных фоторецепторов использовали раствор Рингера, содержащий в мМ: NaCl 102, KCl 2,6, MgCl<sub>2</sub> 1, глюкозу 5, CaCl<sub>2</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 28, HEPES 5; уровень pH доводился до 7,8–8,0 добавлением 0,1 М раствора NaOH; осмоляльность раствора Рингера составляла 290–300 мОсм/кг. Раствор, используемый для приготовления и хранения препаратов сетчатки для электроретинографии (ЭРГ) *ex vivo*, не содержал CaCl<sub>2</sub>, однако дополнительно был добавлен MgCl<sub>2</sub> в компенсирующей концентрации (до 2 мМ). Рабочий раствор с форсколином (10 мкМ) готовили непосредственно перед экспериментом разведением сток-раствора (10 мМ форсколина в ДМСО) в растворе Рингера. В контрольной группе использовали эквивалентный объем чистого ДМСО (0,1% от конечного объема). Также для проверки возможного негативного влияния ДМСО на изолированные колбочки была введена дополнительная контрольная группа с чистым раствором Рингера. Селективный ответ фоторецепторов выделяли посредством добавления в перфузионный раствор аспартата натрия (в конечной концентрации 10 мМ). Все реактивы были приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США).

### Приготовление препаратов сетчатки и одиночных колбочек

Для исследования эффектов форсколина, повышающего внутриклеточный уровень цАМФ, на фотоответы красочувствительных колбочек в исследовании были использованы два взаимодополняющих электрофизиологических метода: 1) регистрация тока одиночных фоторецепторов при помощи всасывающей пипетки и 2) электроретинографическое отведение от изолированной сетчатки (ЭРГ *ex vivo*) (рис. 1). Важно отметить, что для двух указанных методов использовались разные экспериментальные установки, и приготовление препаратов также различалось некоторыми деталями. В обоих случаях рыб сначала умерщвляли путем декапитации, затем под бинокулярным микроскопом выделяли глаза, удаляли переднюю камеру и хрусталик и осторожно извлекали сетчатку.



**Рис. 1.** Схематическое изображение двух экспериментальных методов для изучения ответов КЧ-колбочек (регистрация тока одиночных фоторецепторов при помощи всасывающей пипетки (сверху) и ЭРГ *ex vivo* (снизу)): *a* – выделение изолированной сетчатки из глаза рыб данио; *b* – приготовление суспензии фоторецепторов и ее перенос в перфузионную камеру установки для регистрации тока одиночных клеток; *c* – всасывание изолированной колбочки в пипетку и регистрация ее фотоответов; *d* – размещение изолированной (целой) сетчатки в камере Уссинга для регистрации ЭРГ *ex vivo*; 1 – сетчатка, 2 – электроды, 3 – система перфузии, 4 – суспензия фоторецепторов, 5 – всасывающая пипетка, 6 – масляная система для регулирования давления в пипетке, 7 – красочувствительная колбочка

**Fig. 1.** Schematic representation of two experimental methods for studying the responses of RCs (suction pipette recordings of single photoreceptor currents (top) and *ex vivo* electroretinography (bottom)): *a* – isolation of the retina from the zebrafish eye; *b* – preparation of a photoreceptor suspension and transfer to a perfusion chamber for single-cell current recordings; *c* – suction of an isolated cone into a pipette and recording of its photoresponses; *d* – placement of an intact retina in an Ussing chamber for *ex vivo* ERG recording. 1 – retina, 2 – electrodes, 3 – perfusion system, 4 – photoreceptor suspension, 5 – suction pipette, 6 – oil-based system for regulating the pressure inside the suction pipette, 7 – red-sensitive cone

Для регистрации тока одиночных фоторецепторов изолированную сетчатку помещали в каплю раствора Рингера, аккуратно измельчали на мелкие фрагменты двумя тонкими пинцетами и несколько раз пипетировали с помощью механического дозатора для выделения свободно плавающих фоторецепторов. Полученную суспензию маленьких фрагментов и клеток сетчатки переносили в перфузионную камеру экспериментальной установки для регистрации тока фоторецепторов с помощью всасывающей пипетки.

Для ЭРГ *ex vivo* целую сетчатку аккуратно помещали на кусочек фильтровальной бумаги, размещенной в чашке Петри с небольшим количеством раствора Рингера, таким образом, что фоторецепторный слой был направлен на экспериментатора. После размещения препарата сетчатки в камере Уссинга камеру с сетчаткой переносили в установку для эксперимента.

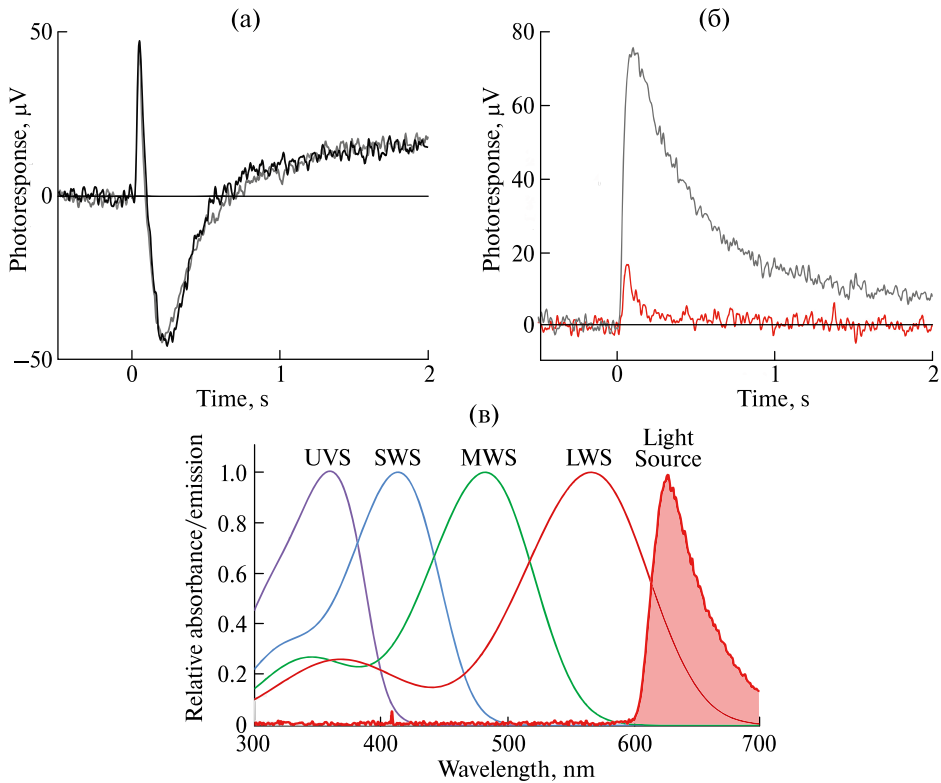
Все описанные процедуры проводили в условиях тусклой красной подсветки (налобный фонарь, подсветка бинокулярного микроскопа) с  $\lambda > 660$  нм, при комнатной температуре (18–22 °С).

#### *Селективное выделение электроретинографического ответа красночувствительных колбочек*

Тотальная ЭРГ *ex vivo* от изолированной сетчатки содержит как минимум две волны: а-волну, проявляющуюся непосредственно после предъявления светового стимула и представляющую собой суммарную активность различных типов фоторецепторов; и b-волну, развивающуюся позднее, отражающую активность клеток других слоев сетчатки, преимущественно биполярных клеток (рис. 2а). Селективный ответ фоторецепторов выделяли посредством добавления в перфузионный раствор аспартата натрия (в конечной концентрации 10 мМ). Для выделения ответа только красночувствительных колбочек использовали белые LED (серии LXHL, Lumileds) с применением красного стеклянного светофильтра (КС-11 с  $\lambda > 600$  нм); сопоставление конечных спектров источника света и спектров чувствительности разных типов колбочек ( $\lambda_{\max}(\text{UV}) = 361$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{SWS}) = 414$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{MWS}) = 483$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{LWS}) = 567$  нм,  $\lambda_{\max}(\text{Rod}) = 505$  нм) [13, 14]) представлено на рис. 2в.

