

СЛУХОВАЯ И ВЕСТИБУЛЯРНАЯ СИСТЕМЫ

УДК 595.771 + 591.498

ВЛИЯНИЕ ОКТОПАМИНА НА ЧАСТОТНУЮ НАСТРОЙКУ СЛУХОВОЙ СИСТЕМЫ КОМАРОВ *CULEX PIPIENS PIPIENS* (DIPTERA, CULICIDAE)

© 2023 г. Д. Д. Воронцов^{1,*}, Д. Н. Лапшин^{2,**}

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, 26, Россия

²Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН
127051 Москва, Б. Каретный переулок, 19, Россия

*E-mail: d.vorontsov@idbras.ru

**E-mail: lapshin@iitp.ru

Поступила в редакцию 05.06.2023 г.

После доработки 15.06.2023 г.

Принята к публикации 23.06.2023 г.

Цель работы состояла в демонстрации физиологических эффектов действия октопамина на слуховые ответы сенсорных нейронов джонстонова органа у комаров *Culex pipiens pipiens* L. Ответы нейронов на звуковую стимуляцию измеряли до и после введения октопамина (а также хлордимеформа, агониста октопаминовых рецепторов) в виде частотно-пороговых кривых или регистрируемой в реальном времени частоты автовозбуждения, возникшей при включении слухового нейрона в контур обратной связи с использованием усиленного ответа этого нейрона в качестве сигнала для возбуждения акустического излучателя. Из наших результатов следует: октопамин влияет на свойства слуховой системы как самцов, так и самок комаров; у самок комаров октопамин значительно снижает чувствительность рецепторов в диапазоне частот ниже 90 Гц и слабо влияет на чувствительность в диапазоне от 100 Гц и выше; у самцов комаров октопамин существенно повышает частотную настройку слуховой системы (соотношение частот после и до введения вещества 1.32–1.55). Показан сильный половой диморфизм в октопаминергической модуляции слуховой системы комаров. Наблюдаемые физиологические эффекты октопамина как у самцов, так и у самок комаров не могут быть полностью объяснены модуляцией механической жесткости антенны и должны включать изменение оптимальных частот настройки слуховых нейронов.

Ключевые слова: Culex, комары, джонстонов орган, слуховые рецепторы, частотная настройка

DOI: 10.31857/S0235009223030071, **EDN:** ZYGYYZ

ВВЕДЕНИЕ

Среди изученных органов слуха членистоногих слуховая система комаров отличается наиболее высокой чувствительностью и сложностью морфологии (Hart et al., 2011). Слуховое восприятие у самцов комаров обеспечивает брачное поведение (Andrés et al., 2020): многие виды спариваются в рое, где роящиеся самцы обнаруживают и затем преследуют залетающих в рой самок, ориентируясь на звук их полета.

На основании результатов многочисленных исследований можно утверждать, что роль слуха самцов комаров в репродуктивном поведении определена вполне надежно. В то же время функции слуха самок в полной мере еще не выяснены. Согласно физиологическим тестам, самка может слышать звук летящего самца, по крайней мере на близком расстоянии (Лапшин, 2012; Lapshin, 2013). Было также показано, что летящие самки

комаров изменяют частоту взмахов крыльев, когда им предъявляют звук летящего самца своего вида (Gibson, Russell, 2006). В связи с этим было высказано предположение, что акустическое взаимодействие в паре служит прекопуляционным тестом на видоспецифичность (Gibson et al., 2010; Aldersley, Cator, 2019; Pantoja-Sánchez et al., 2019). Вместе с тем получены данные, из которых следует, что акустическое поведение перед спариванием у комаров не всегда способствует репродуктивной изоляции гетероспецифических видов (Апасов и др., 1986; Simões et al., 2017).

Возможна и другая функция слуха у кровососущих самок комаров — это поиск объекта нападения. Комары используют разные признаки для обнаружения и преследования прокормителя, и среди таких признаков могут быть звуки, сопровождающие поведение животного. Известны примеры привлечения комаров и мокрецов к звукам, издаваемым лягушками (Bartlett-Healy et al.,

2008; Toma et al., 2019; Legett et al., 2021), но по-прежнему не хватает достоверных поведенческих данных о реакциях на звук самок комаров, паразитирующих на млекопитающих и птицах. Примечательно, что в другом семействе двукрылых — Chironomidae, у роящихся самцов также развился чрезвычайно чувствительный слух (Ogawa, Sato, 1993; Fyodorova, Azovsky, 2003; Лапшин, 2015; Lapshin, 2015), но у самок хирономид нет развитых антенн и соответствующего рецепторного аппарата, сравнимого по сложности со слуховой системой кровососущих комаров. Отсутствуют также какие-либо данные о способности самок хирономид к акустическому восприятию.

И самцы, и самки кровососущих комаров воспринимают своими антеннами скоростную составляющую звука. Нейронный механизм для обнаружения колебаний антенны расположен во втором модифицированном сегменте антенны, называемом джонстоновым органом (ДО). Количество сенсорных нейронов в каждом ДО необычно велико для насекомых: около 15000 у самцов комаров и примерно вдвое меньше у самок (Boo, Richards, 1975a; 1975b). Антенна механически настроена на определенный диапазон частот (Göpfert et al., 1999; Warren et al., 2009). Отдельные сенсорные нейроны ДО комаров обладают различной и дискретной частотной настройкой как у самок (Lapshin, Vorontsov, 2013), так и у самцов (Lapshin, Vorontsov, 2017). Слуховая система самцов настроена на более высокий частотный диапазон по сравнению с самками своего вида, как на механическом, так и на нейронном уровне. По современным оценкам пороговая чувствительность самцов комаров составляет порядка 20 дБ УКС (уровень колебательной скорости) (Feugère et al., 2022). Диапазоны частотной настройки слуха, а также тоны полета (Mukundarajan et al., 2017) видоспецифичны у разных видов комаров.

В последнее десятилетие у комаров была обнаружена система эфферентной модуляции ДО (Andrés et al., 2016). Показано, что ДО получает обширную октопаминанергическую, серотонинергическую и другие виды специфической иннервации. Естественно предположить, что эфферентная модуляция служит для активации энергозатратной слуховой системы только тогда, когда она активно используется, например, у самцов комаров перед и во время периода роев. Действительно было показано, что октопамин (ОА) модулирует слуховые характеристики самцов комаров в суточном ритме, и этот процесс коррелирует с временем роев (Georgiades et al., 2022). Напротив, влияние ОА на слуховое восприятие у самок комаров оказалось не таким выраженным.

На морфологическом уровне у комаров был обнаружен половой диморфизм слуховых эфферентов. У самок комаров *Aedes aegypti* L. и *Culex*

quinquefasciatus Say эфферентные волокна, иннервирующие сенсорные нейроны ДО, были ограничены основанием слуховых ресничек и областью тел слуховых нейронов, тогда как у самцов этих видов имелась разветвленная сеть эфферентных волокон, иннервирующих различные области ДО, включая область непосредственно под базальной пластиной, основания слуховых ресничек, тела нейронов и слуховой нерв (Su et al., 2018). У самок *Anopheles gambiae* сложность эфферентной иннервации также была значительно снижена по сравнению с самцами.

Установлено, что большинство рецепторов биогенных аминов, в том числе и для ОА, по-разному экспрессируются у самцов и самок *An. gambiae* (Georgiades et al., 2022). У *Ae. aegypti*, среди специфических рецепторов ОА, для рецепторов октопамина AaOA β 2-R характерна выраженная экспрессия в антеннах и роструме у взрослых самцов, в то время как антенны и рострум конспецифических самок не имели существенных отличий в уровнях транскриптов между различными рецепторами ОА и тирамина (Finetti et al., 2023).

На функциональном уровне половой диморфизм слуховой эфферентной модуляции проявляется в разной чувствительности к агентам, блокирующим синапсы на пути между ДО и центральной нервной системой. У самцов комаров такое блокирование увеличивало амплитуду колебаний жгутиков антенн в отсутствие стимуляции, так называемых спонтанных осцилляций (СО), которые ранее использовались для косвенной оценки частотной настройки слуховой системы (Warren et al., 2010). В отличие от самцов, у самок *Ae. aegypti* и *An. gambiae* не было выявлено статистически значимого ответа на блокировку синапсов, в то время как у *Cx. quinquefasciatus* уровни СО повышались в 2 раза, что было на порядок меньше, чем у конспецифических самцов (Su et al., 2018).

Торакальная инъекция ОА вызывала увеличение жесткости жгутика антенны и, следовательно, увеличение частоты механической настройки антенны (Andrés et al., 2016; Georgiades et al., 2022). Последующее введение антагониста ОА-рецепторов фентоламина индуцировало почти полный возврат механики антенны к ее исходному состоянию, демонстрируя специфичность воздействия ОА на функцию слуха. Примечательно, что после введения ОА частота СО не изменилась. В этих опытах выраженная октопаминанергическая модуляция также наблюдалась преимущественно у самцов комаров, тогда как у самок после воздействия ОА слуховые изменения были менее выражены.

