

УДК 591.185.63

## ТОНКАЯ СТРУКТУРА РЕЦЕПТИВНЫХ ПОЛЕЙ ОРИЕНТАЦИОННО-ИЗБИРАТЕЛЬНЫХ ГАНГЛИОЗНЫХ КЛЕТОК СЕТЧАТКИ РЫБ

© 2020 г. А. Т. Алипер<sup>1,\*</sup>, И. Дамянович<sup>1</sup>, А. А. Зайчикова<sup>1</sup>, Е. М. Максимова<sup>1</sup>, П. В. Максимов<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН  
127051 Москва, Большой Каретный переулок, д. 19, Россия

\*E-mail: outtaget@gmail.com

Поступила в редакцию 09.09.2019 г.

После доработки 24.10.2019 г.

Принята к публикации 06.11.2019 г.

Ориентационно-избирательные ганглиозные клетки (ОИ ГК) найдены в сетчатке рыб несколько десятилетий назад, но механизмы ориентационной избирательности остаются до сих пор неизученными. ОИ ГК у рыб можно разделить на два класса, различающихся предпочтительной ориентацией, которая может быть близка к вертикальной либо горизонтальной. Остальными характеристиками эти два класса между собой не различаются. Они не избирательны к знаку контраста, т.е. имеют on-off природу. Мы записывали экстраклеточную активность окончаний аксонов сетчаточных ГК в *tectum opticum* живой обездвиженной рыбы. Объектом являлся серебряный карась. Параметры стимулов и экспериментальной серии задавались при помощи специально разработанного программного обеспечения. В данном исследовании мы использовали метод “шахматной доски” со стимуляцией одной точкой и двухточечной стимуляцией. ОИ ГК – детекторы горизонтального и вертикального края – способны давать ответ на одиночные вспышки точек, что позволяет обмерять их возбуждающее рецептивное поле. Ответ на такую стимуляцию заметно слабее в сравнении с таковым на предпочтительный стимул – соответственно ориентированную линию или границу. Однако, когда стимуляция идет одновременно двумя точками, которые выступают аппроксимацией отрезка предпочтительной ориентации, ОИ ГК отвечают длащимся импульсным разрядом. Мы также наблюдали торможение, когда точки были ориентированы ортогонально предпочтительной ориентации. Таким образом, две точки выступают достаточной аппроксимацией предпочтительного или ортогонального направления, что позволяет исследовать локальные свойства рецептивных полей ОИ ГК.

