UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Jurij DOLENŠEK

ELEKTROFIZIOLOŠKI ODZIVI VOHALNIH CELIC AMERIŠKEGA SOMIČA (*Ameiurus melas*) NA AMINOKISLINE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Jurij DOLENŠEK

ELEKTROFIZIOLOŠKI ODZIVI VOHALNIH CELIC AMERIŠKEGA SOMIČA (*Ameiurus melas*) NA AMINOKISLINE

DOKTORSKA DISERTACIJA

ELECTROPHYSIOLOGICAL RESPONSES OF OLFACTORY RECEPTOR NEURONS TO AMINO ACIDS IN BLACK BULLHEAD CATFISH (Ameiurus melas)

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2007

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. Raziskave so bile opravljene na Oddelku za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Tema disertacije je bila sprejeta na senatu Univerze v Ljubljani, dne 14.02. 2006.

Mentor prof. dr. Tine Valentinčič je bil imenovan na senatu Univerze v Ljubljani, dne 14.02. 2006.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik	doc. dr. Peter STUŠEK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
Član	prof. dr. Tine VALENTINČIČ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.
Član	prof. dr. Robert ZOREC Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo.

Datum zagovora: 19.12.2007

Spodaj podpisani Jurij Dolenšek se strinjam z objavo moje doktorske disertacije na spletni strani Digitalne knjižnjice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je doktorska disertacija, ki sem jo oddal v elektronski obliki, enaka tiskani različici.

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jurij Dolenšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

- DK 597.51:612.014:547.46(043.3)=863
- KG voh/ameriški somič/Ameiurus melas/ vohalni organ/ aminokisline/ vohalni epitel/ vohalne celice/ EOG/ elektroolfaktogram/kodiranje/visoko prečiščena voda
- KK
- AV DOLENŠEK, Jurij, univ. dipl. biol.
- SA VALENTINČIČ, Tine
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2007
- IN ELEKTROFIZIOLOŠKI ODZIVI VOHALNIH CELIC AMERIŠKEGA SOMIČA (*Ameiurus melas*) NA AMINOKISLINE
- TD Doktorska disertacija
- OP VIII, 69 str., 1 pregl., 28 sl., 121 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Raziskovali smo elektrofiziološki odziv vohalnega organa ameriškega somiča (Ameiurus *melas*) na aminokisline. Pred draženjem so bile vohalne celice bodisi spontano aktivne bodisi neaktivne. V večini predhodnih raziskav so raziskovalci našli le spontano aktivne vohalne celice, ki so se na aminokisline večinoma odzvale s supresijo, le nekaj teh celic se je na aminokisline odzvalo z ekscitacijo. Večina spontano aktivnih vohalnih celic se na aminokisline ni odzivala ponovljivo. Da bi z elektrodo našli spontano neaktivne vohalne celice, ki se odzivajo na aminokisline, smo poskuse naredili v visoko prečiščeni vodi (VPV, $R>18.2M\Omega cm$), v kateri lahko le malo elektrinine steče mimo snemalne elektrode. Štiriinštirideset vohalnih celic smo testirali z devetimi 10⁻⁴M aminokislinami in 10⁻²M L-Pro. Približno tretjina vohalnih celic so bili specialisti, ki so se odzivali bodisi na L-nVal (N=7), bodisi na L-Met (N=4) ali na L-Ala (N=2). Sedemnajst vohalnih celic se je odzivalo na aminokislini L-Met in L-nVal. Vse vohalne celice, ki so se odzivale na 3-6 aminokislin (N=9), so se najbolj odzivale na eno od aminokislin. Le štiri od 44 vohalnih celic se je približno enako odzivalo na dve aminokislini. Pri 21 L-nVal občutljivih vohalnih celicah smo izmerili koncentracijsko odvisnost odzivov v razponu koncentracij $10^{-8}M - 10^{-4}M$. Odzivi celic na aminokisline so bili tonični (N=9 celic) ali fazično-tonični (N=12 celic). Frekvence akcijskih potencialov med toničnimi odzivi so saturirale pri koncentracijah, ki so bile ~10x večje od vzdražnostnega praga celice. Med fazičnimi odzivi frekvence akcijskih potencialov niso saturirale. Elektroolfaktogram (EOG) smo snemali istočasno z odzivi posameznih vohalnih celic. V VPV je večina aminokislin izzvala enake relativne amplitude EOG kot v vodovodni vodi. Da bi testirali Ottosonovo hipotezo (1971), da je EOG seštevek receptorskih potencialov vohalnih celic, smo izračunali hipotetične EOG krivulje iz števil vohalnih celic, aktiviranih pri različnih koncentracijah L-nVal. Rekrutacija vohalnih celic je sledila predvidenemu EOG. Število aktiviranih vohalnih celic je močno koreliralo z relativnimi amplitudami EOG za (A) različne aminokisline pri enakih koncentracijah in za (B) različne koncentracije L-nVal kar podpira Ottosonovo hipotezo (1971).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

- DC 597.51:612.014:547.46(043.3)=863
- CX olfaction/ black bullhead catfish/ Ameiurus melas/ olfactory organ/ amino acids/ olfactory epithelium/ olfactory receptor neuron/ EOG/ electroolfactogram/ coding/ highly purified water
- CC
- AU DOLENŠEK, Jurij
- AA VALENTINČIČ, Tine
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI ELECTROPHYSIOLOGICAL RESPONSES OF OLFACTORY RECEPTOR NEURONS TO AMINO ACIDS IN BLACK BULLHEAD CATFISH (*Ameiurus melas*).
- DT Doctoral Dissertation
- NO VIII, 69 p., 1 tab., 28 fig., 121 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB We investigated electrophysiological responses of olfactory organs of black bullhead catfish (Ameiurus melas) to amino acids. Prior to stimulation, the olfactory receptor neurons (ORNs) were either spontaneously active or inactive. In most of the previous studies investigators were finding only spontaneously active ORNs that mostly responded to amino acids with suppression, few of these ORNs responded to amino acids with excitation. Responses to amino acid stimuli in spontaneously active ORN were inconsistent. To find with the electrode the spontaneously inactive ORNs that respond to amino acid stimuli we conducted experiments in highly purified water (HPW, $R>18.2M\Omega cm$) which produced little shunting of electrophysiological signals. We tested 44 ORNs with nine 10⁻⁴M amino acids and with 10⁻²M L-Pro. A third of the ORNs were specialist cells responding to L-nVal (N=7), L-Met (N=4) or L-Ala (N=2) only. Seventeen ORNs responded to two amino acid stimuli, L-Met and L-nVal. All ORNs responding to 3-6 amino acids (N=9) responded most to one of the amino acids. Only four of 44 ORNs responded equally well to two effective amino acid stimuli. In 21 L-nVal sensitive ORNs we measured dose-dependence of the cells response in the concentration range from 10^{-8} M to 10⁻⁴M. ORNs responses to amino acids were either tonic (N=9 ORNs) or phasic-tonic (N=12 ORNs). Action potential frequencies in the tonic responses saturated at concentrations ~ 10 fold above the neuron's threshold. During phasic responses the action potential frequencies did not saturate. Electroolfactogram (EOG) was recorded in parallel with single unit activities. In HPW most amino acids evoked relative EOG amplitudes that were equal to those in the tap water. To test the Ottoson's hypothesis (1971) that EOG is the sum of ORNs receptor potentials we calculated the hypothetical EOG curves from the number of ORNs activated at different L-nVal concentrations. The ORNs recruitment closely followed EOG predictions. The numbers of activated ORNs correlated highly with the relative EOG amplitudes for (A) different amino acids at the same concentration and (B) for different L-nVal concentrations which is in favor of the Ottoson's hypothesis (1971).

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC IN SLIKV	Π
1	UVOD	. 1
1.1	Morfološka in histološka zgradba vohalnega organa	. 1
1.2	Receptorski proteini	. 2
1.3	Transdukcijski mehanizmi vohalnega odziva	. 3
1.4	Zgradba vohalnega bulbusa	. 5
1.5	Elektroolfaktogram in odzivi vohalnih celic	. 5
2	NAMEN DELA	. 7
3	MATERIALI IN METODE	. 9
3.1	Vzdrževanje in priprava živali	. 9
3.2	Dražljaji	. 9
3.3	Draženje vohalnega epitela	10
3.4	Snemanje elektrofizioloških odzivov	13
3.5	Analiza podatkov	14
3.6	Redčenje dražljaja v nosni votlini	15
4	REZULTATI	18
4.1	Elektroolfaktogram (EOG)	18
4.2 4.2. 4.2. 4.2.	Odzivi spontano neaktivnih vohalnih celic na draženje z različnimi aminokislinami Dolžine elektrofizioloških odzivov spontano neaktivnih vohalnih celic na različne aminokisline Koncentracijska odvisnost dolžin odzivov spontano neaktivnih vohalnih celic na L-nVal Koncentracijska odvisnost dolžin odzivov spontano neaktivnih vohalnih celic na L-Met	22 23 27 29
4.3 4.3. 4.3. 4.3.	 Tonični in fazično-tonični odzivi spontano neaktivnih vohalnih celic Frekvence akcijskih potencialov med odzivom na različne koncentracije L-nVal Frekvence akcijskih potencialov med odzivom na različne koncentracije L-Met Frekvence akcijskih potencialov med odzivi na različne aminokisline 	30 30 36 37

Dolenšek Dokt. d	Dolenšek J. Elektrofiziološki odzivi vohalnih celic ameriškega somiča (<i>Ameiurus melas</i>) na aminokisline. Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2007	
4.4	Amplitude EOG in število odzivajočih vohalnih celic	39
4.5	Odziv spontano aktivnih vohalnih celic na aminokisline v VPV	43
5	RAZPRAVA IN SLKEPI	45
5.1 5.1.1 5.1.2 5.1.3	RAZPRAVA Elektroolfaktogram (EOG) Odzivi spontano neaktivnih vohalnih celic na draženje z različnimi aminokislinami Amplitude EOG in število odzivajočih vohalnih celic	45 45 47 51
5.2	SKLEPI	55
6	POVZETEK (SUMMARY)	57
6.1	POVZETEK	57
6.2	SUMMARY	59
7	VIRI	61

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC IN SLIK

Preglednica 1: Koncentracija ionov v visoko prečiščeni vodi (VPV) neposredno iz naprave za deionizacijo vode, v vodi, ki je dotekala v nosno votlino iz sistema za draženje in v vodi, ki je iztekala iz nosne votline. V zadnji koloni so koncentracije ionov v umetni jezerski vodi (King in Preston, 1977; Marsot in Couillard, 1979; Christiansen in Marshall, 1965)
Slika 1: Metoda: med draženjem z aminokislinami v visoko prečiščeni vodi smo istočasno odvajali podvodni elektroolfaktogram (EOG) in elektrofiziološko aktivnost posameznih vohalnih celic
Slika 2: Izračunano redčenje dražljaja v nosni votlini po prenehanju dovajanja dražljaja v nosno votlino. A: Volumen nosne votline smo ocenili na Vmin=0.125ml pri majhnih in Vmax=0.5ml pri največjih somičih, začetna koncentracija dražljaja je 10 ⁻⁴ M. B: Koncentracija dražljaja v nosni votlini pri različnih začetnih koncentracijah dražljaja (10 ⁻⁴ M – 10 ⁻⁷ M) pri največjih ribah (V=0.5ml)
Slika 3: EOG v VPV: odziv na draženje z L-Met eno uro (svetlo sivo), tri ure (temno sivo) in pet ur (črno) po začetku poskusa.
Slika 4: Relativne amplitude EOG med draženjem z desetimi aminokislinami v VPV (levo) in v vodovodni vodi (desno). EOG odzivi so standardizirani na odziv na 10 ⁻⁴ M L-Ala in urejeni glede na velikost odzivov v vodovodni vodi
Slika 5: Korelacija med relativnimi amplitudami EOG na nevtralne aminokisline in L-Pro v VPV in v deklorirani vodovodni vodi. R= Pearsonov korelacijski koeficient, debelo je regresijska premica (metoda najmanjših kvadratov), tanjši liniji označujeta 95% interval zaupanja za premico
Slika 6: EOG v VPV: relativne amplitude na različne koncentracije L-nVal
Slika 7: Spontano neaktivna vohalna celica, ki se je elektrofiziološko odzivala na draženje z L-Met in L- nVal. Vohalno celico smo dražili tudi z ekvimolarno zmesjo obeh aminokislin
Slika 8: Spontano neaktivna vohalna celica, ki se je odzvala na šest aminokislin: L-Met, L-nVal, L-Ala, L- Leu, L-Val in L-ArgHCl. Vohalno celico smo dražili tudi z ekvimolarno zmesjo desetih aminokislin (mix10)
Slika 9: Posamezne vohalne celice so se odzivale na (A) eno, (B) dve, (C) tri, štiri, pet ali šest izmed desetih testnih aminokislin (10 ⁻⁴ M in L-Pro 10 ⁻² M)
Slika 10: Dolžine odzivov posameznih vohalnih celic, ki so se odzivale na (A) eno, (B) dve, (C) tri, štiri, pet ali šest aminokislin (10 ⁻⁴ M in L-Pro 10 ⁻² M). »n« označuje aminokislino L-nVal. Zaporedje celic je enako kot na sliki 9
Slika 11: Spontano neaktivna vohalna celica: koncentracijsko odvisen odziv na L-nVal
Slika 12: Koncentracijska odvisnost dolžine odziva vohalnih celic, ki so imele vzdražnostne prage pri 10 ⁻⁷ M (črno), pri 10 ⁻⁶ M (rdeče), pri 10 ⁻⁵ M (modro) in pri 10 ⁻⁴ M (zeleno) L-nVal
Slika 13: Dolžine odzivov posameznih vohalnih celic na različne koncentracije L-Met
Slika 14: Odziv tonične vohalne celice na različne koncentracije L-nVal: akcijski potenciali (zgoraj) in njihova frekvenca (spodaj)
Slika 15: Tonične vohalne celice: frekvence akcijskih potencialov med draženjem z različnimi koncentracijami L-nVal

Slika	16: Odziv fazično-tonične vohalne celice na različne koncentracije L-nVal: akcijski potenciali (zgoraj) in njihova frekvenca (spodaj)
Slika	17: Fazično-tonične vohalne celice: frekvence akcijskih potencialov v fazičnih (○) in toničnih (●) delih odzivov na različne koncentracije L-nVal
Slika	18: Fazično-toničen odziv: frekvence akcijskih potencialov v fazičnih (°) in toničnih (•) delih odzivov celic na različne koncentracije L-Met
Slika	19: Odziv tonične vohalne celice, ki se je odzivala na L-nVal in L-Met: akcijski potenciali (zgoraj) in njihova frekvenca (spodaj)
Slika	20: Odziv fazično-tonične vohalne celice, ki se je odzivala na L-nVal in L-Met: akcijski potenciali (zgoraj) in njihova frekvenca (spodaj)
Slika	21: Število spontano neaktivnih vohalnih celic, ki so se odzvale na posamezne nevtralne aminokisline (10 ⁻⁴ M) in iminokislino L-Pro (10 ⁻² M)
Slika	22: Korelacija med števili aktiviranih vohalnih celic in relativnimi EOG amplitudami na nevtralne aminokisline (10 ⁻⁴ M) ter L-Pro (10 ⁻² M). R= Pearsonov korelacijski koeficient, debelo je regresijska premica (metoda najmanjših kvadratov), tanjši krivulji označujeta 95% interval zaupanja za regresijsko premico. 40
Slika	23: Število spontano neaktivnih vohalnih celic, ki so se odzvale med draženjem z različnimi
	koncentracijami L-nVal
Slika	koncentracijami L-nVal. 41 24: Korelacija med števili elektrofiziološko aktiviranih vohalnih celic in relativnimi EOG amplitudami pri različnih koncentracijah L-nVal. R= Pearsonov korelacijski koeficient, debelo je regresijska premica (metoda najmanjših kvadratov), tanjši krivulji označujeta 95% interval zaupanja za regresijsko premico. 42
Slika Slika	koncentracijami L-nVal. 41 24: Korelacija med števili elektrofiziološko aktiviranih vohalnih celic in relativnimi EOG amplitudami pri različnih koncentracijah L-nVal. R= Pearsonov korelacijski koeficient, debelo je regresijska premica (metoda najmanjših kvadratov), tanjši krivulji označujeta 95% interval zaupanja za regresijsko premico. 42 25: Supresija spontano aktivne vohalne celice v VPV: odziv na deset posameznih aminokislin (zgoraj) in koncentracijsko odvisen odziv na različne koncentracije ekvimolarne zmesi desetih aminokislin v VPV (mix10, spodaj). 43
Slika Slika Slika	koncentracijami L-nVal
Slika Slika Slika	koncentracijami L-nVal

1 UVOD

Vretenčarji zaznavajo kemične snovi z organom za voh in organom za okus. Pri kopenskih vretenčarjih hlapne vonjave zaznava organ za voh, medtem ko kemične snovi, raztopljene v vodi, zaznava organ za okus. Filogenetsko najstarejši vretenčarji, ribe, zaznavajo z obema organoma kemične dražljaje raztopljene v vodi. Okušalni brstiči na koži, brkih in v ustih posredujejo reflekse: obračanje, šavsanje in grizenje hrane, medtem ko zaznava vohalnih dražljajev z vohalnim organom omogoča učenje vonjav (Valentinčič s sod., 1994).