В недавнем обзоре слуховой эфферентной системы комаров (Loh et al., 2023) обобщили эф-

фекты различных нейротрансмиттеров, включая ОА, серотонин и гамма-аминомасляную кислоту. Примечательно, что среди нейротрансмиттеров, которые влияли на слух, все вызывали увеличение частоты механической настройки антенн.

Существует еще одна возможная цель октопаминергической модуляции. Известно, что первичные слуховые нейроны ДО обладают разнообразной частотной настройкой (Lapshin, Vorontsov, 2013; 2017), на которую ОА мог бы влиять независимо, оказывая синергичный эффект на общую частотную настройку ДО. Картирование антителами октопаминовых окончаний в ДО предполагает такую модуляцию, но суммарные электрофизиологические ответы ДО на звук, включающие быстрый переменный и медленный компоненты, не изменялись под влиянием ОА (Andrés et al., 2016).

Цель исследования — разрешение очевидного противоречия между обширной октопаминергической иннервацией слуховых нейронов ДО и отсутствием данных о физиологических эффектах октопамина. Мы ожидали, что локальная микроэлектродная регистрация, а не запись суммарного ответа всего ДО, повысит шансы продемонстрировать октопаминовою модуляцию индивидуальных характеристик слуховых нейронов.

Известно, по крайней мере, три различных метода измерения влияния фармакологического воздействия на частотную настройку слуховых нейронов ДО.

Первый — основан на сравнении частотно-пороговых кривых (аудиограмм), измеренных до и после введения активного вещества. При таком тестировании используются околпороговые синусоидальные сигналы. Измерение каждой частотно-пороговой кривой включает поиск слуховых порогов в ряду частот и занимает значительное время (минуты), поэтому такой метод слишком медленный, чтобы увидеть переходные эффекты.

Во втором методе вместо синусоидальной стимуляции используют модуляцию надпороговым свип-сигналом (sweep signal — длительная тональная посылка с плавно изменяющейся частотой заполнения). В процессе тестирования при этом регистрируют амплитуду ответа слуховых нейронов в зависимости от текущей частоты стимуляции. Таким способом можно проводить измерения в широком частотном диапазоне значительно быстрее, за секунды. Однако методу не хватает точности первого, так как надпороговая стимуляция вызывает общую адаптацию ДО.

Третий метод, основанный на стимуляции слуховых нейронов с положительной обратной связью, обеспечивает онлайн-визуализацию изменений частоты настройки нейронов. Однако этот метод не позволяет измерить форму частот-

но-пороговой кривой. Кроме того, когда в регистрируемый ответ вносит вклад несколько нейронов, смещение механической настройки антенны может привести к последовательной активации различных нейронов, каждый из которых получает первенство на основе комбинации своей собственной частоты и частоты механической настройки антенны. Поскольку второй метод (sweep-стимуляция) в наших экспериментах давал неточные данные о частотной настройке, мы использовали первый (измерение слуховых порогов) и третий (стимуляция с положительной обратной связью) методы, с целью продемонстрировать, как инъекция ОА или агониста октопаминовых рецепторов хлордимерформа (CDM) влияет на частотную настройку слуховых нейронов ДО самок комаров. Для оценки полового диморфизма в эффектах влияния ОА на слуховую систему комаров была проведена серия аналогичных измерений на самцах того же вида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Комары обоего пола *Culex pipiens pipiens* L. были отловлены в природе, в Московской области, Российская Федерация. Опыты проводили на биологической станции Кропотово (54°51'2" с.ш., 38°20'58" в.д.) в сентябре—октябре 2022 г. в лабораторных условиях при температуре 20–22°C.

Микроэлектродная регистрация

Внеклеточную регистрацию активности от аксонов антеннального нерва производили стеклянными микроэлектродами (1B100F-4, WPI Inc.), заполненными физиологическим раствором насекомых (NaCl : 140 mM, KCl : 10 mM, NaHCO₃ : 4.5 mM, NaH₂PO₄ : 3 mM, MgCl₂ : 4 mM, CaCl₂ : 3 mM). Электрод вводили под кутикулу в гибком сочленении между скапусом и педицелем (рис. 1, а). После прокола кутикулы сопротивление электродов составляло 10–40 МОм.

При последующем прокалывании электродом антеннального нерва препарат непрерывно стимулировали тональными пульсами (частота заполнения 70–100 Гц, амплитуда 60 дБ УКС для самок комаров и 200 Гц, 50 дБ УКС для самцов комаров, длительность 200 мс, период 600 мс). Качество отведения считалось приемлемым при амплитуде ответа выше 0.5 мВ (от пика до пика, рис. 1, в, г), после чего систему стимуляции переключали в режим обратной связи (см. ниже).

Акустическая стимуляция

Звуковые стимулы подавали через пару акустических излучателей (динамиков) Scandinavia 75 (DLS, Швеция), взаимно ориентированных акустическими осями под прямым углом (рис. 1, б). Комара фиксировали на пересечении этих осей

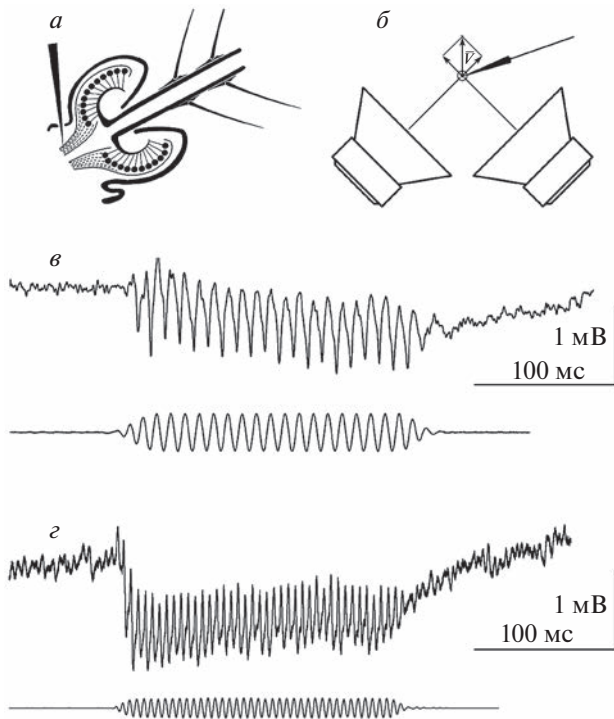


Рис. 1. Регистрация ответов на акустические стимулы от антеннального нерва джонстонова органа комаров *a* — введение регистрирующего электрода в антеннальный нерв через гибкое сочленение между скапусом и педицелом. *б* — схематическое изображение векторной суперпозиции акустических волн от двух ортогонально ориентированных громкоговорителей. Жгутик антенны ориентирован перпендикулярно плоскости изображения. Такая схема стимуляции позволяла регулировать направление звуковой волны для слухового рецептора любой ориентации. *в* — пример электрофизиологического ответа, зарегистрированного в антеннальном нерве самки комара *Culex pipiens pipiens* L. Длительность стимула 200 мс, амплитуда 60 дБ УКС, частота 100 Гц. *г* — пример электрофизиологического ответа, самец комара *Cx. p. pipiens*. Длительность стимула 200 мс, амплитуда 54 дБ УКС, частота 200 Гц.

таким образом, чтобы жгутик левой антенны был направлен перпендикулярно направлениям звуковых волн, исходящих от каждого из двух динамиков. Динамики питались от усилителя мощности (коэффициент усиления 4) через пассивный Sin-Cos преобразователь. Результирующий вектор скорости колебаний воздуха в области пересечения осей определялся суперпозицией сигналов от обоих динамиков. Такая система позволяла подстраивать направление звуковых волн к оптимуму любого слухового рецептора ДО. В начале опыта вектор скорости колебаний воздуха стимула ориентировали под углом 45° относительно сагиттальной плоскости комара.

Синусоидальные стимулы формировали с помощью цифроаналогового преобразователя

ЛА-ЦАПн10м1 (Руднев-Шилев, РФ). Акустическая калибровка стимулирующего устройства проводилась при помощи дифференциального емкостного микрофона NR-231-58-000 (Knowles Electronics, США). Тот же микрофон, помещенный в 2 см от комара, использовали для записи сигналов стимуляции во время опытов.

Дифференциальный микрофон вместе с его усилителем предварительно калибровали в дальнем поле при помощи шумомера V&K 2253 с микрофоном V&K 4176 (Brüel & Kjær, Дания). Все данные об уровне звука в этом исследовании даны в логарифмической шкале в дБ УКС (среднеквадратичный уровень колебательной скорости частиц воздуха), при этом опорный уровень 0 дБ отсчитывается от значения скорости 4.85×10^{-5} мм/с УКС, которое в дальнем поле соответствует эталонному звуковому давлению 20 мкПа. Для контроля акустической измерительной аппаратуры использовали калибратор “Защита-К” (НТМ-Защита, Госреестр РФ 47740-11).