*Ключевые слова:* сетчатка, ганглиозные клетки, рецептивные поля

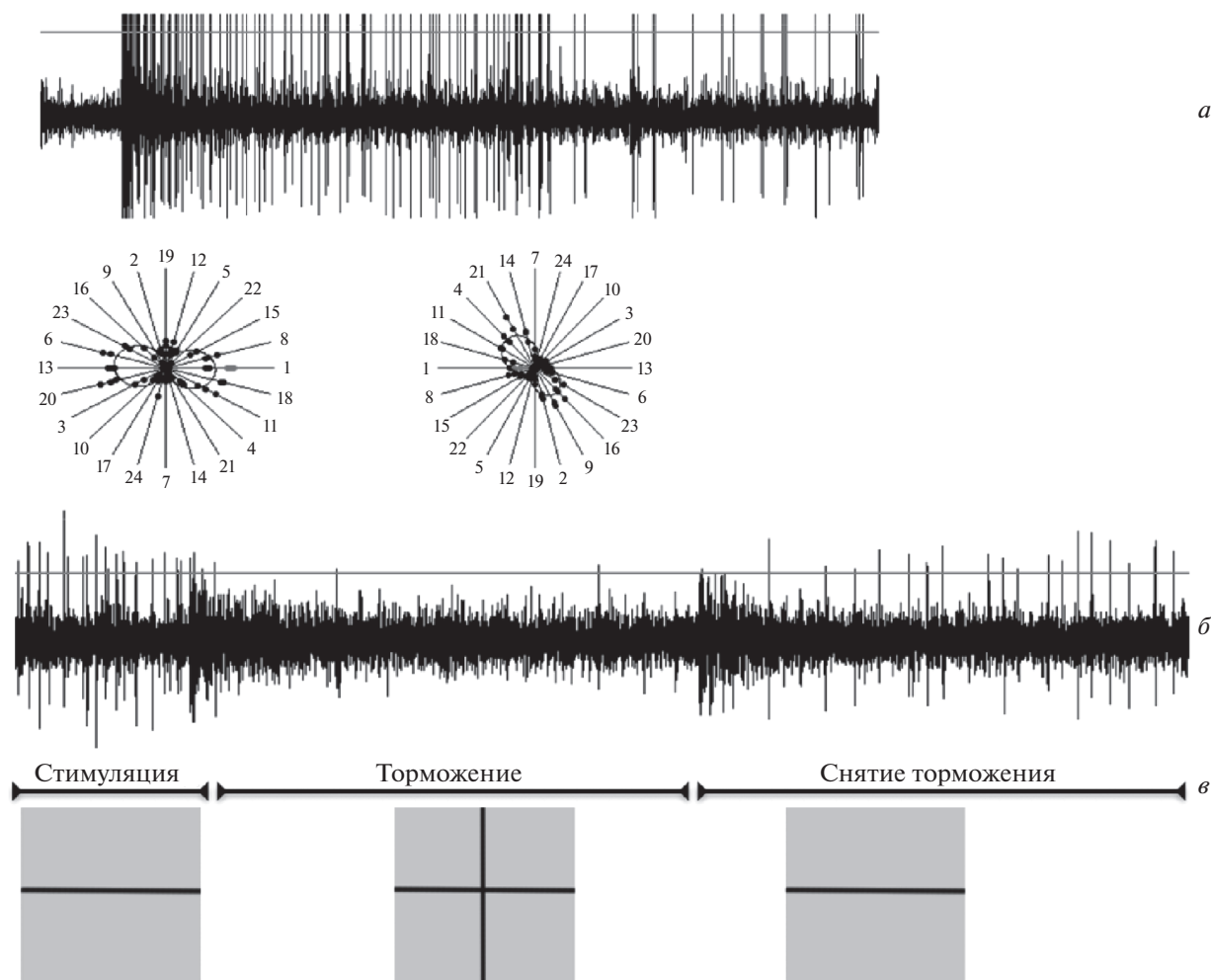
DOI: 10.31857/S0235009220010035

### ВВЕДЕНИЕ

Ганглиозные клетки (ГК) осуществляют заключительный этап обработки зрительной информации в сетчатке позвоночных. Вся зрительная сцена закодирована множеством ГК, чьи рецептивные поля (РП) распределены по поверхности сетчатки. Обычно РП ГК функционально разделены на центральную и периферическую части. Предъявление адекватного стимула в центральной части РП вызывает ответ клетки на такую стимуляцию. Если тот же стимул предъявлять только периферической части РП, никакого ответа не будет. Возбуждаемая центральная часть РП (ВРП) соответствует области, охватываемой дендритным древом клетки, которое собирает зрительный сигнал с относительно обширной области. На сетчатке кролика (Yang, Masland, 1992; 1994, Devries, Baylor, 1997) было показано, что

ВРП и области, покрываемые дендритными древами ГК, имеют примерно одинаковые размеры.

Информация о различных свойствах видимых объектов, их размер, направление движения, форма, цвет и другое, обрабатываются разными типами специализированных ГК – детекторами. Детекторы в том числе описаны в сетчатке рыб (Cronly-Dillon, 1964; Jacobson, Gaze, 1964; Зенкин, Пигарев, 1969; Liege, Galand, 1971; Максимова и др., 1971; Wartzok, Marks, 1973; Kawasaki, Aoki, 1983; Billota, Abramov, 1989). Информация, обработанная специализированными ГК, передается в первичные зрительные центры мозга рыб, в основном в одну из структур среднего мозга – *tectum opticum* (ТО). При вертикальном движении электрода через слои ТО можно наблюдать ответы от аксональных окончаний различных типов ГК. В поверхностных слоях преимущественно отводятся ответы дирекцио-



**Рис. 1.** Свойства ОИ ГК рыб.

Ответ ОИ ГК на стимуляцию стационарной линией предпочтительной ориентации (а). Диаграммы направленности детектора вертикального (слева) и горизонтального (справа) краев (б). Торможение ответа на стационарную линию предпочтительной ориентации ортогональным стимулом (в). Торможение (г).

