

БИОФИЗИКА

УДК 577.354.2:576.895.3:577.161"11"12":57.081.1

**КОРОТКОВОЛНОВАЯ СВЕТОВАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ
В ФОРМИРОВАНИИ СПЕКТРАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ДВУХ ПОПУЛЯЦИЙ КРЕВЕТОК *M. RELICTA* (MYSIDA)****А.Е. Абу Хамидах, Ю.В. Демчук¹, П.П. Зак¹, М. Линдстром², М.А. Островский***(кафедра молекулярной физиологии, e-mail: amnushka@gmail.com)*

В микроспектрофотометрических измерениях экранирующих гранул глаза *M. relict* (Mysida, Crustacea) показано, что большинство гранул имеет спектры, характерные для ксантомматинов ($\lambda_{\text{макс.}}$ 455 нм) с селективным поглощением в синей области спектра. Согласно проведенным математическим расчетам с использованием спектров поглощения экранирующих гранул и зрительных клеток, световая фильтрация, производимая ксантомматиновыми гранулами, позволяет обеспечить кривую спектральной чувствительности, идентичную реальной спектральной чувствительности.

Ключевые слова: Crustacea, спектральная чувствительность.

Около 9000 лет назад в результате таяния скандинавского ледникового щита креветки *M. relict* (Mysida) распределились по изолированным водоемам и сейчас их зрение адаптировано к различным видам спектрального светового окружения [1–3]. Так, озерные креветки, обитающие сейчас в коричнево-красной световой среде, обладают длинноволновым зрительным пигментом с максимумом поглощения около 556 нм и длинноволновой спектральной чувствительностью с максимумом около 600 нм. В то же время популяция этих креветок, обитающая в коротковолновой световой среде Балтийского моря, имеет более коротковолновый зрительный пигмент P532 и спектральную чувствительность с максимумом около 570 нм [3]. При этом у обеих популяций *M. relict* спектральная чувствительность заметно сдвинута в длинноволновую область по отношению к спектрам поглощения их зрительных пигментов. Настоящая работа посвящена исследованию механизмов такой эволюционно-экологической зрительной адаптации к спектральной среде обитания.

Длинноволновые сдвиги спектральной чувствительности, как правило, формируются при участии желтых светоэкранирующих пигментов — ксантомматинов и каротиноидов, ослабляющих свет синего диапазона [4, 5]. Ксантомматины входят в состав микроскопических оммохромных гранул, и каротиноиды содержатся преимущественно в составе липидных капель. Эти разнородные субклеточные частицы образуют светофильтрующие агрегаты, поддающиеся микроспектрофотометрическим измерениям.

Целью настоящей работы было оценить возможное участие экранирующих пигментов в формировании длинноволнового положения спектральной чувствительности глаз *M. relict*.

Объекты и методы

В измерениях было использовано по 7 глаз креветок *M. relict* озерной и балтийской популяций с микроспектрофотометрическими измерениями рабдомов и агрегатов светофильтрующих субклеточных частиц. Содержимое глаза креветки полностью выдавливали через прокол в роговице на покровное стекло и затем плотно придавливали покровным стеклом меньшего размера. Кромки верхнего стекла были смазаны вазелином для защиты препарата от высыхания. Далее пошагово регистрировали спектры поглощения всех визуально различимых объектов, находящихся в препарате. Запись спектров производили на компьютеризованном микроспектрофотометре конструкции В.И. Говардовского [6] в диапазоне длин волн от 338 до 750 нм с использованием фотометрического луча размером 10×10 мкм. Крупные (200×30 мкм) рабдомы зрительных клеток хорошо идентифицировались по характерной морфологии и форме спектров фоточувствительных зрительных пигментов. Агрегаты светофильтрующих гранул были разнородны по размеру формирующих их частиц, по структуре этих частиц и характеру спектров. Микрофотографии объектов фотометрирования приведены на рис. 1. По результатам микроспектрофотометрии был оп-

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва.

² Тварминская зоологическая станция Хельсинкского университета.