Стимуляция в контуре обратной связи

Суть стимуляции с положительной обратной связью заключается во включении исследуемого сенсорного нейрона в контур обратной связи с использованием усиленного синфазного ответа этого нейрона в качестве сигнала для возбуждения стимулирующего динамика (Lapshin, Vongontsov, 2013; 2017). Применяя такую стимуляцию к слуховому рецептору, мы ожидали, что он начнет отвечать на частоте автовозбуждения (AF), близкой к его собственной частоте (оптимуму) настройки.

Измерения порогов

Частотно-пороговые кривые измеряли, используя синусоидальную стимуляцию с шагом изменения частоты 5–20 Гц в зависимости от частотного диапазона. Критерий порога реакции был установлен на уровне превышения на 2 дБ амплитуды рецепторных ответов над средним уровнем шума в текущей регистрации. При каждой комбинации параметров стимуляции порог измеряли последовательно не менее двух раз. Ниже 40 Гц измерения были ограничены существенным снижением эффективности динамиков. Для того чтобы избежать возможной перегрузки слуховой системы комара слишком громкими звуками, уровень стимуляции не превышал 80 дБ УКС.

Для оценки частоты настройки (центральной частоты) исследованного рецептора по его аудиограмме сначала измеряли минимальную и максимальную частоты по уровню +6 дБ от минимального порога, а затем частоту настройки принимали как среднее значение этих двух частот.

Инъекции

Фармакологические препараты, растворенные в физиологическом растворе с добавлением красителя FastGreen (Sigma) для визуализации объема заполнения пипетки, вводили путем торакальной инъекции. Чтобы избежать вибрации во время прокола кутикулы грудного отдела комара, которые могли бы повлиять на качество электрофизиологической регистрации, кутикулу прокалывали заранее. Стеклопипетку, содержащую раствор, либо помещали в положение, готовое к осторожному повторному введению, либо вводили под кутикулу. В последнем случае, для того чтобы предотвратить истечение раствора в гемолимфу комара, к пипетке через пневматический микроинъектор прикладывали небольшое давление всасывания. После проведения контрольных измерений и записей в торакальный отдел комара вводили около 0.3 мкл раствора.

В инъекциях использовали следующие вещества: октопамин (ОА, Sigma), 50 мМ; агонист рецепторов ОА хлордимеформ (CDM, Sigma), 50 мМ. Контрольные инъекции выполняли с использованием физиологического раствора, окрашенного FastGreen.

Анализ данных

Измерения сравнивали попарно до и после инъекции с использованием парного *t*-критерия, если данные проходили тест Шапиро-Уилка на нормальность, или парного критерия Вилкоксона в противном случае. Статистический анализ был выполнен в PAST (Hammer et al., 2001). Сонограммы были построены и проанализированы в Sound Forge Pro 10 (Sony). Результаты измерений представлены в виде “среднее $\pm$ стандартное отклонение”.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Октопамин снижает низкочастотную слуховую чувствительность у самок комаров

У самок комаров торакальная инъекция ОА (50 мМ, $n = 13$) или CDM (50 мМ, $n = 9$) приводила к увеличению порогов на частотах ниже 90 Гц: при частоте 45 Гц — 14.4 ± 13.0 дБ ($p = 0.03$, парный *t*-критерий) после введения ОА, пример на рис. 2, а) и 10.8 ± 6.1 дБ для CDM ($p = 0.02$, парный *t*-критерий, пример на рис. 2, б). Контрольные инъекции физиологического раствора ($n = 9$) не вызывали подобных эффектов (рис. 2, в). На более высоких частотах достоверного изменения слуховых порогов не наблюдалось (рис. 2, а, б, г). Повышение порогов на низких частотах развивалось в течение 3–5 мин после введения и продолжалось не менее 20 мин. Этот эффект был продемонстрирован в специальном эксперименте, ко-

гда порог многократно измеряли на одной частоте (45 Гц) до и после введения CDM (рис. 2, д).

Эффекты увеличения порогов в низкочастотной части диапазона восприятия иллюстрируют также графики, полученные методом усреднения результатов вычитания данных аудиограмм, полученных до и после введения веществ (рис. 2, е). На этих графиках видно, что введение ОА вызывало наиболее сильное увеличение порогов (порядка 20 дБ), тогда как после инъекции CDM пороги возрастали в среднем на 9 дБ. На рис. 2, ж показано распределение значений слуховых порогов на частоте 50 Гц до и после инъекции ОА. В то же время введение раствора Рингера с красителем не вызывало существенных изменений в чувствительности ДО на низких частотах.

Из-за отсутствия на аудиограммах существенных изменений высокочастотных ветвей и ярко выраженных пиков мы не смогли сравнить частоты оптимумов до и после введения ОА.

Октопамин увеличивает частоту слуховых настроек у самок комаров

При непрерывной регистрации возбуждения нейронов на определенной частоте (AF), вызванного стимуляцией с положительной обратной связью, введение как ОА (50 мМ, $n = 13$), так и CDM (50 мМ, $n = 8$) приводило к увеличению AF (рис. 3, а, б).

Сдвиг AF начинался через 30 ± 17 с после введения ОА и продолжался 43 ± 26 с. После этого AF стабилизировалась на новом значении. После введения CDM все частотные перестройки происходили медленнее: начало эффекта через 140 ± 48 с и последующая стабилизация на новом значении через 174 ± 63 с после введения. Сдвиг AF составил 11.7 ± 4.8 Гц ($p = 0.001$, парный критерий Вилкоксона) при ОА и 13.4 ± 4.8 Гц ($p = 0.01$, парный критерий Вилкоксона) при CDM. Перенастройку частоты можно также количественно определить как соотношение между частотами настройки до (F_1) и после (F_2) инъекции, когда эффект стабилизировался. Попарное сравнение значений AF дало следующие соотношения: $F_2/F_1 = 1.11 \pm 0.06$ для ОА, 1.16 ± 0.05 для CDM.

После введения вещества по мере развития эффекта наблюдались признаки прерывистого перехода AF, а также одновременного возбуждения на двух близких AF, лучше разрешенных на высших гармониках (рис. 3, в). Контрольные инъекции физиологического раствора не вызывали увеличения AF (рис. 3, г). Небольшое (менее 2 Гц) снижение AF после инъекции можно заметить на большинстве записей со стимуляцией с обратной связью, в том числе и на контрольных, что, вероятно, является следствием реакции на введение физиологического раствора и/или красителя FastGreen.

