



Обоняние

ДЖОН С. ЛЕФФИНГВЕЛЛ
Leffingwell & Associates, США
leffingwell@mindspring.com

Текст (<http://www.leffingwell.com/olfaction.htm>) переведен с согласия автора, дается с изменениями и сокращениями

Перевод с английского: С. М. Андреев, e-mail: sandr@online.ru

Вставки в тексте в квадратных скобках: С. М. Андреев

This review will explore the current status of our understanding of olfaction and provide in some detail the possible molecular interactions that specify odorant signaling.

Введение

Способность чувствовать запах, или обоняние — врожденное чувство, присущее и человеку, и большинству животных. С точки зрения эволюции это одно из самых древних свойств организма. Обоняние позволяет позвоночным животным и другим живым существам находить пищу, полового партнера, получать чувственное удовольствие (запах цветов или духов), а также принимать сигналы тревоги (например, испорченная пища, опасные химические вещества). Для людей и животных это один из самых важных способов общения с окружающей средой.

Общая физиология обоняния

Одоранты — это летучие химические соединения, которые при вдыхании попадают в верхнюю часть носовых ходов, где находится область, называемая *Regio olfactoria* (обонятельный эпителий) (рис. 1) [и специфически взаимодействуют с расположенными там хеморецепторами].

Для того чтобы вызывать запаховые ощущения, одорант должен обладать достаточно высокой летучестью, некоторой растворимостью в водной среде, низкой полярностью, способностью растворяться в жирах (липофильностью) и поверхностной активностью. До настоящего времени неизвестны одоранты с молекулярной массой больше чем 294* [1].

Обоняние позволяет различать очень большое число химических соединений в крайне низких концентрациях [2]. Зона обоняния в каждой из двух носовых полостей у человека занимает небольшую площадь, приблизительно 2,5 см², и содержит около 50 миллионов сенсорных

клеток (нейронов), от которых отходят два отростка — дендрит и аксон (рис. 2). Дендрит несет реснички, которые выходят из слоя обонятельного эпителия и погружаются в слой слизи (толщиной примерно 60 микрон), контактирующий, в свою очередь, с воздухом полости носа [2a]. Слизистый слой состоит из секретируемых липидов и мукополисахаридов, он предохраняет обонятельный эпителий от высыхания, а липиды слизистой помогают транспортировать молекулы одоранта к обонятельным рецепторам. Секреция слизи осуществляется железами Боумена, протоки которых расположены в обонятельном эпителии. Каждая рецепторная клетка несет от 8 до 20 ресничек, длиной от 30 до 200 микрон. Обонятельные реснички — именно то место, где начинается процесс восприятия запаха и передачи сенсорного сигнала под действием одоранта.

Слой эпителия состоит в основном из опорных и базальных клеток. Первые поддерживают нейроны и секретируют слизь, а вторые делятся путем митоза, когда назревает необходимость обновить нейроны вследствие гибели старых. Полное время обновления нейронов составляет примерно 40 дней. Эпителий содержит также пигментированные клетки — светло-желтые у людей, темно-желтые или коричневые у собак. Существовало мнение, что глубина цвета коррелирует с остротой обоняния.

В то время как сенсорные нейроны пронизывают эпителий насквозь, вплоть до контакта с атмосферой, на противоположной стороне эпителия аксональные отростки этих клеток собираются в пучки, в каждом из которых по 10–100 клеток. Они проходят через пластину решетчатой кости, достигая обонятельной луковицы головного мозга, где объединяются на постсинаптических клетках и образуют синаптические структуры, называемые гломерулами, или клубочками. Гломерулы объединяются в группы, из которых информация передается дальше. Например, у кролика 26 000 нейронов образуют 200 клубочков, из которых каждые 25 оканчиваются митральной клеткой. Таким образом, общая конвергенция составляет 1000:1 [3]. С физиологической точки зрения, такая конвергенция увеличивает чув-

Следует отметить, что автор при этом дает ссылку 1967 г. — Прим. ред.