нально-избирательных ГК (ДИ ГК), несколько глубже наблюдаются окончания разнообразных элементов, таких как ориентационно-избирательные ГК (ОИ ГК), детекторы пятен, цветоопponentные клетки, еще глубже проецируются детекторы контраста с ддящимся ответом (спонтанно-активные ГК) (Максимов, 2009). Особый интерес в данный момент прикован к ОИ ГК рыб, поскольку механизм формирования ориентационной избирательности до сих пор не изучен. У рыб представлены два класса ОИ ГК – с предпочтением к горизонтальным и вертикальным стимулами соответственно. Они могут отвечать ддящимся ответом на стимуляцию стационарной линией предпочтительной ориентации, который может быть заторможен одновременным введением в РП стимула ортогональной ориентации (рис. 1). На записях импульсной активности ли-

ниями показан порог отсечки регистрируемых импульсов.

Цель данной работы – исследование рецептивных полей ОИ ГК сетчатки рыб, выявление зон торможения и потенциации возбуждения в центральной и периферической зонах РП.

## МЕТОДИКА

Объектами для проведения всех опытов служили серебряные караси *Carassius auratus gibelio* размером от 10 до 15 см и весом от 35 до 100 г из подмосковных прудовых хозяйств. Животные содержались в лабораторных аквариумах объемом 60 л с аэрацией и фильтрацией воды в течение нескольких месяцев при комнатной температуре и естественном световом режиме.

Для доступа к ТО у рыбы с одной стороны черепа, контралатерально относительно глаза, на

который подается стимуляция, удаляли теменно-затылочную кость, а также располагающиеся под ней жировую ткань и участок мягкой оболочки мозга. На время опыта животное обездвигивали введением *d*-тубокурарина внутримышечно (доза составляла 0.3 мг на 100 г массы рыбы). Обездвиженную рыбу закрепляли в естественном положении в аквариуме из плексигласа, с принудительным протоком воды через жабры. В установке в течение опыта циркулировало около 10 л постоянно аэрирующейся и фильтрующейся воды. Циркуляция воды обеспечивалась термостатирующим насосом. К жаберному аппарату рыбы вода поступала под давлением 50 см водяного столба. Уровень воды в аквариуме поддерживали таким образом, чтобы глаза рыбы находились полностью под водой, но вода не заливалась на открытый мозг.

Предъявление программно-сгенерированных стимулов осуществлялось через прозрачную стенку аквариума на экране монитора LG Flatron 775FT, установленного на подвижном столике, что позволяло перемещать его в нужное место поля зрения рыбы. В основном исследовали латеральные поля зрения в довольно широкой области: свыше 60° по горизонтали и около 40° по вертикали. Расстояние от монитора до глаза рыбы в ходе эксперимента составляло 30–40 см. В качестве стимулов в экспериментах, описанных в данной работе, использовались только градации серого. Относительные спектры излучения экрана были измерены при помощи модульной спектрометрической системы MCS 500 Modules от производителя Carl Zeiss. Максимальная яркость экрана (при R = G = B = 255), измеренная фотометром ТКА-04/3, составляла 38 кд/м<sup>2</sup>. В энергетических единицах это соответствует эффективной энергетической яркости для фотопического зрения человека, равной 56 мВт ст<sup>-1</sup> м<sup>-2</sup>. Согласно нашим данным (Максимов, 2005), фотопическая спектральная чувствительность ганглиозных клеток сетчатки карася определяется в основном его длинноволновыми колбочками и смещена на 75 нм в длинноволновую сторону. Соответствующая функция спектральной чувствительности была рассчитана по формуле Говардовского (Govardovskii et al., 2000) для зрительного пигмента системы витамина A2 с  $\lambda_{\max} = 622.5$  нм с учетом поглощения в передних средах глаза (Douglas, 1989). Рассчитанная таким образом эффективная энергетическая яркость того же белого экрана для ганглиозных клеток сетчатки карася равнялась 65 мВт ст<sup>-1</sup> м<sup>-2</sup>.

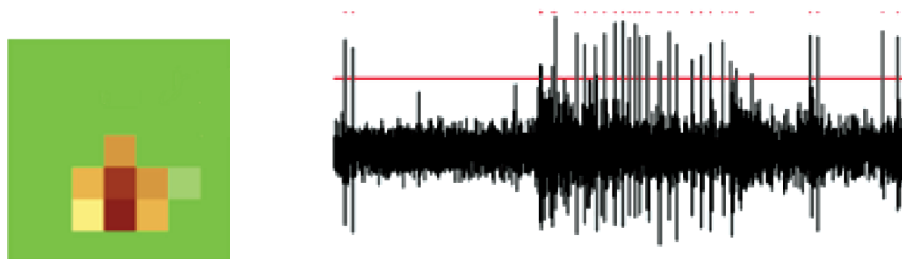
Ответы ганглиозных клеток регистрировали экстраклеточно от окончаний их аксонов в верхних слоях тектума заключенными в стеклянную оболочку металлическими платинированными микроэлектродами (Gaesteland et al., 1959) с диамет-