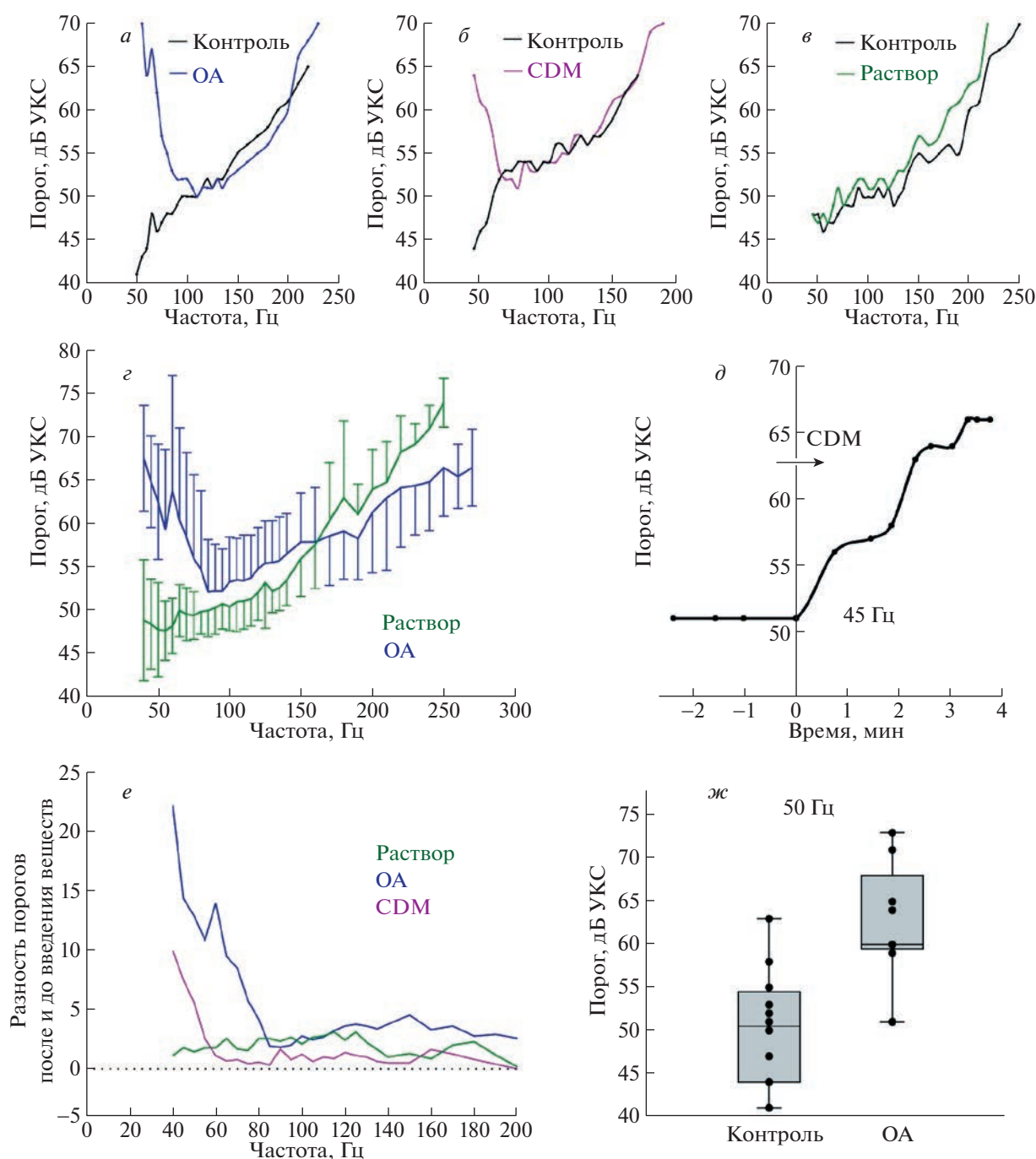


Рис. 2. Влияние ОА и CDM на форму аудиограмм (частотно-пороговых кривых) самок комаров *Culex pipiens pipiens* L.: а, б – примеры аудиограмм, показывающих эффект повышения порогов в диапазоне частот менее 90 Гц после инъекции ОА (а) или CDM (б); в – то же, контрольное введение физиологического раствора; г – усредненные данные по действию ОА (синий цвет графика) и после контрольных инъекций физиологического раствора (зеленый цвет). Указаны средние значения $\pm$ среднеквадратичное отклонения; д – слуховые пороги, последовательно измеренные до и после инъекции CDM (частота стимуляции 45 Гц; точка 0 – начало введения вещества); е – усредненные кривые вычитания (физиологический раствор, $n = 9$; ОА, $n = 13$; CDM, $n = 9$; пороги после инъекций минус пороги до инъекции); ж – распределение значений слуховых порогов на частоте 50 Гц, измеренных до ($n = 12$) и после ($n = 9$) инъекции ОА.

Октопамин увеличивает частоту слуховых настроек у самок комаров

Торакальная инъекция ОА (50 мМ, $n = 7$) самцам комаров приводила к сдвигу аудиограмм в

сторону более высоких частот (рис. 4, а, б).

Этот эффект проявлялся через 20–30 с после инъекции и сохранялся не менее 5 мин. В отличие от частотно-пороговых кривых самок, аудио-

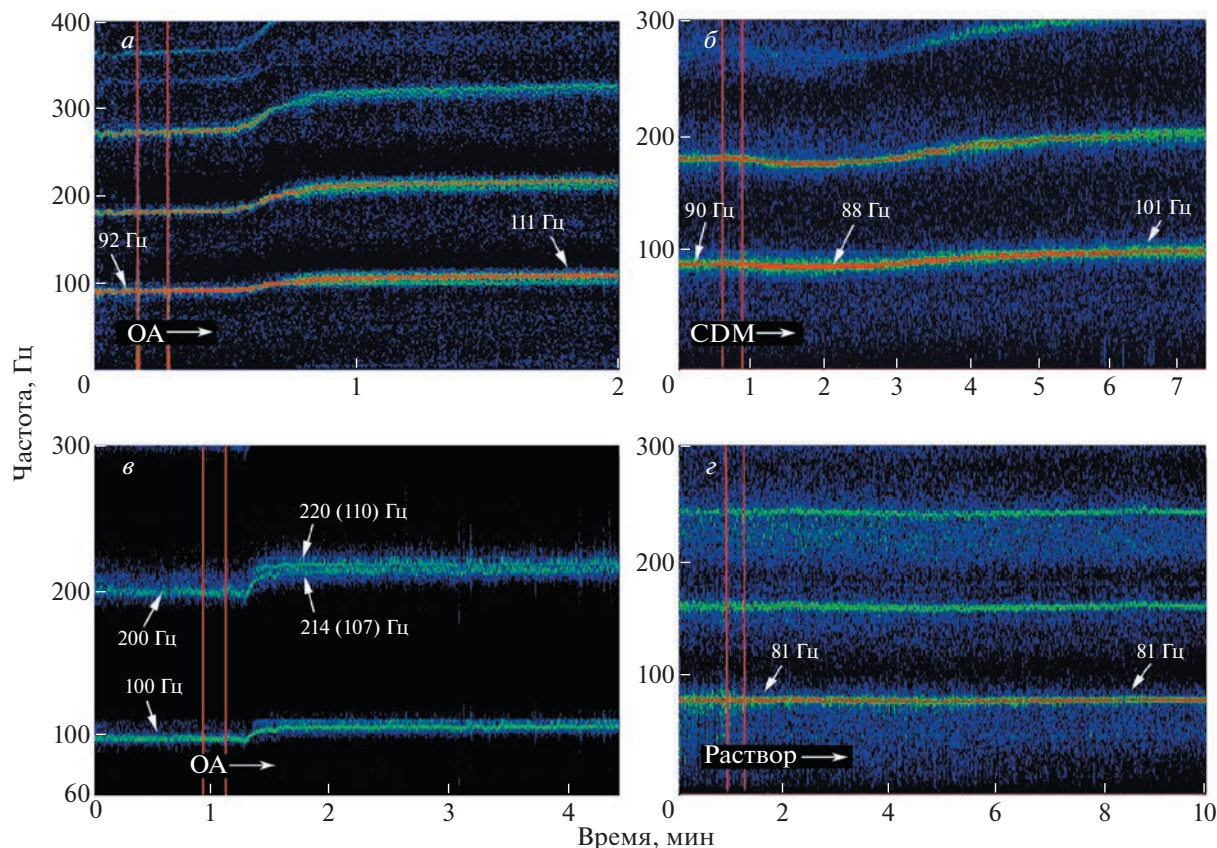


Рис. 3. Примеры изменений частоты настройки рецепторов самок (AF) после инъекции ОА, зарегистрированные в процессе стимуляции с положительной обратной связью.

а — после инъекции ОА наблюдался сдвиг частоты автовозбуждения (AF) с 92 до 111 Гц. Треки, расположенные выше по частоте, соответствуют обергармоникам AF. *б* — после введения CDM наблюдалось небольшое снижение AF (с 90 до 88 Гц) и затем подъем до 101 Гц с выходом на стабильное плато; *в* — после введения ОА возникло одновременное возбуждение на двух близких частотах AF, 107 и 110 Гц; эффект лучше виден на разделении треков вторых гармоник. *г* — стабильная частота AF при инъекции физиологического раствора (контроль). Сонограммы. Вертикальная ось: частота, Гц; горизонтальная ось: время, минуты. Цветом обозначена относительная амплитуда отклика. Вертикальные красные линии обозначают интервал инъекции.

граммы, измеренные у самцов комаров, обычно содержали заметный пик чувствительности при более низких порогах, поэтому можно было измерить и сравнить центральные частоты настройки: сдвиг составил 116 ± 39 Гц ($p = 0.0002$, парный t -критерий). Среднее отношение оптимальных частот при по парном сравнении аудиограмм соответствовало примерно половине октавы: 1.55 ± 0.19 .

У самцов комаров введение ОА приводило к смещению AF на 75.4 ± 9.5 Гц ($p = 0.043$, парный критерий Вилкоксона) (пример на рис. 4, *в*). Отношение частот, измеренное в режиме стимуляции с обратной связью, составило $F_2/F_1 = 1.32 \pm 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши результаты показывают, что ОА влияет на свойства слуховых систем, как самцов, так и

самок комаров; имеется выраженный половой диморфизм в ответ на ОА.

Самки

У самок после инъекции ОА мы наблюдали значительную потерю слуховой чувствительности (увеличение порогов реакций) на низких частотах. На основании уравнений, предоставленных (Göpfert et al., 2005), и данных измерений механических свойств антенны самки комара у *Cx. p. pipiens* (частота механического резонанса $F = 307 \pm 8$ Гц, добротность $Q_3 = 1.38 \pm 0.27$ (Wargen et al., 2009)), мы оценили возможное изменение механической настройки антенны в наших экспериментах после введения ОА (рис. 5, *а*, штриховые и пунктирные линии).