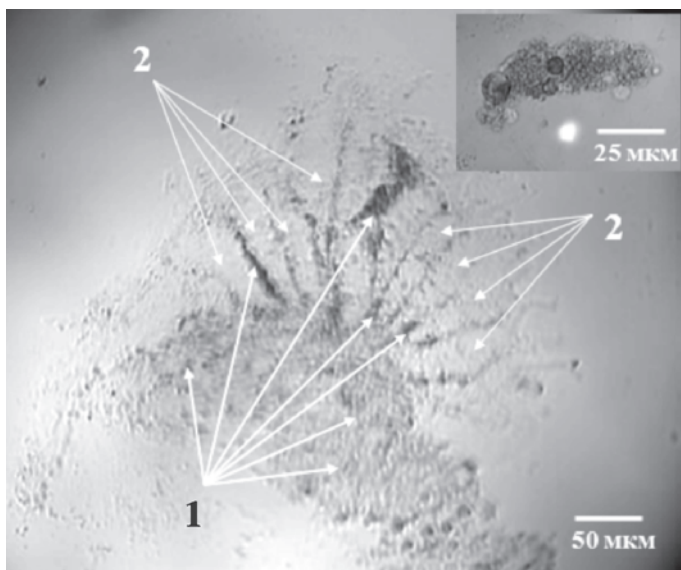


Рис. 1. Объекты микроспектрофотометрии внутриглазных структур *M. relicta*: агрегаты светозащитных гранул (1) и рабдомы зрительных клеток (2).

Врезка в правом верхнем углу — увеличенная микрофотография агрегата светозащитных гранул

ределен характер спектров светофильтрующих частиц, потенциально способных отфильтровывать синий свет и формировать длинноволновое положение спектральной чувствительности глаз *M. relicta*. Спектры этих частиц с коротковолновым поглощением в сочетании со спектрами поглощения рабдомов были использованы для расчетов теоретических кривых спектральной чувствительности. В этих расчетах коэффициент световой фильтрации подбирали так, чтобы положение максимума расчетной кривой совпадало с известными экспериментальными данными электроретинографической спектральной чувствительности [3, 7]. Теоретические кривые и реальную спектральную чувствительность сопоставляли по точкам световой стимуляции электроретинограммы в вышеупомянутых работах.

Результаты и обсуждение

Спектры поглощения изолированных рабдомов.

Зарегистрированные спектры поглощения темноадаптированных рабдомов соответствовали полученным в работе [3]. Рабдомы балтийской популяции *M. relicta* имели максимумы спектров поглощения около 530 нм, и рабдомы озерной популяции имели максимум около 556 нм (рис. 2). Спектры рабдомов обеих популяций соответствовали шаблонам А2-зрительных пигментов позвоночных животных [8].

Спектры поглощения экранирующих пигментов.

Зарегистрированные нами спектры поглощения фотостабильных экранирующих пигментов четко распределились на три спектральные группы. У обеих популяций *M. relicta* 56% агрегатов светозащитных гранул имели спектры с преимуществен-

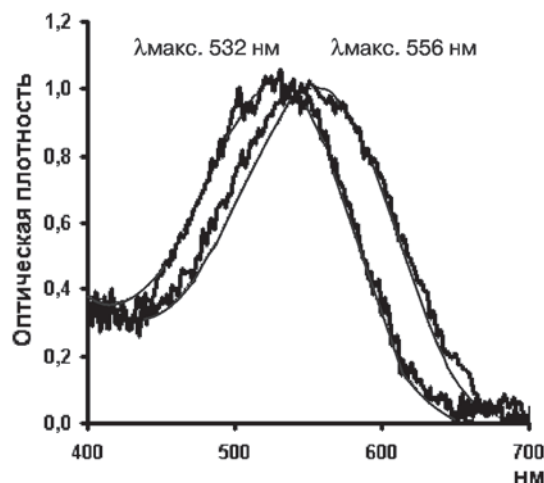


Рис. 2. Образцы спектров поглощения одиночных рабдомов зрительных клеток *M. relicta*.