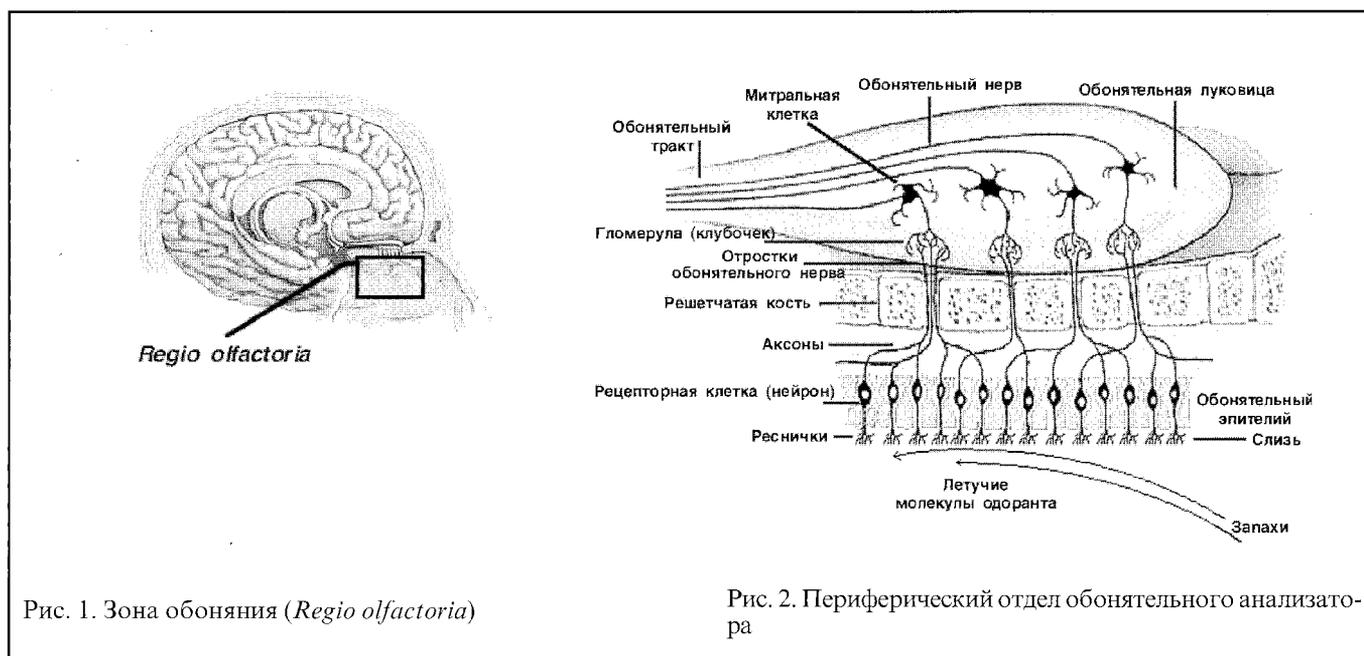
Рис. 1. Зона обоняния (*Regio olfactoria*)

Рис. 2. Периферический отдел обонятельного анализатора

ствительность сенсорного сигнала, посылаемого в мозг. Из митральных клеток сигнал попадает непосредственно в высший отдел центральной нервной системы, где и происходит декодирование сигнала, его сенсорная интерпретация и формирование ответа.

