
СЛУХОВАЯ
СИСТЕМА

УДК 595. 771, 591. 498

**ЧАСТОТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
СЛУХОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ КОМАРОВ-ЗВОНЦОВ
(DIPTERA, CHIRONOMIDAE)**

© 2013 г. Д.Н. Лапшин

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем передачи информации
им. А.А. Харкевича РАН
127994 Москва, ГСП-4, Б. Каретный переулок, 19
E-mail: lapshin@itp.ru*

Поступила в редакцию: 01.10.2012 г.

Комары воспринимают звук перистыми антеннами, в основании которых расположены джонстоновы органы (ДО). Многочисленные рецепторы ДО преобразуют колебания антенны в электрические потенциалы, кодирующие параметры акустического сигнала. Результирующая частотная характеристика слуховой системы этих насекомых определяется в первую очередь избирательностью рецепторов ДО. Однако вопрос о способности комаров к спектральному анализу до сих пор ещё не решен.

При помощи методики регистрации электрических потенциалов в антеннальном нерве было показано, что сигналы, передаваемые от ДО по аксонам в центральную нервную систему, являются аналоговыми отображениями воспринимаемых акустических волн. Эта особенность открывает возможность измерения индивидуальных характеристик рецепторов методом положительной обратной связи. Для его реализации необходимо подать на стимулирующую акустическую систему усиленный сигнал, регистрируемый от аксона рецептора ДО. При выполнении условий амплитудного и фазового согласования положительной обратной связи в системе стимуляции должны возникнуть автоколебания на частоте, близкой к истинной настройке рецептора. Задача данного исследования заключалась в измерении индивидуальных характеристик рецепторов ДО самцов комаров семейства Chironomidae при помощи метода включения слуховой системы насекомого в контур положительной обратной связи.

В ходе экспериментов были обнаружены, как минимум, три группы рецепторов, различавшихся по своей частотной настройке: 140–190, 240–290 и 320–370 Гц (соотношение средних частот трёх групп близко к 1:1.5:2). Диапазону 240–290 Гц соответствует частота крыловых взмахов конспецифических самок. Рецепторы, настроенные на частоты 140–190 Гц, могут воспринимать комбинационные гармоники, равные разности между частотами полёта самца и самки в процессе их пространственного сближения.

Данные о наличии в слуховой системе комаров наборов рецепторов, имеющих разную частотную настройку, позволяют предположить способность этих насекомых к спектральному анализу акустических сигналов.

Ключевые слова: джонстоновы органы, Chironomidae, комар, акустическая коммуникация, положительная обратная связь, частотная настройка.

ВВЕДЕНИЕ

Слуховая система комаров является важным звеном в механизме обеспечения встречи полов. После обнаружения сигнала, характерного для звука полёта самки, самцы, ориентируясь на направление прихода звуковых волн, резко ускоря-

ют полёт и устремляются к источнику звука. Такая схема поведения характерна как для кровососущих комаров (Culicidae), так и для представителей Chironomidae (Ogawa, Sato 1993; Hirabayashi, Nakamoto, 2001).

Самцы комаров воспринимают звук перистыми антеннами, в основании которых расположе-

ны джонстоновы органы (Johnston, 1855). Наиболее подробно на настоящий момент исследована слуховая система кровососущих комаров. Звонцы (Chironomidae) исследованы в меньшей степени, однако у представителей обоих семейств наблюдается много общего в ультраструктурной организации (Жантiev, Федорова, 1999) и физиологических реакциях на звук рецепторного аппарата джонстоновых органов (Жантiev и др., 2001; Лапшин, 2010; 2012).

Как правило, в достижении определенных функциональных характеристик насекомым свойственны экономные решения. В этой связи вызывает удивление очень сложное устройство джонстоновых органов (ДО) комаров, содержащих несколько десятков тысяч механочувствительных рецепторов (Boo, Richards, 1975; Жантiev, Федорова, 1999).

Как и у кулицид, механочувствительные рецепторные клетки в джонстоновых органах звонцов сгруппированы по две-три единицы в радиально расположенных хордотональных сенсиллах (Жантiev, Федорова, 1999). Рецепторы преобразуют колебания антенн в электрические потенциалы, с некоторыми искажениями повторяющие форму акустических колебаний, вызвавших вибрацию антенн. Эти потенциалы распространяются электротонически по аксонам антеннального нерва (Лапшин, 2012) до зоны первичной обработки акустической информации (Ignell et al., 2005).

Частотная характеристика ДО представляет собой результат совместного влияния резонанса антенн, характеристик слуховых рецепторов (Жантiev и др., 2001) и, возможно, активных механизмов настройки (Göpfert, Robert, 2001; Avitabile et al., 2010), которые способствуют увеличению чувствительности к слабым сигналам в области оптимума восприятия ДО.

В последние годы заметно усилился интерес исследователей к нелинейным эффектам, возникающим при воздействии на рецепторный аппарат комаров полетных вибраций (Jackson, Robert, 2006; Warren et al., 2009; Arthur et al., 2010; Лапшин, 2010; Gibson et al., 2010; Лапшин, 2011; 2012). Исследования в этой области показали, что в периферической части слуховой системы комаров, принадлежащих разным семействам, реализуются одни и те же физические закономерности. Было также обнаружено, что самцы и самки кулицид на этапе сближения в полёте взаимно подстраивают частоты взмахов в соотношении 2:3. Такая подстройка и динамика её протекания может служить одним из признаков конспецифич-

ности сближающихся особей (Cator et al., 2009; 2010). Однако осуществление подстройки невозможно без частотного анализа воспринимаемых сигналов.

Данные, полученные с использованием микроэлектродов, существенно изменили представления о функционировании слуховой системы комаров. При помощи этой методики были зарегистрированы реакции рецепторов и интернейронов как на простые акустические стимулы, так и на стимулы, действовавшие в условиях имитации полёта (Лапшин, 2010; 2011; 2012). Было показано, что комары в полёте могут определять степень рассогласования частоты собственных крыловых взмахов и частоты воспринимаемого сигнала. Однако вопрос о способности комаров, сидящих на субстрате, анализировать частотный спектр колебаний воздушной среды, до сих пор ещё не решен (Arthur et al., 2010). Тем не менее уже известны факты, прямо указывающие на такую возможность. У комаров *Culex pipiens pipiens* L. были обнаружены интернейроны, реагирующие на акустические стимулы в узком диапазоне (в частотной полосе шириной 30 Гц по уровню +10 дБ от порогового минимума), причём диапазон восприятия этих нейронов не совпадал со значением первой гармоники звука полёта конспецифической самки и не зависел от условий имитации полёта. Эти данные указывают на различия в частной настройке рецепторов ДО.

Выше уже было упомянуто, что потенциалы в аксонах рецепторов ДО являются аналоговым отображением воспринимаемого акустического сигнала. Эта особенность передачи информации к центральной нервной системе даёт уникальную возможность измерения характеристик отдельного рецептора: для её реализации достаточно подать на акустические излучатели сигнал, регистрируемый от его аксона (естественно, после дополнительного электрического усиления). Если будут выполнены условия амплитудного и фазового согласования положительной обратной связи, в замкнутой системе стимуляции возникнут автоколебания на частоте максимального усиления конкретного рецептора, т.е. на частоте, близкой (но не равной) его истинной настройке.

Задача данного исследования – измерение методом положительной обратной связи индивидуальных частотных характеристик рецепторов джонстоновых органов самцов комаров семейства Chironomidae.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на 12 самцах комаров *Chironomus plumosus* L. из природной популяции. Эксперименты проводили в лабораторных условиях при температуре воздуха 18–22°C в августе – сентябре 2011 г. на базе биостанции "Кропотово" Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Перед опытом комара фиксировали на столике из металлизированного пластика клеем на основе крахмала с добавлением 1%-го раствора NaCl. Такой клей, нанесённый тонким слоем на токопроводящую поверхность столика, помимо механической фиксации комара, выполнял функцию индифферентного электрода и предохранял подопытное насекомое от высыхания. Столик ориентировали в шаровом креплении таким образом, чтобы акустические волны действовали на антенны комара в дорсовентральном направлении.