#### *Экспериментальный протокол ЭРГ ex vivo*

После размещения препарата сетчатки в камере Уссинга, его переносили в экспериментальную установку с проточной системой гравитационной перфузии (скорость протекания раствора 1–1,5 мл/мин). Световые стимулы подавали на препарат сетчатки сверху (на слой фоторецепторов) с помощью светодиодов. В начале протокола оценивали стабильность препарата, предъявляя два контрольных стимула (длительность 2 мс, интервал 5 мин) (примеры ответов на рис. 2а). Препарат сразу исключали из эксперимента, если амплитуда ответов различалась более чем на 30%. Далее в перфузионный раствор добавляли 10 мМ аспартата натрия для подавления активности пострецепторных нейронов сетчатки и регистрировали изолированную а-волну. После этого для выделения ответа красночувствительных колбочек между источником света и препаратом устанавливали стеклянный фильтр КС11, в результате чего свет стимулов становился красным, с заданным спектром (рис. 2б). Каждому препарату предъявляли серию вспышек нарастающей интегральной яркости. Стимулы нарастающей яркости предъявляли длительно-стью 2 мс, затем предъявляли вспышки двух светодиодов длительностью 8 и 64 мс.



**Рис. 2.** Схема экспериментальных условий и процесса выделения фотоответов красночувствительных колбочек с использованием метода ЭРГ *ex vivo*: (а) – примеры тотального ответа ЭРГ препарата сетчатки на контрольные стимулы; (б) – пример выделенной а-волны (серый) того же препарата после перфузии раствором с аспаратом натрия и селективного ответа красночувствительных колбочек (красный); (в) – спектральные чувствительности четырех типов колбочек у рыб *Danio rerio* (UVS – УФ чувствительные, SWS – синечувствительные, MWS – зеленочувствительные, LWS – красночувствительные) и спектр излучения светового стимула, формируемого белым светодиодом с наложенным стеклянным светофильтром KS-11

**Fig. 2.** Experimental conditions and the protocol for isolating photoresponses of RCs using *ex vivo* ERG: (a) – representative full-field ERG responses of retinal preparations to light stimulation; (b) – example of an isolated a-wave (grey) obtained after perfusion with sodium aspartate, revealing the selective response of red-sensitive cones (red); (c) – spectral sensitivities of zebrafish cone types *Danio rerio* (UVS – ultraviolet-sensitive, SWS – short-wavelength-sensitive, MWS – medium-wavelength-sensitive, LWS – long-wavelength/red-sensitive) and the emission spectrum of the light stimulus generated by a white LED combined with a KS-11 glass filter

Ответы на каждой интенсивности усредняли по 15–25 повторениям. Затем перфузионный раствор заменяли на раствор, содержащий 10 мкМ форсколина или 0,1% ДМСО (контроль). Через 20 мин перфузии одним из указанных растворов протокол стимуляции повторяли с теми же параметрами.

Система регистрации ЭРГ *ex vivo* управлялась с помощью платы ввода-вывода PCI-DAS-1602 (Measurement Computing, Norton, Массачусетс, США). Управляющая

программа была написана в лаборатории эволюции органов чувств Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН В.И. Говардовским в среде Microsoft Visual Basic 96 с использованием программной библиотеки Measurement Computing Universal Library. Первичная обработка данных (коррекция нулевой линии, сглаживание) производилась с использованием написанной обрабатывающей программы на основе Microsoft Visual Basic 96.

Для записи ЭРГ ответов использовали усилитель с коэффициентом усиления  $\times 200$ , с фильтром нижних частот 30 Гц и частотой дискретизации 500 Гц.

#### *Регистрация тока изолированных колбочек и определение их спектрального типа*

Для регистрации тока одиночных фоторецепторов использовался метод всасывающей пипетки [15] с некоторыми модификациями. Созданная в лаборатории экспериментальная установка позволяет не только записывать токи одиночных фоторецепторов, но и надежно определять их спектральные типы с помощью системы быстрого переключения световых стимулов с разной длиной волны, благодаря чему мы смогли идентифицировать три из четырех спектральных типов колбочек (сине-, зелено- и красночувствительные), присутствующих в сетчатке рыб данио.

Система световой стимуляции установки состояла из двух независимых каналов, в каждом из которых установлены светодиоды высокой мощности с разными спектральными характеристиками. Интенсивность светодиодов обоих каналов регулировалась компьютером: пошагово с помощью нейтральных (ND) фильтров, размещенных в оптическом луче, и непрерывно, с использованием светодиодов. Первый канал был оснащен светодиодом с длиной волны излучения  $\lambda_{\text{max}} = 525$  нм (зеленый свет), а второй канал — переключаемыми светодиодами с  $\lambda_{\text{max}} = 460, 525$  и 630 нм (синий, зеленый и красный свет соответственно). Процессы получения данных, синхронизация стимулов и интенсивность вспышек точно контролировались с помощью аппаратной платы National Instruments и программного обеспечения LabView 16.0 (National Instruments, Остин, Техас, США). Определение спектрального типа колбочек проводилось путем анализа их ответов на последовательно предъявляемые стимулы зеленого, синего и красного света.

#### *Экспериментальный протокол регистрации тока изолированных красночувствительных колбочек и первичная обработка данных*

Изолированные колбочки в полученной суспензии клеток сетчатки всасывали в стеклянную пипетку внешними сегментами внутрь и регистрировали их ответы на вспышки света с разной длиной волны. Сначала регистрация проводилась в растворе Рингера, затем с помощью системы перфузии раствор Рингера заменяли на раствор, содержащий 10 мкМ форсколина, спустя 20 мин проводили повторную регистрацию ответов согласно установленному протоколу. У контрольных групп вместо форсколина использовали раствор Рингера с ДМСО (0,1% конечная концентрация) или раствор Рингера.

Протокол световой стимуляции начинался с регистрации ответов колбочек на слабые ненасыщающие световые стимулы с разными длинами волн для определения спектрального типа каждой колбочки. Далее последовательно регистрировались серии ответов колбочек на вспышки зеленого света возрастающей интенсивности для последующего построения кривых зависимости амплитуды ответов от интенсивности стимулов и анализа этих кривых. Также к некоторым колбочкам

был применен протокол двойной вспышки для оценки их реакций на последовательные насыщающие вспышки, подаваемые с заданными интервалами времени. Все фотоотчеты колбочек регистрировались с применением фильтра нижних частот 30 Гц и оцифровывались с интервалом 2 мс.

Записи токов колбочек, полученные в экспериментах, обрабатывались с помощью специального программного обеспечения, разработанного в LabVIEW 16.0 и Python 3.8. Для оценки потенциальных изменений в характеристиках реакции колбочек исследовались следующие параметры: темновой ток, чувствительность, скорость активации, скорость выключения фотоответа и время интегрирования.

### Статистический анализ

Статистический анализ проводился в Graphpad Prism 10. Для оценки значимости различий между двумя группами применялся U-критерий Манна–Уитни, между тремя группами – тест Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна, для сравнения одной группы с известным значением (единицей) использовался одновыборочный критерий Вилкоксона. Полученные результаты выражены как отношение параметров после 20-минутной инкубации колбочек в растворе с форсколином (либо с добавлением 0,1% ДМСО, либо в растворе Рингера в случае контрольных групп) к параметрам в растворе Рингера до инкубации. Результаты представлены в виде медианы и квартилей (Q1; Q3). Для определения статистической значимости использовался порог значения  $p$  менее 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящем исследовании мы изучили эффекты форсколина, повышающего внутриклеточный уровень цАМФ, на фотоотчеты КЧ-колбочек двумя взаимодополняющими электрофизиологическими методами – ЭРГ *ex vivo* и регистрацией тока одиночных фоторецепторов при помощи всасывающей пипетки. Работа с изолированными колбочками гарантирует более селективную регистрацию фотоответов от одной колбочки известного спектрального типа, что позволяет провести более точный анализ кинетики этих фотоответов. Однако такой методический подход имеет ряд ограничений: воздействие форсколина возможно только на внутренний сегмент колбочки, тогда как ее наружный сегмент находится внутри всасывающей пипетки и не контактирует с внешним раствором. Кроме того, наблюдается морфологическая неполноценность фоторецептора, связанная с возможным частичным нарушением его целостности при приготовлении суспензии клеток, а также отсутствием ее связи с нижележащими слоями сетчатки. Напротив, метод ЭРГ *ex vivo* преодолевает описанные недостатки метода работы с одиночными фоторецепторами, поскольку при таком подходе колбочки сохраняют связь с сетчаткой, а форсколин воздействует на оба сегмента фоторецептора, включая наружный сегмент, где локализован каскад фототрансдукции. Это позволяет изучать функцию колбочек в условиях, максимально приближенных к естественным, сохраняя целостность и нейронные взаимодействия внутри сетчатки. Таким образом, сопоставление результатов, полученных с помощью этих двух методов, имеет большую ценность и дает возможность получить комплексное представление об изучаемых эффектах, поэтому в последующих подразделах мы представляем данные, полученные двумя методами в параллельном формате.