Рецепция запаха через тройничный нерв

Установлено, что обонятельный эпителий содержит и другую сенсорную систему — рецепторы тройничного нерва. Принимая во внимание, что обонятельная система у человека достаточно ограничена, пятый черепно-мозговой нерв (самый крупный черепно-мозговой нерв, отвечающий за чувствительность лица, зубов, рта, кожи черепа и моторику жевательных мышц) обеспечивает второй набор нервных окончаний, отвечающих за тактильную, компрессионную, болевую и температурную рецепцию в районе рта, глаз и носовой полости. На тройничные рецепторы способны воздействовать многие химические вещества, вызывая ощущения тепла, холода, покалывания, раздражения. Например, левовращающий ментол, (–)-ментол, в умеренных концентрациях вызывает ощущение холода в носовой полости, а при высоких концентрациях — ощущение «горячо». Подобные ощущения часто не ограничиваются областью носа, рта и глаз, а могут распространяться и на другие участки кожи, не имеющие окончаний от пятого черепно-мозгового нерва (особенно область гениталий), так что такие стимуляторы могут давать самые разные эффекты. Камфора, обладающая более сильным запахом, чем ментол, также дает «ощущение холода» при взаимодействии с рецептором тройничного нерва. Предполагается, что около 70% пахучих веществ способны стимулировать эти рецепторы, хотя, в общем, они в несколько раз менее чувствительны, чем обонятельные рецепторы [4].

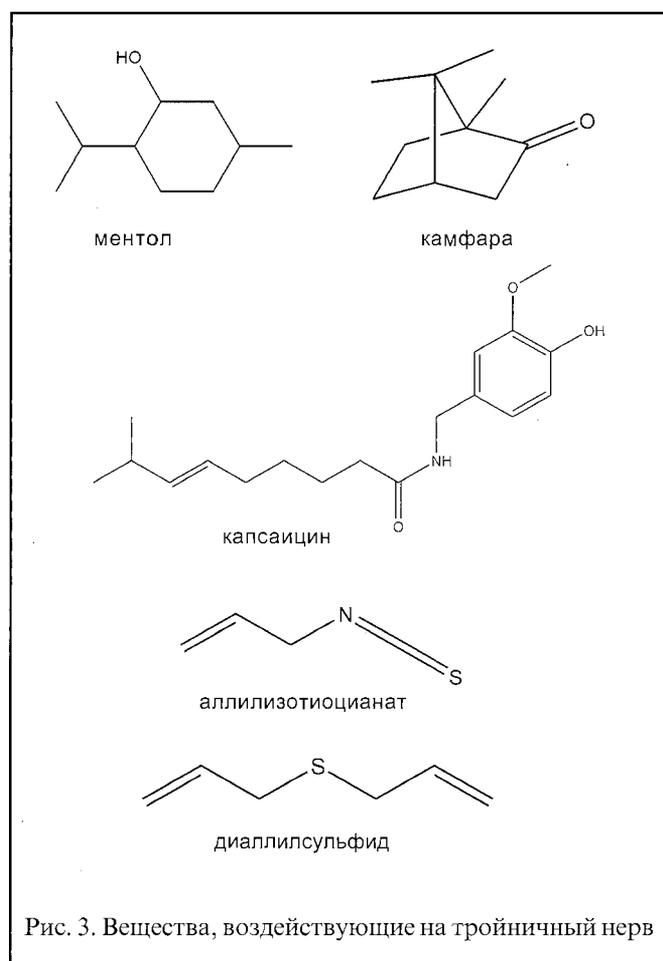
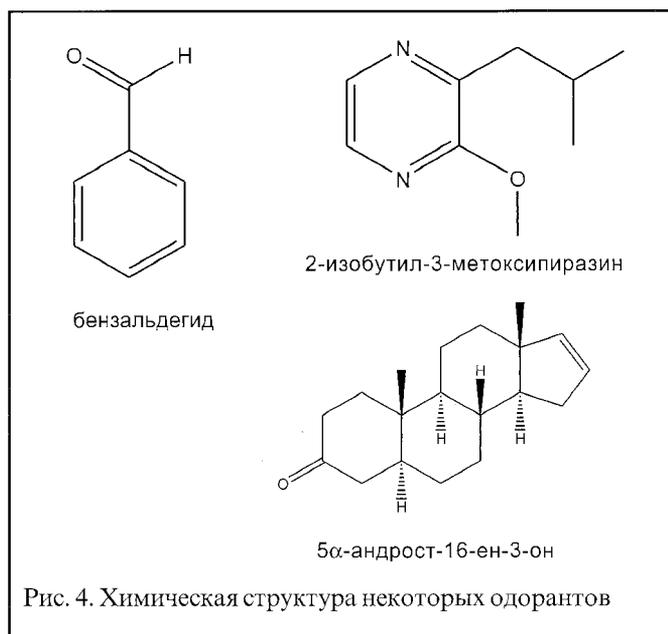