Левая запись — рабдом балтийской морской популяции; правая запись — рабдом озерной популяции. Тонкими линиями обозначены шаблоны А2-зрительных пигментов

ным поглощением в коротковолновом световом диапазоне при $\lambda_{\text{макс.}} 455 \text{ нм}$ (рис. 3, А). Согласно данным литературы [9, 10], спектры такого вида, вероятнее всего, сформированы преимущественно ксантомматином ($\lambda_{\text{макс.}} 440 \text{ нм}$) в сочетании с примесью дигидроксантомматина ($\lambda_{\text{макс.}} 480 \text{ нм}$). Ксантомматин и дигидроксантомматин легко переходят друг в друга в реакциях окисления-восстановления. Среднестатистическая оптическая плотность этих ксантомматиноподобных спектров у озерной популяции креветок составляла 0,59 ($n = 60$) и 0,71 ($n = 46$) у балтийской морской популяции.

Вторыми по массовости в глазах обеих популяций креветок были спектры (рис. 3, Б), характерные [11] для смеси оммохромов, состоящей из омматинов и омминов. Эти спектры имели достаточно равномерное поглощение с невыраженными максимумами при 440 и 555 нм. В глазах озерной популяции *M. relicta* оммохромподобные спектры встречались в 44% случаев, в то время как у балтийской популяции они присутствовали в 24% случаев. Среднестатистическая оптическая плотность оммохромподобных спектров равнялась 0,49 ($n = 48$) у озерной популяции креветок и 0,82 ($n = 20$) у балтийской морской популяции.

Помимо вышеописанных оммохромных гранул, в глазах креветок балтийской морской популяции, но не у озерной популяции, 20% гранул имели спектры, характерные для омминов [10] с $\lambda_{\text{макс.}}$ около 580 нм и средней оптической плотностью около 0,3 ($n = 16$).

Спектры, характерные для каротиноидов, встречались в единичных случаях в виде крупных жировых капель. На рис. 3, Г приведены микрофотография такой капли и ее спектр с характерными для каротиноидов 3 максимумами поглощения 440, 470, 496 нм. Основным максимум этого спектра (470 нм)

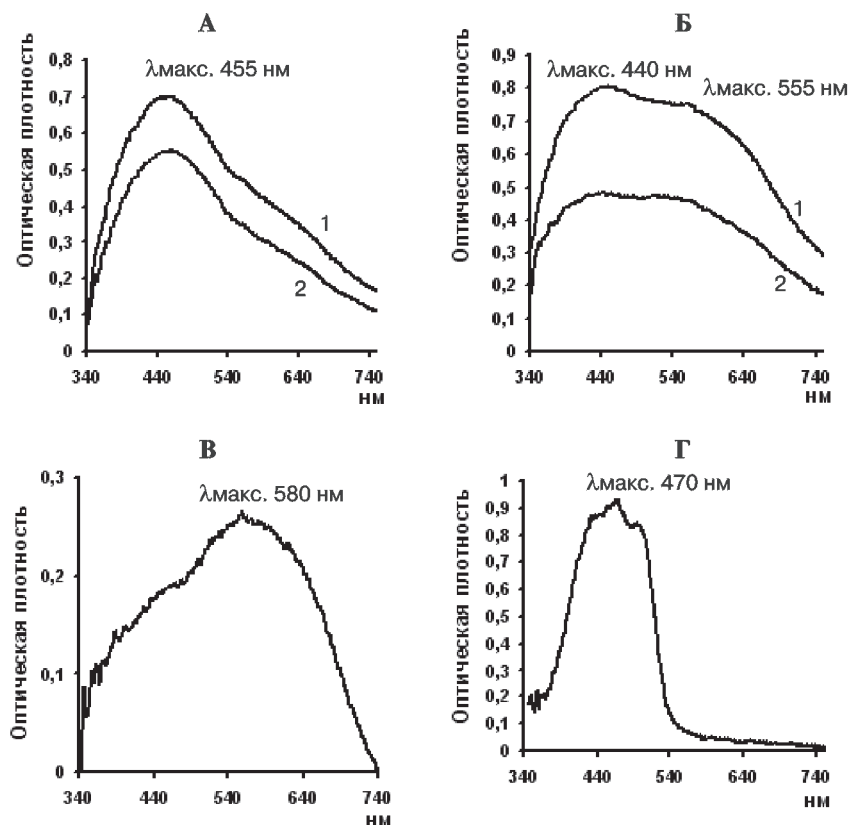


Рис. 3. Спектры поглощения внутриглазных экранирующих гранул *M. relicta*. А — гранулы с ксантомматинподобными спектрами: 1 — усредненный ($n = 46$) спектр поглощения гранул балтийской морской популяции; 2 — усредненный ($n = 60$) спектр поглощения гранул озерной популяции. Б — гранулы с оммохромподобными спектрами: 1 — усредненный ($n = 20$) спектр поглощения гранул балтийской морской популяции; 2 — усредненный ($n = 48$) спектр поглощения гранул озерной популяции. В — усредненный спектр омминподобных гранул ($n = 16$), присущих только балтийской морской популяции. Г — образец спектра поглощения одиночной внутриглазной каротиноидной масляной капли *M. relicta*