Также следует обратить внимание на выбор контрольных групп. Форсколин, который в нашем исследовании является основным действующим агентом, нерастворим в воде и требует предварительного растворения в ДМСО. Согласно литературным данным, ДМСО в концентрации ниже 0,5% является нетоксичным для клеток и тканей. Тем не менее мы считаем важным оценивать возможные негативные эффекты этого растворителя именно на изучаемый тип клеток и при концентрации, соответствующей той, которая воздействует на исследуемый объект в растворе форсколина. Также в электрофизиологических экспериментах с тканями или клетками, выделенными из организма, важным фактором является время их нахождения в условиях *ex vivo*. Поэтому в нашей серии экспериментов, выполненных методом ЭРГ *ex vivo*, была одна контрольная группа, которая подвергалась инкубации в растворе с добавлением 0,1% ДМСО. В серии опытов с изолированными колбочками было две контрольные группы: клетки, инкубированные в растворе ДМСО, и клетки, находившиеся в чистом растворе Рингера, при этом время инкубации совпадало с продолжительностью экспериментов с форсколином. В последующих подразделах мы приводим данные статистического сравнения эффектов форсколина относительно перечисленных контрольных групп.

#### *Влияние форсколина на чувствительность КЧ изолированных колбочек и колбочек в составе целой сетчатки*

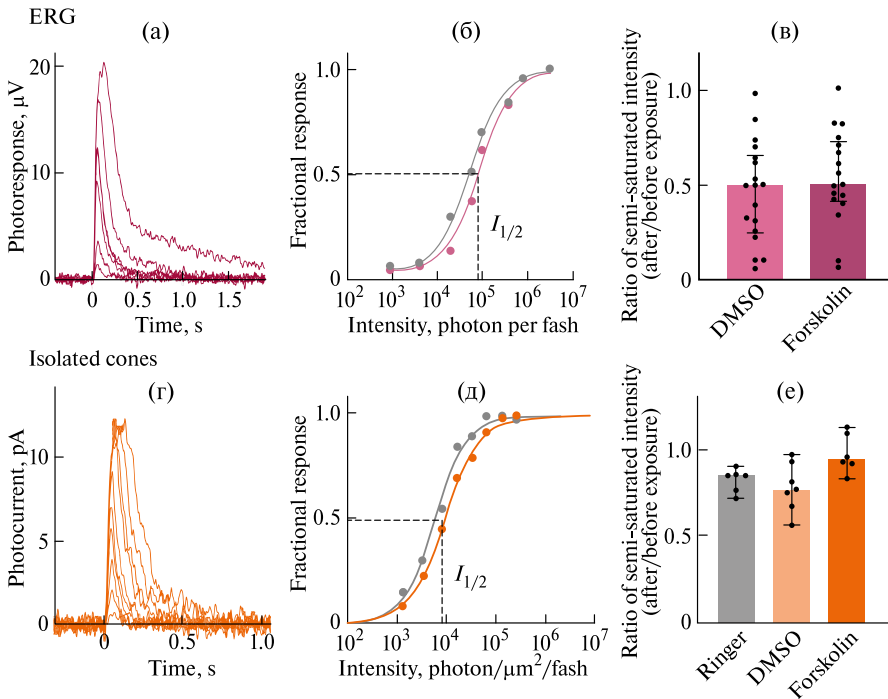
Чтобы исследовать влияние форсколина на чувствительность колбочек в целой сетчатке с помощью ЭРГ *ex vivo*, сначала записывали ответы на серию вспышек с постепенным увеличением интенсивности — от минимально заметных до насыщающих. Затем повторяли ту же серию записей после 20-минутной инкубации сетчатки в растворе форсколина или 0,1% ДМСО (контроль) (рис. 3а). После построения графиков зависимости нормированных по максимальной амплитуде ответов колбочек от интенсивности стимулов оценивали относительные индивидуальные изменения значений полунасыщающей интенсивности. Этот параметр определяли аппроксимируя и кривые ответ-интенсивность уравнением Хилла (рис. 3б).

В обеих исследуемых группах колбочек наблюдалось примерно двукратное уменьшение чувствительности под влиянием как форсколина, так и ДМСО, при этом статистически значимых различий между группами выявлено не было (рис. 3в).

Для оценки влияния форсколина на чувствительность отдельных колбочек был проведен анализ относительных изменений полунасыщающих интенсивностей, которые рассчитывали по тому же принципу, что и для ЭРГ *ex vivo* (рис. 3г, д). Как и в случае с колбочками в составе сетчатки, статистический анализ относительных изменений чувствительности не показал значимых различий между форсколиновой и контрольными группами (рис. 3е).

#### *Влияние форсколина на кинетические параметры ответов изолированных колбочек и колбочек в составе целой сетчатки*

Во время проведения экспериментов ЭРГ *ex vivo* и записей токов от колбочек во всасывающей пипетке визуально наблюдались изменения кинетики и временных параметров ответов, которые наиболее отчетливо проявлялись после 20-минутной инкубации препаратов с форсколином.



**Рис. 3.** Типичные наборы ответов, полученных методом ЭРГ *ex vivo* и при регистрации тока изолированных КЧ-колбочек, и оценка чувствительности к свету: (а) – типичные ЭРГ-ответы КЧ-колбочек на световые стимулы различной интегральной яркости ( $900 - 3 \times 10^6$  фотон/ $\mu\text{м}^2$ /вспышку;  $\lambda_{\text{max}} > 600$  нм); (б) – пример аппроксимации индивидуальных нормированных ответов уравнением Хилла до (серый) и после введения в раствор форсколина (бордовый); (в) – относительные изменения полунасыщающих интенсивностей, определенных согласно протоколу методом ЭРГ *ex vivo* (тест Манна–Уитни,  $p = 0,40$ ), данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; (г) – пример серии записей тока изолированной КЧ колбочки на световые стимулы возрастающей интенсивности ( $409 - 5,2 \times 10^5$  фотон/ $\mu\text{м}^2$ /вспышку;  $\lambda_{\text{max}} = 525$  нм); (д) – пример аппроксимации уравнением Хилла кривых ответ–интенсивность для токов изолированной колбочки, нормированных к темновому (максимальному) току, до (серый) и после (розовый) воздействия форсколина; (е) – относительные изменения чувствительности полунасыщающей интенсивности изолированных КЧ колбочек (тест Краскела–Уоллиса,  $p = 0,14$ ). Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха

**Fig. 3.** Typical sets of responses obtained by *ex vivo* ERG and by recording the current of isolated red-sensitive cones, and assessment of light sensitivity: (a) – typical ERG responses of red-sensitive cones to light stimuli of varying integral brightness ( $900 - 3 \times 10^6$  photons/ $\mu\text{m}^2$ /flash;  $\lambda_{\text{max}} > 600$  nm); (b) – example of the approximation of individual normalized responses using Hill's equation, before (grey) and after the introduction of forskolin into the solution (purple); (c) – Relative changes in half-saturating intensities, determined using the *ex vivo* ERG method (Mann–Whitney test,  $p = 0.40$ ), data are presented as median and interquartile range; (d) – example of a Hill equation approximation of response-intensity curves for isolated cone currents normalized to the maximum dark current, before (grey) and after (red) forskolin exposure; (e) – relative changes in the sensitivity of the half-saturating intensity of isolated red-sensitive cones (Kruskal–Wallis test,  $p = 0.14$ ). The data are presented as the median and interquartile range

При анализе результатов для количественной оценки воздействия форсколина были рассчитаны параметры, характеризующие скорости нарастания (активации) и спада (выключения) ответов на полунасыщающие вспышки.