ром платиновой шляпки 3–5 мкм с сопротивлением 200–500 кОм на частоте 1 кГц. Микроэлектрод под визуальным контролем микроманипулятором Sutter MP-285 подводили к интересующей области поверхности тектума (с учетом ретинопической проекции, ориентируясь по картине кровеносных сосудов) и осторожно погружали, добиваясь стабильного одиночного отведения, о чем судили по величине импульсов и по соотношению сигнала и шума. Импульсы с выхода усилителя переменного тока с полосой пропускания от 100 Гц до 3.5 кГц (Виноградов, 1986) прослушивали при помощи громкоговорителя, наблюдали на экране осциллографа и вводили в память регистрирующего компьютера, оснащенного АЦП с частотой дискретизации 25 кГц.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В рамках данного исследования были рассмотрены РП 37 ОИ ГК. Несмотря на то что предпочтительной для ОИ ГК является стимуляция линиями соответствующей ориентации, эти клетки могут давать также некоторый ответ на иные стимулы, например, на черные или белые пятна небольшого размера. Пример такого ответа дан на рис. 2. Это позволяет оценить размеры, форму их ВРП вспышками пятен, а также установить положение центра ВРП. Вспышки пятен предъявлялись в ячейках квадратной сетки в квазислучайном порядке (метод шахматной доски), после чего программа производила подсчет количества импульсов, возникающих в ответ на стимуляцию. В каждой ячейке сетки стимул предъявляли трижды. Серии стимуляции импульсной активности всегда начинали предъявлением стимула в центральной ячейке. В конце серии проводили повторную стимуляцию в центральном положении для контроля уровня ответа клетки. Результаты опыта, проведенного на детекторе горизонтального края, приведены на рис. 2. Область стимуляции поделена на 49 маленьких квадратов (пятен) размером чуть больше 1°. Клеточные ответы во всей области стимуляции представлены в географической палитре топографической карты. По результатам данной процедуры, область стимуляции смещалась таким образом, чтобы ее центр совпадал с предполагаемым (на основании измерений) центром ВРП исследуемой клетки. Форма ВРП исследованных клеток имела скорее однородный характер, без тенденции к большей протяженности в том или ином направлении.

Для исследования тонкой структуры РП изучаемых ОИ ГК мы использовали метод двухточечной стимуляции, которая позволяет проследить взаимодействие внутри разных зон РП. Схема эксперимента аналогична обмеру РП методом “шахматной доски“, но в данном случае в центральной ячейке стимул вспыхивает каждый раз,



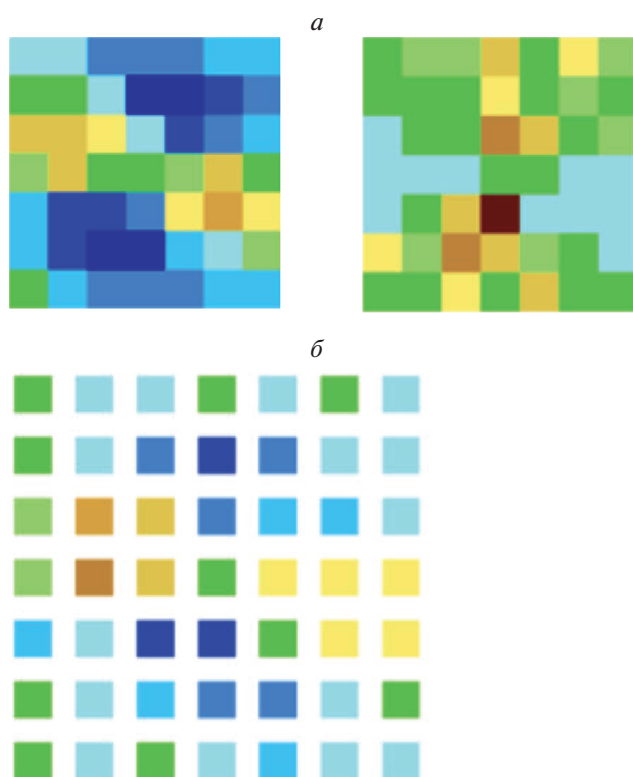
**Рис. 2.** Метод картирования ВРП вспышками пятен.