1.1 MORFOLOŠKA IN HISTOLOŠKA ZGRADBA VOHALNEGA ORGANA

Parni vohalni organi rib ležijo v nosnih votlinah, ki so pri kostnicah na zgornji strani glave, dostop do nosne votline omogočata vstopna in izstopna nosnica. Nos sestavljajo vohalne lamele, ki so pri ameriškem somiču peresaste oblike, lamele v vohalni rozeti so nameščene pravokotno na osrednjo os, imenovano rafa. Rozeta somičev vsebuje 12-15 parov lamel. Zunanji del lamel prekriva nečutilni epitel s kinocilijami, gibanje cilij celic ustvarja vodni tok ob lamelah (Caprio in Raderman-Little, 1978; Cancalon, 1978). Le majhen del lamel ob rafi prekriva čutilni epitel, ta tvori pri kanalskem somiču enotno področje in je široko ~25µm ter visoko ~50 µm. Čutilni epitel, ki je pri kanalskem somiču debel 50µm (Caprio in Raderman-Little, 1978), sestavljajo bazalne, podporne, žlezne in vohalne celice. Majhne bazalne celice ležijo ob bazalni lamini epitela, iz njih nastajajo nove vohalne, žlezne in podporne celice. Enocelične žlezne celice izločajo na površino epitela sluz, sestavljeno iz glikoproteinov in vode (Pelosi, 1996). Sluz ima vlogo zaščite, pri kopenskih vretenčarjih sluz prepreči izsuševanje epitela. Debelina plasti sluzi pri ribah je <4µm (Yamamoto, 1982). Sluz vsebuje vohalne vezavne proteine, na katere se vežejo nekatere vonjave, njihova vloga je delno znana (Pelosi, 1996). Podporne celice so cilindrične oblike, raztezajo se od bazalne lamine do površine epitela in imajo podporno vlogo. Vohalne in podporne celice tvorijo na meji med zunanjostjo (sluzjo) in notranjostjo (medcelični prostor) tesne stike (angl. tight junctions) (Suzuki, 1982).

Vohalne celice so majhni bipolarni nevroni, ki jih morfološko razvrščamo v tri tipe: ciliarne, mikrovilarne in kriptne vohalne celice (Morita in Finger, 1998; Hansen in Zeiske, 1998). Pri podganah ciliarne celice sestavljajo glavni vohalni organ, medtem ko so mikrovilarne celice del vomeronazalnega organa. Pri ribah vomeronazalnega organa ni, vohalni epitel sestavljajo ciliarne in mikrovilarne celice (Laberge in Hara, 2001). Ciliarne celice imajo telesa ob bazalni lamini, na površino epitela sega dendrit z gumbom podobno strukturo, iz katere izraščajo cilije. Pri kanalskem somiču je cilij 5-8, njihova dolžina je 5-8µm (Cancalon, 1983). V cilijah so mikrotubuli, organizirani v strukturo s 9 perifernimi in 1 centralnim parom (Hansen in Zeiske, 1998). Dineinskih rok v strukturi cilij ni, cilije so negibljive. Mikrovilarne celice imajo telesa v drugi tretjini debeline epitela, na apikalnem delu dendrita izraščajo mikrovili. Pri kanalskem somiču je mikrovilov 20-50, njihova dolžina je <5µm (Cancalon, 1983). Kroglaste kriptne celice ležijo pod površino epitela in imajo cilije in mikrovile (Hansen s sod., 2003).

Cilije in mikrovili vohalnih celic ležijo v plasti sluzi, ki prekriva vohalni epitel. Aksoni vohalnih celic predrejo bazalno lamino in sitasto kost ter tvorijo sinapse z mitralnimi celicami v glomerularnem območju vohalnega bulbusa (Satou, 1990).

1.2 RECEPTORSKI PROTEINI

Vohalni receptorski proteini so vsajene v membrano cilij in mikrovilov. Genski zapis za možne transmembranske proteine, ki se nahajajo le v vohalnem epitelu, sta opisala Buck in Axel (1991) pri glodalcih. Receptorski proteini spadajo v veliko skupino receptorjev, na katere so vezani G-proteini. Receptor ima sedem transmembranskih področij z zgradbo α -heliksa, ki tvori zunanje in notranje variabilne segmente. Tretji, četrti in sedmi segmenti najverjetneje vežejo vonjave (Lancet in Ben-Arie, 1993; Ngai s sod., 1993). Vezavno mesto za G-proteine je na citoplazemski strani membrane.

Geni za vohalne receptorje spadajo v eno družino genov, pri miškah je domnevnih genov v tej družini ~1000 (Buck in Axel, 1991; Mombaerts, 1999; Zhang in Firestein, 2002). Pri

ribah je le 100 domnevnih receptorskih genov (Ngai s sod., 1993; Alioto in Ngai, 2005). Molekularno biološke raziskave pri glodalcih kažejo, da ena vohalna celica izraža enega ali nekaj receptorjev (Mombaerts, 2004; Mombaerts s sod., 1996; Tsuboi s sod., 1999; Bozza s sod., 2002; Rawson s sod., 2000). Pri cebricah večina vohalnih celic izraža en receptor, le manjši del celic izraža dva receptorja (Sato s sod., 2007).

Na en receptor se lahko veže več vonjav in ista vonjava se lahko veže na več receptorjev (Malnic s sod., 1999). Pri miškah in podganah imajo receptorji veliko afiniteto za največ eno vonjavo, snovi, ki imajo tej vonjavi podobno kemično strukturo, se vežejo na isti receptor šibkeje (Zhao s sod., 1998; Malnic s sod., 1999; Araneda s sod., 2000; Abaffy s sod., 2006). Pri ribah je malo raziskav vezavne afinitete receptorjev za vonjave. Pri zlati ribici ima receptor, na katerega se vežejo bazične aminokisline, enako afiniteto za aminokislini lizin in arginin (Speca s sod., 1999).

1.3 TRANSDUKCIJSKI MEHANIZMI VOHALNEGA ODZIVA

Najbolje sta poznana transdukcijska mehanizma vohalnega odziva pri miškah in podganah. Vezava vonjave na receptorje sproži verigo dogodkov, med katero nastajajo sekundarni posredniki, kot sta ciklični adenozin monofosfat (cAMP) in inozitol trifosfat (IP₃) (Schild in Restrepo, 1998; Gold, 1999; Nakamura, 2000; Firestein, 2001). Vezava liganda na ustrezen receptor aktivira G-protein (Belluscio s sod., 1998). G-protein aktivira adenilat ciklazo (Wong s sod., 2000; Sklar s sod., 1986), ki katalizira nastanek cAMP. Povišana koncentracija cAMP sproži odpiranje ionskih kanalčkov (Dhallan s sod., 1990: Brunet s sod., 1996; Kurahashi in Kaneko, 1991). Ti kanalčki se nahajajo pri podganah in miškah na membrani cilij in mikrovilov (Leinders-Zufall s sod., 1998; Firestein, 2001) in so zgrajeni iz treh podenot (Bonigk s sod., 1999). Skozi kanalčke, ki ionsko niso selektivni, prehajajo Na⁺ in Ca⁺⁺ (Leinders-Zufall s sod., 1997; Nakamura in Gold, 1987). Povišana celična koncentracija Ca⁺⁺ povzroči odpiranje od Ca⁺⁺ odvisnih Cl⁻ kanalčkov. Prehod Cl⁻ iz celice skozi Cl⁻ kanalčke dodaja k depolarizaciji celice (Kurahashi in Yau, 1993; Delay s sod., 1997; Hallani s sod., 1998; Kaneko s sod., 2004; Reuter s sod., 1998). Depolarizacija membrane cilij in mikrovilov sproži odpiranje Na⁺ napetostno odvisnih kanalčkov in

nastanek akcijskih potencialov na somi in dendritu (Getchell, 1973; Dubin in Dionne, 1994) ter na začetnem delu aksona (Getchell, 1973).

 Ca^{++} ioni so pomembni med adaptacijo odziva celic. Zaradi prehajanja Ca^{++} skozi kanalčke, ki so odvisni od cAMP, povišana celična koncentracija Ca^{++} zniža občutljivost teh kanalčkov za cAMP, pri tem mehanizmu negativne povratne zanke najverjetneje sodeluje kalmodulin (Kurahashi in Menini, 1997; Kramer in Siegelbaum, 1992). Drugi mehanizem fiziološke adaptacije vključuje proteine, ki znižujejo učinkovitost adenilat ciklaze (protein RGS) (Sinnarajah s sod., 2001). Najverjetneje pri adaptaciji signala sodelujejo tudi kinaze, ki fosforilirajo receptorje, in arestin (Schleicher s sod., 1993; Dawson s sod., 1993). Pri ribah najverjetneje sodelujejo pri adaptaciji tudi od Ca^{++} odvisni K⁺ kanali (Yamamoto, 1982).

V vohalnih celicah sesalcev najverjetneje deluje tudi druga transdukcijska pot, ki vključuje IP₃ (Schild in Restrepo, 1998). Vloga te poti ni znana. Sodelujejo G-proteini (Dellacorte s sod., 1996), ki aktivirajo membranski encim fosfolipazo, ki katalizira nastanek IP₃ iz fosfatidilinozitol difosfata (PIP₂). IP₃ v vohalnih celicah podgan povzroči odpiranje neselektivnih kationskih kanalčkov (Lischka s sod., 1999) in depolarizacijo membran.

Pri rakih vključujejo transdukcijske poti tako cAMP kot IP₃ (Boekhoff s sod., 1994). Povečana koncentracija IP₃ v citoplazmi aktivira v membrani kalcijeve selektivne kanalčke ali kationsko neselektivne kanalčke, vdor ionov celico in depolarizacijo celice (Fadool in Ache, 1992). cAMP sproži odpiranje od cAMP odvisnih K⁺ kanalčkov, uhajanje K⁺ iz celice pa celico hiperpolarizira (Hatt in Ache, 1994).

Pri ribah vključujejo transdukcijske poti cAMP in IP₃. Aminokisline sprožijo nastanek obeh posrednikov, cAMP (Bruch in Teeter, 1990) in IP₃ (Restrepo s sod., 1993). cAMP sproži odpiranje kationskih neselektivnih kanalčkov (Bruch in Teeter, 1990) in depolarizacijo membrane celice. Depolarizacijo sproži tudi IP₃, ki povzroči dvig koncentracije Ca⁺⁺ v citoplazmi (Miyamoto s sod., 1992; Cadiou s sod., 2000). Mehanizem nastanka hiperpolarizacije membrane receptorskih celic rib ni pojasnjen.

1.4 ZGRADBA VOHALNEGA BULBUSA

Vohalni bulbus sestavljajo štiri plasti, ki so pri ribah manj očitne kot pri sesalcih (Satou, 1990). Površinsko plast tvorijo aksoni vohalnih celic, pod njo leži plast glomerulov. Pri sesalcih so glomeruli kroglasti prepleti živčnih končičev, ki jih obdajajo telesa astrocitov in periglomerularnih celic (Pinching in Powell, 1971), pri ribah je večina glomerulov kroglaste oblike, nekaj glomerulov pa tvori glomerularne preplete (Baier in Korsching, 1994). Pri glodalcih konvergirajo aksoni vohalnih celic, ki izražajo en receptor, v en ali nekaj sosednjih glomerulov (Ressler s sod., 1994; Vassar s sod., 1994; Mombaerts s sod., 1996), pri cebricah pa v en preplet glomerulov (Sato s sod, 2007). Aksoni vohalnih celic tvorijo sinapse z dendriti celic ovratničark (angl. mitral cells), telesa celic ovratničark ležijo v plasti pod glomeruli. Tu so tudi telesa čopastih celic (angl. ruffed cells) (Kosaka in Hama, 1980; Alonso s sod., 1987). Zrnate (granularne) celice imajo telesa v notranji celični plasti, njihovi dendriti tvorijo recipročne sinapse z dendriti ob aksonu ovratničark (Satou, 1990; Taniguchi in Kaba, 2001; Egger s sod., 2005). Celice ovratničarke in čopaste celice združijo aksone v vohalnem traktu, ki izstopa iz bulbusa.

1.5 ELEKTROOLFAKTOGRAM IN ODZIVI VOHALNIH CELIC

Elektroolfaktogram (EOG) (Ottoson, 1971; Getchell, 1974; Knecht in Hummel, 2004) izmerimo z elektrodo nad vohalnim epitelom, sprememba potenciala med elektrodami je po draženju z aminokislinami negativna. EOG sestavljata hiter fazični odziv in počasno vračanje signala na raven pred začetkom draženja. Najbolj natančno lahko izmerimo EOG vodnih vretenčarjev, pri katerih postavimo elektrodo v vodo približno 1 milimeter nad vohalni epitel (Caprio, 1978; Michel in Lubomudrov, 1995). Različne aminokisline sprožijo različne amplitude EOG odzivov.

Ottoson (1971) utemeljuje, da je EOG vsota receptorskih potencialov vohalnih celic, receptorski potenciali celic se seštevajo v EOG odziv. Neposrednih dokazov, da se odzivi

vohalnih celic seštevajo v amplitudo EOG odziva, ni bilo. Pri podganah je del celic, ki se odzove na draženje z vonjavami, spontano aktivnih (Duchamp-Viret s sod., 1999; Duchamp-Viret s sod., 2000), isto velja za žabe (Revial s sod., 1982; Duchamp 1982; Sicard in Holley, 1984) in ribe (Kang in Caprio, 1995; Koce, 1999; Friedrich in Laurent, 2001, 2004). Na draženje se celice odzivajo s povečanjem (ekscitacija) ali z zmanjšanjem (supresija) frekvence akcijskih potencialov. Pri kanalskem in ameriškem somiču se je večina celic na draženje z aminokislinami odzvalo s supresijo (Kang in Caprio, 1995; Koce, 1999), pri cebricah pa z ekscitacijo (Friedrich in Laurent, 2001, 2004).

Na kemično draženje se odzovejo tudi vohalne celice, ki pred draženjem niso spontano aktivne. Takšnih odzivov celic je opisanih malo, opazili so jih pri celicah rib (Dolenšek, 2002, Miklavc, 2003), dvoživk (Getchell, 1973; Dione, 1992; Trotier in Macleod, 1983) in plazilcev (Mathews, 1972).

2 NAMEN DELA

Ottoson (1971) je EOG odziv opisal kot sumaričen odziv vohalnih celic na draženje z vonjavami. Neposrednih eksperimentalnih podatkov, da se odzivi vohalnih celic seštevajo v amplitudo EOG odziva in s tem potrditve Ottosonove hipoteze, ni bilo. Pri ribah so bile raziskave zadnjih 10 let usmerjene v odzive spontano aktivnih celic, ki se na aminokisline odzovejo s supresijo ali ekscitacijo (Kang in Caprio, 1995; Kang in Caprio, 1997; Koce, 1999; Miklavc, 2003). Večina teh celic se na aminokisline odzove s supresijo spontane aktivnosti, ki v večini primerov ni ponovljiva. Števila spontano aktivnih celic, ki so se odzvala na aminokisline s supresijo, niso korelirala z relativno amplitudo EOG. Manj kot 3% spontano aktivnih celic se je na aminokisline odzvalo z ponovljivo koncentracijsko odvisno ekscitacijo. To nakazuje, da odzivi spontano aktivnih celic ne kodirajo aminokislin, najverjetneje ti odzivi predstavljajo šum v vohalnem sistemu (Valentinčič s sod., 2005). Kako vohalne celice kodirajo aminokisline?

V začetni fazi raziskave nas je zanimalo, ali je vohalni organ somičev elektrofiziološko funkcionalen v vodi z izredno majhno koncentracijo ionov. Raziskovalci (Kurahashi in Yau, 1994; Nakamura in Gold, 1987; Leinders-Zufall s sod., 1998; Firestein, 2001) so namreč mnenja, da so na cilijah in mikrovilih celic ionski kanalčki, ki omogočajo spremembe receptorskega potenciala. Pri ribah je to sporno, saj difuzija zelo hitro izenači koncentracije ionov v sluzi (Jacobs, 1967), v kateri so cilije in mikrovili, s koncentracijo ionov v vodi. V naravi vsebnost ionov v vodi ni stalna, spremembe koncentracije ionov v vodi ne bi omogočala stabilnega delovanja vohalnega organa.

Zato smo vohalni organ oblivali z visoko prečiščeno vodo (VPV) in iskali odzive vohalnih celic na raztopine aminokislin. Med iskanjem elektrofizioloških odzivov celic v VPV smo opazili, da veliko celic, ki se odzove na aminokisline, pred draženjem ni spontano aktivnih. Na draženje so se te celice odzvale z večjim številom akcijskih potencialov, odzivi so bili ponovljivi in koncentracijsko odvisni. To nas je navedlo do vprašanja, ali spontano neaktivne vohalne celice kodirajo aminokisline. Da bi odgovorili na to vprašanje, smo dražili vohalne celice v VPV z desetimi aminokislinami. Določili smo koncentracijsko

odvisnost odzivov vohalnih celic na zelo učinkoviti aminokislini L-nVal in L-Met. Vzporedno smo merili EOG odzive na aminokisline.