Прогноз частотной перенастройки антенны был основан на предположении, что ОА приводит к увеличению жесткости фиксации антенны в

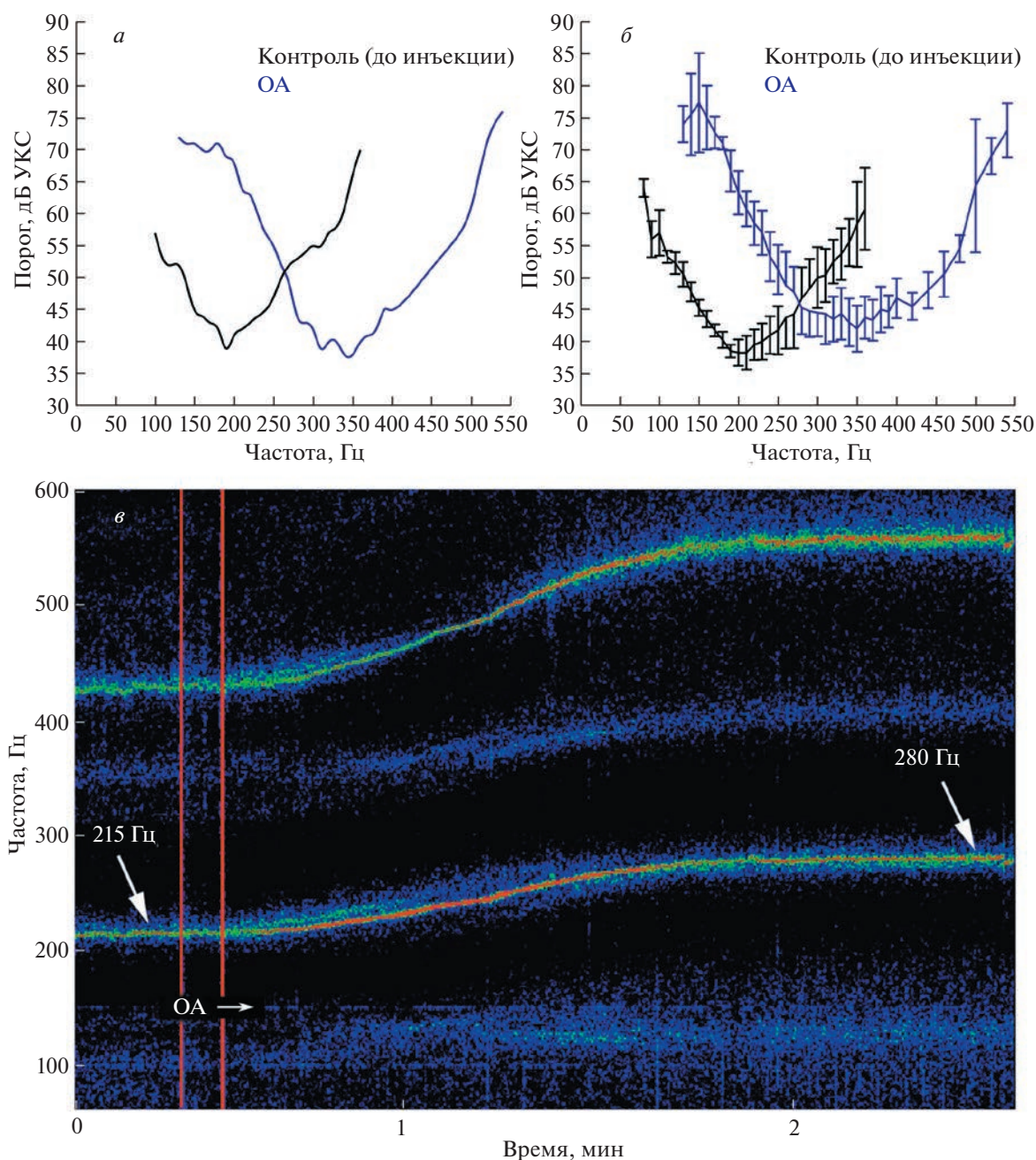


Рис. 4. Частотные перестройки слуховой системы после инъекции ОА самцам комаров *Culex pipiens pipiens* L.

a – частотно-пороговые кривые, измеренные до (черный) и после инъекции ОА (синий) (результаты одного эксперимента); *b* – усредненные частотно-пороговые кривые, построенные по результатам измерений слуховых порогов до (черный) и после инъекции ОА (синий); *v* – пример сонограммы, показывающей перестройку частоты АФ на фоне инъекции ОА при стимуляции положительной обратной связи. Обратите внимание на сдвиг АФ по частоте вверх с 215 до 280 Гц. Вертикальные красные линии указывают интервал инъекции.

джонстоновом органе (Andrés et al., 2016; Georgiades et al., 2022). Это в свою очередь должно приводить к увеличению частоты механической настройки антенны и снижению ее чувствительности на низких частотах (при увеличении жесткости антенна отклоняется на меньший угол при действии

той же поперечной силы). Увеличение жесткости в 1.41 раза приводит к снижению чувствительности антенны на 3 дБ и смещению частоты ее резонанса в $1.41^{\frac{1}{2}} = 1.19$ раза, с 307 до 365 Гц (рис. 5, *a*, пунктирная синяя линия). Здесь и далее при расчете изменений в настройке антенны при увели-

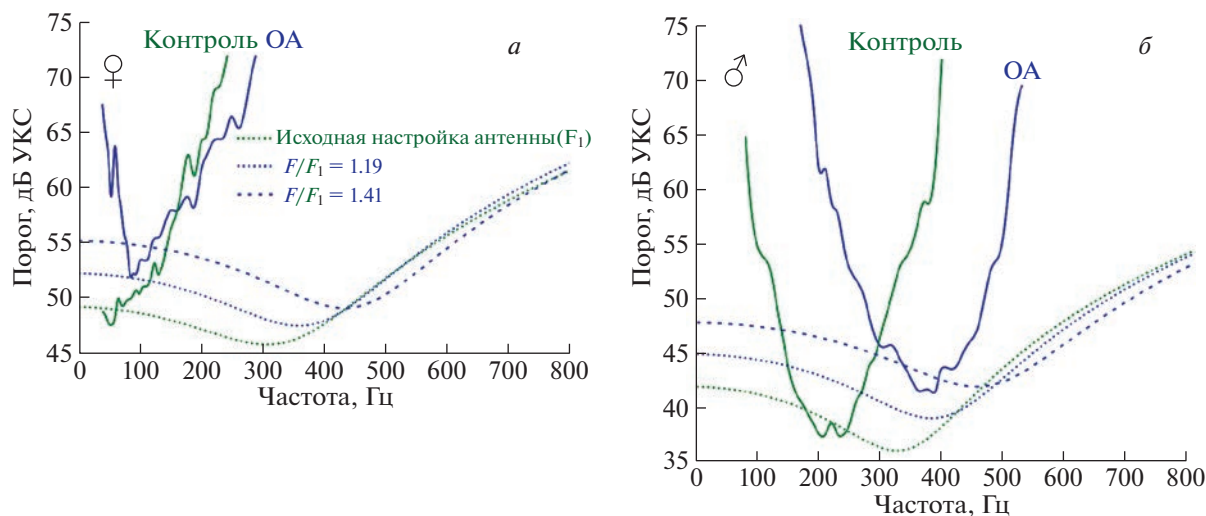


Рис. 5. Теоретически рассчитанные кривые механической настройки антенны, наложенные на экспериментальные частотно-пороговые кривые.

Штриховые и пунктирные линии — расчетные графики реакции антенны на механическую стимуляцию при разных значениях жесткости. Пунктирные синие линии — графики, рассчитанные для самок (а) и самцов (б) с коэффициентом частотной перестройки антенны $F_2/F_1 = 1.19$ и снижением ее чувствительности на 3 дБ. Штриховые синие линии — графики, рассчитанные при коэффициенте частотной перестройки антенны $F_2/F_1 = 1.41$ и снижением ее чувствительности на 6 дБ. Графики инвертированы для более удобного их сопоставления с частотно-пороговыми кривыми (более низкие значения означают более высокую чувствительность). а — усредненные экспериментальные аудиограммы (сплошные линии), полученные на самках комаров, после инъекции физиологического раствора (зеленый цвет) и ОА (синий цвет). График, выполненный зеленым пунктиром, рассчитан с учетом исходной частоты настройки антенны 307 Гц и добротности $Q_3 = 1.38$. б — пример частотно-пороговых кривых, после инъекции физиологического раствора самцам (зеленый цвет графика) и ОА (синий цвет). Исходная настройка антенны самца 328 Гц, добротность $Q_3 = 1.92$ (зеленый пунктир).