Акустическая камера состояла из двух симметричных частей, каждая из которых представляла собой трубу из пластика диаметром 120 мм с динамическим излучателем (динамиком), закреплённым в торце. Одна из частей камеры была съёмной. Два динамика WS 13BF (1045) фирмы "Visaton" (Германия) в собранной камере располагались симметрично друг против друга, и электрически были соединены с выходом усилителя мощности параллельно и противофазно (Лапшин, 2010). В процессе акустической стимуляции за счет колебаний диффузоров динамиков вдоль продольной оси камеры периодически смещался объём воздуха. На антенны подопытного насекомого, помещенного в геометрический центр камеры, действовало переменное усилие, пропорциональное мгновенной скорости воздушного потока.

Для контроля уровня и формы стимулирующих сигналов около центра одного из динамиков был установлен датчик колебаний диффузора – электромагнитный адаптер M75-6S (Shure Inc.). После дополнительного усиления сигнал с выхода адаптера поступал в систему регистрации данных. Все измерения скорости воздушной среды около подопытного комара приведены к логарифмической шкале в единицах децибел. За 0 дБ принято значение уровня колебательной скорости (УКС) $4,85 \cdot 10^{-5}$ мм/с, которое в условиях свободного поля соответствует стандартному значению уровня звукового давления $2 \cdot 10^{-5}$ Па.

При измерении частотно-пороговых характеристик рецепторов ДО в качестве генератора управляющих сигналов был использован цифроана-

логовой преобразователь (ЦАП) ЛАЦАПн10м1 ("Руднев и Шиляев", Россия), подключённый к входу усилителя мощности стимулирующего сигнала (коэффициент усиления по напряжению 10 дБ).

При регистрации электрической активности от волокон антеннального нерва необходимо было обеспечивать локальное отведение с зоной чувствительности, соизмеримой с диаметром отдельного аксона. С учетом этого обстоятельства в работе были использованы стеклянные микроэлектроды. Практика применения таких электродов в опытах с комарами показала, что при определённой форме конической части, даже после частичного разрушения острия в момент прокола кутикулы, его диаметр оставался достаточно мал для решения большинства поставленных задач (Лапшин, 2010; 2012). Электрическое сопротивление электродов из боросиликатного стекла 1B100F-4 (WPI Inc.), заполненных 0.9%-ным раствором NaCl после прокола кутикулы составляло 5–10 МОм. Последующее усиление электрических сигналов осуществляли при помощи усилителя постоянного тока с большим входным сопротивлением (более 10 Гом) в паре с дополнительным усилителем переменного тока (полоса пропускания 5–5000 Гц).

Метод тестирования рецепторов с использованием обратной связи. Для измерения характеристических частот рецепторов ДО был использован метод положительной обратной связи. Принцип тестирования заключался в том, что в качестве электрических сигналов для управления динамиками использовали усиленные потенциалы самих рецепторов. Для формирования положительной обратной связи колебания воздуха, вызванные движением диффузоров динамиков, должны были вызывать синфазный отклик рецепторного потенциала.

С учётом симметрии структуры джонстоновых органов подразумевалось, что при отклонении в сторону от нейтрального положения флагеллума антенны одна часть рецепторов будет растягиваться в продольном направлении, в то время как рецепторы на противоположной стороне будут испытывать сжатие. Соответственно можно было ожидать, что электрические сигналы от рецепторов, расположенных диаметрально симметрично относительно оси флагеллума при стимуляции, будут генерировать противофазные сигналы. С учетом этого обстоятельства в цепь обратной связи был добавлен переключаемый инвертор. Таким образом, стало возможно не только адаптировать условия стимуляции к свойствам конк-

ретного нейрона, но и исследовать один и тот же элемент при действии как положительной, так и отрицательной обратной связи.

В замкнутую цепь передачи сигнала входили следующие элементы: аксон рецептора в антеннальном нерве, микроэлектрод, электрофизиологические усилители, регулятор уровня сигнала обратной связи, частотный фильтр для компенсации влияния резонанса стимулирующих динамиков, переключаемый инвертор (сдвиг фазы сигнала 0° или 180°), фильтр низких частот с частотой среза 500 Гц и наклоном характеристики на более высоких частотах -6 дБ/октаву, амплитудный ограничитель по уровню 100 дБ УКС, усилитель мощности стимулирующего сигнала, динамики акустической камеры, антенна комара в комплексе с ДО и рецепторы в составе сенсилл ДО.

Фильтр низких частот снижал влияние на сигнал обратной связи высокочастотных гармоник и шумов, составлявших значительную часть энергии ответного сигнала рецепторов. Амплитудный ограничитель препятствовал неконтролируемому увеличению управляющего сигнала на входах динамиков при автовозбуждении исследуемого рецептора.

Из всех перечисленных элементов резонансными свойствами обладали подвижная система динамиков (частота основного резонанса 51 Гц), антенны комара (частота резонанса 300–340 Гц, Жантеев и др., 2001) и, гипотетически, рецепторы ДО. Влияние резонанса динамиков в большей степени было скомпенсировано выбором соответствующей частотной характеристики фильтра в канале формирования сигнала обратной связи.

В качестве параметра, характеризующего силу обратной связи, был выбран уровень стимулирующего сигнала, доступный для непосредственно измерения в ходе эксперимента.

В начале опыта по мере смещения электрода в сторону антеннального нерва препарат непрерывно стимулировали последовательностью тональных пульсов с частотой заполнения 260 Гц, уровнем 60 дБ УКС, длительностью отдельного пульса 80 мс и периодом следования пульсов 0.6 с. После резкого увеличения амплитуды ответной электрофизиологической реакции стимулирующую систему переключали в режим положительной обратной связи и измеряли частоту автовозбуждения.

Методики измерения частотно-пороговых характеристик и калибровки стимулирующей аппаратуры описаны ранее (Лапшин, 2010). В качестве критерия ответов рецепторов ДО на стимулы было принято устойчивое превышение на 2 дБ

вызванных стимуляцией амплитудных выбросов над средним значением стационарного шума (в конкретном отведении). Разделение ответной активности и шума осуществлялось амплитудным дискриминатором. В процессе измерения порога на определенной частоте стимул постепенно увеличивали с шагом 1 дБ от заведомо подпорогового уровня. Признаком превышения стимулом порога исследуемого нейрона служило резкое учащение импульсации на выходе дискриминатора, коррелировавшее с предъявлением очередного акустического пульса в непрерывной серии.

Оцифровку сигналов с выходов электрофизиологических усилителей, датчика колебаний диффузора динамика и сигнала с входных клемм динамиков производили при помощи аналогово-цифрового преобразователя E14-440 (L-Card, Россия) под управлением программы Lgraph II, разработки той же фирмы. При последующем анализе данных были использованы компьютерные программы "Sound Forge 10 Pro" (Sony, Япония) и "Spike-C3", разработанная сотрудником ИБР РАН Д.Д. Воронцовым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности регистрации выходных потенциалов рецепторов. Наилучшие результаты тестирования рецепторов ДО по критериям низких порогов возбуждения и малой зашумленности электрофизиологических ответов были получены при внутриклеточном отведении активности от аксонов антеннального нерва (рис. 1, а). При медленном погружении электрода и включенной обратной связи моменту возбуждения рецептора обычно предшествовал отрицательный скачок потенциала, на некоторое время перегружавший усилитель. По мере восстановления чувствительности регистрирующей системы нарастал уровень сигнала в петле обратной связи, достигавший на входе электрофизиологического усилителя значений порядка десяти милливольт. Однако низкая стабильность внутриклеточных отведений, как следствие остаточного механического напряжения в месте охвата кутикулой шейки электрода, не позволяла в таком режиме проводить серии однотипных экспериментов.