Рис. 3. Вещества, воздействующие на тройничный нерв

Другие широко известные агенты, воздействующие на тройничный нерв, включают аллилизотиоцианат (горчица, горчичное масло), капсаицин (острый чилийский перец, мускатный орех) и диаллилсульфид (лук) (рис. 3).



Белки, взаимодействующие с одорантами

В 1979 году ученые во главе со Стивеном Прайсом (Steven Price) [5] открыли в обонятельном эпителии белок, ответственный за связывание с пахучим веществом — анизолом. В то же время другая команда (Фесенко с соавт.) выделила белок, взаимодействующий с камфорой [6]. С тех пор так называемые «одорант-связывающие белки» (ОСБ) были обнаружены для целого ряда химических соединений, таких, как бензальдегид (вишнево-миндальный запах), 2-изобутил-3-метоксипиразин (запах зеленого перца), 5 α -андрост-16-ен-3-он (запах мочи) (рис. 4)

Роль ОСБ пока еще не вполне понятна. По одной из гипотез эти белки связывают одорант в водно-липидной среде слизистого слоя за счет гидрофобных взаимодействий, повышают его концентрацию и транспортируют к рецептору, расположенному в мембране ресничек. По другой гипотезе эти белки взаимодействуют одновременно с одорантом и с рецептором, способствуя перемещению одоранта через мембрану, причем ОСБ действуют как фильтр, предотвращая насыщение рецептора избытком одоранта.

Роль ОСБ стала яснее в 2000 году, уже после открытия липокалинов* (*lipocalins*) человека, участвующих в процессах сорбции одорантов. Липокалины — белки-носители для небольших гидрофобных молекул, они содержатся во многих биологических жидкостях. Термин «липокалин» предложен еще в 1987 г., он является про-

* Эти белки выполняют многие физиологические функции, такие, как транспорт витамина А, одорантов и феромонов, участие в синтезе простагландинов, иммунном ответе, воспалении и процессах детоксикации. Их молекулы имеют три важные особенности: связывают гидрофобные молекулы, связываются с наружными клеточными рецепторами и образуют комплексы с другими макромолекулами в растворе. — Прим. пер.

изводным от греческих слов *lipos* — жир и *calyx* — чаша. Недавно открытый липокалин человека, ОСБ Па, наиболее интенсивно вырабатывается в носовой полости и легких, то есть в структурах дыхательного тракта, а также в слюнной и слезной железах. Другой тип, ОСБ Пв, активен в органах, имеющих отношение к генитальной сфере — в предстательной и молочной железах [6a].

[Взаимодействие рецепторов с мембраной делает их трудным объектом для экспериментального изучения. Поэтому для анализа тонких особенностей взаимодействия одоранта с рецептором в качестве модели рецептора исследователи применили моноклональные антитела (МКА).] В 1988 году получены МКА к простым одорантам — анизолу и бензальдегиду [6b], а в 1999 году ученые из университета Цюриха получили МКА против более сложного гидрофобного соединения, «тразеолида», коммерчески доступного ароматного компонента мускуса — S,S-транс-6-ацетил-1-изопропил-2, 3, 3, 5-тетраметил-индана [6c]. Установлено, что даже такая небольшая молекула может продуцировать широкий набор антител с различной специфичностью. Проведенный рентгеноструктурный анализ кристаллического комплекса тразеолида с антителом при разрешении 2,6 ангстрем показал, что в связывании задействованы исключительно силы Ван-дер-Ваальса. Это исследование впервые продемонстрировало, в чем суть физической природы специфичности молекулы одорантов.