Скорости активации ответов колбочек, записанных как с помощью ЭРГ *ex vivo*, так и с помощью всасывающей пипетки сравнивались подбором масштабирующего коэффициента, который вычислялся путем сопоставления фаз развития нормированных ответов на временном интервале 20–50 мс от начала ответа для колбочек в целой сетчатке и 10–45 мс для изолированных колбочек (рис. 4а). Расчет этого коэффициента не выявил различий в скоростях активации ответов колбочек между группами (рис. 4б, в).

Кроме того, для ответов колбочек, полученных в экспериментах на целой сетчатке, были дополнительно проанализированы два временных параметра: время от начала предъявления стимула до достижения 50 и 80% уровня ответа от его максимальной амплитуды (табл. 1). Анализ показал, что форсколин значительно увеличивал время достижения ответа обеих временных точек, тогда как ДМСО не вызывал никаких существенных изменений (рис. 4з, и).

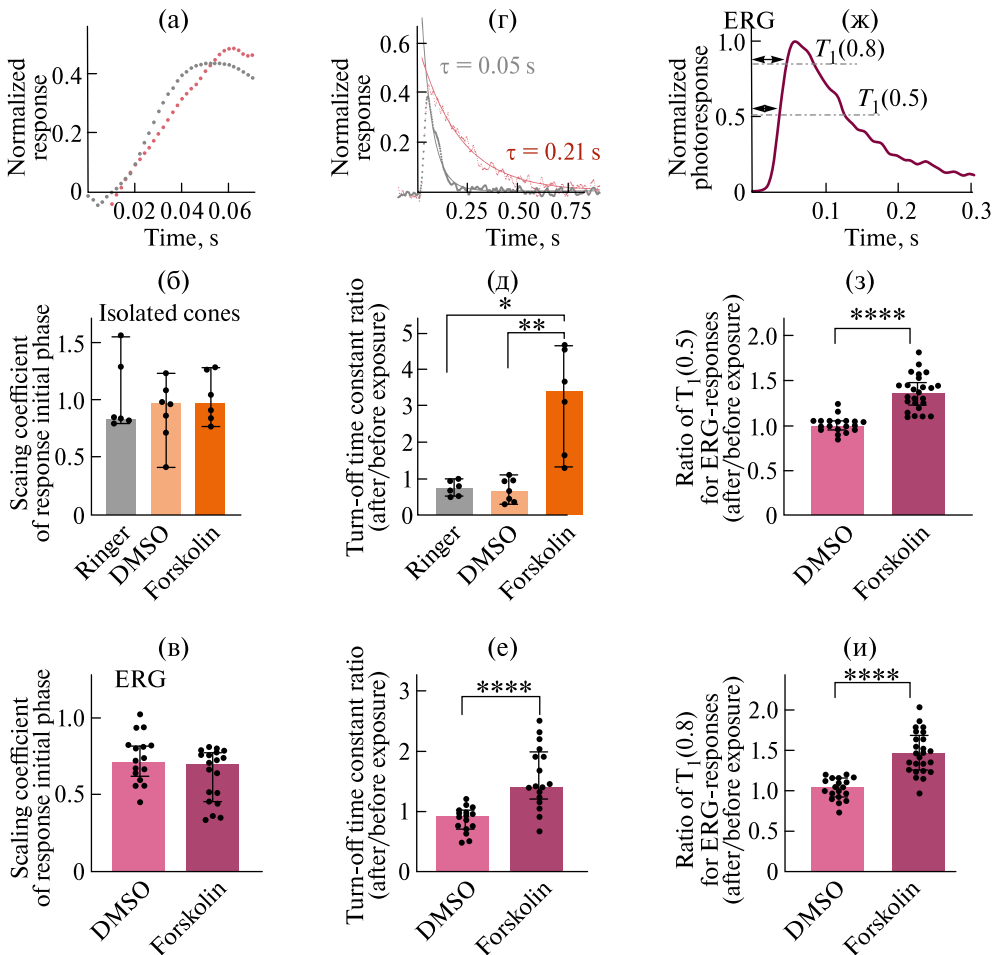
Наблюдаемое замедление ответов как изолированных колбочек, так и колбочек в составе сетчатки было подкреплено количественными расчетами. Для оценки скорости спада ответов мы определили константу времени выключения ответов ( $\tau$ ).

Постоянную времени  $\tau$  определяли путем аппроксимации фазы спада фотоответа одноэкспоненциальной функцией (рис. 4г). Статистический анализ относительных изменений этого параметра показал, что как для одиночных колбочек, так и для колбочек в составе целой сетчатки существует статистическое различие между группами (рис. 4д, е). Сравнение каждой из этих групп с фиксированным значением – единицей с помощью критерия Вилкоксона выявило, что форсколин вызывает увеличение постоянной времени выключения ( $p < 0,001$  для ЭРГ *ex vivo*;  $p = 0,03$  для метода всасывающей пипетки), в то время как в 0,1% ДМСО и растворе Рингера (контрольные группы) этот параметр по меньшей мере не возрастает ( $p = 0,025$  для ЭРГ ответов,  $p = 0,03$  для ответов изолированных колбочек в растворе Рингера,  $p = 0,08$  для ответов изолированных колбочек в 0,1% ДМСО), что указывает на возможное увеличение скорости выключения фотоответов колбочек на уровне сетчатки.

Для описания ответов изолированных колбочек был рассчитан дополнительный параметр, напрямую связанный с кинетикой каскада фототрансдукции, – время интегрирования. Он характеризует временной интервал активности фоторецептора в ответ на одиночный стимул-вспышку. Этот показатель рассчитывался как интеграл по времени нормированного на собственный максимум ответа от начала его развития до возвращения к исходной базовой линии (рис. 5а). Было обнаружено, что для изолированных колбочек время интегрирования между форсколиновой и контрольными группами статистически различается (рис. 5б). Сравнение этого параметра для каждой группы с фиксированной единицей с помощью критерия Вилкоксона показало, что форсколин увеличивает время существования фотоответа красночувствительных колбочек ( $p = 0,03$ ), тогда как в контрольной группе с ДМСО этого не наблюдается ( $p = 0,03$  и  $p = 0,08$  для групп с раствором Рингера и 0,1%-ном ДМСО соответственно).

В отличие от записей токов изолированных колбочек, ответ от целой сетчатки, даже с учетом селективного выделения ответа только красночувствительных

колбочек, может содержать медленную компоненту, обусловленную в первую очередь активностью глиальных клеток (клеток Мюллера). Поэтому попытки расчета времени интегрирования для ЭРГ ответов целой сетчатки оказались неудачными из-за сильного влияния ширины окна интегрирования на значение самого интеграла. В качестве альтернативы были выбраны схожие параметры – время нахождения фотоответа на уровнях выше 50% ( $T_1(0,5)$ ) и 80% ( $T_1(0,8)$ ) от пикового значения ответа (рис. 5б). Статистическая оценка этих параметров между группами форсколина и контроля показала статистически значимые различия (рис. 5г, д). В дополнение к проведенному анализу было выполнено сравнение этих параметров с единицей с использованием критерия Вилкоксона, которое показало, что только форсколин приводит к их увеличению ( $p < 0,01$  для  $T_1(0,8)$  и  $p < 0,001$   $T_1(0,5)$  для группы форсколина;  $p = 0,11$  для ( $T_1(0,8)$  и  $p = 0,21$  для  $T_1(0,5)$  для контрольной



**Таблица 1.** Время от начала предъявления полунасыщающего стимула до достижения ответа уровней 50% ( $T_1(0,5)$ ) и 80% ( $T_1(0,8)$ ) от его максимальной амплитуды