В то же время при отладке методики выяснилось, что эффект автовозбуждения можно реализовать и при внеклеточном отведении активности рецепторов при условии достаточно близкого положения острия электрода к исследуемому аксону. В таком режиме при постепенном увеличении

уровня обратной связи из подпороговой области автогенерация возникала резко. Амплитуда сигнала при этом увеличивалась на 7–12 дБ (рис. 1, в, з). Уровень стимула, от которого начиналась генерация, был определён как порог автовозбуждения. Эта величина сильно зависела от качества отведения электрической активности рецепторов и составляла в разных опытах от 58 до 82 дБ УКС. Дальнейшие исследования проводили при уровне обратной связи на 10–15 дБ превышавшем порог возбуждения рецептора.

Влияние фазового сдвига сигнала обратной связи на эффекты самовозбуждения рецепторов ДО. В начале эксперимента при высокой амплитуде стимуляции (порядка 90 дБ и выше) генерацию можно было наблюдать при отведении электрической активности от кутикулы капсулы ДО (микрофонный потенциал), т.е. без проникновения электрода в гемолимфу. Как правило, возбуждение при этом возникало сразу на нескольких частотах, каждая из которых сопровождалась собственным комплексом обергармоник (рис. 2, а). При переключении фазы обратной связи некоторые частоты сменялись другими либо сохранялись в своих прежних значениях (рис. 2, в).

Опыты с регистрацией микрофонного потенциала от поверхности ДО служили в качестве контроля, подтверждающего, что генерация, возникавшая при включении положительной обратной связи в электрофизиологическом эксперименте, не была следствием механического повреждения электродом слуховых рецепторов.

При отведении рецепторной активности от антеннального нерва спектры сигналов при автовозбуждении, как правило, имели линейчатую структуру (рис. 2, б, з). Помимо одной или нескольких дискретных частот генерации в спектре также наблюдались высшие и комбинационные гармоники.

Включение и выключение инверсии в петле обратной связи (сдвиг фазы на 180° и обратно к 0°) всегда приводило к смене частот автовозбуждения. Наблюдались также случаи, когда при инверсии генерация прекращалась.

Формирование зон режекции. При инверсии фазы обратной связи многократно возникал эффект подавления шума в той области частот, где до переключения наблюдалась генерация (формирование зон режекции, рис. 2, в, з). При этом на частотах обергармоник после переключения фазы аналогичное подавление не было выражено. На сонограммах, характеризующих динамику изменения спектров сигналов во времени, зона

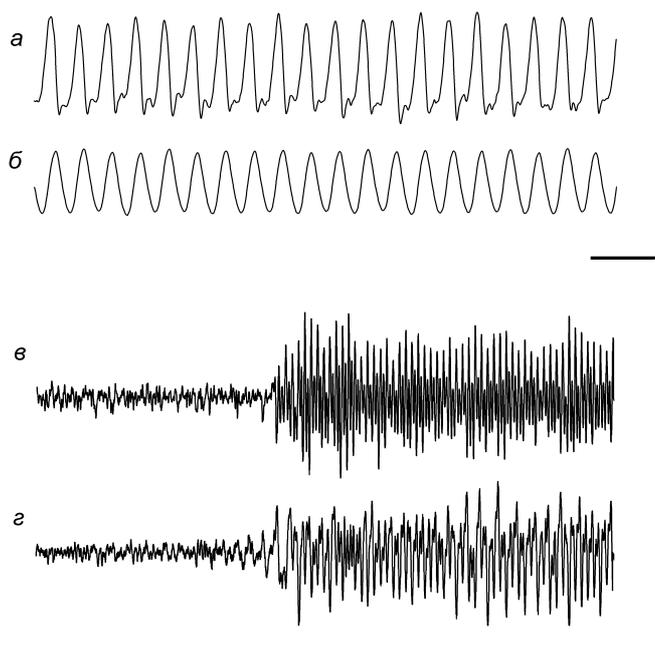


Рис. 1. Осциллограммы активности рецепторов ДО самцов комаров в режиме автогенерации:

а - внутриклеточное отведение от аксона рецептора; б - акустический сигнал обратной связи, действовавший на антенны комара (256 Гц, 65 дБ УКС); в - момент возникновения генерации в рецепторе при околопороговом уровне обратной связи (внеклеточное отведение); г - акустический сигнал положительной обратной связи (255 Гц, 70 дБ УКС). Калибровка амплитуды: 5 мВ (а) и 1 мВ (в); калибровка времени: 10 мс (б) и 100 мс (г).

режекции проявлялась в виде непрерывной тёмной полосы, отражающей эффект подавления шумов в определенном частотном диапазоне (рис. 3, а).

Известно, что при действии отрицательной обратной связи эффективно подавляются шумы различного происхождения. Если частотная характеристика замкнутой цепи обратной связи определялась резонансной проводящей структурой, то наибольший эффект от ее действия должен наблюдаться в области резонанса. Избирательное подавление шумов (формирование зон режекции) можно объяснить именно этим эффектом.

Зоны режекции наблюдались как при прямой, так и при инверсной обратной связи. Этот эффект можно объяснить осевой симметрией джонстоновых органов: положительная обратная связь для одних рецепторов могла быть отрицательной для других, расположенных симметрично относительно оси антенны.

Влияние уровня обратной связи на частоту генерации. При уменьшении уровня обратной связи частота генерации, как правило, обратно

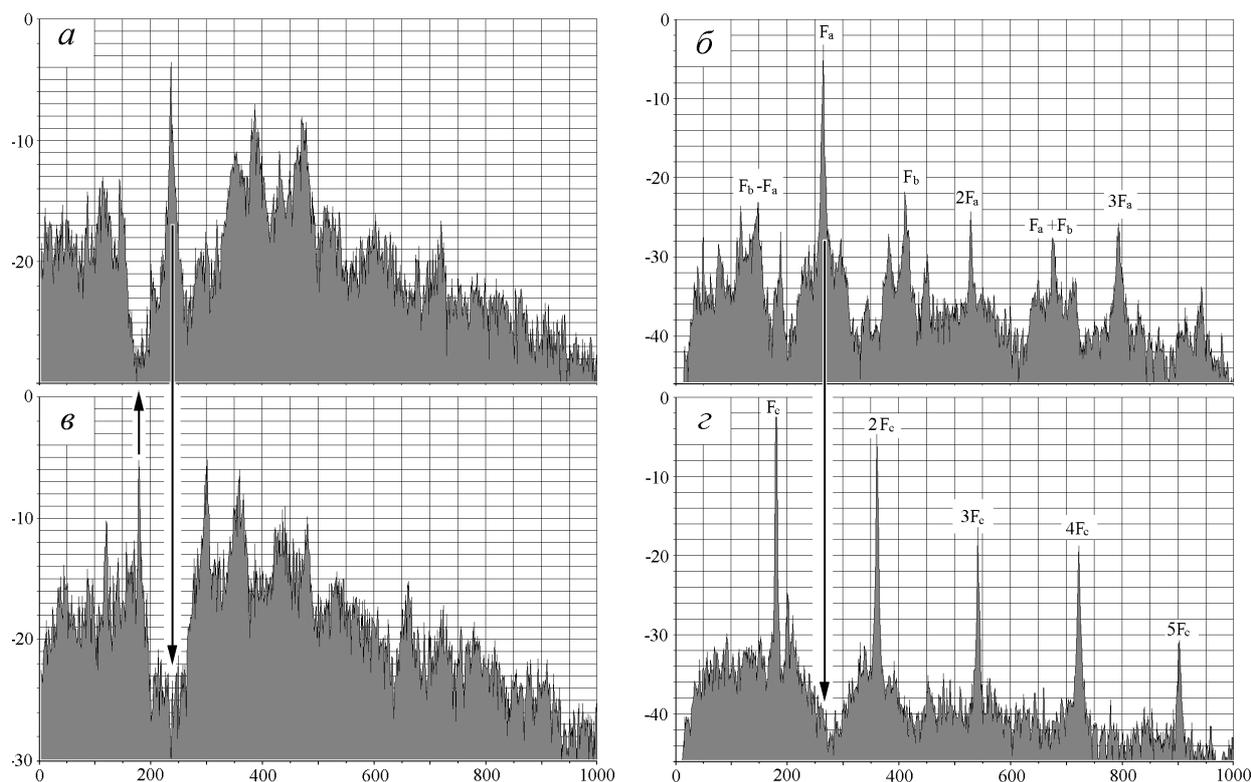


Рис. 2. Примеры спектров микрофонных потенциалов (*а, в*) и электрической активности в антеннальном нерве (*б, г*) при автовозбуждении слуховой системы комара на фоне инверсной (*а, б*) и прямой обратной связи (*в, г*).