V naslednjem koraku smo preverili hipotezo (Ottoson, 1971), da se receptorski potenciali spontano neaktivnih vohalnih celic seštejejo v EOG. Zato smo korelirali števila spontano neaktivnih vohalnih celic, ki so se odzvala na draženje z aminokislinami, z relativnimi amplitudami EOG med draženjem z istimi aminokislinami.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZDRŽEVANJE IN PRIPRAVA ŽIVALI

Ameriške somiče (*Ameiurus melas*) smo dobili iz jezera blizu Maribora. Skupine 100 rib smo vzdrževali v prezračeni vodovodni vodi v 500 litrskih polietilenskih bazenih pri 14-20°C. Nekaj tednov pred poskusi smo posamezne ribe prenesli v akvarije, ki smo jih vzdrževali pri 20-25°C in 12-12 urnem dnevno-nočnem ritmu. Ribe (50-196g) smo anestezirali v 1:5000 raztopini etil 3-aminobenzoat metansulfonata (MS-222, Fluka) in imobilizirali z vbrizganjem galamin trietiljodida v mišico (Flaxedil, 0.38mg na 100g teže, Aldrich). Ribo smo ovili v moker papirnat robček in položili v posodo iz Plexi-stekla. Glavo ribe smo pritrdili s plastičnimi palicami. Škrge smo izpirali s prezračeno vodovodno vodo, ki je vsebovala MS-222 s pomočjo viličastih cevk, ki smo jih potisnili pod škržna poklopca. Kirurško smo odstranili kožo in kosti nad vohalno votlino in izpostavili vohalno rozeto.

3.2 DRAŽLJAJI

Vohalne celice smo dražili z raztopinami desetih aminokislin, raztopljenih v visoko prečiščeni vodi (VPV, R>18.2 MΩcm, Milli-Q185, Millipore): L-alanin (L-Ala, A), L-serin (L-Ser, S), L-metionin (L-Met, M), L-leucin (L-Leu, L), L-izolevcin (L-Ile, I), L-valin (L-Val, V), L-norvalin (L-nVal, n), L-arginin hidroklorid (L-ArgHCl, R), L-lizin hidroklorid (L-LysHCl, K) in L-prolin (L-Pro, P). Razen s posameznimi aminokislinami smo vohalne celice dražili tudi z (A) ekvimolarnimi zmesmi vseh 10 aminokislin ali (B) samo tistih aminokislin, ki so bile učinkovite pri posamezni celici. Koncentracija posameznih aminokislin in aminokislin v zmeseh, ki smo jo vbrizgali v sistem za draženje, je bila 10^{-4} M razen L-Pro, kjer smo uporabili višjo koncentracijo aminokisline (10^{-2} M). Koncentracijsko odvisnost odzivov vohalnih celic smo merili tako, da smo korakoma (10x redčenja) manjšali koncentracijo učinkovitega dražljaja do koncentracije, pri kateri se

celica ni odzvala na draženje. Raztopine aminokislin smo pripravili v 10ml polistirenskih lončkih (VWR International) <1 uro pred začetkom poskusa. pH vrednosti 10⁻²M raztopin aminokislin, vključno z L-ArgHCl in L-LysHCl, so bile enake pH vrednosti same VPV (4.1 do 4.9). Aminokisline največje dostopne čistosti (>99%) smo kupili pri podjetjih Fluka Chemie AG, Švica (L-Ala, L-Leu, I-Ile in L-Pro), Sigma-Aldrich Inc., ZDA (L-Ser, L-Met, L-Val, L-nVal in L-ArgHCl) ter BDH Chemicals Ltd., Anglija (L-LysHCl).

3.3 DRAŽENJE VOHALNEGA EPITELA

Izpostavljeni vohalni epitel smo nenehno oblivali z VPV, pretok vode skozi nosno votline je bil ~18ml/min. VPV vsebuje majhne koncentracije ionov (preglednica 1), koncentracije natrijevih, kalijevih, kalcijevih in magnezijevih ionov so približno 1000x manjše kot koncentracije teh ionov v umetni jezerski vodi (King in Preston, 1977; Marsot in Couillard, 1979; Christiansen in Marshall, 1965). V VPV smo izmerili naslednje koncentracije ionov: Na⁺ 7 \pm 2µg/l, K⁺ 50 \pm 5µg/l, Ca²⁺ 5 \pm 2µg/l in Mg²⁺ 0,5 \pm 0,1µg/l. Ob vstopu v nosno votlino so bile koncentracije ionov v vodi: Na⁺ $8\pm 2\mu g/l$, K⁺ $64\pm 5\mu g/l$, Ca²⁺ $16\pm 2\mu g/l$ in Mg²⁺ $2\pm0,1\mu g/l$, na iztoku iz nosne votline pa: Na⁺ $30\pm2\mu g/l$, K⁺ $45\pm5\mu g/l$, Ca²⁺ $12\pm2\mu g/l$ in Mg²⁺ 2±0,1µg/l (Polona Razpotnik, Fakulteta za kemijo, Univerza v Ljubljani). V sedmih poizkusih smo v visoko prečiščeno vodo dodali majhne količine natrijevega klorida, s čimer smo zmanjšali upornost vode na 0.3 MΩcm (Multiline P4, WTW). VPV smo iz 101 steklenice gravitacijsko vodili v Y-cevko, ki je vodo razdelila na uravnalno in dražilno cevko (slika 1). Cevki smo ponovno združili v T-ventilčku, njegova izhodna cevka (0,8mm notranji premer) je vodila v nosno votlino. Konec izhodne cevke, ki smo ga usmerili z mikromanipulatorjem Narishige MM-33N, smo namestili 1-2mm od vohalne rozete. 0.5ml dražilne raztopine smo s tuberkulinsko brizgo vbrizgali skozi dodatno T-cevko v sredino dražilne cevke. Z ročnim obratom T-ventilčka smo preusmerili tok VPV iz uravnalne cevke skozi dražilno cevko. Z vbrizganjem Kongo Rdečega v dražilno cevko (Koce, 1999) smo izmerili, da dražilna tekočina doseže vohalno lamelo 1-3 sekunde po odprtju Tventilčka. Intervale med zaporednimi draženji vohalnega epitela smo prilagodili glede na koncentracijo dražljaja: 1.5min za 10^{-4} M in 1min za 10^{-5} M – 10^{-8} M.

Preglednica 1: Koncentracija ionov v visoko prečiščeni vodi (VPV) neposredno iz naprave za deionizacijo vode, v vodi, ki je dotekala v nosno votlino iz sistema za draženje in v vodi, ki je iztekala iz nosne votline. V zadnji koloni so koncentracije ionov v umetni jezerski vodi (King in Preston, 1977; Marsot in Couillard, 1979; Christiansen in Marshall, 1965).

(Table 1: Concentration of ions in the highly purified water (HPW) directly from water purification system, in the water entering the olfactory cavity and in the water flowing out of the olfactory cavity. In the last column are ion concentrations in artificial pond water (King in Preston, 1977; Marsot in Couillard, 1979; Christiansen in Marshall, 1965).)

	VISOKO PREČIŠČENA VODA (VPV)	Voda, ki je dotekala v nosno votlino	Voda, ki je odtekala iz nosne votline	Umetna jezerska voda
Na⁺	$7\pm2~\mu$ g/l	$8\pm2~\mu$ g/l	$30\pm2~\mu$ g/l	39000 µg/l
K⁺	$50\pm5~\mu\text{g/l}$	$64\pm5~\mu\text{g/l}$	$45\pm5~\mu\text{g/l}$	4000 µg/l
Ca ²⁺	$5\pm2~\mu$ g/l	$16\pm2~\mu\text{g/l}$	$12\pm2~\mu\text{g/l}$	7000 µg/l
Mg ²⁺	$0,5\pm0,1~\mu\text{g/l}$	$2\pm0,1~\mu$ g/l	$2\pm0,1~\mu$ g/l	2000 µg/l



Slika 1: Metoda: med draženjem z aminokislinami v visoko prečiščeni vodi smo istočasno odvajali podvodni elektroolfaktogram (EOG) in elektrofiziološko aktivnost posameznih vohalnih celic.

(Fig. 1: Methods: during stimulation with amino acids in the highly purified water we simultaneously recorded underwater electroolfactogram (EOG) and electrophysiological activities of single olfactory receptor neurons (ORNs).)

Odzive vohalnih celic smo merili z zunajcelično nizko-impedančno (~1 kΩ) stekleno elektrodo, konica je bila napolnjena z zlitino Bi 49%, In 21%, Pb 18% in Sn 12% (MaTeck Material-Technologie & Kristalle GmbH, Nemčija) in prekrita s platino (premer platinaste kroglice 3-8µm) (Gesteland, 1975; Erickson and Caprio, 1984). Napetostne spremembe (akcijske potenciale) smo AC ojačili (Grass P-5, 5000x, pasovni filter 10-3000 Hz) in vodili na avdio-monitor (Grass AM8) ter osciloskop (Hitachi VC-6023). Signale smo shranili na avdio kanalu video kasete. Električni mikromanipulator (MS 314, Hugo Sachs Elektronik) je omogočil približevanje konice elektrode vohalnemu epitelu v majhnih korakih (3µm). Relativna občutljivost različnih delov vohalne rozete na aminokisline enaka na vseh vohalnih lamelah (Chang in Caprio, 1996), merili smo električno aktivnost na sprednjih (1-5) lamelah. Pri različnih položajih elektrode na vohalnem epitelu smo iskali snemalna mesta s pomočjo ekvimolarne zmesi desetih aminokislin. Ko smo zaznali električni odziv vohalnih celic, smo prilagodili položaj elektrode tako, da smo izboljšali razmerje signal/šum (amplituda akcijskih potencialov >200µV). Istočasno smo snemali elektroolfaktogram (EOG) z elektrodo Ag/AgCl₂, ki je bila povezana s stekleno pipeto, napolnjeno s Ringer-agarjem. Vrh pipete (zunanji premer konice 150µm) smo postavili ~1mm nad vohalni epitelij. Signal EOG smo DC ojačili (10-100x, Grass P18D) in prikazali na osciloskopu in risalniku (Omniscribe recorder, Industrial Scietific, Inc.). Digitaliziran signal EOG (frekvenca vzorčenja 44000 Hz, NeuroCorder D-890, Neuro Data Instr. Corp.) smo shranili na video kanalu video kasete. Drugi avdio kanal video kasete smo uporabili za shranjevanje opisa poskusa. Podatke vohalnih celic in digitalizirane podatke EOG smo po poskusu kopirali na osebni računalnik s SW-DAQ vmesnikom (frekvenca vzorčenja 44100 Hz; National Instruments).

3.5 ANALIZA PODATKOV

Elektrofiziološko aktivnost vohalnih celic smo analizirali 15 sekund pred in 30 sekund po začetku draženja z aminokislinami. Računalniški program 'Neuro Event Manager' (Amon, 1992) omogoča izbor akcijskih potencialov na osnovi njihove oblike. Akcijske potenciale smo naložili enega na drugega in primerjali njihove oblike na 50 ms oknu na računalniškem ekranu. Z računalniškim programom smo filtrirali akcijske potenciale, ki so imeli drugačno obliko kot izbrani akcijski potencial. V naslednjem koraku smo akcijske potenciale spremenili v dogodke s časi, v katerih so se pojavili. Izračunali smo dolžine odzivov in časovne intervale med dogodki v odzivu vohalne celice. Kriteriji za določitev električne aktivnosti celice so vključevali najmanjši interval med dogodki (>5 ms). Frekvenco akcijskih potencialov v odzivih vohalnih celic na aminokisline smo ocenili z računalniškim programom S-PLUS (S-Plus 2000, Mathsoft, Inc.) s prilagojeno metodo 'Cumulative Slope Analysis', ki jo je zasnoval Andrej Blejec (2005). Pri tej metodi vlak akcijskih potencialov pojmujemo kot zaporedje diskretnih dogodkov s časi t_i (*i*=1,2,..,*n*; n= zadnji dogodek v odzivu celice). Funkcija kumulativne distribucije dogodkov s časi t_i je definirana kot število dogodkov do vključno dogodka v času t_i . Naklon kumulativne distribucije dogodkov se spreminja z gostoto dogodkov in je enak gostoti dogodkov na časovno enoto oziroma frekvenci proženja akcijskih potencialov vohalne celice. Lokalno linearno regresijo izračunamo za pet zaporednih dogodkov in tako določimo naklon kumulativne distribucije dogodkov. Naslednji izračun opravimo, ko premaknemo opazovano okno petih dogodkov za en dogodek naprej. Najvišjo frekvenco v fazičnih odzivih smo določili v 0-300 ms odziva, frekvenco v toničnih odzivih pa smo ocenili z mediano frekvenco v 500-1500 ms odziva. V naslednjem koraku smo preverili, ali izvirajo akcijski potenciali iz iste vohalne celice tako, da smo celice dražili z zmesjo učinkovitih dražljajev. Če je bila frekvenca akcijskih potencialov v odzivu na zmes enaka frekvenci v odzivu na posamezne aminokisline, smo domnevali, da odziv izvira iz iste celice. Če pa je bila frekvenca višja kot pri draženju s posamezno aminokislino, so akcijski potenciali verjetno izvirali iz več celic. Koncentracijsko odvisnost odzivov vohalnih celic smo analizirali tako, da smo merili dolžine odzivov celic in frekvence akcijskih potencialov med draženjem z različnimi koncentracijami aminokislin. Največje amplitude EOG odzivov smo izmerili z milimetrskim merilom na papirju risalnika kot odklon signala od bazne linije. Amplitude EOG odzivov na različne aminokisline in različne koncentracije aminokislin smo standardizirali na amplitudo EOG odziva na 10⁻⁴M L-Ala.

3.6 REDČENJE DRAŽLJAJA V NOSNI VOTLINI

Po začetku dovajanja dražljaja v nosno votlino raste njegova koncentracija do največje koncentracije, ki je nekaj (~20%) nižja od vbrizgane koncentracije aminokisline. Po prenehanju dovajanja aminokisline se njena koncentracija eksponentno zmanjšuje. Hitrost zmanjševanja koncentracije dražljaja v nosni votlini smo poskušali oceniti s preprostim izračunom. Predpostavili smo, da v nosno votlino, katere volumen (V) se med draženjem ne spreminja, doteka voda s stalnim pretokom (Φ =18ml/min), ki zmanjšuje koncentracijo dražljaja v majhnih časovnih korakih (*dt*). Mešanje raztopin v nosni votlini, ki ga zagotavljajo kinocilije, nameščene na vohalnih lamelah, je izjemno hitro (Caprio in Radeeman-Little, 1978) in zato ni ozko grlo zgoščevanja ali redčenja aminokisline v nosni votlini.

Po prenehanju dovajanja dražljaja (čas t=0) je v nosni votlini raztopljenih n₀ delcev dražljaja. Če upoštevamo zgornje predpostavke, je po času dt (prvi korak) število delcev dražljaja v nosni votlini manjše za faktor R, ki je sorazmeren pretoku vode skozi nosno votlino in obratno sorazmeren volumnu nosne votline. Število delcev (n₁) v nosni votlini po času dt opisuje enačba:

$$n_1 = n_0 - Rn_0 = n_0 (1-R), \quad R = \frac{\Phi dt}{V}$$
 ...(1)

pri čemer je V volumen nosne votline in Φ hitrost pretoka vode skozi nosno votlino.

V naslednjem koraku s časom dt se število delcev ponovno zmanjša za faktor R, kar opisuje enačba:

$$n_2 = n_1 - Rn_1 = n_0 (1-R)^2$$
 ...(2)

Po *n* korakih oziroma po času t = n dt se število delcev dražljaja (n_t) v nosni votlini eksponentno zmanjšuje, kar opisuje izpeljana enačba (2):

$$n_t = n_0 (1-R)^n$$
 ...(3)

oziroma

$$n_t = n_0 \left(1 - \frac{\Phi t}{V} \cdot \frac{1}{n} \right)^n \qquad \dots (4)$$

Zveznemu redčenju dražljaja ustreza neskončno veliko korakov, kar opišemo z limito $n \rightarrow \infty$ enačbe (4). Če razrešimo limito, je delcev v nosni votlini po času *t*:

$$n_t = n_0 e^{\frac{\Phi t}{V}} \qquad \dots (5)$$

Enačba (5) opisuje eksponentno manjšanje števila delcev dražljaja (n_t) v nosni votlini po prenehanju dovajanja dražljaja v nosno votlino (slika 2). Število delcev n_t po času t je odvisno od volumna (V) in pretoka skozi nosno votlino (Φ). Prostornino nosne votline (V) v poizkusih smo ocenili na: pri najmanjših ribah 0.125ml oziroma pri največjih ribah 0.5ml. Če je začetna koncentracija dražljaja v nosni votlini 10⁻⁴M, se pri najmanjših ribah zmanjša koncentracija pod 10⁻⁷M v <2.9 sekundah oziroma pri največjih ribah v <11.5 sekundah (slika 2).