Слева приведен пример картированного РП детектора горизонтального края. В каждой точке светлое пятно вспыхивало 3 раза, в центральном положении проводилась контрольная стимуляция после окончания серии. Количество импульсов в ответе клетки в каждой точке стимуляции отражено в географической палитре. Справа приведен ответ клетки на стимуляцию вспышкой пятна.

а параллельно с ним в квазислучайном порядке предъявляется еще один в другой ячейке сетки. Примеры результатов такого эксперимента представлены на рис. 3, *а*. Каждый такой эксперимент давал на выходе одну и ту же картину — ортогонально ориентированные вытянутые “восьмерки” зон активации и торможения, далеко выходящие за пределы измеренных ранее ВРП. При уве-

личении расстояния между ячейками можно наблюдать ограниченность таких зон (рис. 3, *б*).

Данные, приведенные в этом исследовании, противоречат тому, что показывают другие работы по изучению ориентационной избирательности в сетчатке рыб. Актуальная модель ориентационной избирательности, предложенная британскими исследователями (Antinucci et al., 2018), предполагает, что форма дендритного дерева ОИ ГК вытянута в направлении предпочтительной ориентации, а торможение реализуется посредством  $tenm3+$  амакриновых клеток, чье дендритное дерево вытянуто ортогонально предпочтительной ориентации. Согласно нашим же измерениям, дендритное дерево ОИ ГК, вероятно, имеет округлую форму и не вытянуто в каком-либо направлении. Похожая схема реализована у детекторов вертикального края сетчатки мыши, когда дендритное дерево самой ГК имеет округлую форму, а дендрит тормозной амакриновой клетки вытянут ортогонально предпочтительной ориентации (Nath, Schwartz, 2016). Необходимо, впрочем, учитывать, что в данном случае аналогия условна, потому как в отличие от ориентационно-избирательных клеток сетчатки рыб, такие клетки у млекопитающих имеют не on-off природу, а демонстрируют избирательность, так же и к знаку контраста. Кроме того, “распознавание” точки как образующей вместе с центральной аппроксимацией отрезка предпочтительной ориентации происходит в том числе далеко за границами предполагаемого ВРП. Таким образом, есть вероятность, что кроме тормозных  $tenm3+$  амакриновых клеток в формировании механизма ориентационной избирательности принимает участие еще один тип амакриновых клеток, усиливающий ответ и собственно формирующий ориентационное предпочтение. Можно предположить, что одни и те же амакриновые клетки могут образовывать тормозные синапсы на одних ОИ ГК и возбуждающие на ОИ ГК с предпочтением ортогональной ориентации. Однако также ориента-



**Рис. 3.** Результаты экспериментов с двухточечной стимуляцией ОИ ГК.

Детекторы горизонтального (слева) и вертикального (справа) краев (*а*). Эксперимент, выполненный с увеличенным расстоянием между ячейками сетки (*б*). Расстояние между ячейками сетки составляет  $0.55^\circ$ .