Микрофонный потенциал, частоты генерации: 235 Гц (*а*) и 179 Гц (*в*). Одновременная генерация на двух частотах (*б*): $F_a = 264$ Гц и $F_b = 412$ Гц (буквенные обозначения частот относятся только к данному фрагменту рисунка). Генерация на одной частоте (*г*): $F_c = 180$ Гц. Частоты автовозбуждения и комплементарные им зоны режекции, возникавшие при инверсии обратной связи, отмечены стрелками. Спектрограммы построены по результатам одного опыта. По горизонтальным осям – частота, Гц, по вертикальным осям – относительный уровень гармонических составляющих, дБ.

понижалась (рис. 3, *б, в*), хотя наблюдались и случаи с противоположной тенденцией. Если рецепторы ДО комаров имеют характеристики классического резонансного звена (рис. 4), то направление сдвига частоты при уменьшении уровня обратной связи указывает на "истинное" положение резонанса, т.е. на то направление, при котором нарастающий коэффициент передачи резонансной структуры способен скомпенсировать снижение эффективности обратной связи. По этой же причине зоны режекции, как правило, наблюдались с некоторым сдвигом (не более 10%) относительно комплементарной частоты автовозбуждения.

Одновременная генерация на нескольких частотах. Выше уже были отмечены случаи, когда генерация при автовозбуждении происходила не на одной частоте (без учёта сопряженного ряда обергармоник), а на двух частотах или более. Такой эффект был ожидаемым, поскольку при внеклеточной регистрации активности рядом с

электродом могли находиться аксоны разных рецепторов – это создавало предпосылки для одновременного возбуждения слуховой системы на нескольких частотах (рис. 3, *б, в*). В опыте условия самовозбуждения двух рецепторных каналов различались, поэтому при малом уровне обратной связи в режим генерации сначала включался рецептор, имевший больший коэффициент передачи в области контакта с электродом, а затем при увеличении обратной связи возбуждался и второй рецептор.

При двухчастотной генерации на каждый из рецепторов действовали не только преобразованный в вибрацию флагеллума эквивалент собственного выхода, но и аналогичный сигнал от другой клетки. Такое суммарное воздействие приводило к формированию комплекса комбинационных гармоник (рис. 2, *б*).

Во многих случаях при двухчастотной генерации результирующая спектральная картина выглядела как единый гармонический ряд (рис. 3, *в*).

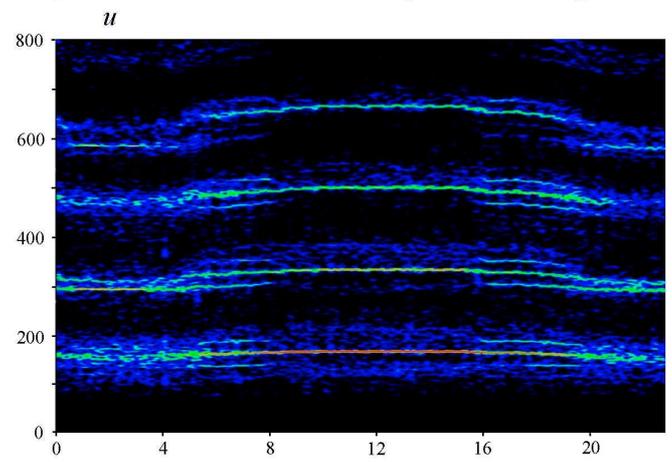
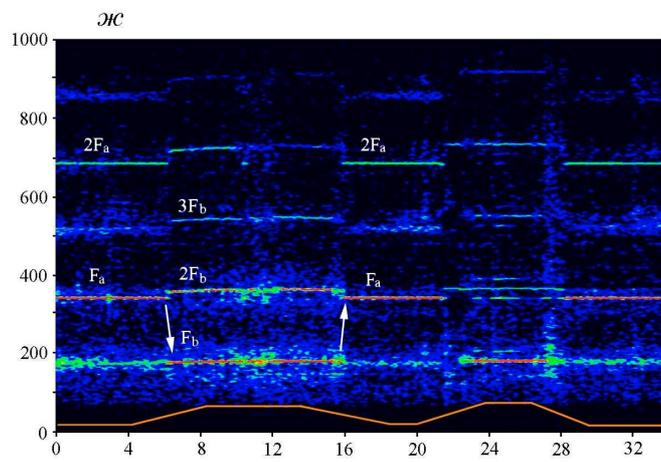
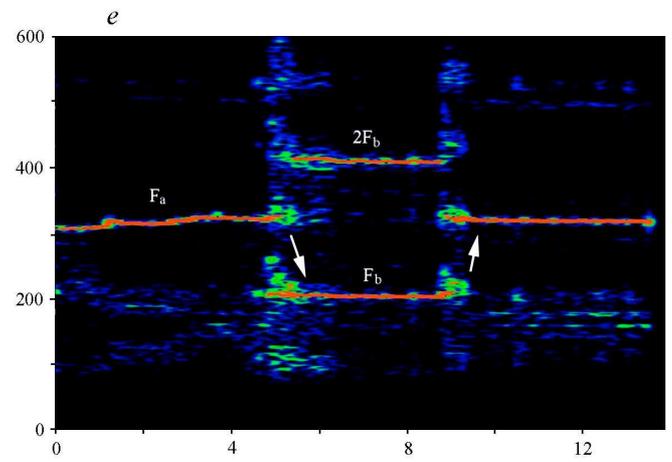
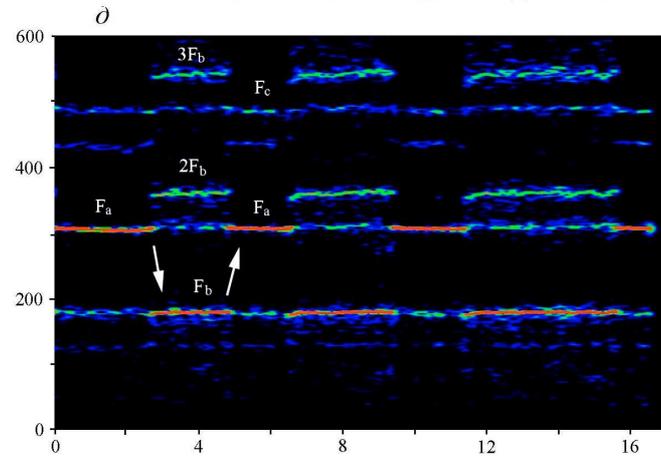
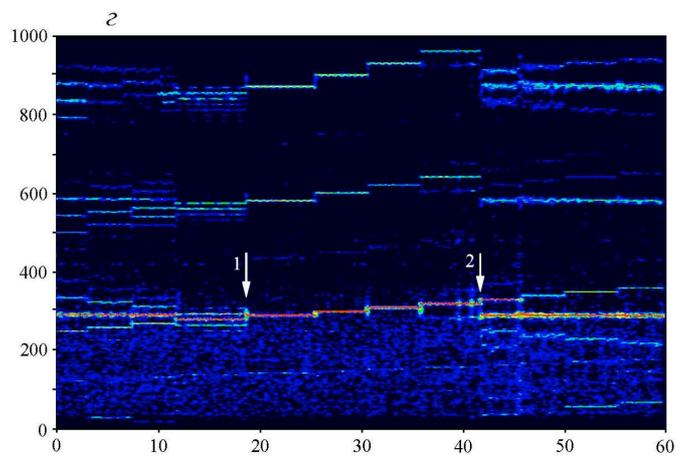
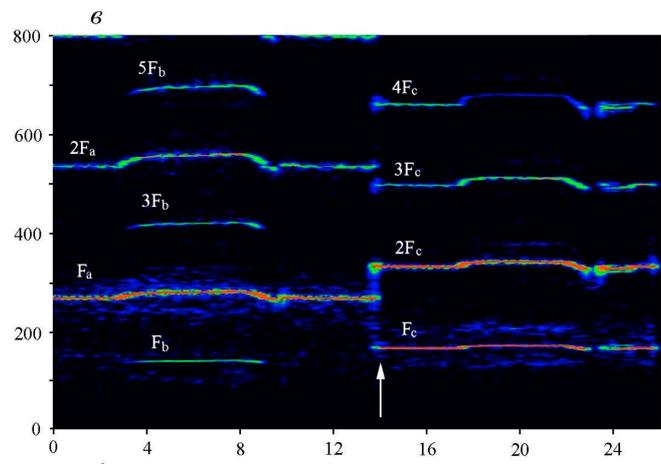
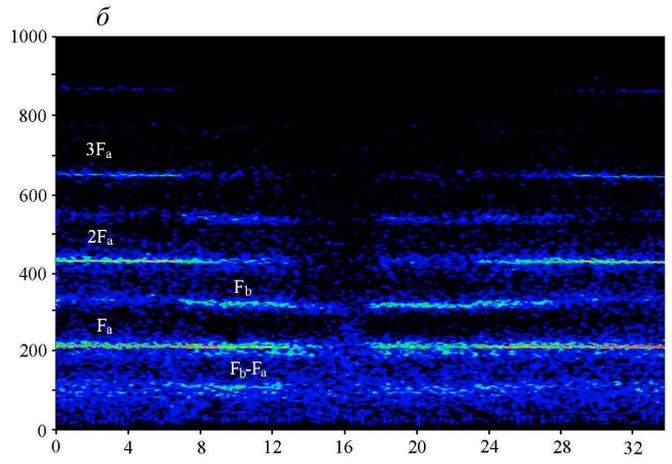
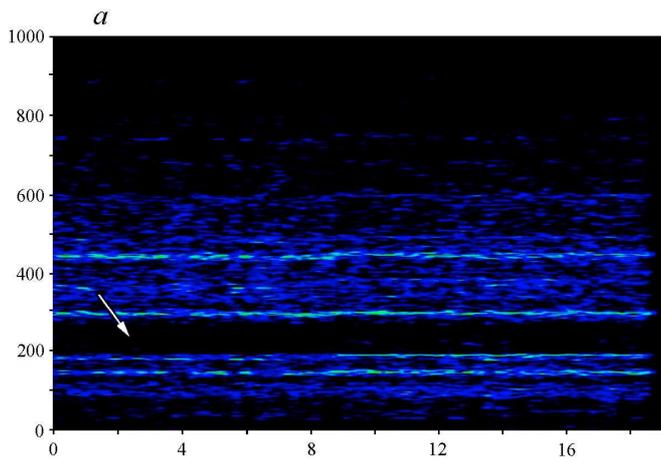