Slika 2: Izračunano redčenje dražljaja v nosni votlini po prenehanju dovajanja dražljaja v nosno votlino. A: Volumen nosne votline smo ocenili na Vmin=0.125ml pri majhnih in Vmax=0.5ml pri največjih somičih, začetna koncentracija dražljaja je 10^{-4} M. B: Koncentracija dražljaja v nosni votlini pri različnih začetnih koncentracijah dražljaja (10^{-4} M – 10^{-7} M) pri največjih ribah (V=0.5ml).

(Fig. 2: Calculated stimulus dilution in the nasal cavity after end of delivering the stimulus into nasal cavity. A: Volume of the nasal cavity was estimated Vmin=0.125 ml in small and Vmax=0.5 ml in the largest catfish, initial stimulus concentration was 10^{-4} M. B: Stimulus concentration in the nasal cavity for different initial stimulus concentrations (10^{-4} M – 10^{-7} M) in the largest catfish (V=0.5 ml).)

4 REZULTATI

4.1 ELEKTROOLFAKTOGRAM (EOG)

Pri ameriškem somiču (*Ameiurus melas*) smo v visoko prečiščeni vodi (VPV) vzporedno merili odzive celotnega vohalnega organa (elektroolfaktogram - EOG) in odzive posameznih vohalnih celic na aminokisline. Tudi po 6 urah oblivanja z VPV, ki vsebuje majhno koncentracijo ionov (preglednica 1), je vohalni organ deloval na enak način kot na začetku draženja. Pri nekaj več kot polovici rib (N=57) je bila amplituda EOG, ne glede na dražljaj, ponovljiva - njena oblika in amplituda odziva na aminokisline sta bili po več urah skoraj enaki kot na začetku poskusov (slika 3). V 45% primerov (N=46) amplituda EOG ni bila ponovljiva. Pri nekaterih od teh preparatov (N=7) smo v VPV dodali 1mg/l natrijevega klorida, upornost vode se je zmanjšala z >18,2 MΩcm na ~0.3 MΩcm. Amplitude EOG so bile po dodatku ionov stabilne in ponovljive. Zaradi primerjav EOG med različnimi ribami smo standardizirali največje amplitude EOG odzivov na odziv ene od bolj učinkovitih aminokislin (10⁻⁴ M L-Ala).



Slika 3: EOG v VPV: odziv na draženje z 10⁻⁴M L-Met eno uro (svetlo sivo), tri ure (temno sivo) in pet ur (črno) po začetku poskusa. Kontrolni dražljaj je bil VPV (črno).

(Fig. 3: EOG in HPW: response to 10⁻⁴M L-Met one hour (light gray), three hours (dark gray) and five hours (black) after the beginning of experiment. Control stimulus was HPW (black).)

Različne aminokisline so prožile različne amplitude EOG (slika 4). Največjo relativno amplitudo EOG je pri koncentraciji 10^{-4} M izzvala aminokislina L-Met (mediana (M) =1.20). Po velikosti relativnih amplitud sledijo L-ArgHCl (M=1.16), L-nVal (M=1.06), L-LysHCl (M=0.99), L-Ser (M=0.89), L-Leu (M=0.86), L-Val (M=0.66), L-Ile (M=0.64). Tudi pri 100x večji koncentraciji (10^{-2} M) je iminokislina L-Pro izzvala najmanjšo relativno amplitudo EOG (M=0.45). Relativne velikosti EOG odzivov, ki so jih izzvale nevtralne aminokisline (L-Met, L-nVal, L-Ala, L-Leu, L-Ser, L-Val in L-Ile) in iminokislina L-Pro v VPV, so značilno korelirale z amplitudami EOG v deklorirani vodovodni vodi (Koce, 1999) (R=0.94, p<0.001; slika 5). Bazični aminokislini L-ArgHCl in L-LysHCl sta v VPV izzvali nepričakovano velike relativne amplitude EOG (M=1.16 oz. 0.99), mediani relativni EOG amplitudi soli bazičnih aminokislin v VPV sta bili približno dvakrat večji kot v vodovodni vodi (M=0.50 oz. M=0.55; Koce, 1999) (slika 4).



Slika 4: Relativne amplitude EOG med draženjem z desetimi aminokislinami v VPV (levo) in v vodovodni vodi (desno). EOG odzivi so standardizirani na odziv na 10⁻⁴M L-Ala in urejeni glede na velikost odzivov v vodovodni vodi.

(Fig. 4: Relative EOG amplitudes to ten amino acids in the HPW (left) or in the tap water (right). EOG responses are standardized to 10^{-4} M L-Ala response and arranged in the order of amplitudes in the tap water.)



Slika 5: Korelacija med relativnimi amplitudami EOG na nevtralne aminokisline in L-Pro v VPV in v deklorirani vodovodni vodi. R= Pearsonov korelacijski koeficient, debelo je regresijska premica (metoda najmanjših kvadratov), tanjši liniji označujeta 95% interval zaupanja za premico.

(Fig. 5: Correlation between relative EOG amplitudes to neutral amino acids and L-Pro in HPW and in tap water. R= Pearson correlation coefficient, thick is regression line (least square method), thin lines mark 95% confidence interval for the regression line.)

EOG odziv na aminokisline v VPV je bil koncentracijsko odvisen (slika 6). Za L-nVal je največjo relativno amplitudo izzvala najvišja koncentracija (10⁻⁴M, M=1.06), nižje koncentracije aminokisline so izzvale manjše amplitude (10⁻⁵M: M=0.89, 10⁻⁶M: M=0.59, 10⁻⁷M: M=0.44).



Slika 6: EOG v VPV: relativne amplitude na različne koncentracije L-nVal.

(Fig. 6: EOG in HPW: relative amplitudes to different L-nVal concentrations.)

4.2 ODZIVI SPONTANO NEAKTIVNIH VOHALNIH CELIC NA DRAŽENJE Z RAZLIČNIMI AMINOKISLINAMI

Elektrofiziološke odzive posameznih spontano neaktivnih vohalnih celic smo poiskali s pomočjo draženja z zmesjo desetih aminokislin. Na draženje z zmesjo aminokislin se te celice, ki pred draženjem ne prožijo akcijskih potencialov, odzovejo z večjim številom akcijskih potencialov (sliki 7 in 8). Odzivne celice smo nato dražili s posameznimi aminokislinami pri koncentraciji 10⁻⁴M (L-Pro pri 10⁻²M). Celotno zaporedje testiranj z zmesjo in z desetimi aminokislinami smo uspeli izvesti na 44 celicah (N=142). Spontano neaktivne vohalne celice so se, za razliko od spontano aktivnih celic, ponovljivo odzivale na aminokisline.



Slika 7: Spontano neaktivna vohalna celica, ki se je elektrofiziološko odzivala na draženje z L-Met in LnVal. Vohalno celico smo dražili tudi z ekvimolarno zmesjo obeh aminokislin.

(Fig. 7: Spontaneously inactive ORN that electrophysiologically responded to L-Met and L-nVal. ORN was also tested with equimolar mixture of both amino acids.)



Slika 8: Spontano neaktivna vohalna celica, ki se je odzvala na šest aminokislin: L-Met, L-nVal, L-Ala, L-Leu, L-Val in L-ArgHCl. Vohalno celico smo dražili tudi z ekvimolarno zmesjo desetih aminokislin (mix10).

(Fig. 8: Spontaneously inactive ORN responding to six amino acids: L-Met, L-nVal, L-Ala, L-Leu, L-Val in L-ArgHCl. ORN was also tested with the equimolar mixture of ten amino acids (mix10).)

4.2.1 Dolžine elektrofizioloških odzivov spontano neaktivnih vohalnih celic na različne aminokisline

A. Odziv vohalnih celic na dve (N=22) in eno aminokislino (N=13)

Največ spontano neaktivnih vohalnih celic (39%, N=17) se je odzvalo na L-nVal in L-Met (slika 9). Dolžine odzivov teh celic na L-nVal (2.4 - 14.7 s) so bile daljše kot dolžine odzivov na L-Met pri enaki (10^{-4} M) koncentraciji (slika 10). Pri večini (N=11) teh celic je bil odziv na L-Met <50% dolžine odziva na L-nVal, pri nekaterih celicah (N=6) pa 71-96%

dolžine tega odziva. Nižja (10⁻⁵M) koncentracija L-nVal je sprožila odziv dveh celic (N=2), nižja koncentracija L-Met pa ne.

Dve celici sta se odzivali na L-Val in L-nVal (slika 9). Pri eni celici je bil valinski (10.8 s) odziv veliko večji od norvalinskega (5.2 s), pri drugi pa sta bila odziva skoraj enaka (L-nVal: 3.2 s; L-Val: 2.9 s; slika 10). Na L-ArgHCl in L-LysHCl sta se odzvali dve celici (slika 9), pri obeh celicah sta bili dolžini odzivov na ti dve aminokislini skoraj enaki (3.9 in 3.6 s oziroma 1.7 s in 1.6 s; slika 10). Na L-Pro in L-Met se je odzvala ena vohalna celica (slika 9), odziv te celice na L-Pro (20.9 s) je bil nekajkrat daljši od odziva na L-Met (5.6 s) (slika 10).

Nekatere celice so se odzvale na eno aminokislino (L-nVal: N=7, L-Met: N=4 in L-Ala: N=2) (slika 9), dolžine odzivov na L-nVal so bile 2.3-8.0 s, na L-Met 2.3-11.3 s in na L-Ala 2.7-5.3 s (slika 10).

B. Odziv vohalnih celic na tri (N=3), štiri (N=2), pet (N=2) in šest (N=2) aminokislin

Aminokisline L-nVal, L-Met in L-Ala so izzvale odziv dveh celic (slika 9). L-nVal je bil bolj učinkovit kot L-Met in L-Ala, izzval je različno dolžino odziva (23.2 s pri eni in 5.5s pri drugi celici; slika 10). L-nVal je bil najbolj učinkovita aminokislina tudi pri celici, ki se je odzvala še na L-Met in L-LysHCl, dolžina odziva na L-nVal (14.1 s) je bila dvakrat daljša od dolžine odziva na L-LysHCl in L-Met (sliki 9 in 10). Pri dveh celicah, ki sta se odzivali še na 10⁻⁴M L-Met, L-Ala in L-Ser, je L-nVal izzval najdaljši odziv (21.5 s pri eni in 7.7 s pri drugi celici) (sliki 9 in 10). Celici sta se na manj učinkovite aminokisline (L-Met, L-Ala in L-Ser) odzvale z manj kot tretjino dolžine odziva na L-nVal. Nižja koncentracija (10⁻⁵M) L-nVal je povzročila fiziološki odziv pri eni celici, medtem ko L-Met pri tej koncentraciji ni izzval odziva. L-nVal je izzval dolg odziv (20.1 s) pri celici, ki se je odzivala še na L-Met, L-Ala, L-Val ter L-Ser, ostale aminokisline so izzvale <15% dolžine tega odziva (sliki 9 in 10). Edina celica, pri kateri je bil L-Met bolj učinkovit od LnVal, se je odzvala še na L-Ala, L-Val ter L-Leu (slika 9). Dolžina odziva na L-Met je bila razmeroma kratka (5.8 s), ostale učinkovite aminokisline pri tej celici so izzvale še krajši odziv (slika 10). Močno učinkovit je bil L-nVal tudi pri celici, ki se je odzvala še na L- Met, L-Ala, L-Val, L-Ser in L-LysHCl (sliki 9 in 10). Odziv te celice L-nVal je trajal 21.6 s, ostale aminokisline so pri tej celici so izzvale <12% dolžine odziva na L-nVal. Pri celici, ki se je odzvala še na L-Met, L-Ala, L-Val, L-Leu in L-ArgHCl (slika 9), je L-nVal izzval 6.5 s odziva, manj učinkovite aminokisline pa manj kot 3 s odziva (slika 10). Zaključimo lahko, da je bila večina celic, ki se je odzivala na več aminokislin, specializiranih za odziv na L-nVal.

A ýý	B ST ST	C OF
VOHALNE ROMAN CELICE	VOHALNE	VOHALNE \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$
040615a 0 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 0 0	040621a 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	050408b 0 0 0 0 0 1 1 0 0 1
041215a 0 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 0 0	040610b 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	041116c <mark>1</mark> 0000 <mark>11</mark> 000
050824b 0 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 0 0	040525a 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	050804a <mark>1</mark> 0000 <mark>11</mark> 000
041130c 0 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 0 0	031112c 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	
040312a 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0	040120c 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	040615c <mark>11</mark> 000 <mark>11</mark> 000
050914a 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 0 0 0	050413b 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	041227a <mark>11</mark> 0000 <mark>11</mark> 000
030527a 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 / 0 /	050512a 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	
050406b 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 0 0 0	030908a 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	050414b <mark>1011</mark> 0110000
051110c 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 0 0 0	030827d 0 0 0 0 0 1 1 / 0 0	051110a <mark>111</mark> 00 <mark>11</mark> /0/
031027c 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 / 0 0	030527m 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> / 0 /	
040525b 0 0 0 0 0 <mark>1</mark> 0 0 0 0	031222f 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	050413c <mark>1 0 1 1 0 1 1 0 1 0</mark>
030807d 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0	030829d 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 / 0	050804f <mark>111</mark> 00 <mark>11</mark> 00 <mark>1</mark>
041201b <mark>1</mark> 0000000000	050118a 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	
	030827c 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 0	
	030529h 0 0 0 0 0 <mark>1 1</mark> 0 0 /	
	041227d 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0	
	0307311 0 0 1 0 0 1 0 0 0 /	1 ODZIV NA AMINOKISLINO
	0411300 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1	
	050419b 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1	U NI ODZIVA NA AMINOKISLINO
		/ NI TESTIRANO

Slika 9: Posamezne vohalne celice so se odzivale na (A) eno, (B) dve, (C) tri, štiri, pet ali šest izmed desetih testnih aminokislin $(10^{-4}M \text{ in L-Pro } 10^{-2}M)$.

(Fig. 9: Single ORNs responded to (A) one, (B) two, (C) three, four, five or six out of ten tested amino aicds $(10^{-4}M \text{ in L-Pro } 10^{-2}M)$.)



С ASVLIn м P R SEKUND 050408b 041116c 20 10 10 050804a -25050 05050 040615c 04 1227 050414b -0 050413c -050804f

Slika 10: Dolžine odzivov posameznih vohalnih celic, ki so se odzivale na (A) eno, (B) dve, (C) tri, štiri, pet ali šest aminokislin (10⁻⁴M in L-Pro 10⁻²M). »n« označuje aminokislino L-nVal. Zaporedje celic je enako kot na sliki 9.

(Fig. 10: Response durations of single ORNs that responded to (A) one, (B) two, (C) three, four, five or six amino acids $(10^{-4}M \text{ in L-Pro } 10^{-2}M)$. »n« marks amino acid L-nVal. ORNs are arranged as in Fig. 9.)

4.2.2 Koncentracijska odvisnost dolžin odzivov spontano neaktivnih vohalnih celic na L-nVal

Raziskovali smo koncentracijsko odvisnost dolžin odzivov spontano neaktivnih vohalnih celic (N=21) za aminokislino L-nVal (slika 11). Koncentracijo aminokisline smo nižali v štirih korakih od 10^{-4} M do 10^{-8} M.

Celica, ki se je odzivala na $\geq 10^{-6}$ M L-nVal (slika 11), je imela najdaljši odziv (14.9 s) na največjo testno koncentracijo aminokisline 10^{-4} M. Nižji koncentraciji L-nVal (10^{-5} M in 10^{-6} M) sta izzvali krajše odzive te celice (4.6 s oz. 3.0 s). Najbolj občutljivi celici sta se odzivali na $\geq 10^{-7}$ M L-nVal (N=2), večina celic je imela vzdražnostni prag za L-nVal pri 10^{-6} M (N=8) oziroma 10^{-5} M (N=7) L-nVal (slika 12).



Slika 11: Spontano neaktivna vohalna celica: koncentracijsko odvisen odziv na L-nVal.


Vse celice so se odzivale koncentracijsko odvisno na L-nVal. Pri isti koncentraciji so imele bolj občutljive celice skoraj vedno daljše odzive na L-nVal kot manj občutljive celice (slika 12). Pri najvišji (10⁻⁴M) koncentraciji so bili najdaljši odzivi tistih celic, ki so imele nizke vzdražnostne prage (npr.črno in rdeče). Tudi pri nižjih koncentracijah so bili ti odzivi (črni in rdeči) daljši od odzivov celic z visokimi vzdražnostnimi pragi (modro in zeleno). Najmanj občutljive celice (zeleno) so na 10⁻⁴M L-nVal odzvale kratko (2.6-5.2 s).



Slika 12: Koncentracijska odvisnost dolžine odziva vohalnih celic, ki so imele vzdražnostne prage pri 10⁻⁷M (črno), pri 10⁻⁶M (rdeče), pri 10⁻⁵M (modro) in pri 10⁻⁴M (zeleno) L-nVal.

(Fig. 12: Dose-dependant response durations of ORNs with thresholds at 10^{-7} M (black), at 10^{-6} M (red), at 10^{-5} M (blue) and at 10^{-4} M (green) L-nVal.)