ционная избирательность может формироваться и разными типами амакриновых клеток.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Виноградов Ю.А. Электронные приборы в электрофизиологических, морфологических и этологических исследованиях. Препринт № 13. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1986. 23 с.
- Зенкин Г.М., Пигарев И.Н. Детекторные свойства ганглиозных клеток сетчатки щуки. *Биофизика*. 1969. Т. 14. № 4. С. 722–730.
- Максимов В.В., Максимова Е.М., Максимов П.В. Классификация дирекционально-избирательных элементов, регистрируемых в тектуме карася. *Сенсорные системы*. 2005. Т. 19. № 4. С. 342–356.
- Максимов В.В., Максимова Е.М., Максимов П.В. Классификация ориентационно-избирательных элементов, регистрируемых в тектуме карася. *Сенсорные системы*. 2009. Т. 23. № 1. С. 13–23.
- Максимова Е.М., Орлов О.Ю., Диментман А.М. Исследование зрительной системы нескольких видов морских рыб. *Вопросы ихтиологии*. 1971. Т. 11. № 5. С. 893–899.
- Antinucci P., Hindges R. *Orientation-Selective Retinal Circuits in Vertebrates*. Front Neural Circuits. 2018.
- Billota J., Abramov J. *Orientation and direction tuning of goldfish ganglion cells*. Visual Neurosci. 1989. P. 3–13.
- Cronly-Dillon J.R. *Units sensitive to direction of movement in goldfish tectum*. Nature. 1964. V. 203. P. 214–215.
- Dervies S.H., Baylor D.A. Mosaic arrangement of ganglion cell receptive fields in rabbit retina. *J Neurophysiol*. 1997. V. 78. P. 2048–2060.
- Douglas R.N., McGuidan C.M. The spectral transmission of freshwater ocular media an interspecific comparison and a guide to potential ultraviolet sensitivity. *Vision Res*. 1989. V. 29 (7). P. 871–879.
- Gaestesland R.C., Howland B., Lettvin J.Y. Pitts W.H. Comments on microelectrodes. *Proc IRE*. 1959. V. 47. P. 1852–1856.
- Govardovskii V.I., Fyhrquist. N., Reuter T., Kuzmin D.G., Donner K. In search of the visual pigment template. *Vis. Neurosci*. 2000. V. 17 (4). P. 509–528
- Jacobson M., Gaze R.M. Types of visual response from single units in the optic tectum and optic nerve of the goldfish. *J. Exp Physiol*. 1964. V. 49. P. 199–209.
- Kawasaki M., Aoki K. Visual responses recorded from the optic tectum of the Japanese dace. *Tribolodon hakonensis*, *J. Comp Physiol*. 1983. V. 152. P. 147–153.
- Liege B., Galand G. Types of single-unit visual responses in the trout's optic tectum. Ed. A. Gudikov. *Visual Information Processing and Control of Motor Activity*. Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 1971. P. 63–65.
- Nath A., Schwartz G.W. Cardinal Orientation Selectivity Is Represented by Two Distinct Ganglion Cell Types in Mouse Retina. *J. Neurosci*. 2016. V. 16. P. 3208–3221.
- Wartzok D., Marks W.B. Directionally selective visual units recorded in optic tectum of the goldfish. *J. Neurophysiol*. 1973. V. 36. P. 588–604.
- Yang G., Masland R.H. Direct visualization of the dendritic and receptive fields of directionally selective retinal ganglion cells. *Science*. 1992. V. 258. P. 1949–1952.
- Yang G., Masland R.H. Receptive fields and dendritic structure of directionally selective retinal ganglion cells. *J. Neurosci*. 1994. V. 14. P. 5267–5280.

## Fine structure of receptive fields of orientation-selective ganglion cells in goldfish retina

A. T. Aliper<sup>a, #</sup>, I. Damjanovic<sup>a</sup>, A. A. Zaichikova<sup>a</sup>, E. M. Maximova<sup>a</sup>, and P. V. Maximov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences  
127051 Moscow, Bolshoy Karetny per. 19, Russia

<sup>#</sup>E-mail: outtaget@gmail.com

Orientation-selective ganglion cells (OS GCs) had been found in fish retina decades ago, however the underlying mechanisms behind their orientation selectivity remain unclear. OS GCs in fish can be divided into two physiological types that differ in preferred orientations close to vertical and horizontal. In other properties, the two types of the OS GCs do not differ from each other. They are not selective to the sign of stimulus contrast, i.e., have ON-OFF nature. We recorded extracellular activity from the axon terminals of retinal GCs in the *tectum opticum* of living restrained goldfish. The properties of stimuli and the experimental series were adjusted with software developed specifically for our research. For current study we used random checkerboard mapping method with single spot and two-spot flashing stimuli presented on CRT monitor. Orientation-selective ganglion cells – detectors of horizontal and vertical lines – are able to respond to single flashing spot stimuli, allowing to estimate their excitatory receptive fields' sizes and shape. However the response to this kind of stimulation is significantly weaker when compared to response to preferred stimuli – properly oriented stripes and edges. But when presented with stimulus of simultaneous flash of two spots that stand for end points of a line segment of preferred orientation the OS GCs respond with sustained spike discharge. We also observed inhibition when two spots were oriented orthogonally. The resulting images of local excitations and inhibitions in the RFs of OS GCs depicted in pseudo colors of geographic palette resemble two intersected hourglasses, with narrow excitatory and wide inhibitory zones. Two spots appear to be sufficient approxima-

tion of segments of preferred or orthogonal orientation and allow examining local properties of their receptive fields. Hence two-spot stimulation may become an effective instrument to reveal retinal synaptic map of OS GCs on the IPL level.