Рис. 3. Частотные перестройки в процессе автовозбуждения рецепторов, возникавшие при различных условиях стимуляции (буквенные обозначения частот относятся к конкретным фрагментам рисунка):

a – зона подавления (режекции) шума в ограниченном частотном диапазоне (указана стрелкой);

b – изменение режима автовозбуждения с частотой (F_a) и появление дополнительных частотных компонентов (F_b и $F_b - F_a$) при плавном уменьшении до нуля (период 6–15 с) и последующем увеличении уровня обратной связи (17–32 с);

v – появление второй частоты генерации (F_b) при увеличении уровня обратной связи ($F_a = 260$ – 270 Гц, $F_b = 133$ Гц); переход на одночастотный режим генерации ($F_c = 165$ Гц) при инверсии обратной связи (момент переключения фазы указан стрелкой);

z – явление "захвата" частоты автовозбуждения внешним акустическим стимулом, возникшее при частоте 290 Гц (стрелка 1) и сохранявшееся до 320 Гц, после чего произошел срыв захвата (стрелка 2); частота стимула в ходе опыта увеличивалась с шагом 10 Гц в диапазоне от 240 до 360 Гц;

d – частотная альтернация; $F_a = 309$ Гц, $F_b = 181$ Гц, стрелками показаны первые два переключения между режимами генерации, остальные переходы происходили аналогичным образом, светлая пунктирная полоса на частоте $F_c = 485$ Гц – проявление активности спонтанно генерировавшей клетки;

e – переключения частоты автовозбуждения под влиянием внешних акустических сигналов (щечков); стрелками показаны переходы между двумя последовательными режимами генерации;

ж – примеры резких изменений частоты и амплитуды автовозбуждения при возвратно-поступательном движении микроэлектрода относительно антеннального нерва (график смещения электрода представлен на фрагменте линией оранжевого цвета, смещение этой линии вверх соответствует погружению электрода в осевом направлении, полный размах продольного смещения электрода составлял порядка 30 мкм);

з – эффекты амплитудной модуляции выходных сигналов рецепторов, возникавшие во время постепенного увеличения (в период 4–8 с) или уменьшения (16–20 с) обратной связи.

На сонограммах цвет линий отображает относительную мощность частотных компонентов спектра сигналов: от темно синего (слабые спектральные составляющие) по возрастающей через зелёный и желтый к красному цвету, соответствующему уровню доминирующих компонентов в спектре. По вертикальным осям сонограмм – частота, Гц; по горизонтальным осям – время, с.

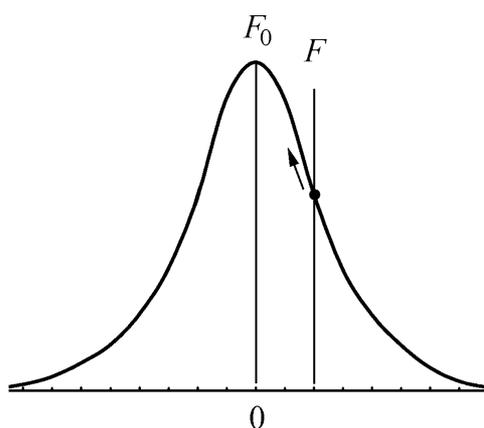


Рис. 4. Теоретическая амплитудно-частотная характеристика резонансной системы.

По горизонтальной оси – относительная частотная расстройка $(F - F_0) / F_0$. На правой ветви графика условно показана точка, в окрестностях которой происходит самовозбуждение системы в условиях положительной обратной связи. При ослаблении обратной связи рабочая точка смещается к вершине кривой в сторону большего коэффициента передачи (направление указано стрелкой). Частота генерации при этом снижается ($F \rightarrow F_0$).

Такой эффект можно объяснить тем, что частоты двух каналов, охваченных генерацией, находились в соотношении либо 1:2, либо 1:1.5. Точность выполнения кратного или полукратного соотношения указывает на взаимную синхронизацию генераторов. В свою очередь подобная синхронизация возможна при наличии функциональной связи между рецепторами и одновременно противоречит предположению о случайном сочетании рецепторных ответов в суммарном электрофизиологическом сигнале.

При инверсии фазы спектр электрофизиологического ответа мог меняться полностью. Например, в опыте, иллюстрированном рис. 3, в (момент переключения фазы обозначен стрелкой), в системе сформировался единый гармонический ряд (одночастотное автовозбуждение) с частотой генерации $F_c = 165$ Гц. При увеличении уровня обратной связи от 62 до 72 дБ УКС частота генерации возросла до 171 Гц.

Захват частоты автоколебаний внешним стимулом. Эффекты взаимной синхронизации рецепторов могли базироваться на "затягивании" частоты возбуждения внешним сигналом. Для оценки такой возможности препарату в состоянии одночастотного автовозбуждения предъявляли тональный стимул с варьируемой частотой и амплитудой, близкой к уровню сигнала действовавшей обратной связи. Эти эксперименты показали, что внешний захват частоты генерации действительно

возможен (рис. 3, з), но в только узком диапазоне: от 2 до 10% от основной частоты генерации.