Обонятельные рецепторы

В 1991 г. Линда Бак (*Linda Buck*) [7] и Ричард Эксел (*Richard Axel*) (см. рис. 5) [8] открыли два семейства трансмембранных белков, которые, как они считали, и являются рецепторами обоняния, а также целый ряд кодирующих их генов. Ими было клонировано и охарактеризовано 18 различных членов этого очень большого семейства, кодирующих «7-спиральные трансмембранные белки» (*7 helical transmembrane proteins*). Экспрессия их происходит исключительно в обонятельном эпителии. Это был явный прорыв в понимании системы обоняния [9]. Все эти белки содержат 7 спиральных сегментов и имеют аминокислотную последовательность, сходную с последовательностями другого семейства рецепторов, сопряженных с G-белками (см. ниже подробности о мембранах и рецепторах, сопряженных с G-белками). Сейчас уже известно примерно 350 генов и 560 псевдогенов* запаховых рецепторов человека [7, 12f, 12c, 12h]. Такое число генов и псевдогенов, специфичных для системы обоняния, составляет почти 2% из 50 тыс. генов человека. Эта цифра уступает только числу генов рецепторов иммунной системы.

* Псевдогены — неактивные, но стабильные элементы генома, возникшие в результате мутаций в ранее работавшем гене, имеют поврежденную стоп-кодонами открытую рамку считывания. — Прим. пер.



Однако до начала 1998 года не существовало прямых доказательств того, что они и в самом деле являются генами, кодирующими рецепторы запаха. И только в январе 1998 года Файерштейн (*Firestein*) с сотрудниками [10] из Колумбийского университета весьма убедительно продемонстрировали, что это действительно так. В обонятельные нейроны крысы они встроили ген, после чего клетки с высокой интенсивностью начали синтезировать молекулы обонятельного рецептора. При подаче одоранта в нейронах генерировался очень сильный электрический импульс, существенно более высокий по сравнению с контролем [11]. Колумбийские ученые использовали два сцепленных гена, один из которых кодировал обонятельный рецептор крысы, называемый *rat 17*, а другой — ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Белок GFP выделяют из светящейся медузы, и он применяется сейчас в молекулярной биологии для маркировки генетически измененных клеток. [Указанные гены вводились с помощью инактивированного аденовируса, который служил им носителем и мог легко проникать в клетки.] Поскольку клетки с геном *rat 17* несли также и ген GFP, можно было отчетливо различать трансформированные клетки по яркому зеленому свечению при облучении их синим светом. Аспирант Файерштейна, Хейкин Жао (*Haiqing Zhao*), работающий сейчас в Медицинской школе Джона Хопкинса (*Johns Hopkins Medical School*), после таких генетических процедур обрабатывал обонятельные нейроны крыс различными одорантами и измерял электрическую активность нейронов, получая «электрооофактограммы». Активность была наивысшей, когда клеткам подавали октаналь — альдегид, запах которого для человека ассоциируется с мясом [12]. Интересно, что большинство ароматдегустаторов и парфюмеров описывают его аромат не как мясной, а скорее как насыщенно-фруктовый с цитрусово-апельсиновым оттенком. В этом исследовании на обонятельных рецепторах было изучено 74 одо-

ранта. Данная работа ответила на давно стоявшие вопросы: может ли отдельный рецептор распознавать различные одоранты, содержит ли отдельный нейрон различные рецепторы [12a]? По всей видимости, чтобы организм мог различать тысячи отдельных запахов, они должны как-то комбинироваться, т. е. один рецептор может реагировать с разными одорантами (но с разной силой) и, наоборот, молекула одоранта может взаимодействовать с разными рецепторами. В результате такой комбинации отдельный запах будет активировать множество гломерул в обонятельной луковице [12b]. Более детально эта проблема обсуждается в конце обзора*.