*Key words:* retina, ganglion cells, receptive fields

## REFERENCES

- Vinogradov Y. A. *Elektronnyye pribory v elektro-fiziologicheskikh, morfologicheskikh i etologicheskikh issledovaniyakh* [Electronic devices in elektro-physiological, morfologikal and ethological research] Preprint № 13. Vladivostok: DVNC AN SSSR. 1986. 23 p. [in Russia].
- Zenkin G.M., Pigarev I.N. *Detektornyye svoystva ganglioznykh kletok setchatki shchuki* [Detection properties of ganglion cells in pike retina]. *Biofizika* [Biofiziks]. 1969. V. 14. № 4. P. 722–730 [in Russia].
- Maksimov V.V., Maksimova E.M., Maksimov P.V. *Klassifikatsiya direktsional'no-izbiratel'nykh elementov, registriruemyykh v tektume karasya* [Classification of direction-selective elements recorded in goldfish tectum] *Sensornyye sistemy* [Sensory systems]. 2005. V. 19. № 4. P. 342–356 [in Russia].
- Maksimov V.V., Maksimova E.M., Maksimov P.V. *Klassifikatsiya orientatsionno-izbiratel'nykh elementov, registriruemyykh v tektume karasya* [Classification of orientation-selective elements recorded in goldfish tectum]. *Sensornyye sistemy* [Sensory systems]. 2009. V. 23. № 1. P. 13–23 [in Russia].
- Maksimova E.M., Orlov O.Y., Dimentman A.M. *Issledovanie zritel'noy sistemy neskol'kih vidov morskikh ryb* [Reserching the visual system of several species of sea fish]. *Voprosy ihtiologii* [Ichthyology issues]. 1971. V. 11. № 5. P. 893–899 [in Russian].
- Antinucci P., Hindges R. *Orientation-Selective Retinal Circuits in Vertebrates*. Front Neural Circuits. 2018.
- Billota J., Abramov J. Orientation and direction tuning of goldfish ganglion cells. *Visual Neurosci*. 1989. P. 23–13.
- Cronly-Dillon J.R. Units sensitive to direction of movement in goldfish tectum. *Nature*. 1964. V. 203. P. 214–215.
- Devries S.H., Baylor D.A. Mosaic arrangement of ganglion cell receptive fields in rabbit retina. *J Neurophysiol*. 1997. V. 78. P. 2048–2060.
- Douglas R.N., McGuidan C.M. The spectral transmission of freshwater ocular media an interspecific comparison and a guide to potential ultraviolet sensitivity. *Vision Res*. 1989. V. 29 (7). P. 871–879.
- Gaesteland R.C., Howland B., Lettvin J.Y., Pitts W.H. Comments on microelectrodes. *Proc IRE*. 1959. V. 47. P. 1852–1856.
- Govardovskii V.I., Fyhrquist N., Reuter T., Kuzmin D.G., Donner K. In search of the visual pigment template. *Vis. Neurosci*. 2000. V. 17 (4). P. 509–528.
- Jacobson M., Gaze R.M. Types of visual response from single units in the optic tectum and optic nerve of the goldfish. *J. Exp Physiol*. 1964. V. 49. P. 199–209.
- Kawasaki M., Aoki K. Visual responses recorded from the optic tectum of the Japanese dace, *Tribolodon hakonensis*. *J. Comp Physiol*. 1983. V. 152. P. 147–153.
- Liege B., Galand G. Types of single-unit visual responses in the trout's optic tectum. Ed. A. Gudikov. *Visual Information Processing and Control of Motor Activity*. Bulgarian Academy of Sciences, Sofia. 1971. P. 63–65.
- Nath A., Schwartz G.W. Cardinal Orientation Selectivity Is Represented by Two Distinct Ganglion Cell Types in Mouse Retina. *J Neurosci*. 2016. V. 16. P. 3208–3221.
- Wartzok D., Marks W.B. Directionally selective visual units recorded in optic tectum of the goldfish. *J Neurophysiol*. 1973. V. 36. P. 588–604.
- Yang G., Masland R.H. Direct visualization of the dendritic and receptive fields of directionally selective retinal ganglion cells. *Science*. 1992. V. 258. P. 1949–1952.
- Yang G., Masland R.H. Receptive fields and dendritic structure of directionally selective retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 1994. V. 14. P. 5267–5280.