4.2.3 Koncentracijska odvisnost dolžin odzivov spontano neaktivnih vohalnih celic na L-Met

Koncentracijsko odvisnost odziva na L-Met smo uspeli določiti pri šestih celicah (slika 13). Pri 10^{-4} M L-Met so bile dolžine odzivov celic med 2.5 in 5.8 s, štiri od teh celic so se odzivale na $\geq 10^{-5}$ M L-Met (dolžine odzivov med 1.2 in 3.5 s). Nižja (10^{-5} M) koncentracija L-Met je pri teh štirih celicah izzvala krajši odziv kot odziv na višjo (10^{-4} M) koncentracijo te aminokisline.



Slika 13: Dolžine odzivov posameznih vohalnih celic na različne koncentracije L-Met.

(Fig. 13: ORNs response durations to different L-Met concentrations.)

4.3 TONIČNI IN FAZIČNO-TONIČNI ODZIVI SPONTANO NEAKTIVNIH VOHALNIH CELIC

Vohalne celice so se na draženje z aminokislinami odzivale na dva načina: tonično ali fazično-tonično. Celice smo zato poimenovali tonične ali fazično-tonične celice.

4.3.1 Frekvence akcijskih potencialov med odzivom na različne koncentracije LnVal

A. Tonični odziv vohalnih celic na L-nVal

Frekvenca akcijskih potencialov med odzivom tonične celice (slika 14) je, ne glede na koncentracijo L-nVal, upadala od začetka (<30 Hz) do konca (0 Hz) odziva. Nižja (10⁻⁵M) koncentracija L-nVal je izzvala hitrejše upadanje frekvence odziva in s tem krajši odziv kot višja koncentracija L-nVal. Pri koncentracijah blizu vzdražnostnega praga je L-nVal izzival malo akcijskih potencialov.



Slika 14: Odziv tonične vohalne celice na različne koncentracije L-nVal: akcijski potenciali (zgoraj) in njihova frekvenca (spodaj).

(Fig. 14: Tonic ORN response to different L-nVal concentrations: action potentials (above) and their frequency (below).)

Devet celic od enaindvajsetih se je tonično odzvalo na vse testne koncentracije L-nVal (slika 15). Mediana frekvenca v odzivih celic na 10⁻⁴M L-nVal je bila 17 Hz (kvartila 14 in 22 Hz, N=9), v odzivih na 10⁻⁵M L-nVal pa 16 Hz (kvartila 13 in 20 Hz, N=6). Na 10⁻⁶M L-nVal sta se odzvali dve vohalni celici (14 in 16 Hz; slika 15A-B).



Slika 15: Tonične vohalne celice: frekvence akcijskih potencialov med draženjem z različnimi koncentracijami L-nVal.

(Fig. 15: Tonic ORNs: action potential frequencies during stimulation with different L-nVal concentrations.)

B. Fazično-tonični odziv vohalnih celic na L-nVal

Fazično-tonična celica (slika 16) se prvih 300 ms odziva na 10^{-4} M L-nVal fazično, najvišja frekvenca akcijskih potencialov med fazičnim odzivom je bila >60 Hz. Fazičnemu delu odziva je sledil več kot 4000 ms dolg tonični odziv, frekvenca akcijskih potencialov na začetku toničnega odziva je bila ~20 Hz, zmanjševala se je proti koncu odziva. Tudi 10^{-5} M L-nVal je izzval fazično-tonični odziv, kratkemu (<300 ms) fazičnemu odzivu z visoko frekvenco (>50 Hz) je sledil tonični del odziva z nižjimi frekvencami (<30 Hz). Pri koncentraciji L-nVal, ki je bila blizu vzdražnostnega praga celice (10^{-6} M), se je ta celica na draženje odzvala tonično.



Slika 16: Odziv fazično-tonične vohalne celice na različne koncentracije L-nVal: akcijski potenciali (zgoraj) in njihova frekvenca (spodaj).

(Fig. 16: Phasic-tonic ORN response to different L-nVal concentrations: action potentials (above) and their frequency (below).)

V celoti se je na draženje z 10⁻⁴M L-nVal 12 izmed 21vohalnih celic odzvalo fazičnotonično (slika 17). Fazični deli odzivov celic na 10⁻⁴M L-nVal so imeli mediano frekvenco 68 Hz (kvartila 65 in 78Hz, N=12), tonični deli pa 19Hz (kvartila 16 in 22Hz; N=12). Na 10⁻⁵M koncentracijo L-nVal se je fazično-tonično odzvalo 9 celic. Fazični del odziva na to koncentracijo je imel mediano frekvenco 52 Hz (kvartila 41 in 60 Hz; N=9), tonični pa 20 Hz (kvartila 14 in 22 Hz, N=9). V razponu koncentracij med 10⁻⁴M in 10⁻⁵M frekvence toničnih delov odziva niso bile koncentracijsko odvisne (Wilcoxonov test predznačenih rangov, N=11). Fazične dele odzivov smo opazili tudi med draženjem z 10⁻⁶M koncentracijo L-nVal (N=4) (slika 17B-E). Koncentracije L-nVal blizu vzdražnostnega praga so izzivale malo akcijskih potencialov (N=3; slika 17A, G-H).

FREKVENCA V 500-1500ms OD ZAČETKA ODZIVA (mediana in razpon)
MAKSIMALNA FREKVENCA (<300ms)

Slika 17: Fazično-tonične vohalne celice: frekvence akcijskih potencialov v fazičnih (\circ) in toničnih (\bullet) delih odzivov na različne koncentracije L-nVal.

(Fig. 17: Phasic-tonic ORNs: action potential frequencies during phasic (\circ) and tonic (\bullet) parts of responses to different L-nVal concentrations.)

4.3.2 Frekvence akcijskih potencialov med odzivom na različne koncentracije L-Met

Pri šestih celicah, ki smo jim določili koncentracijsko odvisnost na L-Met $(10^{-4}M - 10^{-8}M)$, smo opazili tako fazično-tonične (N=4) kot tudi tonične (N=2) odzive.

A. Toničen odziv na L-Met

Na 10⁻⁴M L-Met sta se dve celici odzvali tonično. Nižja koncentracija L-Met (10⁻⁵M) je pri obeh celicah sprožila malo akcijskih potencialov.

B. Fazično-toničen odziv na L-Met

Odziv vohalnih celic (N=4) na L-Met je imel tudi fazično-tonične lastnosti. Izmed 4 celic, ki so se fazično-tonično odzvale na 10^{-4} M L-Met (slika 18), sta se 2 celici odzvali fazično-tonično tudi na 10^{-5} M L-Met, celica, ki se je odzivala tudi na 10^{-6} M in 10^{-7} M L-Met, se je na te koncentracije odzvala tonično.

Slika 18: Fazično-toničen odziv: frekvence akcijskih potencialov v fazičnih (\circ) in toničnih (\bullet) delih odzivov celic na različne koncentracije L-Met.

(Fig. 18: Phasic-tonic response: action potential frequencies during phasic (\circ) and tonic (\bullet) parts of ORNs responses to different L-Met concentrations.)

4.3.3 Frekvence akcijskih potencialov med odzivi na različne aminokisline

A. Tonične celice

Tonične celice so se na vse učinkovite aminokisline odzivale tonično. Celica, ki se je odzivala na bolj učinkovit L-nVal tonično, se je tudi na manj učinkovit L-Met odzvala tonično (slika 19). Tonični odzivi so bili značilni za več kot polovico celic (N=25). Na najbolj učinkovito aminokislino je bila mediana frekvenca odzivov teh celic 17 Hz (kvartila 13 in 19 Hz, N=25). Pri odzivih posameznih celic smo primerjali frekvence proženja akcijskih potencialov na najbolj učinkovito in manj učinkovite aminokisline. Manj učinkovite aminokisline so izzvale podobne frekvence akcijskih potencialov kot najbolj učinkovita aminokislina, frekvence so se razlikovale za največ 10 Hz.

Slika 19: Odziv tonične vohalne celice, ki se je odzivala na L-nVal in L-Met: akcijski potenciali (zgoraj) in njihova frekvenca (spodaj).

(Fig. 19: Response of a tonic ORN that responded to L-nVal and L-Met: action potentials (above) and their frequency (below).)

B. Fazično-tonične celice

Fazično-tonične celice so se na najbolj učinkovito aminokislino odzvale fazično-tonično. Celica, ki se je odzivala fazično-tonično na L-nVal, se je odzvala fazično-tonično tudi na manj učinkovit L-Met (slika 20). Manj kot polovica (N=19) vseh celic, ki smo jih testirali z desetimi aminokislinami, je bilo fazično-toničnih. V fazičnih delih odzivov na najbolj učinkovito aminokislino je bila mediana frekvenca celic 69 Hz (kvartila 63 in 87 Hz, N=19), v toničnih delih pa 18 Hz (kvartila 15 in 25 Hz, N=19). Tudi odziv na manj učinkovite aminokisline je bil pri večini teh celic (N=15) fazično-toničen, pri nekaterih celicah pa, ne glede na občutljivost celic, toničen - brez fazičnega dela (N=4). Fazični deli odzivov na manj učinkovite aminokisline niso dosegali največjih frekvenc, značilnih za posamezno celico. Tako je pri celici, ki se je odzivala na L-nVal in L-Met (slika 20), bolj učinkovit L-nVal izzvala višjo (67 Hz) frekvenco kot manj učinkovit L-Met (59 Hz). V toničnih delih odzivov so bile frekvence na bolj in manj učinkovitih aminokislin podobne, razlikovale so se največ za 11 Hz. Izjema je bila fazično-tonična celica, pri kateri so se tonični deli odzivov na različne aminokisline razlikovali za 28 Hz.

Slika 20: Odziv fazično-tonične vohalne celice, ki se je odzivala na L-nVal in L-Met: akcijski potenciali (zgoraj) in njihova frekvenca (spodaj).

(Fig. 20: Response of a phasic-tonic ORN that responded to L-nVal and L-Met: action potentials (above) and their frequency (below).)

Po Ottosonovi hipotezi (1971) se receptorski potenciali vohalnih celic seštejejo v EOG. Da bi to hipotezo preverili, smo korelirali števila aktiviranih spontano neaktivnih vohalnih celic z relativnimi amplitudami EOG med draženjem z istimi aminokislinami. Nevtralne aminokisline, ki so izzvale velike EOG amplitude (slika 4), so sprožile odziv velikega števila vohalnih celic (slika 21). L-Met oz. L-nVal, ki izzoveta velike EOG amplitude, sta izzvala elektrofiziološki odziv pri 32 oz. 35 vohalnih celicah, medtem ko je L-Pro, ki izzove najmanjšo EOG amplitudo, pri visoki koncentraciji (10^{-2} M) aktiviral eno samo vohalno celico. Števila vohalnih celic, ki so se odzvale na posamezne nevtralne aminokisline in L-Pro, so značilno korelirale z relativnimi amplitudami EOG (R=0.77, p<0.05; slika 22).

Slika 21: Število spontano neaktivnih vohalnih celic, ki so se odzvale na posamezne nevtralne aminokisline $(10^{-4}M)$ in iminokislino L-Pro $(10^{-2}M)$.

(Fig. 21: Numbers of spontaneously inactive ORNs responding to single neutral amino acids $(10^{-4}M)$ and L-Pro $(10^{-2}M)$.)

Slika 22: Korelacija med števili aktiviranih vohalnih celic in relativnimi EOG amplitudami na nevtralne aminokisline (10^{-4} M) ter L-Pro (10^{-2} M). R= Pearsonov korelacijski koeficient, debelo je regresijska premica (metoda najmanjših kvadratov), tanjši krivulji označujeta 95% interval zaupanja za regresijsko premico.

(Fig. 22: Correlation between numbers of responding ORNs and relative EOG amplitudes to neutral amino acids $(10^{-4}M)$ and L-Pro $(10^{-2}M)$. R= Pearson correlation coefficient, thick is regression line (least square method), thin lines mark 95% confidence interval for the regression line.)

Veljavnost Ottosonove hipoteze smo preverili še pri raziskavi koncentracijske odvisnosti L-norvalinskega odziva. Število aktiviranih vohalnih celic pri različnih koncentracijah L-nVal je bilo odvisno od koncentracije: 21 pri 10^{-4} M, 17 pri 10^{-5} M, 11 pri 10^{-6} M in 2 pri 10^{-7} M (slika 23). Tudi EOG odziv na aminokisline v VPV je bil koncentracijsko odvisen (slika 6). Števila elektrofiziološko aktivnih vohalnih celic pri različnih koncentracijah L-nVal močno korelirajo (R=0.97, p<0.05) z relativnimi amplitudami EOG odzivov pri istih koncentracijah (slika 24).

Slika 23: Število spontano neaktivnih vohalnih celic, ki so se odzvale med draženjem z različnimi koncentracijami L-nVal.

(Fig. 23: Numbers of spontaneously inactive ORNs that responded to different L-nVal concentrations.)

Slika 24: Korelacija med števili elektrofiziološko aktiviranih vohalnih celic in relativnimi EOG amplitudami pri različnih koncentracijah L-nVal. R= Pearsonov korelacijski koeficient, debelo je regresijska premica (metoda najmanjših kvadratov), tanjši krivulji označujeta 95% interval zaupanja za regresijsko premico.

(Fig. 24: Correlation between numbers of responding ORNs and relative EOG amplitudes to different L-nVal concentrations. R= Pearson correlation coefficient, thick is regression line (least square method), thin lines mark 95% confidence interval for the regression line.)

4.5 ODZIV SPONTANO AKTIVNIH VOHALNIH CELIC NA AMINOKISLINE V VPV

Med iskanjem odzivov vohalnih celic na aminokisline smo pogosto opazili spontano aktivne celice. Poskusi v VPV so bili usmerjeni v iskanje celic brez spontane aktivnosti, pri nekaj spontano aktivnih celic pa smo posneli lastnosti odzivov na aminokisline v VPV. Spontano aktivne celice so se na draženje z ekvimolarno zmesjo aminokislin pogosto odzvale s supresijo. Z izjemo ene celice je bila ponovljivost odzivov na draženje z aminokislinami majhna. Celice, ki so se na zmes aminokislin odzvale s supresijo, smo dražili še z desetimi posameznimi aminokislinami. Pri eni izmed teh celic smo lahko določili koncentracijsko odvisnost supresije aktivnosti celice (slika 25). Spontana frekvenca akcijskih potencialov pri tej celici je bila med 14 in 23 Hz.

L-Met 10 ⁻⁴ M		?7a
L-nVal 10 ⁻⁴ M	╺╫╫╄╴╫╫┼╫╴╢╴╢╴╢╢╴╢╢╴╢╢╴╢╢╴╢╢╴╢╢╴╢╢╴╢╢╴╎╢╢╴╢╎┙╴╴╴	
L-Ala 10 ⁻⁴ M	╫╌╫┼╬┼╗╴┉╴┿╴╫╖┉╫┉╫┉╫┉╫┉╫┉╢┙╢╢╸╢╢╴╢╴╌╢╴╍╴┶╍┉┈┶┶┉┈╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴╴	
L-Leu 10 ⁻⁴ M		
L-Ser 10 ⁻⁴ M		
L-Lys HCI 10 ⁻⁴ M		
L-Val 10 ⁻⁴ M		
L-Arg HCI 10 ⁻⁴ M		
L-IIe 10 ⁻⁴ M		
L-Pro 10 ⁻² M	╈╋╾╈╺╫╌╫╸┾╉┶┲╫╌╌╄╾┡╸╫╌╫┾╪╫╖╌╢╸╴╢╴┥╎╴╴┥╴╴╴╸╴╸╴╸╴╴┙╴╎┤╎┍╴┼╵╴┠┤┤╴╫╢╴╢╽╎╴╫╢╴╢╢╄╴╫╴╫╴┼╢╴╢╢╫╴╊┾╫╴╫╟╴	
KONTROLA	ten were besteren wirten wer an weren w	
mix10 10 ⁻³ M	┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉┉	
mix10 10 ⁻⁴ M		
mix10 10 ⁻⁵ M		
mix10 10 ⁻⁶ M		
mix10 10 ⁻⁷ M	A & Meddan Markan - Markan - Markan And - Markan And Har Bard and And - Markan - M	1 mV

Slika 25: Supresija spontano aktivne vohalne celice v VPV: odziv na deset posameznih aminokislin (zgoraj) in koncentracijsko odvisen odziv na različne koncentracije ekvimolarne zmesi desetih aminokislin v VPV (mix10, spodaj).

(Fig. 25: Suppression of spontaneously active ORN in HPW: response to ten single amino acids (above) and dose-dependant response to different concentrations of equimolar mixture of the ten amino acids (mix10, below).)

Ekscitacijo spontano aktivnih celic smo na draženje z zmesjo aminokislin opazili zelo redko. Ena od celic, ki smo jo dražili z desetimi aminokislinami, se je odzivala na štiri (L-Ala, L-Val, L-ArgHCl in L-Ile) aminokisline (slika 26). Spontana frekvenca akcijskih potencialov je bila pri tej celici med 1-16 Hz.