чении жесткости мы не учитывали погрешность второго порядка, возникавшую из-за влияния факторов, вносящих в систему затухание. Увеличение жесткости в 2 раза по сравнению с исходным значением должно привести к падению чувствительности на 6 дБ и увеличению частоты настройки в $2^{1/2} = 1.41$ раза, с 307 до 433 Гц (рис. 5, а, штриховая синяя линия). Легко видеть, что перестройка резонанса антенны не могла быть причиной повышения слуховых порогов на частотах ниже 90 Гц, наблюдавшегося в наших опытах после введения ОА. Хотя дальнейшее увеличение жесткости антенны значительно повысило бы слуховые пороги ниже 90 Гц, оно обязательно произвело бы аналогичный эффект на частоте 100 Гц и выше, чего мы в экспериментах не наблюдали. Таким образом, можно сделать вывод, что влияние ОА на частотные свойства слуховой системы комаров не определялось модуляцией жесткости антенны, а скорее всего, имело нейронную природу.

Рассмотрим два механизма, которые могли бы быть ответственными за наблюдаемые эффекты ОА:

- перенастройка рецепторов ДО на более высокие частоты;
- избирательное торможение низкочастотных слуховых рецепторов (ниже 90 Гц).

У самок комаров относительное увеличение частоты настройки рецепторов при действии ОА было небольшим, в пределах 1.11–1.2 (рис. 3, а). Такие изменения можно объяснить зависящим от ОА повышением добротности слуховых рецепторов, что приводило бы к смещению их настройки в сторону более высоких частот, согласно уравнению, представленному в работе (Göpfert et al., 2005). Реальная степень перенастройки слуховых рецепторов у самок комаров в наших экспериментах могла быть еще меньше, так как наблюдаемое одновременное возбуждение на нескольких АФ (рис. 3, в) свидетельствовало о последовательном участии ряда отдельных рецепторов в процессе сдвига АФ вверх по частоте.

Можно предположить, что частотно-избирательное снижение чувствительности рецепторов ДО происходило вследствие уменьшения постоянной времени механосенсорных мембран рецепторов. Однако подобный механизм не способен обеспечить наблюдаемую ниже 90 Гц крутизну скатов левых ветвей аудиограмм (более 12 дБ на октаву, рис. 2, а).

Избирательное торможение низкочастотных слуховых рецепторов октопамином может быть причиной наблюдаемого снижения слуховой чувствительности на низких частотах. Эта гипотеза,

однако, требует наличия в каждом фокальном отведении не менее двух рецепторов, настроенных на разные частоты, с условием, что один из этих рецепторов настроен на более низкие частоты и тормозится ОА. Присутствие в суммарном отведении активности нескольких рецепторов весьма вероятно, так как известно, что слуховые сенсиллы ДО содержат по два или три сенсорных нейрона (Boo, Richards, 1975a; 1975b), при этом совместная активность нескольких нейронов присутствует почти в каждом отведении (Lapshin, Vorontsov, 2017; 2023). Таким образом, поставленное в гипотезе условие, как правило, выполняется.

На первый взгляд неясно функциональное значение потери низкочастотной чувствительности без пропорционального улучшения высокочастотного слуха. Однако, если предположить, что ОА настраивает слуховую систему самки комара на брачное поведение в рое, то потеря чувствительности к низкочастотным звукам может быть оправдана. Под воздействием ОА слуховая система фокусируется на диапазоне частот взмахов крыльев самцов и быстрых частотных модуляциях, производимых самцами комаров, в то время как несущественные в данном контексте более низкие частоты не воспринимаются даже как продукты нелинейных искажений. В другой поведенческой ситуации самки комаров могут использовать свой низкочастотный слух для поиска прокормителей, поскольку низкочастотные звуки меньше затухают в атмосфере и лучше распространяются через растительность (Ситник, 2007).

Все кривые, полученные вычитанием порогов до инъекции из их значений после инъекции, в том числе и после инъекции физиологического раствора (рис. 2, е), указывают на постепенное ухудшение качества электрофизиологической регистрации. Поскольку точки всех трех кривых лежат выше нуля, это означает, что пороги только увеличивались в ходе эксперимента. Вероятнее всего, одним из ведущих факторов, снижавшим качество регистрации, была вибрация, сопровождавшая введение вещества через микропипетку.

Самцы

Поскольку известно, что жесткость антенн самцов комаров в значительной степени модулируется ОА (Andrés et al., 2016), один из очевидных вопросов заключался в том, можно ли полностью объяснить наблюдавшиеся физиологические эффекты ОА увеличением частоты механической настройки антенн.

Антенна самца *Cx. p. pipiens* настроена примерно на 330 Гц (Warren et al., 2009). Данных о механической настройке антенн комаров этого вида после инъекции ОА нет, но известно, что у сам-

цов *Cx. quinquefasciatus* антенны настроены на более высокие частоты, около 380 Гц (Warren et al., 2009), а после действия ОА настройка их антенн смещалась вверх до 540 Гц, т.е. примерно на пол-октавы, или 1.42 раза (Andrés et al., 2016). При расчете теоретических кривых механической перестройки антенны у самцов *Cx. p. pipiens* мы взяли за основу близкий коэффициент, 1.41.

Оптимальные частоты большинства рецепторов ДО самцов *Cx. p. pipiens* до введения ОА группировались в диапазоне около 200 Гц (рис. 4, а, б), что существенно ниже частоты механической настройки антенны 330 Гц (рис. 5, б, пунктирная зеленая линия). После введения ОА оптимумы рецепторов сместились вверх примерно до 350 Гц (рис. 4, а, б), что также ниже прогнозируемой частоты механической настройки антенны при двукратном увеличении жесткости антенны под воздействием ОА (ожидаемый сдвиг частоты настройки $330 \cdot 2^{1/2} = 330 \cdot 1.41 = 465$ Гц, рис. 5, б, штриховая синяя линия). Совпадения нейронной и механической настройки возможно достичь при увеличении жесткости антенны примерно в 1.5 раза, при этом частота механической настройки антенны не превышала бы $330 \cdot 1.5^{1/2} = 404$ Гц (рис. 5, б, пунктирная синяя линия). Как и у самцов комаров, увеличение жесткости антенны у самцов должно приводить к снижению слуховой чувствительности в диапазоне ниже частоты настройки антенны и, соответственно, к повышению слуховых порогов после введения ОА (например, как на рис. 5, б), однако такой эффект наблюдался не во всех наших экспериментах (пример с противоположной тенденцией на рис. 4, а).

Таким образом, наблюдаемую физиологическую перестройку рецепторов ДО у самцов комаров нельзя объяснить только увеличением частоты механической настройки антенн. Кроме того, кривые настройки рецепторов, измеренные в электрофизиологических экспериментах, во всех случаях были значительно острее, чем предсказанные кривые настройки антенны (рис. 5).

Разница между оценками коэффициента перенастройки (F_2/F_1) в зависимости от использованного метода измерения (по кривым пороговой настройки $F_2/F_1 = 1.55$ и по данным АФ $F_2/F_1 = 1.32$) свидетельствует о том, что смещение кривых настройки в сторону более высоких частот включало синергичные эффекты ОА на механические свойства антенны и на избирательные свойства слуховых рецепторов ДО. В связи с этим следует отметить, что само по себе увеличение жесткости антенн без соответствующей перенастройки слуховых рецепторов привело бы только к общему снижению слуховой чувствительности.

Подводя итог по результатам использования различных методов оценки частотной настройки ДО, можно сделать выводы:

– у самок комаров действие ОА значительно снижало чувствительность в области низких частот (ниже 90 Гц). В то же время заметных ОА-зависимых изменений в области частот 100 Гц и выше мы не наблюдали;

– у самцов действие ОА вызывало сдвиг частотных оптимумов слуховых рецепторов в сторону более высоких частот примерно на половину октавы;

– и у самцов, и у самок комаров эффекты действия ОА на слуховую систему нельзя полностью объяснить механической перенастройкой антенного комплекса, поэтому мы предполагаем, что ОА оказывает модулирующее действие на частотно-пороговые характеристики слуховых нейронов ДО.