Гены обоняния

[Важную информацию о рецепторах обоняния должны были дать генетические исследования.] В 2000 г. доктор Дорон Ланцет (*Doron Lancet*) со своими коллегами из Вейсмановского Института Наук (*Weizmann Institute of Science Crown Human Genome Center*) создали автоматизированную базу данных для генов обонятельных рецепторов человека [12c, 12h]. [Их цель была найти все гены обоняния в геноме человека, информация о котором стала общедоступной после его расшифровки.] В процессе изучения они отобрали 906 человеческих генов-кандидатов, из которых более 60% были, по-видимому, псевдогенами.

По данным авторов проекта HORDE (*The Human Olfactory Receptor Data Explorer*) гены обоняния присутствуют практически во всех хромосомах человека, за исключением хромосом 20 и Y. Выяснилось, что хромосома 11 содержит их больше всего. Собранные данные очень важны в плане изучения эволюционного древа человека [12d, 12i].

В июне 2001 года сотрудники биотехнологической корпорации *Senomux* Зозуля, Эчеверри и Нгуен (*Zozulya, Echeverri, Nguyen*) опубликовали статью, озаглавленную «*The human olfactory receptor repertoire*» («Репертуар обонятельных рецепторов человека»), в которой они сообщили об идентификации и клонировании 347 полноразмерных рецепторных генов человека. Сравнительный анализ предсказанных последовательностей позволил им установить общие структурные особенности этого громадного семейства рецепторов. Они считают, что спектр найденных [с помощью компьютерного анализа] последовательностей представляет по существу полный репертуар действующих обонятельных рецепторов человека [12f]. Ценно то, что вся информация полностью доступна в интернете, включая и файл со всеми 347 первичными структурами рецепторов [12g].

* Перевод второй части обзора также будет опубликован в альманахе «Косметика и медицина». — Прим. ред.

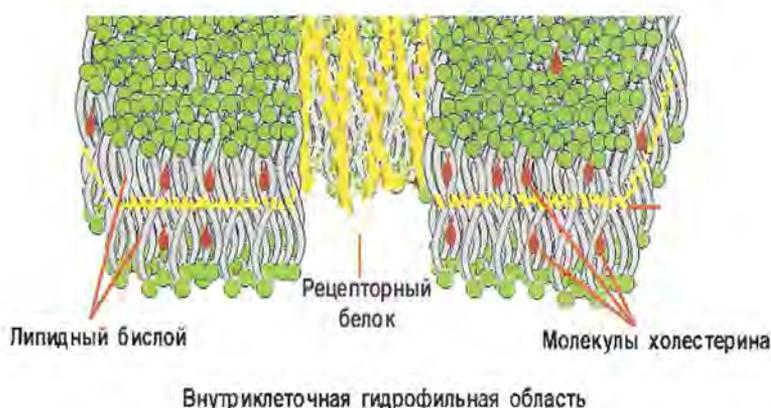


Рис. 6. Срез липидной мембраны с встроенным 7-спиральным рецепторным белком

Еще одна работа, посвященная уже идентификации мышинных генов рецепторов обоняния, появилась в журнале *Nature Neuroscience* от 22 января 2002 года [12]. Используя базу данных генома мыши, созданную корпорацией *Celera*, Стюарт Файерстейн и его сотрудник Ксинмин Жанг (*Stuart Firestein, Xinmin Zhang*) обнаружили в ней 1296 рецепторных генов (включая 20% псевдогенов). Оказалось, что гены человека расположены примерно в тех же участках, что и аналогичные мышинные гены. Все это говорит о том, что обонятельная система человека сохранила способность распознавать широкий спектр веществ несмотря на то, что человек потерял почти две трети рецепторов обоняния по сравнению с мышью.