Slika 26: Ekscitacija spontano aktivne vohalne celice v VPV na aminokisline (L-Ala, L-Val, L-ArgHCl in L-Ile; zgoraj) in na ekvimolarno zmes desetih aminokislin (mix10, spodaj).

(Fig. 26: Excitation of spontaneously active ORN in HPW to amino acids (L-Ala, L-Val, L-ArgHCl in L-Ile; above) and to equimolar mixture of the ten amino acids (mix10, below).)

5 RAZPRAVA IN SLKEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Elektroolfaktogram (EOG)

S kalomelno elektrodo oddaljeno ~1 mm od vohalnega epitela rib izmerimo med draženjem z vonjavami počasen negativni potencial – elektroolfaktogram (EOG). Aminokisline, ki so kemijski dražljaji pri vodnih živalih (Sorensen in Caprio, 1998), sprožijo različne velikosti odzivov EOG. Raziskave vohalne učinkovitosti aminokislin pri somičih so bile narejene v vodovodni vodi (Caprio, 1978; Caprio in Byrd, 1984; Valentinčič s sod., 2000). Največjo amplitudo EOG sta izzvali naravna aminokislina L-Met in aminokislina L-nVal, ki je ni v naravi, najmanjšo amplitudo pa iminokislina L-Pro (slika 4). Podobno vohalno učinkovitost aminokislin opazimo tudi pri drugih sladkovodnih ribah (cebrice: Michel in Lubomudrov, 1995) in somičih iz brakičnih voda (*Arius felis*: Caprio, 1980).

Visoko prečiščena voda (VPV, preglednica 1), s katero smo oblivali vohalni organ, vsebuje približno 1000x manj ionov kot umetna jezerska voda (King in Preston, 1977; Marsot in Couillard, 1979; Christiansen in Marshall, 1965). Raziskovalci (Kurahashi in Yau, 1994; Nakamura in Gold, 1987; Leinders-Zufall s sod., 1998; Firestein, 2001) menijo, da so ionski kanalčki, skozi katere tečejo ioni med nastankom receptorskega potenciala, razporejeni v membranah cilij oziroma mikrovilov vohalnih celic. Pri sladkovodnih živalih je vohalni epitel izpostavljen sladki vodi, ki vsebuje malo ionov. Kljub temu je vohalni epitel sladkovodnih rib funkcionalen tudi več ur po začetku poskusov (Caprio, 1978; Caprio in Byrd, 1984; Erickson in Caprio, 1984; Kang in Caprio, 1995, 1997; Michel in Lubomudrov, 1995) oziroma pri ribah v naravi deluje celo življenje. Tudi v VPV smo lahko 6 ur po začetku poizkusov merili ponovljive EOG odzive (slika 3). Koncentracija K⁺, Ca⁺⁺ in Mg⁺⁺ v vodi, ki je iztekala iz nosne votline, je bila skoraj enaka kot v vodi, ki je v

nosno votlino dotekala (preglednica 1). Koncentracija Na^+ , ki se je pri prehodu nosne votline najbolj povečala, je ostala v istem velikostnem razredu koncentracij (µg/l) kot ob dotoku v nosno votlino. Med draženjem vohalnega organa so vohalne celice izgubile le malo kationov.

Elektrofiziološke učinkovitosti nevtralnih aminokislin in L-Pro v VPV in v deklorirani vodovodni (Koce, 1999; Valentinčič s sod., 2000) so bile enake (slika 4). Enako učinkovitost aminokislin v obeh medijih potrjuje visoka korelacija (R=0.94, p<0.05) med amplitudami EOG odzivov v VPV in deklorirani vodovodni vodi (slika 5). Vohalni organ somičev je elektrofiziološko enako učinkovit v vodah z malo ioni in vodah, ki skoraj ne vsebujejo ionov. Bazični aminokislini (pH raztopin L-LysHCl, L-ArgHCl v VPV in pH VPV so skoraj enaki) sta izzvali veliko večje odzive v VPV kot v vodovodni vodi (slika 4). Velika EOG amplituda ne odraža velikega števila vohalnih celic, ki so se odzvale na draženje z bazičnimi aminokislinami. Na L-LysHCl so se odzvale 4 celice, 3 pa na L-ArgHCl, kar je v primerjavi z 35 celicami, ki so se odzvale na L-nVal, zelo malo.

Elektrofiziološki vohalni odziv je bil neodvisen od koncentracije ionov v vodi okoli vohalnega epitela tudi pri zlati ribici, kjer so primerjali vohalne odzive v umetni sladki vodi in v umetni sladki vodi brez kalcija ali natrija (Hubbard s sod., 2002) in lososu *Oncorhynchus keta*, kjer so primerjali vohalne odzive v sladki in morski vodi (Shoji s sod., 1994).

5.1.2 Odzivi spontano neaktivnih vohalnih celic na draženje z različnimi aminokislinami

Odzive spontano neaktivnih vohalnih celic so opazovali tudi pri dvoživkah (Getchell, 1973; Dione, 1992; Trotier in Macleod, 1983) in plazilcih (Mathews, 1972). Število spontano neaktivnih vohalnih celic rib, ki so so odzval na aminokisline, je bilo v preteklih raziskavah zelo majhno (Miklavc, 2003, Valentinčič s sod., 2005). Najbolj verjetni razlog za majhno število opaženih spontano neaktivnih celic, ki se odzovejo na aminokisline, je v prevajanju elektrofiziološkega signala mimo elektrode (angl. shunting). VPV vsebuje malo ionov in ima veliko upornost (>18.2M Ω cm), prevajanje mimo elektrode je majhno, odzive vohalnih celic lahko opazimo iz večje razdalje kot v vodovodni vodi. Spontano neaktivne vohalne celice smo dražili z desetimi aminokislinami. Določili smo koncentracijsko odvisnost odzivov za zelo dražeči aminokislini L-nVal in L-Met.

Alkasab s sod. (2002) je hipotetično predvidel prisotnost ozko specializiranih vohalnih celic in drugih celic, ki so široko uglašene - niso specializirane. Vohalni receptorski proteini v nosu miši in podgan, ki so jih izrazili z metodo heterologne ekspresije, vežejo ozek nabor vonjav (Bozza s sod., 2002; Abaffy s sod., 2006; Araneda s sod., 2000). Receptorski protein ima vedno največjo vezavno afiniteto za eno od vonjav, ta izzove največji odziv celice, nekaj, običajno kemijsko sorodnih snovi se z manjšo afiniteto veže na isti receptorski protein, take vonjave izzovejo manjši odziv celice. Raziskave odzivov vohalnih celic žab *in vivo* so pokazale spontano aktivne celice, ki se odzovejo na kemijsko različne vonjave z ekscitacijo (Revial s sod., 1982; Duchamp-Viret s sod., 1999). Predvidevajo, da imajo vohalne celice žab med seboj prekrivajoče spektre odzivnosti. Podobno se pri paglavcih žabe krempljičarke (*Xenopus laevis*) ista vohalna celica odziva na kemijsko različne aminokisline (Manzini in Schild, 2004).

Približno tretjina (30%) spontano neaktivnih celic ameriškega somiča se je odzivalo na eno aminokislino (L-Ala, L-Met ali L-nVal) (slika 9). Največ celic (39%) se je odzivalo na L-Met in L-nVal, pri večini teh celic je bil odziv na L-nVal večji od odziva na L-Met (sliki 9 in 10). Ker na zemlji ni naravnega L-nVal, lahko pojmujemo, da so te celice specializirane za L-Met. Pri dveh celicah je bila dolžina odziva na najbolj učinkovito aminokislino (L-Val; L-Pro) vsaj dvakrat daljša od odziva na drugo najbolj učinkovito aminokislino. Izjema sta bili celici, ki sta se približno enako dolgo odzivali na L-LysHCl in L-ArgHCl. Afiniteto vohalnega receptorja 5.24 za L-Lys in L-Arg pri zlati ribici je približno enaka (Speca s sod., 1999). Vse celice, ki so se pri 10⁻⁴M koncentraciji aminokislin. Z izjemo ene celice je bil to L-nVal. Pri nizkih koncentracijah so tudi te celice specialisti za L-nVal. Celice, ki bi se enako odzivala na več kot 2 aminokislini, nismo opazili, od 22 celic, ki so se odzvale na dve aminokislini, so se le 3 odzvale enako na obe aminokislini.

Odzivi vohalnih celic vretenčarjev so koncentracijsko odvisni. Pri miših (Bozza s sod., 2002), močeradu Ambystoma tigrinum (Getchell in Shepherd, 1978a; Firestein s sod., 1993), žabi Rana temporaria (Reisert in Matthews, 1999), zlata ribici Carassius auratus in cebrici Danio rerio (Luu s sod., 2004) saturirajo receptorski tokovi ali frekvence akcijskih potencialov znotraj približno desetkratnega prirastka koncentracije dražljaja. Med elektrofiziološkimi meritvami odziva spontano aktivnih vohalnih celic kanalskega somiča Ictalurus punctatus niso opazili koncentracijske odvisnosti vohalnega odziva (Kang in Caprio, 1995; Kang in Caprio, 1997). Nasprotno pa so se vse spontano neaktivne vohalne celice ameriškega somiča na draženje z aminokislinami odzvale koncentracijsko odvisno. Več kot polovica (57%) spontano neaktivnih vohalnih celic se je na aminokisline odzivalo tonično (sliki 14 in 15). Frekvenca akcijskih potencialov v odzivih na različne koncentracije testne aminokisline L-nVal je dosegla največjo vrednost (mediana frekvenca celic 17 Hz) pri koncentracijah, ki so bile približno ~10x večje od vzdražnostnega praga celice. Manj kot polovica vohalnih celic (43%) se je pri koncentracijah, ki so bile več kot 10x večje od vzdražnostnega praga, odzivalo fazično-tonično (sliki 16 in 17). Odziv je sestavljal začetni kratek (<300 ms) fazični del (mediana frekvenca celic 68 Hz) in daljši tonični del (mediana frekvenca celic 19 Hz).

Tonični odziv se je pri koncentracijah L-nVal, ki so bile več kot 10x višje od vzdražnostnega praga, pričel s saturirano frekvenco akcijskih potencialov. Nasprotno pa fazični deli odzivov niso saturirali celo pri koncentracijah, ki so bile več kot 1000x večje od vzdražnostnega praga. Prisotnost fazičnega dela v odzivih ni bila povezana z občutljivostjo ali dolžino odziva vohalnih celic. Dolge odzive, ki so trajali več kot 20 sekund, smo opazili tako pri fazično-toničnih kot pri toničnih celicah. Fazično-tonične lastnosti so opisali pri spontano aktivnih (~0.3 Hz) celicah močerada (Getchell, 1978a, 1978b).

Med dolgotrajnim draženjem vohalnih celic močerada je Getchell (1978b) opazil, da odzivi celic ne adaptirajo – dolžina proženja akcijskih potencialov je sledila dolžini draženja. Ali tudi odziv spontano neaktivne vohalne celic med daljšim draženjem ne adaptira? Trajanje draženj vohalnih celic pri različnih koncentracijah aminokislin smo ocenili z izračunom števila delcev dražljaja v vodi v nosni votlini po izbranih časih (slika 2). Po prenehanju dovajanja aminokisline v nosno votlino njena koncentracija eksponencialno upada. Po začetku draženja z 10⁻⁴M koncentracijo aminokisline upade njena koncentracija pod vzdražnostni prag najbolj občutljivih opaženih celic (10⁻⁷M) v manj kot 13.2 s, po začetku draženja z 10⁻⁶M aminokislino v manj kot 9.4s in po začetku draženja z 10⁻⁶M aminokislino v manj kot 5.6 s. Tako ocenjena trajanja koncentracij L-nVal, ki so nad opaženimi vzdražnostnimi pragi celic (slika 27), se razmeroma dobro ujemajo z izmerjenimi dolžinami odzivov celic (slika 12). Sklepamo, da odzivi spontano neaktivnih vohalnih celic med draženjem, ki je bilo krajše od 13.2 s, niso adaptirali.

Slika 27: Ocenjena trajanja draženja vohalnega organa z koncentracijami L-nVal, ki so večje 10⁻⁷M (črno, debela črta), 10⁻⁶M (rdeče, debela črta), 10⁻⁵M (modro, debela črta) in 10⁻⁴M (zeleno, debela črta). Tanjše črte prikazujejo izmerjene dolžine odzivov vohalnih celic, ki so imele vzdražnostne prage pri 10⁻⁷M (črno), pri 10⁻⁶M (rdeče), pri 10⁻⁵M (modro) in pri 10⁻⁴M (zeleno) L-nVal.

(Fig. 27: Estimated durations of stimulation with L-nVal concentrations that were larger than 10⁻⁷M (thick black line), 10⁻⁶M (thick red line), 10⁻⁵M (thick blue line) and 10⁻⁴M (thick green line). Thin lines present response durations of ORNs with thresholds at 10⁻⁷M (black), at 10⁻⁶M (red), at 10⁻⁵M (blue) and at 10⁻⁴M (green) L-nVal.)

EOG je preprosta metoda meritve učinkovitosti dražljajev, vendar do sedaj mehanizem nastanka EOG signala ni bil potrjen z odzivi posameznih celic. Ottoson (1971) je predvidel, da je EOG odziv seštevek receptorskih potencialov vohalnih celic. Pri ribah so bile raziskave vohalnih celic zadnjih 12 let usmerjene v raziskave spontano aktivnih celic v vodovodni vodi (Kang in Caprio, 1995; Kang in Caprio, 1997; Valentinčič in Koce, 2000; Valentinčič s sod., 2005). Aleš Koce (1999) in Pika Miklavc (2003) sta med draženjem z aminokislinami opazovala aminokislinske odzive >500 takih celic. Tako pri kanalskem kot pri ameriškem somiču se večina spontano aktivnih celic na draženje z aminokislinami odzove s supresijo -zmanjšanjem frekvence akcijskih potencialov (Kang in Caprio, 1995; Koce, 1999; Miklavc, 2003; Valentinčič s sod., 2005). Pri ameriškem somiču so supresijski odzivi na aminokisline slabo ponovljivi in večinoma niso koncentracijsko odvisni. Edina celica, pri kateri smo v VPV določili koncentracijsko odvisnost supresije, se je odzvala s supresijo na vse testne aminokisline (slika 25). Odziv takšnih celic ne omogoča razlikovanja aminokislin. Le tri procente spontano aktivnih celic se je na draženje z aminokislinami odzvalo s koncentracijsko odvisno ekscitacijo. Samo transducer, ki se ponovljivo in koncentracijsko odvisno odziva na draženje, lahko kodira lastnosti dražljajev, ostalo je šum v čutilu. Majhno število koncentracijsko odvisnih odzivov spontano aktivnih celic in slaba ponovljivost rezultatov pri zaporednem draženju izključi spontano aktivne vohalne celice kot kodirajoče nevrone. Valentinčič s sod. (2005) predlaga, da so supresijski odzivi najverjetneje lastnost mladih vohalnih celic, katerih aksoni vzpostavljajo povezave z ustreznimi mitralnimi celicami v vohalnem bulbusu, supresija njihovega delovanja poveča razliko med aktivnostjo vzburjenih spontano neaktivnih vohalnih celic in aktivnostjo zavrtih spontano aktivnih vohalnih celic.

Če je Ottosonova hipoteza (1971) pravilna, pričakujemo pozitivno korelacijo med odzivi vohalnih celic in amplitudo EOG. Spontano neaktivne vohalne celice imajo različne vzdražne prage za L-nVal, najbolj občutljive celice so se odzvale na 10^{-7} M koncentracijo te aminokisline (slika 23). Višje koncentracije L-nVal so sprožile odzive večjega števila spontano neaktivnih vohalnih celic – kodiranje z rekrutiranjem (Korsching, 2005; Duchamp-Viret s sod., 1999; Mueller s sod., 2005). Po draženju z različnimi koncentracijami L-nVal je število aktiviranih spontano neaktivnih vohalnih celic značilno koreliralo z amplitudami EOG (R=0.97, p<0.05) (slika 24). Kodiranje kvantitete torej poteka z rekrutiranjem vohalnih celic, ki sledi povečevanju koncentracij aminokisline. Vzporedno se povečuje amplituda EOG. To potrjuje tudi hipotetična EOG krivulja (slika 28), ki je izračunana iz števila aktiviranih vohalnih celic pri različnih časih po začetku draženja in pri različnih koncentracijah L-nVal. Oblike izračunanih EOG signalov za različne koncentracije L-nVal se ujemajo z oblikami eksperimentalno izmerjenih EOG odzivov pri istih koncentracijah L-nVal.

Slika 28: (A) izmerjeni EOG in (B) iz števila aktiviranih spontano neaktivnih vohalnih celic izračunani EOG med draženjem z različnimi koncentracijami L-nVal.

(Fig. 28: (A) measured EOG and (B) from number of responding ORNs calculated EOG to different L-nVal concentrations.)