отвечает спектру астаксантина [12], наиболее массовому каротиноиду беспозвоночных и низших позвоночных животных.

В целом проведенные измерения показали, что только ксантомматинподобные гранулы (рис. 3, А) могут рассматриваться как светофильтры, формирующие спектральную чувствительность *M. relicta*. Эти гранулы имеют выраженное селективное поглощение синей области видимого спектра, необходимое для обеспечения длинноволнового положения спектральной чувствительности. В глазах *M. relicta* гранулы этого вида преобладают как по численности — 56%, так и по суммарной оптической плотности (n^x OD). При этом в глазах озерной популяции их суммарная оптическая плотность (n^x OD) по $\lambda_{\text{макс}}$ обеспечивает 70% поглощения света по сравнению с остальными видами гранул. В глазах балтийской морской популяции гранулы этого типа обеспечивают 60% поглощения света.

Расчеты теоретической спектральной чувствительности *M. relicta*, формируемой “ксантомматиновой” световой фильтрацией в сопоставлении с экс-

периментальными электроретинографическими данными. В настоящем разделе приводятся расчеты теоретической спектральной чувствительности, формируемой спектрами поглощения зрительных пигментов *M. relicta* в сочетании со световой фильтрацией ксантомматинподобными гранулами. В расчетах были использованы спектры поглощения рабдомов (рис. 2) и спектры поглощения ксантомматинподобных гранул (рис. 3, А). Расчетный уровень ксантомматиновой коротковолновой фильтрации был задан так, чтобы максимумы теоретической расчетной спектральной чувствительности совпадали с экспериментальными данными электроретинографической спектральной чувствительности *M. relicta*, приведенными в работе [3], а именно $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм для морской популяции и $\lambda_{\text{макс}}$ 600 нм для озерной популяции. При этом для озерной популяции необходимый коэффициент участия ксантомматиновой фильтрации составил 1,3, и для морской популяции он был принят равным 1,5. Шкала длин волн была составлена по спектральным точкам монохроматических световых вспышек, использованным в работе [3] для определения электроретинографической спектральной чувствительности, а именно 475 нм, 500 нм, 515 нм, 525 нм, 550 нм, 570 нм, 590 нм, 605 нм, 625 нм, 650 нм, 670 нм, 690 нм, 700 нм, 720 нм, 750 нм. Конечным результатом вычислений были кривые относительных величин квантового захва-

та зрительными пигментами после ксантомматиновой световой фильтрации. Результаты этих расчетов были сопоставлены с реальной спектральной чувствительностью, полученной при электроретинографических измерениях [3]. В цифровом виде произведенные расчеты приведены в табл. 1 и 2.

В приведенных таблицах цифровые данные в колонке 6 определены по графикам спектральной чувствительности из работы [3].

Цифры квантового захвата (колонка 5), осуществляемого зрительными пигментами после фильтрации света ксантомматиновыми гранулами, позволяют построить теоретические кривые спектральной чувствительности для обеих популяций *M. relicta*. На рис. 4 полученные нами теоретические расчетные кривые спектральной чувствительности сопоставлены с реальными экспериментальными кривыми, приведенными в работе [3]. Как следует из рис. 4, полученные теоретические кривые имеют хорошее соответствие с реальными экспериментальными кривыми спектральной чувствительности, приведенными в работах [3, 7].