Клеточная мембрана с рецептором

Рецепторы обоняния представляют собой белковые структуры, встроенные в клеточную мембрану и сопряженные с G-белками.

На рис. 6 изображена схематично биологическая мембрана со встроенным обонятельным рецепторным белком, спирали которого пересекают липидный бислой 7 раз туда и обратно. Мембрана состоит из фосфолипидного бислоя, на обеих сторонах которой, наружной и внутриклеточной, зеленым цветом обозначены гидрофильные отрицательно заряженные фосфатные группы. «Хвосты» фосфолипидов (углеводородные цепи), ориентированы навстречу друг другу (занимают центральную часть мембраны, обозначены серым цветом) и создают гидрофобное окружение. Такой липидный бислой

непроницаем для крупных молекул, плохо проницаем для заряженных ионов и достаточно проходим для гидрофобных молекул с небольшой молекулярной массой.

Клеточная мембрана представляет собой подвижную текучую структуру толщиной примерно 5 нм. Отдельные фосфолипиды быстро перемещаются вдоль плоскости этого слоя. Например, фосфолипиды бактериальных клеток могут переходить с одной стороны мембраны на другую всего за несколько минут, хотя это расстояние превышает размер их молекул в тысячи раз. Диффузия белков внутри мембраны также происходит, но гораздо медленнее из-за их большого размера.

Холестерин — необходимый компонент клеточных мембран, он помогает разрушать Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия и делать более плотной упаковку липидных хвостов фосфолипидов. [Холестерин увеличивает механическую прочность бислоя. Молекулы холестерина ориентируются в бислой таким образом, чтобы их гидроксильные группы примыкали к полярным головкам фосфолипидных молекул. При этом плоские стероидные кольца молекул холестерина обездвиживают участки углеводородных цепей, непосредственно примыкающих к полярным головкам. Остальные части углеводородных цепей не утрачивают своей гибкости. Холестерин предотвращает слипание и кристаллизацию углеводородных цепей, и таким образом предотвращается резкое уменьшение текучести мембран, которое в противном случае имело бы место при низкой температуре.]

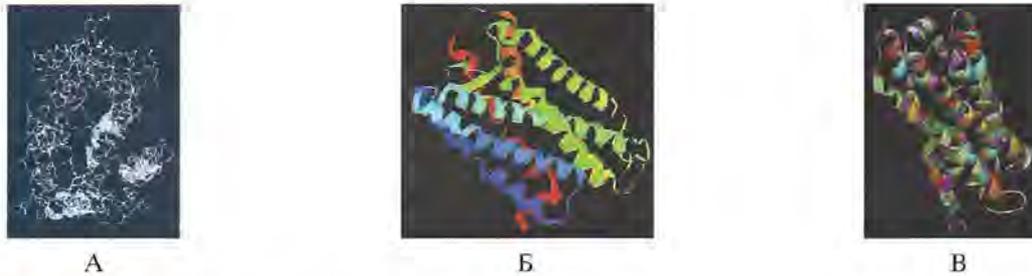


Рис. 7. Трехмерные модели рецепторного белка OR1.01.05

- А: Визуализация сделана с помощью программы *Swiss-Pdb Viewer*. Выделены голубым цветом комплементарные участки на спиральных 3, 4 и 5, связывающие одорант.
 Б: Визуализация с помощью программы *Chime*.
 В: Визуализация с помощью программы *Weblab Viewer*

Рецепторы, сопряженные с G-белками

Рецепторы, сопряженные с G-белками (*G-protein-coupled receptors, GPCR*), имеют очень древнее происхождение [13]. Они присутствуют даже у таких примитивных созданий, как плоские черви. Система GPCR относится к семейству фармакологически важных белков, для нее сейчас известно порядка 450 генов. В свою очередь, рецепторы обоняния являются одной из самых больших групп GPCR, описанных к настоящему времени. Эти рецепторы индуцируют синтез нейротрансмиттеров, циклоаденозинмонофосфата (цАМФ) и инозитолтрифосфата, вызывающих открытие катионных каналов и, в конечном счете, возникновение потенциала действия* и передачу сенсорного сигнала [14].