Процессы захвата частоты автовозбуждения и последующего срыва захвата при увеличении или уменьшении частоты внешнего синусоидального стимула происходили сходным образом примерно в одном диапазоне и асимметрично относительно исходной частоты возбуждения. На рис. 3, з основные моменты этого процесса обозначены стрелками.

Все другие частотные треки на сонограмме рис. 3, з представляют собой либо гармонические ряды основных сигналов, возникавшие за счёт нелинейности рецепторов, либо комбинационные производные от этих сигналов.

Частотная альтернация. В процессе дрящего автовозбуждения многократно наблюдались самопроизвольно повторяющиеся скачкообразные переходы с одной частоты на другую (частотная альтернация, рис. 3, д), либо аналогичные переходы, но происходившие под воздействием коротких внешних стимулов, например, щелчков или других резких звуков (рис. 3, е). Частотная альтернация иногда проявлялась в процессе варьирования уровня обратной связи.

При альтернации на тех же частотах могли наблюдаться более слабые сигналы. На сонограмме рис. 3, д на частотах F_a и F_b этим сигналам соответствуют компоненты сине-зеленой окраски. Скорее всего автовозбуждение на исходных частотах после альтернации значительно уменьшалось по амплитуде, но не подавлялось полностью. Возможно также, что слабые сигналы отражали активность рецепторов, настроенных на ту же частоту, но пространственно располагавшихся в иной позиции в ДО относительно оси антенны.

Переключение частот генерации возможно при функциональном взаимодействии двух генераторов. С учётом объединения нескольких рецепторов в одной сенсилле (Жантиев, Федорова, 1999) наиболее вероятно их триггерное переключение за счёт внутренних электрических связей. Кроме того, высокая воспроизводимость такого типа эффектов (примерно в половине опытов) указывает на анатомическую близость в антеннальном нерве аксонов взаимодействовавших рецепторов.

Влияние локализации точки отведения рецепторной активности на процессы автовозбуждения. Кроме фазы и амплитуды сигнала обратной связи на частоту автовозбуждения существенно влияло положение острия электрода в антеннальном нерве. Желая убедиться, что изменение частоты

ты возбуждения определялось именно положением электрода, а не механическим повреждением аксонов, электрод сдвигали в продольном направлении с последующим его возвратом до возобновления исходной генерации. При таком возвратно-поступательном смещении электрода можно было наблюдать эффекты восстановления прежней частоты или резкие переходы с одной частоты генерации на другую (рис. 3, *ж*), с последующим возвратом к исходному режиму. В приведенном на рис. 3, *ж* примере в начале регистрации (первые 6 с) помимо частоты F_a в спектре сигнала также присутствовал шум с избыточностью в области частоты F_b . В данном случае мог "шуметь" рецептор, настроенный на частоту F_b , и проявивший себя устойчивой генерацией после механического смещения электрода (шестая секунда), либо это были сигналы каких-то других рецепторов с более слабой связью с отводящим электродом, но также настроенные на частоты, близкие к F_b . После смещения электрода назад и последовавшего затем перехода генерации от F_b к F_a (15–16 с) шумовая дорожка на частоте F_b восстанавливалась.

Следует отметить, что реальный сдвиг электрода относительно антеннального нерва не точно соответствовал контролируемому смещению механического позиционера, на котором был укреплен электрод. Из-за частичной фиксации электрода кутикулой в месте её прокола при подаче вперед вместе с электродом смещалась и голова комара. За счёт вязкости гемолимфы, окружающей шейку электрода, его движение относительно антеннального нерва продолжалось ещё некоторое время.

Амплитудная модуляция рецепторной активности. В ходе исследования настроек рецепторов ДО при варьировании уровня обратной связи неоднократно наблюдалась амплитудная модуляция сигнала, регистрируемая в антеннальном нерве (рис. 3, *ж*, на интервале 23–26 с; рис. 3, *и*). Такую модуляцию можно было бы объяснить взаимодействием ответов от двух рецепторов, либо, если спектральных пиков было несколько, возбуждением целой группы рецепторов с близкими частотами настройки. Однако в случаях равенства интервалов между спектральными компонентами, группирующимися около кратных обергармоник (рис. 5), можно предположить общую модуляцию электрической активности со стороны какого-то системного регулятора. Возможно, в таких случаях обнаруживалось влияние адаптационных механизмов, действующих с задержкой относительно фронта изменения амплитуды входного сигнала. Такая функциональная система, охваченная положительной обратной связью, также может входить в режим генерации, период которой будет определяться временем задержки.

Об избирательности рецепторов, характеризующей относительную ширину частотной полосы пропускания, косвенно можно судить по результатам опытов с захватом частоты генерации внешним стимулом (рис. 3, *з*) или по форме соответствующих зон режекции (рис. 2, *в*, *з*). Однако выводы на основе таких данных следует делать осторожно, поскольку положительная обратная связь приводит к росту эквивалентной добротности колебательной системы (т.е. к сужению полосы воспринимаемых частот), а отрицательная обратная связь, наоборот, добротность снижает (полоса восприятия при этом расширяется). Кроме

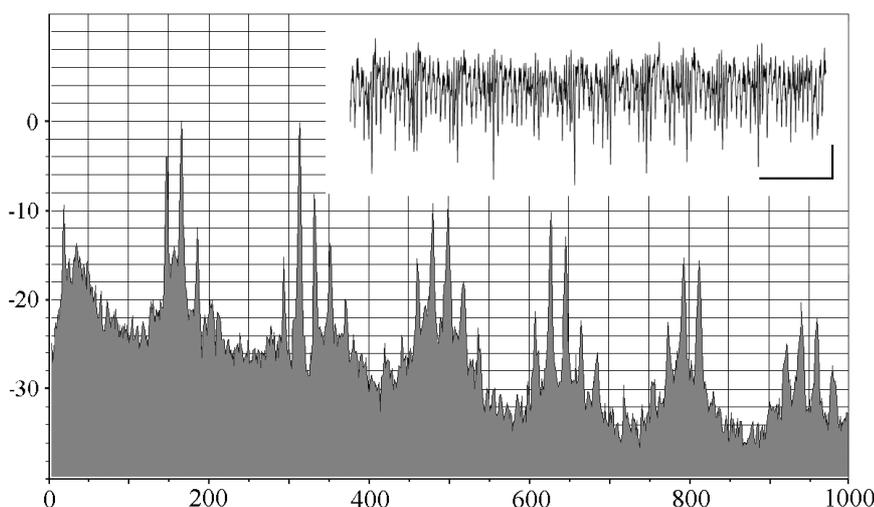


Рис. 5. Спектр и осциллограмма (на врезке) амплитудно-модулированного сигнала, зарегистрированного в антеннальном нерве комара в режиме автовозбуждения рецепторов ДО.

Для осциллограммы: калибровка времени 100 мс, калибровка амплитуды 1 мВ.

Для спектра: по горизонтальной оси – частота, Гц; по вертикальной оси – относительный уровень гармонических составляющих, дБ.

того, при оценке полосы пропускания рецепторов не исключены погрешности, связанные с возможным совместным действием нескольких рецепторов с близкими частотами настройки. Расширение зоны режекции в примере на рис. 2, в можно объяснить именно таким эффектом.

Частотно-пороговые характеристики. В тех опытах, когда низкие пороги автовозбуждения указывали на близкое положение отводящего электрода относительно аксона исследуемого рецептора, были измерены частотно-пороговые характеристики. Работа основывалась на предположении, что именно такие рецепторы будут вносить наибольший вклад в регистрируемый электрофизиологический сигнал при действии внешних акустических стимулов.

Это предположение оправдалось лишь отчасти. Действительно, примерно в половине исследованных отведений были получены частотно-пороговые характеристики с выраженными минимумами на одной или нескольких частотах. Примеры таких характеристик приведены на рис. 6. Оценка добротности двух резонансных структур (рис. 6, а) по критерию + 3 дБ от минимума даёт нижний предел $Q_{min} > 10$ для частоты 200 Гц и $Q_{min} > 20$ для частоты 310 Гц. Для более точного определения добротности рецепторов ДО необходимо было бы уменьшить интервал между последовательными измерениями порогов с 10 до 2 Гц. Однако с таким малым интервалом затруднительно измерить частотно-пороговую характеристику в широком диапазоне частот из-за резкого увеличения времени проведения эксперимента. При большой длительности опыта на точность результатов измерений начинает существенно влиять нестабильность электрофизиологического отведения.