Таблица 1

Расчет спектральной чувствительности
озерной популяции *M. relicta*

1	2	3	4	5	6	7
λ	P556 OD	OD ксант. гранул	T% ксантомматин	Квантовый захват (P556 + ксант. фильтр.)	Log спектр. чувствит.	Спектр. чувствит.
475	0,450	0,972	0,055	0,217	-0,500	0,316
500	0,653	0,914	0,065	0,311	-0,500	0,316
515	0,786	0,827	0,084	0,433	-0,367	0,430
525	0,867	0,764	0,102	0,541	-0,250	0,562
550	0,994	0,665	0,136	0,755	-0,130	0,741
570	0,967	0,614	0,159	0,876	-0,033	0,927
590	0,812	0,559	0,188	0,977	0,000	1,000
605	0,637	0,520	0,211	1,000	0,000	1,000
625	0,383	0,477	0,240	0,866	-0,067	0,857
650	0,131	0,418	0,286	0,460	-0,333	0,465
670	0,039	0,358	0,343	0,183	-0,600	0,251
690	0,010	0,318	0,386	0,055	-1,100	0,079
700	0,005	0,284	0,428	0,031	-1,400	0,040
720	0,001	0,254	0,468	0,009	-1,750	0,018
750	0,000	0,198	0,553	0,001	-2,500	0,003

Примечание. 2 — экспериментальный спектр поглощения зрительного пигмента P556 в отн. ед.; 3 — экспериментальный спектр поглощения “ксантомматинных” гранул в отн. ед.; 4 — расчет коэффициента пропускания “ксантомматинных” гранул; 5 — расчет величины квантового захвата зрительного пигмента P556 после световой фильтрации через “ксантомматинные” гранулы; 6 — Log спектральной чувствительности по данным [3]; 7 — расчет спектральной чувствительности по данным колонки 6.

На этом основании можно предполагать, что формирование длинноволнового положения спектральной чувствительности *M. relicta* осуществляется с преимущественным участием ксантомматинных

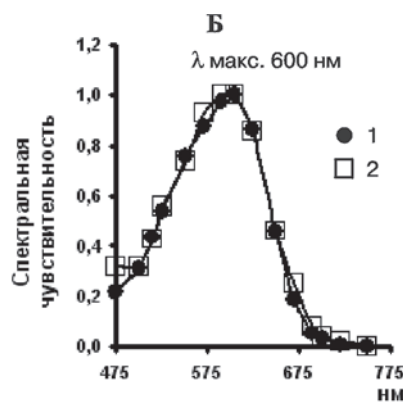
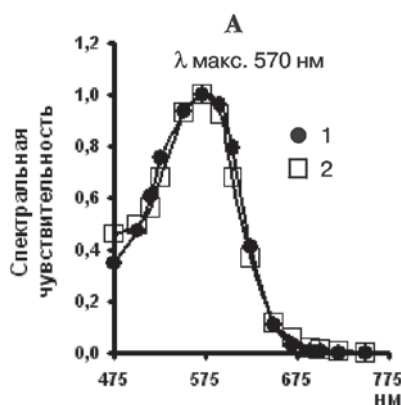


Рис. 4. Кривые спектральной чувствительности балтийской морской (А) и озерной (Б) популяций *M. relicta*.

1 — расчетные теоретические кривые; 2 — экспериментальные электроретинографические кривые

Таблица 2

Расчет спектральной чувствительности
морской популяции *M. relicta*

1	2	3	4	5	6	7
λ	P532 OD	OD ксант. гранул	T% ксантомматин	Квантовый захват (P532 + ксант. фильтр.)	Log спектр. чувствит.	Спектр. чувствит.
475	0,625	0,974	0,035	0,311	-0,333	0,465
500	0,849	0,913	0,043	0,433	-0,300	0,501
515	0,952	0,841	0,055	0,574	-0,250	0,562
525	0,991	0,776	0,069	0,728	-0,167	0,681
550	0,940	0,702	0,088	0,924	-0,030	0,933
570	0,750	0,658	0,103	1,000	0,000	1,000
590	0,491	0,609	0,122	0,976	-0,033	0,927
605	0,300	0,570	0,140	0,822	-0,167	0,681
625	0,114	0,534	0,158	0,429	-0,433	0,369
650	0,022	0,476	0,193	0,114	-0,933	0,117
670	0,005	0,412	0,241	0,035	-1,250	0,056
690	0,001	0,367	0,281	0,010	-1,667	0,022
700	0,001	0,331	0,319	0,006	-1,933	0,012
720	0,000	0,285	0,373	0,002	-2,300	0,005
750	0,000	0,233	0,447	0,000	-3,200	0,001