**Table 1.** Time to reach 50% ( $T_1(0.5)$ ) and 80% ( $T_1(0.8)$ ) of maximal response amplitude from stimulus onset under semi-saturating conditions

| Параметр        | Группа ДМСО |             | Группа форсколин |             |
|-----------------|-------------|-------------|------------------|-------------|
|                 | р-р Рингера | ДМСО        | р-р Рингера      | Форсколин   |
| $T_1(0,5)$ , мс | 40 (36; 44) | 40 (36; 46) | 42 (36; 46)      | 60 (50; 64) |
| $T_1(0,8)$ , мс | 50 (46; 74) | 54 (46; 64) | 56 (50; 64)      | 86 (76; 96) |

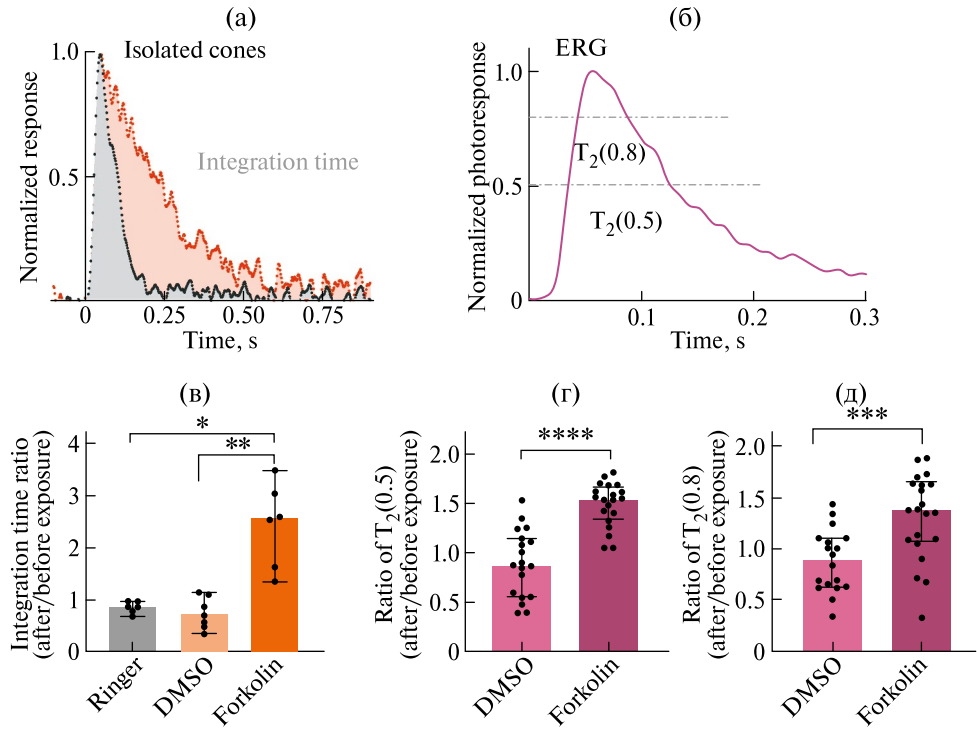
Данные представлены как медиана (1-й; 3-й квартили).

Data are presented as the median (with the first and third quartiles).

**Рис. 4.** Определение кинетических параметров ответов изолированных колбочек и колбочек в составе целой сетчатки: (а) – пример сопоставления восходящих фаз нормированных ответов изолированной колбочки до (серый) и после (розовый) инкубации в растворе с форсколином; (б) – сравнение значений масштабирующего коэффициента для ответов изолированных колбочек (тест Краскела–Уоллиса,  $p = 0,78$ ); (в) – сравнение значений масштабирующего коэффициента для ответов колбочек, записанных методом ЭРГ *ex vivo* (тест Манна–Уитни;  $p = 0,12$ ); (г) – пример аппроксимации нисходящей фазы ответов изолированной колбочки одноэкспоненциальной функции до (серый) и после (розовый) инкубации в растворе с форсколином, а также абсолютные значения постоянной времени выключения, рассчитанные для каждой кривой; (д) – сравнение отношений констант времени выключения для ответов изолированных колбочек (тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна, \*\*\*\* –  $p < 0,001$ ; \* –  $p = 0,02$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ); (е) – относительные изменения постоянных времени выключения ЭРГ ответов колбочек (тест Манна–Уитни,  $p < 0,001$ ); (ж) – пример определения времени достижения 50%-ного ( $T_1(0,5)$ ) и 80%-ного ( $T_1(0,8)$ ) уровня восходящей фазы фотоответа от его максимума; (з) – относительные изменения времени достижения 50%-ного уровня ( $T_1(0,5)$ ) восходящей кривой ответа от его максимальной амплитуды (тест Манна–Уитни,  $p < 0,001$ ); (и) – относительные изменения времени достижения 80%-ного уровня ( $T_1(0,8)$ ) восходящей кривой ответа (тест Манна–Уитни,  $p < 0,001$ ). На графиках представлены индивидуальные значения, медиана и межквартильный размах

**Fig. 4.** Determination of the kinetic parameters of the responses of isolated cones and cones in the intact retina: (a) – example of a comparison of the initial phases of normalized responses of isolated cones before (grey) and after (red) incubation in a forskolin solution; (b) – comparison of scaling coefficient values for responses of isolated cones (Kruskal–Wallis test,  $p = 0.78$ ); (v) – comparison of scaling coefficient values for cone responses recorded by *ex vivo* ERG. (Mann–Whitney test;  $p = 0.12$ ); (r) – example of the approximation of the decay phase of isolated cone responses by a single exponential function, before (grey) and after (pink) incubation in a forskolin solution, as well as the absolute values of the decay time constant calculated for each curve; (d) – comparison of the ratios of the decay time constants for the responses of isolated cones (Kruskal–Wallis test with Dunn’s post hoc test, \*\*\*\* –  $p < 0.001$ ; \* –  $p = 0.02$ , \*\* –  $p < 0.01$ ); (e) – relative changes in the ERG response turn-off time constants in the flask (Mann–Whitney test,  $p < 0.001$ ); (zh) – example of determining the time to reach 50% ( $T_1(0.5)$ ) and 80% ( $T_1(0.8)$ ) of the upward phase of the photoresponse from its maximum; (z) – relative changes in the time taken to reach 50% ( $T_1(0.5)$ ) of the rising response curve from its maximum amplitude (Mann–Whitney test,  $p < 0.001$ ); (i) – relative changes in the time to reach 80% ( $T_1(0.8)$ ) of the rising response curve (Mann–Whitney test,  $p < 0.001$ ). The graphs show individual values, the median and the interquartile range

группы с 0,1% ДМСО), что хорошо согласуется с эффектами форсколина, оказываемыми на постоянную времени выключения ЭРГ-ответов колбочек, а также время интегрирования ответов изолированных колбочек.



**Рис. 5.** Определение времени интегрирования для ответов изолированных колбочек и аналога времени интегрирования для ЭРГ ответов: (а) – пример определения времени интегрирования для ответов изолированных колбочек; (б) – пример определения аналога времени интегрирования: времени нахождения фотоответа на уровнях больше 80%  $T_2(0,8)$  и 50%  $T_2(0,5)$  от максимальной амплитуды; (в) – сравнение отношений значений времени интегрирования ответов изолированных колбочек (тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна; \*\*\*\* –  $p < 0,001$ ; \* –  $p = 0,02$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ); (г) – относительные изменения времени  $T_2(0,5)$  для ЭРГ-ответов (тест Манна–Уитни;  $p < 0,001$ ); (д) – относительные изменения времени  $T_2(0,8)$  для ЭРГ-ответов (тест Манна–Уитни;  $p < 0,001$ ). На графиках представлены индивидуальные значения, медиана и межквартильный размах

**Fig. 5.** Determination of the integration time for isolated cone responses and the integration time analogue for ERG responses: (a) – example of determining the integration time for isolated cone responses; (б) – example of determining the analogue of the integration time, i.e. the time taken for the photoreponse to reach levels greater than 80% and 50% of the maximum amplitude ( $T_2(0.8)$  and  $T_2(0.5)$ , respectively); (в) – comparison of the ratios of integration times for isolated cone responses (Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc test; \*\*\*\* –  $p < 0.001$ ; \* –  $p = 0.02$ , \*\* –  $p < 0.01$ ); (г) – relative changes in  $T_2(0.5)$  time for ERG responses (Mann–Whitney test;  $p < 0.001$ ); (д) – relative changes in  $T_2(0.8)$  time for ERG responses (Mann–Whitney test;  $p < 0.001$ ). The graphs show individual values, the median and the interquartile range