Это исследование финансировалось РНФ, грант 22-24-00065.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят за содействие сотрудников биостанции “Кропотово” ИБР РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Апасов С.Г., Жантеев Р.Д., Тамарина Н.А., Федорова М.В. Акустическая ориентация самцов *Aedes diaantaeus* при спаривании. *Паразитология*. 1986. Т. 20. № 5. С. 351–355.
- Лапшин Д.Н. Слуховая система самок кровососущих комаров (Diptera, Culicidae): акустическое восприятие в условиях имитации полета. *Энтомологическое обозрение*. 2012. Т. 91. № 3. С. 465–484.
- Лапшин Д.Н. Пространственная и частотная избирательность слуховых рецепторов комаров-звонцов (Chironomidae, Diptera). *Энтомологическое обозрение*. 2015. Т. 94. № 4. С. 761–776.
- Ситник В.В. Влияние массива растительности на распространение акустических возмущений. *Математическое моделирование*. 2007. Т. 19. № 8. С. 90–96.
- Aldersley A., Cator L.J. Female resistance and harmonic convergence influence male mating success in *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*. 2019. V. 9 (2145). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38599-3>
- Andrés M., Seifert M., Spalthoff C., Warren B., Weiss L., Giraldo D., Winkler M., Pauls S., Go M., Göpfert M.C. Auditory efferent system modulates mosquito hearing. *Current Biology*. 2016. V. 26. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.077>
- Andrés M., Su M.P., Albert J., Cator L.J. Buzzkill: targeting the mosquito auditory system. *Current Opinion in Insect Science*. 2020. V. 40. P. 11–7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.04.003>
- Bartlett-Healy K., Crans W., Gaugler R. Phonotaxis to amphibian vocalizations in *Culex territans* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 2008. V. 101. P. 95–103. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2008\)101\[95:PTA-VIC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2008)101[95:PTA-VIC]2.0.CO;2)
- Boo K.S., Richards A.G. Fine structure of the scolopidia in the Johnston's organ of male *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 1975. V. 4. P. 549–566. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(75\)90031-8](https://doi.org/10.1016/0020-7322(75)90031-8)
- Boo K.S., Richards A.G. Fine structure of scolopidia in Johnston's organ of female *Aedes aegypti* compared with that of the male. *J. Insect Physiology*. 1975. V. 21. P. 1129–1139. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(75\)90126-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90126-2)
- Feugère L., Simões P.M.V., Russell I.J., Gibson G. The role of hearing in mosquito behaviour. Chapter 26. In: Ignell R., Lazzari C.R., Lorenzo M.G., Hill S.R. (eds.) *Sensory ecology of disease vectors*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands. 2022. P. 683–708. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-932-9_26
- Finetti L., Paluzzi J.P., Orchard I., Lange A.B. Octopamine and tyramine signalling in *Aedes aegypti*: Molecular characterization and insight into potential physiological roles. *PloS one*. 2023. V. 18. № 2. e0281917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281917>
- Fyodorova M.V., Azovsky A.I. Interactions between swarming *Chironomus annularius* (Diptera: Chironomidae) males: Role of acoustic behavior. *J. Insect Behav.* 2003. V. 16. № 2. P. 295–306. <https://doi.org/10.1023/A:1023976120723>
- Georgiades M., Alampounti C.A., Somers J., Su M., Ellis D., Bagi J., Ntabaliba W., Moore S., Albert J.T., Andrés M. A novel beta-adrenergic like octopamine receptor modulates the audition of malaria mosquitoes and serves as insecticide. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.02.502538v1> (accessed 08.02.2022) (preprint). <https://doi.org/10.1101/2022.08.02.502538>
- Gibson G., Russell I.J. Flying in tune: sexual recognition in mosquitoes. *Current Biology*. 2006. V. 16. № 13. P. 1311–1316. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.053>
- Gibson G., Warren B., Russell I. Humming in tune: sex and species recognition by mosquitoes on the wing. *J. Association for Research in Otolaryngology*. 2010. V. 11. P. 527–540. <https://doi.org/10.1007/s10162-010-0243-2>
- Göpfert M.C., Briegel H., Robert D. Mosquito hearing: sound-induced antennal vibrations in male and female *Aedes aegypti*. *J. Experimental Biology*. 1999. V. 202. P. 2727–2738. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.20.2727>
- Göpfert M.C., Humphris A.D., Albert J.T., Robert D., Hendrich O. Power gain exhibited by motile mechanosensory neurons in *Drosophila* ears. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 2. P. 325–330. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405741102>
- Hammer O., Harper D.A., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*. 2001. V. 4. № 1. P. 9.
- Hart M., Belton P., Kuhn R. The Risler manuscript. European mosquito. *European Mosquito Bulletin*. 2011. V. 29. P. 103–113.

- Lapshin D.N. Auditory system of blood-sucking mosquito females (Diptera, Culicidae): acoustic perception during the flight simulation. *Entomological Review*. 2013. V. 93. № 2. P. 135–149. <https://doi.org/10.1134/S0013873813020012>
- Lapshin D.N. Directional and frequency characteristics of auditory receptors in midges (Diptera, Chironomidae). *Entomological Review*. 2015. V. 95. P. 1155–1165. <https://doi.org/10.1134/S001387381509002X>
- Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Frequency tuning of individual auditory receptors in female mosquitoes (Diptera, Culicidae). *J. Insect Physiology*. 2013. V. 59. P. 828–839. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.05.010>
- Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Frequency organization of the Johnston's organ in male mosquitoes (Diptera, Culicidae). *J. Experimental Biology*. 2017. V. 220. P. 3927–3938. <https://doi.org/10.1242/jeb.152017>
- Lapshin D.N., Vorontsov D.D. *Mapping the auditory space of Culex pipiens female mosquito in 3D*. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.01.09.523250v1> (accessed 09.01.2023) (preprint). <https://doi.org/10.1101/2023.01.09.523250>
- Legett H.D., Aihara I., Bernal X.E. Within host acoustic signal preference of frog-biting mosquitoes (Diptera: Culicidae) and midges (Diptera: Corethrellidae) on Iriomote Island, Japan. *Entomological Science*. 2021. V. 24. № 2. P. 116–122. <https://doi.org/10.1111/ens.12455>
- Loh Y.M., Su M.P., Ellis D.A., Andrés M. The auditory efferent system in Mosquitoes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023. V. 11–1123738.11. P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1123738>
- Mukundarajan H., Hol F.J.H., Castillo E.A., Newby C., Prakash M. Using mobile phones as acoustic sensors for high-throughput mosquito surveillance. *Ecology Epidemiology and Global Health*. 2017. V. 6–e27854. <https://doi.org/10.7554/eLife.27854>
- 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. <https://doi.org/10.7601/mez.44.355>
- Pantoja-Sánchez H., Vargas J.F., Ruiz-López F., Rúa-Urbe G., Vélez V., Kline D.V., Bernal X.E. A new approach to improve acoustic trapping effectiveness for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*. 2019. V. 44. № 2. P. 216–222. <https://doi.org/10.1111/jvec.12352>
- Simões P.M., Gibson G., Russell I.J. Pre-copula acoustic behaviour of males in the malarial mosquitoes *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s. does not contribute to reproductive isolation. *J. Experimental Biology*. 2017. V. 220. № 3. P. 379–385. <https://doi.org/10.1242/jeb.149757>
- Su M.P., Andrés M., Boyd-Gibbins N., Somers J., Albert J.T. Sex and species specific hearing mechanisms in mosquito flagellar ears. *Nature Communications*. 2018. V. 9. № 1. P. 3911.
- Toma T., Takara T., Miyagi I., Futami K., Higa Y. Mosquitoes and frog-biting midges (Diptera: Culicidae and Corethrellidae) attracted to traps with natural frog calls and synthesized sounds at Iriomote Island, Ryukyu Archipelago, Japan. *Medical Entomology and Zoology*. 2019. V. 70. № 4. P. 221–234. <https://doi.org/10.7601/mez.70.221>
- 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. 9. P. 485–491. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.059>
- Warren B., Lukashkin A.N., Russell I.J. The dynein–tubulin motor powers active oscillations and amplification in the hearing organ of the mosquito. *Proceedings of the Royal Society B*. 2010. V. 277. P. 1761–1769. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2355>

Effect of octopamine on the frequency tuning of the auditory system in *Culex pipiens pipiens* mosquito (Diptera, Culicidae)

D. D. Vorontsov^{a, #} and D. N. Lapshin^{b, ##}

^aKoltzov Institute of Developmental Biology Russian Academy of Sciences
119334 Moscow, Vavilova, 26, Russia

^bInstitute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute)
127994 Moscow, Bolshoy Karetny per., 19, Russia

[#]E-mail: d.vorontsov@idbras.ru

^{##}E-mail: lapshin@iitp.ru

We aimed at demonstrating the direct physiological effects of octopamine on the auditory responses of the Johnston's organ sensory neurons in *Culex pipiens pipiens* mosquitoes. Responses to acoustic stimulation were measured as the frequency-threshold curves and as an instantly recorded autoexcitation frequency before and after the injection of octopamine (or chlordimeform, an agonist of octopamine receptors). The autoexcitation frequency was assessed by including the auditory neurons into a positive feedback loop, when the amplified neuronal response was used to drive the stimulating loudspeaker. Our results indicate that: octopamine affects the properties of the auditory system both in male and female mosquitoes; in female mosquitoes, octopamine significantly reduces the sensitivity of auditory neurons below 90 Hz and produces little effect in the high-frequency range (100 Hz and above); in male mosquitoes, octopamine significantly raises the tuning

frequency of the auditory system (ratio of tuning frequencies before and after the injection 1.32–1.55). There is a strong sexual dimorphism in the octopaminergic modulation of the mosquito auditory system. The observed physiological effects of octopamine, both in male and female mosquitoes, cannot be fully explained by the modulation of mechanical stiffness of the antenna and must include the changes in frequency tuning of the auditory neurons.