Примечание. 2 — экспериментальный спектр поглощения зрительного пигмента P532 в отн. ед.; 3 — экспериментальный спектр поглощения “ксантомматинных” гранул в отн. ед.; 4 — расчет коэффициента пропускания “ксантомматинных” гранул; 5 — расчет величины квантового захвата зрительного пигмента P532 после световой фильтрации через “ксантомматинные” гранулы; 6 — Log спектральной чувствительности по данным [3]; 7 — расчет спектральной чувствительности по данным колонки 6.

светофильтрующих гранул. Использование ксантомматина как основного коротковолнового светофильтра, формирующего спектральную чувствительность у представителей Decapoda, было недавно рассмотрено в работе [5].

Зарегистрированные нами спектры “ксантомматинных” гранул имеют максимум (455 нм), промежуточный между известными спектрами собственно ксантомматина ($\lambda_{\text{макс.}}$ 440 нм) и его производного — дигидроксантомматина ($\lambda_{\text{макс.}}$ 480 нм). Ксантомматин и дигидроксантомматин достаточно легко переходят друг в друга при реакциях окисления-восстановления [9]. Судя по положению максимума регистрируемых нами “ксантомматинных” спектров, они сформированы с некоторым участием примеси дигидроксантомматина. Спектр такого смешанного светофильтра имеет по-

тенциальную способность обратимо перестраиваться в пределах 40 нм между крайними положениями ксантомматинового и дигидроксантомматинового спектров.

В наших измерениях субклеточные частицы с каротиноидными спектрами встречались крайне редко и поэтому можно предполагать, что коротковолновая световая фильтрация в глазах *M. relicta* основана скорее на оммохромах, нежели на каротиноидах. Оммохромная светофильтрация представляется более надежной и доступной, так как оммохромы вырабатываются непосредственно в глазу, в отличие от каротиноидов, требующих диетической поддержки. Судя по морфологии расположения гранул по отношению к рабдомам зрительных клеток, спектральная чувствительность в глазах *M. relicta* формируется светом, отраженным от светофильтрующих гранул, окружающих рабдом.

Согласно данным литературы, одной из основных функций оммохромов в глазах ракообразных (Crustacea) является их антирадикальная защита структур глаза от фотохимического повреждения коротковолновым видимым светом [13]. Полученные в настоящей работе данные о том, что в глазах *M. relicta* преобладают оммохромные гранулы с коротковолновым поглощением света для длин

волн короче 450 нм, указывают, что в данном случае оммохромы, в дополнение к антиоксидантной защите глаз, выполняют также и светофильтрующую фотопротекторную функцию в наиболее опасной для глаза синей области спектра.

Выводы

1. Показано, что основным видом светофильтрующих гранул в глазах креветок *M. relicta* (Mysida) являются гранулы с селективным поглощением света в синей области спектра, соответствующие по спектрам поглощения оммохрому ксантомматину (λ_{макс} 455 нм).