*Влияние форсколина на темновой ток и протокол двух вспышек для  
изолированных колбочек*

Для оценки возможного влияния форсколина на темновой ток колбочек регистрировались ответы на насыщающие стимулы. Этот анализ проводился только для метода регистрации тока одиночных колбочек. Как в группе форсколина, так и в обеих контрольных группах наблюдалось снижение амплитуды темнового тока после 20-минутной инкубации, но оно не достигло значимых различий между группами (рис. 6а, в). Кроме того, для КЧ-колбочек нам было интересно применить протокол двойных насыщающих вспышек, который был описан для колбочек Chrispel с соавт. [12] и оказался единственным подходом в указанной работе, который позволил выявить влияние форсколина на колбочки мальков рыб данио. Поскольку ранее в нашем исследовании на зелено- и синечувствительных колбочках взрослых рыб того же вида [11] результат Chrispel с соавт. воспроизвести не удалось, нам было интересно, не обуславливали ли данный эффект у мальков именно КЧ-колбочки. На рис. 6б представлены примеры ответов колбочек на два последовательных насыщающих стимула одинаковой интенсивности, поданных друг за другом с интервалом 1500 мс. Визуально заметно, что амплитуда ответа на вторую вспышку практически не изменяется. На рис. 6г показаны отношения амплитуд ответов на вторую вспышку к амплитудам ответов на первую вспышку для заданных временных интервалов между вспышками. Таким образом, в наших условиях эксперимента эффект форсколина, зафиксированный Chrispel с соавт., не наблюдался также и в отношении КЧ-колбочек. Таким образом, форсколин не влиял на восстановление амплитуды ответов изолированных колбочек сетчатки взрослых рыб данио, в отличие от результатов в [12], где форсколин снижал способность колбочек сетчатки личинок рыб данио восстанавливать амплитуду ответов на вторую вспышку.

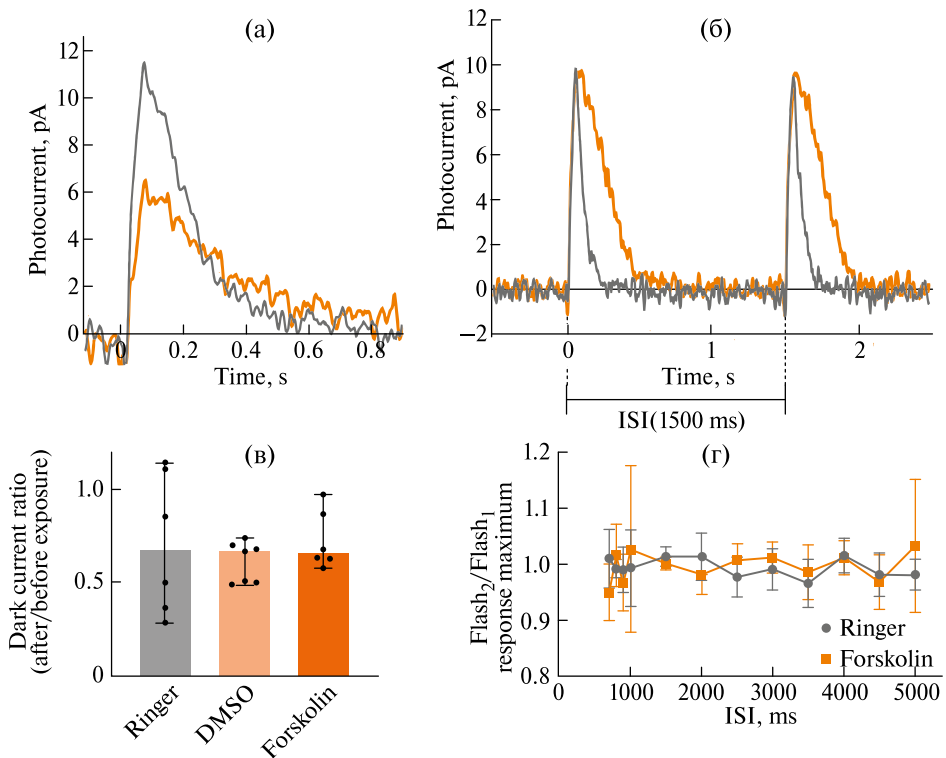
**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Настоящее исследование является продолжением нашего цикла работ, в котором мы оцениваем модулирующую роль цАМФ в каскаде фототрансдукции фоторецепторов дневного зрения – колбочек. Ранее нами были исследованы эффекты повышения внутриклеточного уровня цАМФ в зелено- и синечувствительных колбочках рыб данио [11]. В этой работе был применен налаженный нами метод регистрации тока одиночных фоторецепторов к красночувствительным колбочкам рыб данио и дополнили его методом *ex-vivo*-ЭРГ целой сетчатки с селективным выделением ответов только КЧ колбочек. Применяя активатор аденилатциклаз – форсколин, мы исследовали, как влияет повышение внутриклеточного уровня цАМФ на чувствительность к свету, и кинетические параметры фотоответов КЧ-колбочек рыб данио.

В отличие от небольшого увеличения чувствительности у зелено- и синечувствительных колбочек при повышении уровня цАМФ [11], чувствительность КЧ-колбочек под действием форсколина достоверно не изменялась, причем одинаковый результат был получен обоими методами регистрации ответов. При этом изменение кинетических параметров ненасыщенного фотоответа КЧ-колбочек качественно схож с тем, что мы наблюдали у двух других спектральных типов колбочек.

Для полного понимания роли цАМФ в регуляции каскада фототрансдукции колбочек мы провели сравнительный анализ эффектов форсколина в колбочках разных спектральных типов. В ранее опубликованной нами работе [11] было

показано, что повышение внутриклеточного уровня цАМФ в изолированных синечувствительных и зеленочувствительных колбочках существенно замедляет кинетику ответов, увеличивая при этом время интегрирования, но не влияет на скорость активации каскада фототрансдукции. Такая же картина наблюдается и в КЧ-колбочках: форсколин замедляет выключение каскада фототрансдукции, не затрагивая процессы его активации. Однако степень выраженности действия форсколина на выключение каскада в разных типах колбочек неодинакова. Сравнительный анализ показал, что из трех спектральных типов ответы КЧ-колбочек характеризуются относительно медленной кинетикой выключения каскада под действием форсколина: постоянная времени выключения ответов КЧ-колбочек более чем в три раза превышает аналогичный показатель для зеленочувствительных колбочек, тогда как по сравнению с синечувствительными колбочками у красночувствительных колбочек наблюдается лишь тенденция к уменьшению скорости процессов инактивации (рис. 7а). Замедление выключения каскада фототрансдукции сопровождается увеличением времени интегрирования, которое у КЧ-колбочек заметно больше, чем у зеленочувствительных колбочек (рис. 7б). Таким образом, выявленные регуляторные влияния цАМФ на фототрансдукцию в колбочках трех спектральных типов рыб данио проявляются на этапе выключения каскада фототрансдукции и имеют однонаправленный характер, который отражается в замедлении процессов инактивации каскада. Однако степень проявления этого эффекта цАМФ варьирует

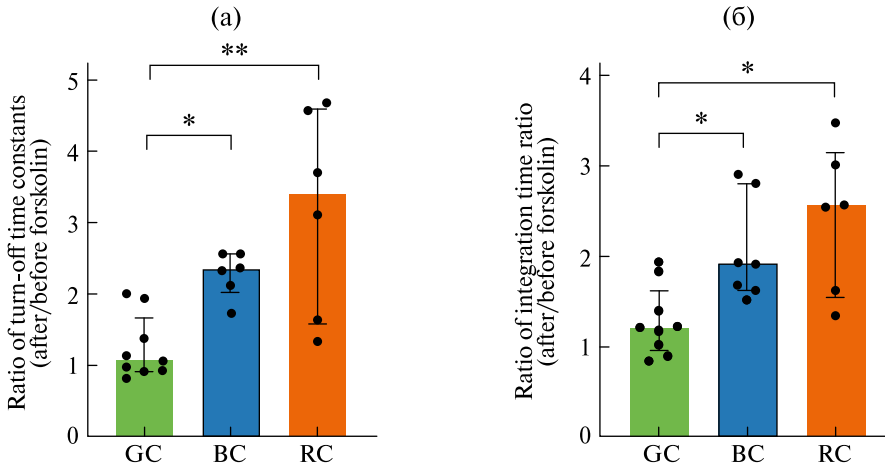


в разных типах колбочек, что может быть связано с особенностями молекулярных механизмов регуляции фототрансдукции в этих типах колбочек.