Ali velja Ottosonova hipoteza tudi za različne lastnosti aminokislin? Bolj učinkovite aminokisline, ki izzovejo večjo amplitudo EOG, so izzvale odziv večjega števila spontano neaktivnih celic (slika 21). Na nevtralne aminokisline in L-Pro so števila odzivnih vohalnih celic značilno korelirala (R=0.77, p<0.05) z relativnimi amplitudami EOG (slika 22). Izračunana korelacija je značilna že pri razmeroma majhnem (44 celic) vzorcu vohalnih celic. Ocenjeno število vohalnih celic je bilo pri šarenki 45000 \pm 26600 (Sato in Suzuki, 2001). Smatramo, da bolj učinkovite aminokisline vzdražijo večje število vohalnih celic in sprožijo večjo amplitudo EOG (slika 22), ki je najverjetneje posledica večjega števila aktiviranih vohalnih celic. Tako odzivi spontano neaktivnih vohalnih celic potrjujejo Ottosonovo hipotezo (1971), da je EOG odziv seštevek receptorskih potencialov vohalnih celic.

5.2 SKLEPI

Ugotovili smo, da je pri ameriškem somiču (*Ameiurus melas*) elektrofiziološka učinkovitost aminokislin v visoko prečiščeni vodi (VPV) enaka kot v vodovodni vodi. Enako učinkovitost aminokislin podpira visoka korelacija med relativnimi amplitudami EOG nevtralnih aminokislin in L-Pro v VPV in vodovodni vodi.

Večina spontano neaktivnih vohalnih celic so ozko specializirani nevroni, ki se najmočneje odzivajo na eno aminokislino. Približno tretjina vohalnih celic so bili specialisti, ki so se odzivali na eno (L-nVal: N=7; L-Met: N=4; L-Ala: N=2) izmed desetih testnih aminokislin. Sedemnajst vohalnih celic se je odzivalo na aminokislini L-nVal in L-Met. Ker L-nVal v naravi ni, so te celice najbolj verjetno specialisti za naravno aminokislino L-Met, torej lahko tudi te celice uvstimo med specializirane celice. Vse vohalne celice, ki so se odzivale na 3-6 aminokislin, so se najbolj odzivale na eno od aminokislin. Pri nizkih koncentracijah aminokislin lahko tudi te celice delujejo kot specializirane celice. Le štiri izmed 44 celic se je približno enako odzvalo na dve aminokislini.

Spontano neaktivne vohalne celice so se ponovljivo in koncentracijsko odvisno odzivale na draženje z aminokislinami. Pri 21 vohalnih celicah, ki so se odzivale na L-nVal, smo določili koncentracijsko odvisnost odzivov v razponu koncentracij $10^{-8}M - 10^{-4}M$. Na draženje so se vohalne celice odzivale tonično (N=9) ali fazično-tonično (N=12). Frekvenca akcijskih potencialov toničnih odzivov je dosegla največjo vrednost (saturirala) pri koncentracijah L-nVal, ki so ~10x večje od vzdražnostnega praga celice. Frekvenca med fazičnimi odzivi ni saturirala celo pri koncentracijah, ki so bile 1000x večje od vzdražnostnega praga celice.

Ottosonova hipoteza (1971) predvideva, da je EOG seštevek receptorskih potencialov množice vohalnih celic. Števila spontano neaktivnih vohalnih celic, ki so se odzvala na (A) različne koncentracije L-nVal ali (B) na različne aminokisline pri istih koncentracijah so značilno korelirala z amplitudami EOG odzivov. Prav tako se hipotetična krivulja EOG,

izračunana iz števila aktiviranih vohalnih celic pri različnih koncentracijah L-nVal ujema z izmerjeno krivuljo EOG odziva. S tem potrjujemo Ottosonovo hipotezo (1971).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Raziskovali smo elektrofiziološki odziv vohalnih organov ameriškega somiča (Ameiurus *melas*) med draženjem z aminokislinami. Ribje vohalne celice, ki se odzivajo na draženje z aminokislinami, so pred draženjem spontano aktivne ali neaktivne. Večina spontano aktivnih vohalnih celic se je odzivalo na draženje z aminokislinami s supresijo, le malo celic se odzvalo z ekscitacijo (Kang in Caprio, 1995, 1997). Problem je, da večina odzivov ribjih vohalnih celic ni ponovljivih. Spontana aktivnost je najverjetneje lastnost mladih vohalnih celic, njihovi odzivi med draženjem z aminokislinami verjetno povečajo razmerje signala proti šumu v vohalnem organu, kjer pa kodirajoči nevroni še niso bili identificirani. Pri ribah so opazili le malo spontano neaktivnih vohalnih celic, ki se odzivajo na vohalne dražljaje. Zelo težko je z elektrodo poiskati nevrone, ki pred draženjem ne oddajajo električnih signalov. Zato smo snemali odzive spontano neaktivnih vohalnih celic na dražljaje v visoko prečiščeni vodi (VPV, R>18.2MΩcm), v kateri lahko steče malo elektrinine mimo snemalne elektrode, najdemo lahko oddaljene spontano neaktivne vohalne celice, ki niso v neposrednem stiku elektrodo. Uspešno smo posneli odzive 44 vohalnih celic na deset aminokislin (L-Ala, L-Ser, L-Met, L-Leu, L-Ile, L-Val, L-nVal, L-ArgHCl, L-LysHCl pri 10⁻⁴M in L-Pro pri 10⁻²M) in določili lastnosti koncentracijske odvisnosti celic na zelo učinkovito aminokislino L-nVal (N=21). Vzporedno z odzivi vohalnih celic smo merili elektroolfaktogram (EOG).

Nevtralne aminokisline in L-Pro so bile enako učinkovite v VPV in v vodovodni vodi. L-Met in L-nVal sta izzvali največji amplitudi EOG, najmanjšo pa L-Pro. Visoka korelacija med relativnimi amplitudami EOG v VPV in vodovodni vodi potrjuje enako učinkovitost aminokislin v obeh medijih.

Večina spontano neaktivnih vohalnih celic je specializiranih nevronov, ki se najmočneje odzovejo na eno vonjavo. Približno tretjina celic se je odzvala bodisi na L-nVal (N=7), na

L-Met (N=4) ali na L-Ala (N=2). Sedemnajst vohalnih celic se je odzivalo na draženje z LnVal in L-Met. Ker L-nVal v naravi ni, so te celice najverjetneje specializirane za L-Met. Pri dveh celicah je bila dolžina odziva na najbolj učinkovito aminokislino (L-Val; L-Pro) več kot dvakrat daljša od odziva na manj učinkovito aminokislino. Nekaj vohalnih celic se je odzivalo na tri (N=3), štiri (N=2), pet (N=2) in šest (N=2) aminokislin. Te celice so imele odziv na najbolj učinkovito aminokislino vsaj dvakrat daljši kot odziv na ostale aminokisline. Pri nizkih koncentracijah aminokislin so tudi te celice specializirani nevroni. Le štiri izmed 44 vohalnih celic se je približno enako odzivalo na dve aminokislini (L-LysHCl/L-ArgHCl, L-Val/L-nVal ali L-Met/L-nVal).

Vse spontano neaktivne vohalne celice so se na draženje z aminokislinami odzivale koncentracijsko odvisno. Dvanajst izmed 21 vohalnih celic se je na L-nVal odzivalo fazično-tonično. V fazičnem odzivu frekvenca akcijskih potencialov ni saturirala pri koncentracijah L-nVal, ki so bile 1000x večje od vzdražnega praga celice. Devet izmed enaindvajsetih vohalnih celic se je na L-nVal odzvalo le tonično. Pri vseh toničnih odzivih je frekvenca akcijskih potencialov saturirala pri koncentracijah L-nVal, ki so bile ~10x večje od vzdražnega praga celice.

Mehanizmi nastanka EOG (1971) niso bili podprti z podatki. Če je EOG vsota receptorskih potencialov vohalnih celic, pričakujemo pozitivno korelacijo med števili odzivnih vohalnih celic in amplitudami EOG. Števila spontano neaktivnih vohalnih celic, ki so se odzvala na $10^{-8}M - 10^{-4}M$ koncentracije L-nVal, so močno korelirala z relativnimi amplitudami EOG. Iz števil aktiviranih vohalnih celic pri različnih koncentracijah L-nVal smo izračunali hipotetične EOG krivulje. Rekrutacija vohalnih celic je sledila izmerjenemu EOG. Ali je Ottosonova hipoteza (1971) pravilna tudi za različne aminokisline? Bolj učinkovite aminokisline. Za nevtralne aminokisline in L-Pro so števila odzivnih spontano neaktivnih vohalnih celic značilno korelirala z relativnimi amplitudami EOG. Visoki korelaciji potrjujeta Ottosonovo hipotezo (1971).

6.2 SUMMARY

We investigated electrophysiological responses of black bullhead catfish (Ameiurus melas) olfactory organs to amino acid stimuli. Prior to stimulation, fish olfactory receptor neurons (ORNs) are either spontaneously active or inactive. Most spontaneously active ORNs respond to amino acids with suppression, few responded with excitation (Kang in Caprio, 1995, 1997). The problem is that most responses of fish spontaneously active ORNs are not repeatable. Spontaneous activity is a likely property of young ORNs, their responses during the amino acid stimulation is likely to increase signal to noise ratio in an olfactory organ where the coding neurons were not identified. In fishes few spontaneously inactive ORNs were ever observed to respond to olfactory stimuli. It is extremely difficult to locate with the electrode neurons that do not emit electric signals before stimulation. Therefore we recorded spontaneously inactive ORNs responsiveness to stimuli in highly purified water (HPW, R>18.2MΩcm), which produces little shunting of electrophysiological signal and enables monitoring distant spontaneously inactive ORNs that are not in contact with the recording electrode. We successfully recorded series of responses of 44 ORNs to ten amino acids (L-Ala, L-Ser, L-Met, L-Leu, L-Ile, L-Val, L-nVal, L-ArgHCl, L-LysHCl at 10⁻⁴M and L-Pro at 10⁻²M) and determined ORNs dose-response characteristics for the highly stimulatory amino acid L-nVal (N=21). Simultaneously with single unit activities we measured electroolfactogram (EOG).

Neutral amino acids and L-Pro were equally effective in HPW and in tap water. Amino acids L-Met and L-nVal triggered the largest EOG amplitudes and L-Pro evoked the smallest EOG amplitude. High correlation between relative EOG amplitudes in HPW and in the tap water corroborated equal amino acid effectiveness in both media.

Majority of spontaneously inactive ORNs are specialized receptor neurons that respond best to one amino acid. Approximately one third of ORNs responded to L-nVal (N=7), L-Met (N=4) or L-Ala (N=2) only. Seventeen ORNs responded to L-nVal and L-Met. Since L-nVal is not a natural amino acid, these ORNs are likely specialized L-Met neurons. In two ORNs the response to the most effective amino acid (L-Val; L-Pro) was >twice larger than the response to less effective amino acids. Some ORNs responded to three (N=3), four (N=2), five (N=2) or six (N=2) amino acids. In these ORNs the firing response to the most effective amino acid was >twice longer than the responses to any other amino acid. At low amino acid concentrations these ORNs are also specialized neurons. Only four out of 44 ORNs responded equally well to two amino acids (L-LysHCl/L-ArgHCl, L-Val/L-nVal or L-Met/L-nVal).

All spontaneously inactive ORNs responded to amino acid stimulation dose-dependently. Twelve out of twenty-one ORNs responded to L-nVal with phasic-tonic activity. The phasic action potential frequencies did not saturate for concentrations up to 1000x above the neuron's thresholds. Nine out of twenty-one ORNs responded to L-nVal with tonic activity only. For all the tonic activities the action potential frequencies saturated at L-nVal concentration that were ~10x larger that the thresholds.

Mechanisms underlying the amplitude of EOG (Ottoson, 1971) were not supported by data. If EOG is the sum of ORNs' receptor potentials, one can expect positive correlation between numbers of ORNs responding to amino acids and EOG amplitudes. The number of spontaneously inactive ORNs responding to $10^{-8}M - 10^{-4}M$ L-nVal concentrations correlated highly with the relative EOG amplitudes. From numbers of activated ORNs at different L-nVal concentrations we calculated hypothetical EOG curves. ORNs recruitment closely followed the EOG predictions. Is the Ottoson hypothesis also true also for different amino acids? The more effective amino acids triggered responses in larger number of spontaneously inactive ORNs than the less effective amino acids. For neutral amino acids and L-Pro the numbers of responding ORNs correlated significantly with the relative EOG amplitudes. The high correlations strongly support the Ottoson hypothesis (1971).

7 VIRI

Abaffy T., Matsunami H., Luetje C. W. 2006. Functional analysis of a mammalian odorant receptor subfamily. Journal of Neurochemistry, 97: 1506-1518

Alioto T. S., Ngai J. 2005. The odorant receptor repertoire of teleost fish. BMC Genomics, 6:173: 1-14.

Alkasab T. K., White J., Kauer, J. S. 2002. A computational system for simulating and analyzing arrays of biological and artificial chemical sensors. Chemical Senses, 27: 261-275.

Alonso J. R., Lara J., Miguel J. J., Aijon, J. 1987. Ruffed cells in the olfactory bulb of freshwater teleosts. I. Golgi impregnation. J.Anat., 155: 101-107.

Amon T. 1992. A new computer program for neuronal spike data evaluation. Biol.vestn. 40(2):1-8.

Araneda R. C., Kini A. D., Firestein S. 2000. The molecular receptive range of an odorant receptor. Nature Neuroscience, 3(12): 1248-1255.

Baier H., Korsching S. 1994. Olfactory glomeruli in the zebrafish form an invariant pattern and are identifiable across animals. J.Neurosci., 14: 219-230.

Belluscio L., Gold G. H., Nemes A., Axel R. 1998. Mice deficient in Golf are anosmic. Neuron, 20: 69-81.

Blejec A. 2005. Statistical method for detection of firing rate changes in spontaneously active neurons. Neurocomputing 65-66:557-563.

Boekhoff I., Michel W. C., Breer H., Ache B. W. 1994. Single odors differentially stimulate dual second messenger pathways in lobster olfactory receptor cells. J.Neurosci., 14: 3304-3309.

Bönigk W., Bradley J., Müller F., Sesti F., Boekhoff I., Ronnett G. V., Kaupp U. B., Frings S. 1999. The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. J.Neurosci., 19(13): 5332-5347.

Bozza T., Feinstein P., Zheng C., Mombaerts P. 2002. Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. The Journal of Neuroscience, 2 2(8): 3033-3043.

Bruch R. C., Teeter J. H. 1990. Cyclic AMP links amino acid chemoreceptors to ion channels in olfactory cilia. Chem.Senses, 15: 419-430.

Brunet L. J., Gold G. H., Ngai J. 1996. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. Neuron, 17: 681-693.

Buck L., Axel R. 1991. A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors: A Molecular Basis for Odor Recognition. Cell, 65: 175-187.

Cadiou H., Sienaert I., Vanlingen S., Parys J. B., Molle G., Duclohier H. 2000. Basic properties of an inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channel in carp olfactory cilia. European Journal of Neuroscience, 12: 2805-2811.

Cancalon P. F. 1978. Isolation and characterization of the olfactory epithelial cells of the catfish. Chem.Senses Flav., 8: 381-396.

Cancalon P. F. 1983. Receptor cells of the catfish olfactory mucosa. Chem.Senses, 8: 203-209.

Caprio J. 1978. Olfaction and taste in the channel catfish: an electrophysiological study of the responses to amino acids and derivatives. J.Comp.Physiol.[A], 123: 357-371.

Caprio J. 1980. Similarity of olfactory receptor responses (EOG) of freshwater and marine marine catfish to amino acids. Can.J.Zool. 58:1778-1784.

Caprio J., Byrd R. P. 1984. Electrophysiological evidence for acidic, basic, and neutral amino acid olfactory receptor sites in the catfish. J.Gen.Physiol., 84: 403-422.

Caprio J., Raderman-Little R. 1978. Scanning electron microscopy of the channel catfish olfactory lamellae. Tissue & Cell, 10(1): 1-9.

Chang Q. H., Caprio J. 1996. Electrophysiological evidence for the broad distribution of specific odorant receptor molecules across the olfactory organ of the channel catfish. Chem.Senses, 21: 519-527.

Christiansen R. G., Marshall J. M. 1965. Study of phagocytosis in the ameba Chaos chaos. J.Cell Biol. 25:443-457.

Dawson T. M., Arriza J. L., Jaworsky D. E., Borisy F. F., Attramadal H., Lefkowitz R. T., Ronnett G. V. 1993. Beta-adrenergic receptor kinase-2 and beta-arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitiation. Science, 259:825-829

Delay R. J., Dubin A. E., Dionne V. E. 1997. A Cyclic Nucleotide-depended Chloride Conductance in Olfactory Receptor Neurons. J.Membrane Biol., 159: 53-60.

Dellacorte C., Restrepo D., Menco B. P. M., Andreini I., Kalinoski D. L. 1996. G_q/G_{11} : Immunolocalization in the olfactory epithelium of the rat (Rattus rattus) and the channel catfish (Ictalurus punctatus). Neuroscience, 74: 261-273.

Dhallan R. S., Yau K., Schrader K. A., Reed R. R. 1990. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. Nature, 347: 184-187.

Dionne V. E. 1992. Chemosensory responses in isolated olfactory receptor neurons from Necturus maculosus. J.Gen.Physiol., 99: 415-434.