2. Согласно математическим расчетам, теоретические кривые спектральной чувствительности, построенные с учетом ксантомматиновой светофильтрации, хорошо описывают характер реальной спектральной чувствительности креветок *M. relicta*.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ОБН РАН "Механизмы физиологических функций: от молекулы до поведения" и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-00200).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindström M., Nilsson H.L. Spectral and visual sensitivities of *Cirrolana borealis* Lilljeborg, a deep-water isopod (Crustacea, Flabellifera) // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1983. Vol. 69. P. 243–256.
2. Lindström M. Eye function of Mysidacea (Crustacea) in the northern Baltic Sea // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2000. Vol. 246. P. 85–101.
3. Jokela-Määttä M., Pahlberg J., Lindström M., Zak P.P., Porter M., Ostrovsky M.A., Cronin T.W., Donner K. Visual pigment absorbance and spectral sensitivity of the *Mysis relicta* species group (Crustacea, Mysida) in different light environments // J. Comp. Physiology A. 2005. Vol. 191. P. 1087–1097.
4. Jordão J.M., Cronin T.W., Oliveira R.F. Spectral sensitivity of four species of fiddler crabs (*Uca pugnax*, *Uca pugilator*, *Uca vomeris* and *Uca tangeri*) measured by in situ microspectrophotometry // J. of Experiment. Biol. 2007. Vol. 210. P. 447–453.
5. Frank T.M., Porter M., Cronin T.W. Spectral sensitivity, visual pigments and screening pigments in two life history stages of the ontogenetic migrator *Gnathophausia ingens* // J. Mar. Biol. Ass. of the United Kingdom. 2009. Vol. 89. N 1. P. 119–129.
6. Говардовский В.И., Зуева Л.В. Скоростной микроспектрофотометр для исследования фотолиза зрительных пигментов in situ // Сенсорные системы. 2000. Т. 14. № 4. С. 288–296.
7. Audzijonyte A., Pahlberg J., Vainola R., Lindstrom M. Spectral sensitivity differences in two sibling *Mysis* species (Crustacea, Mysida): adaptation or phylogenetic constraints? // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2005. Vol. 325. P. 228–239.
8. Govardovskii V.I., Fyhrquist N., Reuter T., Kuzmin D.G., Donner K. In search of the visual pigment template // Vis. Neurosci. 2000. Vol. 17. P. 509–528.
9. Бруммон Г. Биохимия природных пигментов. М., 1986. 425 с.
10. Denys C.J. Ommochrome pigments in the eyes of *Euphausia superba* (Crustacea, Euphausiacea) // Polar Biology. 1982. N 1. P. 69–76.
11. Cronin T.W., Marshall J.N. Multiple spectral classes of photoreceptors in the retinas of gonadactiloid stomatopod crustaceans // J. Comp. Physiology A. 1989. Vol. 166. P. 261–275.
12. Bhosale P., Serban B., Zhao D.Yu., Bernstein P.S. Identification and metabolic transformations of carotenoids in ocular tissues of the Japanese quail *Coturnix japonica* // Biochemistry. 2007. Vol. 46. P. 9050–9057.
13. Dontsov A.E., Fedorovich I.B., Lindstrom M., Ostrovsky M.A. Comparative study of spectral and antioxidant properties of pigments from the eyes of two *Mysis relicta* (Crustacea, Mysidae) populations, with different light damage resistance // J. Comp. Physiol. B. 1999. Vol. 169. P. 157–164.

Поступила в редакцию
01.10.09

SHORTWAVE LIGHT FILTRATION IN FORMATION OF SPECTRAL SENSITIVITY FOR TWO SHRIMP POPULATIONS OF *M. RELICTA* (MYSIDA)

A.E. Abu Khamidakh, J.V. Demchuk, P.P. Zak, M. Lindstrom, M.A. Ostrovsky

It is known that spectral sensitivity curves of shrimp *M. relict*a (Crustacea) have more long-wave position than the actual spectra of their visual pigments. We evaluated the possible role of screening pigments in the formation of the long-wavelength shift. In microspectrophotometrical measurements of screening granules in the eyes of *M. relict*a it is shown that the most of the granules have a characteristic spectrum of xanthommatin (λ_{\max} 455 nm) with a selective absorption in the blue region. According to the mathematical calculations carried out, light filtering through these granules allows getting the spectral sensitivity curve that is identical to the real spectral sensitivity.

Key words: *Crustacea, spectral sensitivity.*

Сведения об авторах

Абу Хамидах Амна Ейадовна — студентка 5-го курса кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: (495) 939-74-22; e-mail: amnushka@gmail.com

Демчук Юлия Владимировна — аспирантка Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. Тел.: (495) 939-74-22; e-mail: julia_demchuk@mail.ru

Зак Павел Павлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. Тел.: (495) 939-74-22; e-mail: pavelzak@mail.ru

Линдстром Магнус — докт. философии, доц., науч. сотр. Тварминнской зоологической станции Хельсинкского университета. Тел.: 8-10-358-(0)40 841-50-52; e-mail: magnus.lindstrom@helsinki.fi

Островский Михаил Аркадьевич — докт. биол. наук, акад. РАН, зав. кафедрой молекулярной физиологии биологического факультета МГУ, зав. лабораторией физико-химических основ рецепции Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. Тел.: (495) 939-73-57; e-mail: ostrovsky@sky.chph.ras.ru