Важной особенностью настоящего исследования является то, что нам удалось сочетать два электрофизиологических метода – регистрацию тока изолированных колбочек и ЭРГ *ex vivo*, которая проводится на изолированной, но все же целой сетчатке. Применить метод ЭРГ *ex vivo* с выделением селективного ответа одного типа фоторецепторов в случае рыб данио возможно только для красночувствительных колбочек. Дело в том, что спектры поглощения зрительных пигментов рыб, в частности, данного вида сильно перекрываются, и подобрать световой стимул, который активировал бы только один тип фоторецепторов можно лишь на краю общего спектра чувствительности (см. рис. 2в). Поэтому подобного параллельного сравнения двумя методами селективно для зелено- или синечувствительных колбочек провести нельзя. В то же время применение дополнительного метода, где колбочки остаются в целой сетчатке и их наружные сегменты не погружены внутрь пипетки, а непосредственно взаимодействуют с раствором форсколина, позволяют верифицировать физиологичность полученных нами результатов на отдельных колбочках. В нашем исследовании эффекты форсколина на изолированные колбочки и колбочки в препарате целой сетчатки полностью согласуются: суммарного изменения чувствительности под действием форсколина не происходит, скорость активации, оцениваемая обоими электрофизиологическими методами также не меняется, тогда как выключение фототока замедляется как в изолированных колбочках, так

**Рис. 6.** Определение темнового тока изолированных колбочек и влияние форсколина на амплитуду ответов в протоколе двойных вспышек: (а) – типичный ответ красночувствительной колбочки на насыщающий стимул ( $6,5 \times 10^4$  фотон/мкм<sup>2</sup>/вспышка;  $\lambda_{\max} = 525$  нм), серая линия показывает ответ в растворе Рингера, розовая линия – ответ после 20-минутной инкубации в растворе с добавлением форсколина; (б) – репрезентативный ответ колбочки на две последовательные насыщающие вспышки ( $\lambda_{\max} = 525$  нм;  $6,5 \times 10^4$  фотон/мкм<sup>2</sup>/вспышка), серая линия показывает ответы в растворе Рингера, розовая линия – ответы после воздействия форсколина, ISI – межстимульный интервал; (в) – сравнение отношений амплитуд ответов колбочек на насыщающие стимулы ( $6,5 \times 10^4$  фотон/мкм<sup>2</sup>/вспышка;  $\lambda_{\max} = 525$  нм) (тест Краскала–Уоллиса,  $p = 0,73$ ), данные представлены в виде индивидуальных значений, медианы и межквартильного размаха; (г) – график зависимости отношений амплитуд ответов колбочек на вторую вспышку относительно первой от длительности интервала между вспышками, серые символы и линия – зависимость в растворе Рингера, розовые символы и линия – после воздействия форсколина, ISI – межстимульный интервал, данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение

**Fig. 6.** Determination of dark current in isolated cones and the effect of forskolin on response amplitude in the dual-flash protocol. (a) – typical response of a red-sensitive cone to a saturating stimulus ( $6.5 \times 10^4$  photons/ $\mu\text{m}^2$ /flash;  $\lambda_{\max} = 525$  nm). The grey line shows the response in Ringer's solution and the pink line shows the response after a 20-minute incubation in forskolin. (b) – representative response of a cone to two consecutive saturating flashes ( $\lambda_{\max} = 525$  nm;  $6.5 \times 10^4$  photons/ $\mu\text{m}^2$ /flash): the grey line shows the responses in Ringer's solution and the red line shows the responses after exposure to forskolin. ISI: interstimulus interval. (v) – comparison of the ratios of cone responses to saturating stimuli ( $6.5 \times 10^4$  photons/ $\mu\text{m}^2$ /flash;  $\lambda_{\max} = 525$  nm) (Kruskal–Wallis test,  $p = 0.73$ ). Data are presented as individual values, median and interquartile range. (r) – graph dependence of response ratio of cone responses to the second flash relative to the first on the interval between flashes. Grey symbols and line: dependence in Ringer's solution. Red symbols and line: after exposure to forskolin. ISI is the interstimulus interval. The data are presented as the mean value and standard deviation



**Рис. 7.** Прямое сравнение эффектов форсколина на скорость выключения (а) и время интегрирования (б) полунасыщенного фотозвета зеленочувствительных (GC), синечувствительных (BC) и красночувствительных (RC) колбочек рыб данио. Данные о GC и BC взяты из нашей предыдущей работы [11]. Для оценки значимости различий между двумя использовался тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна, \* –  $p = 0,02$ ; \*\* –  $p < 0,01$ . Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха

**Fig. 7.** Direct comparison of the effects of forskolin on the turn-off rate (a) and integration time (б) of the half-saturated photoresponses of green-, blue- and red-sensitive cones in zebrafish. Data on GC and BC cones were taken from our previous work [11]. To assess the significance of the differences between the two, a Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc test was performed ( $p < 0.001$ ). \* indicates  $p = 0.02$  and \*\* indicates  $p < 0.01$ . The data are presented as the median and interquartile range

и в препарате целой сетчатки. Что же касается времени интегрирования, этот параметр оказалось затруднительно определить для ЭРГ ответов красночувствительных колбочек, поскольку медленные компоненты ответов искажали итоговое значение. Тем не менее мы применили другие параметры, по смыслу заменяющие время интегрирования – время пребывания ответа на уровне выше уровня 0,5 и 0,8 от его максимума:  $T_2(0,5)$  и  $T_2(0,8)$  соответственно (см. рис. 5б, г, д). Было выяснено, что эти альтернативные параметры значимо увеличиваются под действием форсколина (т.е. при повышении внутриклеточного уровня цАМФ), что также согласуется с возрастанием времени интегрирования ответов изолированных колбочек.

Кроме того, для фотозветов колбочек, записанных методом ЭРГ *ex vivo*, был проведен дополнительный анализ восходящей фазы ответа. Первый компонент восходящей фазы ненасыщенного фотозвета – скорость активации каскада фототрансдукции в случае колбочек, где все процессы протекают очень быстро, может быть оценен на отрезке первых десятков миллисекунд после подачи короткой вспышки. Как было показано с помощью шкалирования восходящей фазы ответа, этот компонент в колбочках рыб данио под действием форсколина не изменяется. Кроме того, ближе к пику в развитие фотозвета в случае колбочек, вероятно, уже вмешиваются некоторые процессы выключения каскада. Для ЭРГ-ответов колбочек были дополнительно проанализированы времена от начала предъявления стимула до достижения уровня 0,5 и 0,8 от максимума (см. рис. 4ж, з, и).

Форсколин значимо увеличивал указанные времена по сравнению с контролем. Мы предполагаем, что причиной этого может быть более раннее вмешательство какого-то из процессов выключения каскада фототрансдукции. Таким образом, можно заключить, что повышение уровня цАМФ приводит к замедлению самого медленного процесса инактивации каскада в колбочках и к одновременному ускорению другого — исходно более быстрого.

Есть все основания полагать, что тем процессом инактивации каскада фототрансдукции, который существенно замедляется, особенно в КЧ колбочках, является фосфорилирование возбужденного светом зрительного пигмента. Именно этот этап инактивации каскада находится под контролем G-белок-сопряженных рецепторных родопсинкиназ (GRK). Они же, как известно, являются мишенью для цАМФ — при повышении уровня цАМФ их активность уменьшается вследствие их фосфорилирования протеинкиназой A, и, следовательно, инактивация возбужденного зрительного пигмента замедляется. Более быстрым эффектом инактивации каскада, который еще больше ускоряется под действием высокого уровня цАМФ, о чем косвенно можно судить по нашим данным, могла бы быть инактивация трансдуцина. Однако эта гипотеза требует серьезной и детальной верификации.