Зоны оптимумов восприятия были близки, но, как правило, не совпадали со значениями частот автоколебаний рецепторов, зарегистрированных в тех же точках отведения электрической активности. Собственно, так и должно было быть, поскольку генерация в петле обратной связи, включающей резонансную систему, в норме происходит с некоторым смещением относительно частоты резонанса (рис. 4).

Суммарная гистограмма распределения частот генерации. При подготовке данных для гистограммы в пределах результатов каждого опыта конкретная частота учитывалась один раз, независимо от числа её повторных наблюдений. Затем все зарегистрированные частоты округлялись до значений, кратных 5 Гц. Если частота генерации

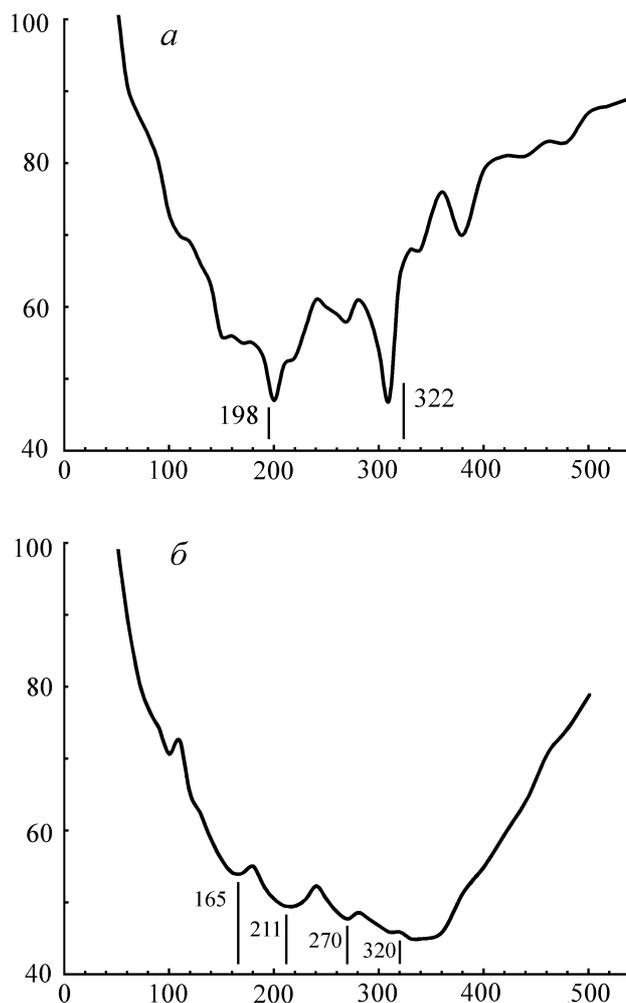


Рис. 6. Примеры частотно-пороговых характеристик, измеренных в точках устойчивой автогенерации. По горизонтальным осям – частота, Гц, по вертикальным осям – уровень пороговых стимулов, дБ УКС. Вертикальными линиями с числами на полях графиков обозначены положение на оси и значения частот генерации, зарегистрированных в том же отведении.

плавно изменялась в ходе опыта, то на гистограмме этот факт учитывался прибавлением единиц во все каналы перекрывающие диапазон изменения частоты, однако в любой из каналов гистограммы от каждого опыта могла быть добавлена только одна единица. Общее число зарегистрированных частот автовозбуждения составляло порядка 100.

Гистограмма (рис. 7) содержит два пика в областях 140–190, 240–290 Гц и менее выраженную группу в диапазоне 320–370 Гц (соотношение средних частот трёх групп близко к 1:1.5:2). Минимальные пороги автовозбуждения зарегистрированы в диапазонах 160–172 Гц (пороги 65–68 дБ) и 236–306 Гц (пороги 66–68 дБ). Главному

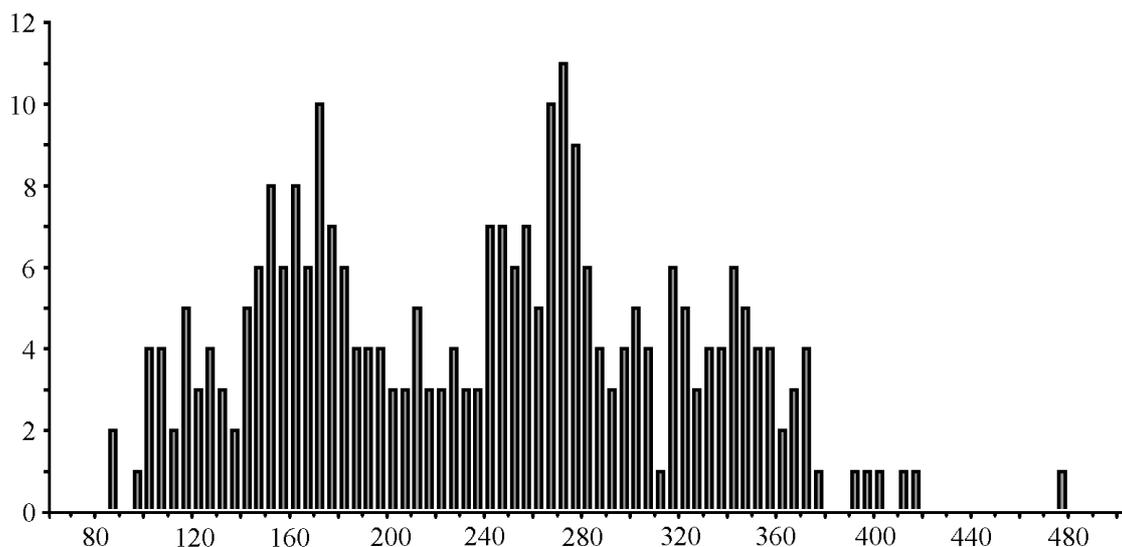


Рис. 7. Суммарная гистограмма распределения значений частот автогенерации.

По горизонтальной оси – частота, Гц, по вертикальной оси – общее количество зарегистрированных частот в пределах одного бина.

минимуму ранее измеренной частотно-пороговой характеристики самцов комаров *Ch. plumosus* (Лапшин, 2010) соответствует второй пик гистограммы (240–290 Гц).

Сравнение формы распределения на рис. 7 с частотами крыловых взмахов конспецифических самок с учетом температурных различий при проведении экспериментов (260–283 Гц; Römer, 1970; Жантиев и др., 2001) показало хорошее соответствие второму пику на гистограмме в диапазоне 240–290 Гц. В то же время роль рецепторов, настроенных на частоты 140–190 Гц, может быть весьма важной: именно в этот диапазон попадают комбинационные гармоники, равные разности между частотами полёта воспринимающих звук самцов и самок (Лапшин, 2010).

Рецепторы, объединённые в отдельную группу на гистограмме в соответствии с характеристическими частотами, могли составлять единый пул, в пределах которого разница в настройках определялась случайным разбросом характеристик отдельных клеток, либо набор таких настроек в пределах каждой группы неслучаен. Предполагаемая схема обработки сигналов с учётом частотных преобразований в условиях полёта и сохраняющая, кстати, у самцов функциональность в покое за счёт высокой чувствительности в диапазоне 240–290 Гц, предполагает неслучайный набор рецепторов. Многоканальность рецепторной системы комаров в сочетании с короткими путя-

ми электротонического проведения (Ignell et al., 2005) должна способствовать резкому ускорению обработки акустической информации.