Dolenšek J. 2002. Supresija spontane aktivnosti vohalnih čutilnih celic ameriškega somiča med draženjem z aminokislinami. Spontana aktivnost in odzivnost vohalnih čutilnih celic ameriškega somiča (Ameiurus melas) v umetni jezerski in deionizirani void. Diplomsko delo. Ljubljana, BF, Oddelek za Biologijo: 33 str.

Dubin A. E., Dionne V. E. 1994. Action potencials and chemosensitive conductances in the dendrites of olfactory neurons suggest new features for odor transduction. J.Gen.Physiol., 103: 181-201.

Duchamp A. 1982. Electrophysiological responses of olfactory bulb neurons to odour stimuli in the frog. A comparison with receptor cells. Chem.Senses, 7: 191-210.

Duchamp-Viret P., Chaput M., Duchamp A. 1999. Odor response properties of rat olfactory receptor neurons. Science, 284(5432: 2171-2178.

Duchamp-Viret P., Duchamp A., Chaput M. A. 2000. Peripheral odor coding in the rat and frog: Quality and intensity specification. Journal of Neuroscience, 20: 2383-2390.

Egger V., Svoboda K., Mainen Z. F. 2005. Dendrodendritic synaptic signals in olfactory bulb granule cells: local spine boost and global low-threshold spike. The Journal of Neuroscience, 25(14): 3521-3530.

Erickson J. R., Caprio J. 1984. The spatial distribution of ciliated and microvillous olfactory receptor neurons in the channel catfish is not matched by a differential specificity to amino acid and bile salt stimuli. Chem.Senses 9:127-141.

Fadool D. A., Ache B. W. 1992. Plasma membrane inositol 1,4,5-trisphosphate-activated channels mediate signal transduction in lobster olfactory receptor neurons. Neuron, 9: 907-918.

Firestein S., Picco C., Menini A. 1993. The relation between stimulus and response in olfactory receptor cells of the tiger salamander. J.Physiol.(Lond.) 468:1-10.

Firestein S. 2001. How the olfactory system makes sense of scents. Nature 413:211-218.

Friedrich R. W., Laurent G. 2001. Dynamic Optimization of Odor Representations by Slow Temporal Patterning of Mitral Cell Activity. Science, 291: 889-894.

Friedrich R. W., Laurent G. 2004. Dynamics of olfactory bulb input and output activity during odor stimulation in zebrafish. J.Neurophys., 91:2658-2669

Gesteland R. C. 1975. Activity in the olfactory epithelium. In: Methods in Olfactory Research, (ed. D. G. Moulton, A. Turk, and J. W. Johnson, Jr.). New York Academic Press: 288-305.
Getchell T. V. 1973. Analysis of unitary spikes recorded extracellularly from frog olfactory receptor cells and axons. J.Physiol., 234: 533-551.

Getchell T. V. 1974. Electrogenic sources of slow voltage transients recorded from frog olfactory epithelium. J.Neurophysiol., 37: 1115-1130.

Getchell T. V., Shepherd G. M. 1978a. Responses of olfactory receptor cells to step pulses of odour at different concentrations in the salamander. J.Physiol. 282:521-540.

Getchell T. V., Shepherd G. M. 1978b. Adaptive properties of olfactory receptors analysed with odour pulses of varying durations. J.Physiol. 282:541-560.

Gold G. H. 1999. Controversial issues in vertebrate olfactory transduction. Annual Review of Physiology 61:857-871.

Hallani M., Lynch J. W., Barry P. H. 1998. Characterization of calcium-activated chloride channels in patches excised from the dendritic knob of mammalian olfactory receptor neurons. Journal of Membrane Biology, 161: 163-171.

Hansen A. in Zeiske E. 1998. The peripheral olfactory organ of the zebrafish, Danio rerio: an ultrastructural study. Chemical senses 23:39-48

Hansen A., Rolen S. H., Anderson K., Morita Y., Caprio J., Finger T. E. 2003. Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish. J.Neurosci, 23(28): 9328-9339.

Hatt H., Ache B. W. 1994. Cyclic nucleotide- and inositol phosphate-gated ion channels in lobster olfactory receptor neurons. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:6264-6268.

Hubbard P. C., Ingleton P. M., Bendell L. A., Barata E. N., Canário A. V. M. 2002. Olfactory sensitivity to changes in environmental $[Ca^{2+}]$ in the freshwater teleost Carassius auratus: an olfactory role for the Ca^{2+} -sensing receptor? Journal Of Experimental Biology, 205: 2755-2764.

Jacobs M. H. 1967. Diffusion processes. Springer-Verlag New York Inc.:160 str.

Kaneko H., Putzier I., Frings S., Kaupp U. B., Gensch T. 2004. Chloride accumulation in mammalian olfactory sensory neurons. The Journal of Neuroscience, 24(36): 7931-7938.

Kang J. S., Caprio J. 1997. In vivo responses of single olfactory receptor neurons of channel catfish to binary mixtures of amino acids. J.Neurophysiol., 77: 1-8.

Kang J., Caprio J. 1995. In vivo responses of single olfactory receptor neurons in the channel catfish, Ictalurus punctatus. J.Neurophysiol., 73(1): 172-177.

King C. A., Preston T. M. 1977. Studies of anionic sites on the cell surface of the amoeba Naegleria gruberi using cationized ferritin. J.Cell Sci. 28:133-149.

Knecht A., Hummel T. 2004. Recording of the human electro-olfactogram. Physiology and Behavior, 83: 13-19.

Koce A. 1999. Elektrofiziološki odzivi vohalnih čutilnih celic in vohalnega epitela ameriškega somiča (Ameiurus nebulosus) na draženje z aminokislinami in njihovimi zmesmi. Doktorska disertacija. Ljubljana, BF, Oddelek za Biologijo: 72 str.

Korsching S. 2005. Selective imaging of the receptor neuron population in the olfactory bulb of zebrafish and mice. Chemical senses 30:i101-i102.

Kosaka T. in Hama K. 1980. Presence of the ruffed cell in the olfactory bulb of the catfish, Parasilurus asotus, and the sea eel, Conger myriaster. J.Comp.Neurol. 193:103-117.

Kramer R. H., Siegelbaum S. A. 1992. Intracellular Ca^{2+} regulates the sensitivity of cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor neurons. Neuron, 9: 897-906.

Kurahashi T., Kaneko A. 1991. High density cAMP-gated channels at the ciliary membrane in the olfactory receptor cell. NeuroReport, 2: 5-8.

Kurahashi T., Menini A. 1997. Mechanism of odorant adaptation in the olfactory receptor cell. Nature, 385: 725-729.

Kurahashi T., Yau K. W. 1993 Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. Nature 363: 71-74.

Kurahashi T., Yau K. W. 1994. Tale of an unusual chloride current. Current Biology, 4: 256-258.

Laberge F., Hara T. J. 2001. Neurobiology of fish olfaction: a review. Brain Research Reviews, 36: 46-59.

Lancet D., Ben-Arie, N. 1993. Olfactory receptors. Curr.Biol., 3: 668-674.

Leinders-Zufall T., Rand M. N., Shepherd G. M., Greer C. A., Zufall F. 1997. Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. J.Neurosci., 17(11): 4136-4148.

Leinders-Zufall T., Greer C. A., Shepherd G. M., Zufall F.1998. Imaging odor-Induced calcium transients in single olfactory cilia: Specificity of activation and role in transduction. The Journal of Neuroscience,18(15): 5630-5639.

Lischka F. W., Zviman M. M., Teeter J. H., Restrepo D. 1999. Characterization of inositol-1,4,5trisphosphate-gated channels in the plasma membrane of rat olfactory neurons. Biophysical Journal, 76: 1410-1422.

Luu P., Acher F., Bertrand H. O., Fan J., Ngai J. 2004. Molecular determinants of ligand selectivity in a vertebrate odorant receptor. The journal of Neuroscience 24(45):10128-10137.

Malnic B., Hirono J., Sato T., Buck L. B. 1999. Combinatorial receptor codes for odors. Cell, 96: 713-723.

Manzini I., Schild D. 2004. Classes and narrowing selectivity of olfactory receptor neurons of Xenopus laevis tadpoles. The Journal of General Physiology, 123(2): 99-107.

Marsot P., Couillard P. 1979. Action du glutathion sur l'induction de pseudopodes et l'activite locomotrice d'Amoeba proteus. Can.J.Zool. 57:465-468.

Mathews D. F. 1972. Response patterns of single neurons in the tortoise olfactory epithelium and olfactory bulb. J.Gen.Physiol., 60: 166-180.

Michel W. C., Lubomudrov L. M. 1995. Specificity and sensitivity of the olfactory organ of the zebrafish, Danio rerio. J.Comp.Physiol.[A], 177: 191-199.

Miklavc P. 2003. Razlikovanje aminokislin in odzivi vohalnih čutilnih celic pri ameriških somičih (Ameiurus melas, Pisces). Magistrsko delo. Ljubljana, BF, Oddelek za Biologijo: 55 str.

Miyamoto T., Restrepo D., Cragoe E. J., Teeter J. H. 1992. IP₃- and cAMP-induced responses in isolated olfactory receptor neurons from the channel catfish. J.Membr.Biol., 127: 173-183.

Mombaerts P. 1999. Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. Annual Review of Neuroscience, 22: 487-509.

Mombaerts P. 2004. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one recpetor-one neuron hypothesis revisited. Current Opinion in Neurobiology, 14: 31-36.

Mombaerts P., Wang F., Dulac C., Chao S. K., Nemes A., Mendelsohn M., Edmondson J., Axel, R. 1996. Visualizing an Olfactory Sensory Map. Cell, 87: 675-686.

Morita Y., Finger T. E. 1998. Differential projections of ciliated and microvillous olfactory receptor cells in the catfish, Ictalurus punctatus. Journal Of Comparative Neurology, 398: 539-550.

Mueller K. L., Hoon M. A., Erlenbach I., Chandrashekar J., Zuker C. S., Ryba N. J. P. 2005. The receptors and coding logic for bitter taste. Nature 434:225-229.

Nakamura T., Gold, G. H. 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. Nature, 325(6103): 442-444.

Nakamura T. 2000. Cellular and molecular constituents of olfactory sensation in vertebrates. Comp.Biochem.Physiol.A Mol.Integr.Physiol. 126:17-32.

Ngai J., Dowling M. M., Buck L., Axel R., Chess A. 1993. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. Cell, 72: 657-666.

Ottoson D. 1971. The electro-olfactogram. In Beidler, L. M. (Ed.), Handbook of Sensory_Physiology. Vol 4: Part 1: 95-131. Berlin: Springer-Verlag.

Pelosi P. 1996. Perireceptor events in olfaction. J.Neurobiol., 30: 3-19.

Pinching A. J., Powell T. P. S. 1971. The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. J.Cell Sci., 9: 347-377.

Rawson N. E., Eberwine J., Dotson R., Jackson J., Ulrich P., Restrepo D. 2000. Expression of mRNAs encoding for two different olfactory receptors in a subset of olfactory receptor neurons. Journal of Neurochemistry, 75: 185-195.

Reisert J., Matthews H. R. 1999. Adaptation of the odour-induced response in frog olfactory receptor cells. Journal of Physiology 519:801-813.

Ressler K. J., Sullivan S.L., Buck L. B. 1994. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. Cell, 79: 1245-1255.

Restrepo D., Boekhoff I., Breer H. 1993. Rapid kinetic measurements of second messenger formation in olfactory cilia from channel catfish. olfactory signal transduction. Am J Physiol. 264(4Pt1):C906-911.

Reuter D., Zierold K., Schröder W. H., Frings S. 1998. A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. Journal of <u>Neuroscience</u>, 18: 6623-6630.

Revial M. F., Sicard G., Duchamp A., Holley A. 1982. New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. I. Experimental results. Chem.Senses, 7: 175-190.

Sato K., Suzuki N. 2001. Whole-cell response characteristics of ciliated and microvillous olfactory receptor neurons to amino acids, pheromone candidates and urine in rainbow trout. Chem.Senses 26:1145-1156.

Sato Y., Miyasaka N., Yoshihara Y. 2007. Hierarchical Regulation of Odorant Receptor Gene Choice and Subsequent Axonal Projection of Olfactory Sensory Neurons in Zebrafish. The Journal of Neuroscience 27(7):1606-1615.

Satou M. 1990. Synaptic organization, local neuronal circuitry, and functional segregation of the teleost olfactory bulb. Prog.Neurobiol., 34: 115-142.

Schild D. in Restrepo D. 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. Physiol.Rev. 78(2):429-466.

Schleicher S., Boekhoff I., Arriza J., Lefkowitz R. J., Breer, H. 1993. A β -adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90: 1420-1424.

Shoji T., Fujita K., Ban M., Hiroi O., Ueda H., Kurihara K. 1994. Olfactory responses of chum salmon to amino acids are independent of large differences in salt concentrations between fresh and sea water. Chem.Senses, 19: 609-615.

Sicard G., Holley A. 1984. Receptor cell responses to Odorants: Similarities and differences among odorants. Brain Res., 292: 283-296.

Sinnarajah S., Dessauer C. W., Srikumar D., Chen J., Yuen J., Yilma S., Dennis J. C., Morrison E. E., Vodyanoy V., Kehrl J. H. 2001. RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. Nature, 409: 1051-1055.

Sklar P. B., Anholt R. R. H., Snyder S. H. 1986 The odorant-senzitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. The Journal of Biological Chemistry, 261(33): 15538-15543.

Sorensen P. W., Caprio J. 1998. Chemoreception. In: The Physiology of Fishes. Evans, D. H. (ur.). CRC Press: 375-405.

Speca D. J., Lin D. M., Sorensen P. W., Isacoff E. Y., Ngai J., Dittman A. H. 1999. Functional identification of a goldfish odorant receptor. Neuron, 23: 487-498.

Suzuki N. 1982. Responses of olfactory receptor cells to electrical and chemical stimulation. In: Chemoreception in fishes. Hara T.J. (ed.). Elsevier Publishing: 93-108.

Taniguchi M., Kaba H. 2001. Properties of reciprocal synapses in the mouse accessory olfactory bulb. Neuroscience, 108: 365-370.

Trotier D., MacLeod P. 1983. Intracellular Recordings from Salamander Olfactory Receptor Cells. Brain Res., 268: 225-237.

Tsuboi A., Yoshihara S., Yamazaki N., Kasai H., Asai-Tsuboi H., Komatsu M., Serizawa S., Ishii T., Matsuda Y., Nagawa F., Sakano H. 1999. Olfactory neurons expressing closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. Journal of Neuroscience, 19: 8409-8418.

Valentinčič T., Wegert S., Caprio J. 1994. Learned olfactory discrimination versus innate taste responses to amino acids in channel catfish, Ictalurus punctatus. Physiol.Behav. 55(5):865-873.

Valentinčič T., Kralj J., Stenovec M., Koce A., Caprio J. 2000. The behavioral detection of binary mixtures of amino acids and their individual components by catfish. Journal Of_Experimental Biology, 203: 3307-3317.

Valentincic T., Koce A. 2000. Coding principles in fish olfaction as revealed by single unit, EOG and behavioral studies. Pflugers Archiv European Journal of Physiology 439 Suppl.:R193-R195.

Valentincic T., Miklavc P., Dolensek J. in Plibersek K. 2005. Correlations between olfactory discrimination, olfactory receptor neuron responses and chemotopy of amino acids in fishes. Chem.Senses 30 (suppl.1):i312-i314.

Vassar R., Chao S. K., Sitcheran R., Nunez J. M., Vosshall L. B., Axel R. 1994. Topographic Organization of Sensory Projections to the Olfactory Bulb. Cell, 79:981-991.

Wong S. T., Trinh K., Hacker B., Chan G. C. K., Lowe G., Gaggar A., Xia Z., Gold G. H., Storm D. R. 2000. Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leds to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. Neuron, 27: 487-497.

Yamamoto M. 1982. Comparative morphology of the peripheral olfactory organ in teleosts. In Hara, T. J. (Ed.), Chemoreception in fishes: 39-59. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company.

Zhang X., Firestein S. 2002. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. Nature Neuroscience, 5(2): 124-133

Zhao H., Ivic L., Otaki J. M., Hashimoto M., Mikoshiba K., Firestein S. 1998. Functional expression of mammalian odorant receptor. Science, 279: 237-242.

ZAHVALA

Zahvala velja:

prof. dr. Tinetu Valentinčiču za mentorski trud, članom komisije za zagovor doktorata za popravke disertacije, prof. dr. Johnu Capriu za kritično branje manuskripta članka, prof. dr. Andreju Blejcu za nasvete pri statistični obdelavi, programiranju SPLUS in za vsakoletna novoletna presenečenja, katedri za Fiziologijo živali (Gregor, Aleš in Andrej – hvala), staršem za visok prag tolerance, Niki za pomoč pri še_vedno_ne_najdem_rabim_takoj, Gagiju za bodrilne besede, dobro zabavo in vsakodnevno informiranje, kaj se dogaja, Kaji za to, da si bila vedno za debato in obilo glasne zabave

in Tadeji za veliko razumevanja in pomoči ter še več ljubezni.