Наблюдаемые изменения в параметрах фотоответа колбочек могут быть также связаны с прямым эффектом цАМФ на свойства катионных каналов в мембране наружного сегмента. Так, Farber с соавт. [16] была дана оценка уровней цАМФ и цГМФ, из которой следует, что соотношения цАМФ/цГМФ в колбочках больше 1, в противоположность палочкам. Есть указания на средство обоих циклических нуклеотидов к управляемым циклическими нуклеотидами (CNG) каналам, хотя средство это для двух нуклеотидов и различно [17]. Однозначно о характере изменения проводимости каналов наружного сегмента под действием цАМФ в фоторецепторах сказать нельзя [18, 19], предполагая, что уровень цАМФ в колбочках после добавления форсколина может повышаться кратно, логично было бы ожидать конкурентные взаимодействия с каналами между цАМФ и цГМФ, что могло бы привести к замедлению кинетики как восходящей, так и нисходящей фазы фотоответа [19]. Однако остается открытым вопрос о возможном влиянии такого взаимодействия на чувствительность. Для ответа на данные вопросы требуется знать более точные (измеренные современными методами) уровни цАМФ и цГМФ в колбочках, а также проводимость самой мембраны наружного сегмента колбочек и ее зависимость от соотношения цАМФ/цГМФ.

Следует отметить, что уровень цАМФ изменяется в сетчатке в течение суточного цикла. Таким образом, наблюдаемые нами эффекты, вероятно, должны иметь физиологическое (адаптивное) значение. В этой связи разная степень регулировки каскада фототрансдукции у колбочек разных спектральных типов может быть полезна для животных как изучаемого вида, так и других видов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Arshavsky V.Y., Burns M.E. Photoreceptor signaling: supporting vision across a wide range of light intensities. *J. Biol. Chem.* 2012; **287**:1620–1626. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.305243>
2. Erofeeva N., Meshalkina D., Firsov M. Multiple roles of cAMP in vertebrate retina. *Cells.* 2023; **12**(8):1157. <https://doi.org/10.3390/cells12081157>

3. Astakhova L.A., Kapitskii S.V., Govardovskii V.I. et al. Cyclic AMP as a regulator of the phototransduction cascade. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2014;**44**:664–671. <https://doi.org/10.1007/s11055-014-9967-5>
4. Astakhova L.A., Samoiliuk E.V., Govardovskii V.I. et al. cAMP controls rod photoreceptor sensitivity via multiple targets in the phototransduction cascade. *J. Gen. Physiol.* 2012;**140**(4):421–433. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210811>
5. Astakhova L.A., Nikolaeva D.A., Fedotkina T.V. et al. Elevated cAMP improves signal-to-noise ratio in amphibian rod photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 2017;**149**(6):689–701. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611744>
6. Tosini G., Pozdeyev N., Sakamoto K. et al. The circadian clock system in the mammalian retina. *BioEssays.* 2008;**30**(6):624–633. <https://doi.org/10.1002/bies.20777>
7. Fukuhara C., Liu C., Ivanova T.N. et al. Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina. *J. Neurosci.* 2004;**24**(7):1803–1811. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4988-03.2004>
8. Horner T.J., Osawa S., Schaller M.D. et al. Phosphorylation of GRK1 and GRK7 by cAMP-dependent protein kinase attenuates their enzymatic activities. *J. Biol. Chem.* 2005;**280**(30):28241–28250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505117200>
9. Sato S., Kefalov V.J. Characterization of zebrafish rod and cone photoresponses. *Sci. Rep.* 2025;**15**(1):13413. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-96058-8>
10. Chrispell J.D., Dong E., Osawa S. et al. Grk1b and Grk7a both contribute to the recovery of the isolated cone photoresponse in larval zebrafish. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018;**59**(12):5116–5124. <https://doi.org/10.1167/jovs.18-24455>
11. Nikolaeva D.A., Astakhova L.A. cAMP-mediated modulation of functions of green- and blue-sensitive cones in zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 2025;**26**(16):7882. <https://doi.org/10.3390/ijms26167882>
12. Chrispell J.D., Xiong Y., Weiss E.R. Grk7 but not Grk1 undergoes cAMP-dependent phosphorylation in zebrafish cone photoreceptors and mediates cone photoreceptor recovery at elevated cAMP. *J. Biol. Chem.* 2022;**298**:102636. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102636>
13. Allison W.T., Haimberger T.J., Hawryshyn C.W. et al. Visual pigment composition in zebrafish: evidence for a rhodopsin–porphyropsin interchange system. *Vis. Neurosci.* 2004;**21**(6):945–952. <https://doi.org/10.1017/s0952523804216145>
14. Govardovskii V.I., Fyhrquist N., Reuter T. et al. In search of the visual pigment template. *Vis. Neurosci.* 2000;**17**(4):509–528. <https://doi.org/10.1017/s0952523800174036>
15. Baylor D.A., Lamb T.D., Yau K.-W. The membrane current of single rod outer segments. *J. Physiol.* 1979;**288**:589–611. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012715>
16. Farber D.B., Chase D.G., Lolley R.N. Cyclic nucleotides in rod- and cone-dominant retinas. *Neurochem. Int.* 1980;**1**(5–6):327–336. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(80\)90070-4](https://doi.org/10.1016/0197-0186(80)90070-4)
17. Pagès F., Ildefonse M., Ragno M. et al. Coexpression of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the rod cyclic GMP-gated channel restores native sensitivity to cyclic AMP: role of D604/N1201. *Biophys. J.* 2000;**78**(3):1227–1239. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(00\)76680-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(00)76680-x)

18. Furman R.E., Tanaka J.C. Photoreceptor channel activation: interaction between cAMP and cGMP. *Biochemistry*. 1989;28(6):2785–2788.  
<https://doi.org/10.1021/bi00433a007>
19. Dryer S.E., Henderson D. Cyclic GMP-activated channels of the chick pineal gland: effects of divalent cations, pH, and cyclic AMP. *J. Comp. Physiol. A*. 1993;172(3):271–279. <https://doi.org/10.1007/bf00216609>

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Веселов Яков Сергеевич – мл. науч. сотр., Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: [vesjack@mail.ru](mailto:vesjack@mail.ru)  
<https://orcid.org/0009-0005-3057-3285>

Громова Галина Евгеньевна – мл. науч. сотр., Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: [411225@rambler.ru](mailto:411225@rambler.ru)  
<https://orcid.org/0009-0003-9970-236X>

Калита Алиса Дмитриевна – мл. науч. сотр., Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: [alice.kalita01@gmail.com](mailto:alice.kalita01@gmail.com)  
<https://orcid.org/0009-0003-2636-9009>

Николаева Дарья Александровна – канд. биол. наук; науч. сотр., Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: [daryakorenyak@gmail.com](mailto:daryakorenyak@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-6328-1626>

Астахова Любовь Александровна – канд. биол. наук; вед. науч. сотр., Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН Санкт-Петербург, Российская Федерация  
E-mail: [lubkins@yandex.ru](mailto:lubkins@yandex.ru)  
<https://orcid.org/0000-0003-3162-2446>

Поступила в редакцию 21.11.2025  
После доработки 04.12.2025  
Принята к публикации 04.12.2025

#### ABOUT THE AUTHORS

Veselov, Yakov S. – Research Assistant, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: [vesjack@mail.ru](mailto:vesjack@mail.ru)  
<https://orcid.org/0009-0005-3057-3285>

Gromova, Galina E. — Research Assistant, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: 411225@rambler.ru  
<https://orcid.org/0009-0003-9970-236X>

Kalita, Alisa D. — Research Assistant, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: alice.kalita01@gmail.com  
<https://orcid.org/0009-0003-2636-9009>

Nikolaeva, Daria A. — Cand. Sc. (Biology), Research Officer, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: daryakorenyak@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0002-6328-1626>

Astakhova, Lyubov A. — Cand. Sc. (Biology); Head Scientist Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: lubkins@yandex.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-3162-2446>

Received November 21, 2025  
Revised December 04, 2025  
Accepted December 04, 2025