Влияние резонансных свойств антенн комаров на результаты измерений. На автовозбуждение рецепторов ДО существенное влияние оказывал суммарный фазовый сдвиг во всех промежуточных звеньях передачи сигнала. На высоких частотах наиболее значимым должен быть фазовый вклад антеннального комплекса (Göpfert et al., 1999) с резонансом в области 300–340 Гц (данные о частоте резонанса антенн комаров *Ch. plumosus* приведены по работе Жантиева и др., 2001). Согласно общеизвестным физическим закономерностям по мере приближения частоты акустического стимула к точке механического резонанса антенны фазовая задержка вибрации флагеллума относительно колебаний воздуха должна быстро нарастать. При достижении суммарным фазовым сдвигом значения 90° обратная связь становится неэффективной независимо от дополнительной инверсии. Этим можно объяснить резкое падение вероятности регистрации активности рецепторов на частотах выше 380 Гц (рис. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании данных, полученных с применением новой методики тестирования слуховой системы комаров, можно сделать вывод о присутствии

в составе ДО, как минимум, трех групп рецепторов, различающихся по своей частотной настройке. Многоканальность рецепторной системы комаров в сочетании с короткими путями электротонического проведения должны способствовать резкому ускорению обработки акустической информации.

О природе индивидуальной избирательности рецепторов ДО пока нельзя сказать ничего конкретного. Возможно, что в ее основе лежат ионные механизмы на клеточной мембране, аналогичные уже изученным у земноводных (Smotherman, Narins, 1998).

При наличии в слуховой системе комаров наборов рецепторов, имеющих разную частотную настройку, естественно предположить способность этих насекомых к спектральному анализу акустических сигналов. Сложно устроенная слуховая система комаров скорее всего обеспечивает реализацию нескольких жизненно важных форм поведения, таких как видовая идентификация, взаимодействие самцов в рое и функция защиты от хищников.

Автор выражает глубокую признательность директору Института биологии развития им. Н.К. Колцова РАН д.б.н. Н.Д. Озернюку и руководителю Кропотовской биостанции к.б.н. А.В. Широковой за содействие при проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Жантиев Р.Д., Федорова М.В. Ультраструктура джонстонова органа *Chironomus plumosus* (Diptera, Chironomidae) // Энтومол. обозрение. 1999. Т. 78. № 2. С. 287–295.
- Жантиев Р.Д., Федорова М.В., Чуканов В.С., Есипович Н.Г. Морфофункциональная организация антенн и джонстоновых органов комаров-звонцов (Diptera, Chironomidae) // Сенсорные системы. 2001. Т. 15. № 1. С. 73–84.
- Лашин Д.Н. Восприятие акустических сигналов самцами комаров (Diptera, Chironomidae) в условиях имитации полёта // Сенсорные системы. 2010. Т. 24. № 2. С. 141–150.
- Лашин Д. Н. Частотные характеристики слуховых интернейронов самцов комаров *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae) // ДАН. 2011. Т. 439, № 2. С.279–282.
- Лашин Д.Н. Биоакустика комаров: функционирование слуховой системы самцов *Culex pipiens pipiens* L. в условиях имитации полёта // Энтомологическое обозрение. 2012. Т. 91. № 1. С. 36–57.
- Arthur B.J., Wytenbach R.A., Harrington L.C., Hoy R.R. Neural responses to one- and two-tone stimuli in the hearing organ of the dengue vector mosquito // J. Exp. Biol. 2010. V. 213. P. 1376–1385.
- Avitabile D., Homer M., Champneys A.R., Jackson J.C., Robert D. Mathematical modelling of the active hearing process in mosquitoes // J. R. Soc. Interface. 2010. V. 7. P. 105–122.
- Boo K.S., Richards A.G. Fine structure of the scolopidia in the Johnston's organ of male *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Gulicidae) // Int. J. Insect Morphol. Embryol. 1975. V. 4. P. 549–566.
- Cator L.J., Ng'Habi K.R., Hoy R.R., Harrington L.C. Sizing up a mate: variation in production and response to acoustic signals in *Anopheles gambiae* // Behav. Ecology. 2010. V. 21. № 5. P.1033–1039.
- Cator L.J., Arthur B.J., Harrington L.C, Hoy R.R. Harmonic convergence in the love songs of the dengue vector mosquito // Science. 2009. V. 323. № 5917. P. 1077–1079.
- Gibson G., Warren B., Russell I. Humming in tune: sex and species recognition by mosquitoes on the wing // JARO. 2010. V. 11. P. 527–540.
- Gopfert M.C., Briegel H., Robert D. Mosquito hearing: sound-induced antennal vibrations in male and female *Aedes aegypti* // J. Exp.Biol. 1999. V. 202. P. 2727–2738.
- Gopfert M.C., Robert D. Active auditory mechanics in mosquitoes // Proc. R. Soc. Lond. 2001. V. 268. P. 333–339.
- Hirabayashi K., Nakamoto N. Field study on acoustic response of chironomid midges (Diptera: Chironomidae) around a hyper-eutrophic lake in Japan // Ann. Entomol. Soc. Am. 2001. V. 94. № 1. P. 123–128.
- Jackson J.C., Robert D. Nonlinear auditory mechanism enhances female sounds for male mosquitoes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 45. P. 16734–16739.
- Johnston G. Auditory apparatus of the *Culex* mosquito // Q. J. Microsc. Sci. 1855. V. 3. P. 97–102.
- Ignell R., Dekker T., Ghaninia M., Hansson B.S. Neuronal architecture of the mosquito deutocerebrum // J. Comp. Neurology, 2005. V. 493. P. 207–240.
- Ogawa K., Sato H. Relationship between male acoustic response and female wingbeat frequency in a chironomid midge, *Chironomus yoshimatsui* (Diptera : Chironomidae) // Jpn. J. Sanit. Zool. 1993. V. 44. № 4. P. 355–360.
- Römer F. Einfluss von Temperatur und Alter auf die Flughöhe beim Schwärmen von *Chironomus plumosus* L. // Rev. Suisse de Zool. 1970. B. 77. S. 603–616.
- Smotherman M.S., Narins P.M. Effect of temperature on electrical resonance in leopard frog saccular hair cells // J. Neurophysiology. 1998. V. 79. № 1. P. 312–321.
- Warren B., Gibson G., Russell I. J. Sex recognition through midflight mating duets in *Culex* mosquitoes is mediated by acoustic distortion // Current Biology. 2009. V. 19. P. 485–491.

Frequency tuning of the auditory receptors in mosquitoes (Diptera, Chironomidae)

D. N. Lapshin

*Institute for Information Transmission Problems of the RAS (Kharkevich Institute)
127994, Moscow, Bolshoy Karetny per, 19*

Mosquitoes hear with their feather-like antennae, each attached to a Johnston organ (JO). Numerous receptors of JO transform acoustic vibrations into electrical potentials thus encoding the parameters of a sound. The resulting frequency response of the whole auditory system is determined primarily by the frequency tuning of receptor cells. However, the question of whether mosquitoes are capable of spectral analysis of sounds has yet to be solved.

It was shown previously that the signals transmitted via the receptor axons to the brain form the analogue representation of the acoustic vibrations rather than spike trains encoding the same signals. This feature makes it possible to measure the individual characteristics of receptors by using a positive feedback method. To do that one should feed the amplified signal from the receptor axon to the acoustic stimulation device. If the phase and the amplitude of that positive feedback will match the given receptor cell the oscillations will appear in the stimulation signal with the frequency very close to the intrinsic tuning of the receptor.

The objective of this study was to measure the properties of individual acoustic receptors in male mosquitoes of the family Chironomidae by using the positive feedback method. At least three groups of receptors were found distinct in their frequency tuning: 140–190 Hz, 240–290 Hz and 320–370 Hz (ratio of average frequencies close to 1 : 1.5 : 2). The second range (240–290 Hz) corresponds to the conspecific female flight tone. Lower tuned receptors (140–190 Hz) may perceive harmonic combination equal to the difference between the male and female flight tones when they approach each other.

The presence of differently tuned receptors in the auditory system of mosquitoes suggests their ability to the spectral analysis of sounds.

Key words: Johnston organ, Chironomidae, mosquito, acoustic communication, positive feedback, frequency tuning.