Key words: *Culex*, mosquitoes, Johnston's organ, auditory neurons, frequency tuning

REFERENCES

- Apasov S.R., Zhantiev R.D., Tamarina N.A., Federova M.V. Akusticheskaja orientacija samcov *Aedes diaantaeus* pri sparivanii [Acoustic orientation of *Aedes diaantaeus* males during pairing]. *Parazitologiya* [Parasitology]. 1986. V. 20. № 5. P. 351–355.
- Lapshin D.N. Sluhovaja sistema samok krovososushhih komarov (Diptera, Culicidae): akusticheskoe vospriyat'ie v uslovijah imitacii poljota. [Auditory system of blood-sucking mosquito females (Diptera, Culicidae): acoustic perception during the flight simulation]. *Jentomologicheskoe obozrenie* [Entomological review]. 2012. V. 91. № 3. P. 465–484.
- Lapshin D.N. Prostranstvennaja i chastotnaja izbiratel'nost' sluhovyh receptorov komarov-zvoncov (Diptera, Chironomidae) [Directional and frequency characteristics of auditory receptors in midges (Diptera, Chironomidae)]. *Jentomologicheskoe obozrenie* [Entomological review]. 2015. V. 94. № 4. P. 761–776.
- Sitnik V.V. Vlijanie massiva rastitel'nosti na rasprostranenie akusticheskikh vozmushhenij [A forestry influence on an acoustic perturbation propagation]. *Matematicheskoye modelirovaniye* [Math modeling]. 2007. V. 19. № 8. P. 90–96 (in Russian).
- Aldersley A., Cator L.J. Female resistance and harmonic convergence influence male mating success in *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*. 2019. V. 9 (2145). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38599-3>
- Andrés M., Seifert M., Spalthoff C., Warren B., Weiss L., Giraldo D., Winkler M., Pauls S., Go M., Göpfert M.C. Auditory efferent system modulates mosquito hearing. *Current Biology*. 2016. V. 26. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.077>
- Andrés M., Su M.P., Albert J., Cator L.J. Buzzkill: targeting the mosquito auditory system. *Current Opinion in Insect Science*. 2020. V. 40. P. 11–7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.04.003>
- Bartlett-Healy K., Crans W., Gaugler R. Phonotaxis to amphibian vocalizations in *Culex territans* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 2008. V. 101 P. 95–103. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2008\)101\[95:PTA-VIC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2008)101[95:PTA-VIC]2.0.CO;2)
- Boo K.S., Richards A.G. Fine structure of the scolopidia in the johnston's organ of male *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 1975. V. 4. P. 549–566. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(75\)90031-8](https://doi.org/10.1016/0020-7322(75)90031-8)
- Boo K.S., Richards A.G. Fine structure of scolopidia in Johnston's organ of female *Aedes aegypti* compared with that of the male. *J. Insect Physiology*. 1975 V. 21. P. 1129–1139. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(75\)90126-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90126-2)
- Feugère L., Simões P.M.V., Russell I.J., Gibson G. The role of hearing in mosquito behaviour. Chapter 26. In: Ignell R., Lazzari C.R., Lorenzo M.G., Hill S.R. (eds.) *Sensory ecology of disease vectors*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands. 2022. P. 683–708. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-932-9_26
- Finetti L., Paluzzi J.P., Orchard I., Lange A.B. Octopamine and tyramine signalling in *Aedes aegypti*: Molecular characterization and insight into potential physiological roles. *PloS one*. 2023. V. 18. № 2. e0281917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281917>
- Fyodorova M.V., Azovsky A.I. Interactions between swarming *Chironomus annularius* (Diptera: Chironomidae) males: Role of acoustic behavior. *J. Insect Behav.* 2003. V. 16. № 2. P. 295–306. <https://doi.org/10.1023/A:1023976120723>
- Georgiades M., Alampounti C.A., Somers J., Su M., Ellis D., Bagi J., Ntabaliba W., Moore S., Albert J.T., Andrés M. *A novel beta-adrenergic like octopamine receptor modulates the audition of malaria mosquitoes and serves as insecticide*. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.02.502538v1> (accessed 08.02.2022) (preprint). <https://doi.org/10.1101/2022.08.02.502538>
- Gibson G., Russell I.J. Flying in tune: sexual recognition in mosquitoes. *Current Biology*. 2006. V. 16. № 13. P. 1311–1316. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.053>
- Gibson G., Warren B., Russell I. Humming in tune: sex and species recognition by mosquitoes on the wing. *J. Association for Research in Otolaryngology*. 2010. V. 11. P. 527–540. <https://doi.org/10.1007/s10162-010-0243-2>
- Göpfert M.C., Briegel H., Robert D. Mosquito hearing: sound-induced antennal vibrations in male and female *Aedes aegypti*. *J. Experimental Biology*. 1999. V. 202. P. 2727–2738. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.20.2727>
- Göpfert M.C., Humphris A.D., Albert J.T., Robert D., Hendrich O. Power gain exhibited by motile mechanosensory neurons in *Drosophila* ears. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 2. P. 325–330. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405741102>
- Hammer O., Harper D.A., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*. 2001. V. 4. № 1. P. 9.
- Hart M., Belton P., Kuhn R. The Risler manuscript. European mosquito. *European Mosquito Bulletin*. 2011. V. 29. P. 103–113.
- Lapshin D.N. Auditory system of blood-sucking mosquito females (Diptera, Culicidae): acoustic perception during the flight simulation. *Entomological Review*. 2013. V. 93. № 2. P. 135–149. <https://doi.org/10.1134/S0013873813020012>

- Lapshin D.N. Directional and frequency characteristics of auditory receptors in midges (Diptera, Chironomidae). *Entomological Review*. 2015. 95, 1155–1165. <https://doi.org/10.1134/S001387381509002X>
- Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Frequency tuning of individual auditory receptors in female mosquitoes (Diptera, Culicidae). *J. Insect Physiology*. 2013. V. 59. P. 828–839. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.05.010>
- Lapshin D.N., Vorontsov D.D. Frequency organization of the Johnston's organ in male mosquitoes (Diptera, Culicidae). *J. Experimental Biology*. 2017. V. 220. P. 3927–3938. <https://doi.org/10.1242/jeb.152017>
- Lapshin D.N., Vorontsov D.D. *Mapping the auditory space of Culex pipiens female mosquito in 3D*. URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.01.09.523250v1> (accessed 09.01.2023) (preprint). <https://doi.org/10.1101/2023.01.09.523250>
- Legett H.D., Aihara I., Bernal X.E. Within host acoustic signal preference of frog-biting mosquitoes (Diptera: Culicidae) and midges (Diptera: Corethrellidae) on Iriomote Island, Japan. *Entomological Science*. 2021. V. 24. № 2. P. 116–122. <https://doi.org/10.1111/ens.12455>
- Loh Y.M., Su M.P., Ellis D.A. and Andrés M. The auditory efferent system in Mosquitoes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023. V. 11–1123738.11. P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1123738>
- Mukundarajan H., Hol F.J.H., Castillo E.A., Newby C., Prakash M. Using mobile phones as acoustic sensors for high-throughput mosquito surveillance. *Ecology Epidemiology and Global Health*. 2017. V. 6–e27854. <https://doi.org/10.7554/eLife.27854>
- 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. <https://doi.org/10.7601/mez.44.355>
- Pantoja-Sánchez H., Vargas J.F., Ruiz-López F., Rúa-Uribe G., Vélez V., Kline D.V., Bernal X.E. A new approach to improve acoustic trapping effectiveness for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*. 2019. V. 44. № 2. P. 216–222. <https://doi.org/10.1111/jvec.12352>
- Simões P.M., Gibson G., Russell I.J. Pre-copula acoustic behaviour of males in the malarial mosquitoes *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* s.s. does not contribute to reproductive isolation. *J. Experimental Biology*. 2017. V. 220. № 3. P. 379–385. <https://doi.org/10.1242/jeb.149757>
- Su M.P., Andrés M., Boyd-Gibbins N., Somers J., Albert J.T. Sex and species specific hearing mechanisms in mosquito flagellar ears. *Nature Communications*. 2018. V. 9. № 1. P. 3911.
- Toma T., Takara T., Miyagi I., Futami K., Higa Y. Mosquitoes and frog-biting midges (Diptera: Culicidae and Corethrellidae) attracted to traps with natural frog calls and synthesized sounds at Iriomote Island, Ryukyu Archipelago, Japan. *Medical Entomology and Zoology*. 2019. V.70. № 4. P. 221–234. <https://doi.org/10.7601/mez.70.221>
- 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. 9. P. 485–491. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.059>
- Warren B., Lukashkin A.N., Russell I.J. The dynein–tubulin motor powers active oscillations and amplification in the hearing organ of the mosquito. *Proceedings of the Royal Society B*. 2010. V. 277. P. 1761–1769. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2355>