Чтобы представить зрительно структуру обонятельного рецептора (рис. 7), мы построили компьютерную модель человеческого рецептора OR1.01.05 (номенклатура корпорации *Senomyx*) на основе гомологии с молекулой родопсина**. Имея возможность моделировать трехмерные структуры, исследователи уделили большое внимание анализу участков контакта рецептора с одорантом, т. е. комплементарной области [14b–14d]. Док-

* Потенциал действия — быстрое изменение или сдвиг мембранного потенциала, в результате чего возникает нервный электрический импульс, передаваемый аксоном. — Прим. пер.

** Применение компьютерных моделей связано с тем, что пока невозможно получить кристаллы этих белков, а следовательно, провести рентгеноструктурный анализ их пространственной структуры. Это обусловлено тем, что нельзя отделить белки от мембран, не разрушив их структуру. Чтобы выйти из этой ситуации, в базе данных белковых структур (*SwissProt/ExPASy*) отыскивают белки с подходящей гомологией по аминокислотной последовательности и с уже установленной трехмерной структурой, а затем, используя их как матрицу, проводят расчет новой структуры и строят трехмерную модель на компьютере. Для просмотра моделей белков разработаны специальные программы визуализации (*viewer*). — Прим. пер.



Source: <http://rodin.ehp.ucsf.edu/online/infbio01/lanct1/>

Рис. 8. Относительная локализация спиральных сегментов обонятельного рецептора и его одорант-связывающего участка (*Pipel & Lancet, Protein Science 1999*)

тор Ланцет (*Lancet*) с сотрудниками пришли к заключению, что у рецепторных белков комплементарная область расположена в трансмембранных сегментах 3, 4, и 5 [14b] (рис. 8).

Однако Сингер (*Singer*) в своей статье «Анализ молекулярных механизмов взаимодействия октаналья с обонятельным рецептором *rat 17*» [14c] делает особый акцент на том, что октаналь связывается с рецепторной полостью (размером ~10 ангстрем), расположенной в доменах 3–7 на поверхности клетки. Результаты моделирования показывают, что аминокислотные остатки трансмембранных спиралей 3, 5, и 6 непосредственно участвуют в связывании, а спираль 4 может также играть важную роль, т. к. она расположена напротив спирали 3 и 5 и поэтому может изменять свое положение, если ключевые остатки спирали 4 подвергаются мута-



ции. Присутствие важного остатка *Lys* (лизин) в спирали 7 сходно с расположением той же аминокислоты у родственного белка родопсина, где *Lys-296* (спираль 7) связывает хромофор ретиналь [14e]. Замена этого остатка может изменить специфичность рецептора и переключить его на распознавание других функциональных групп.

G-белки

G-белки называются так потому, что они связывают гуанозинтрифосфат, ГТФ (GTP). Фактически G-белки представляют собой устройства, передающие сигнал (после получения стимула извне) от рецептора внутрь клетки через молекулы ферментов-посредников и ионные каналы*. После связывания одоранта с рецепторным белком сопряженный с ним G-белок передает сигнал аденилатциклазе, фосфолипазе C, K^+ -каналам и другим эффекторам.

На рис. 9 изображена модель трансмембранного 7-спирального рецепторного белка (сверху) и сопряженного с ним G-белка (внизу) в его тримерной форме (слегка модифицированная модель из лаборатории Бурне (*Bourne lab*: <http://www.cmp Pharm.ucsf.edu/bourne/index.html>)). Хорошо видно, как взаимодействуют аминокислотные остатки (красный и желтый цвет), входящие в β - и α -субъединицы G-белка (голубой и серый цвет соответственно). Эти субъединицы играют важную роль в связывании и высвобождении гуанозиндифосфата (ГДФ) (выделен зеленым цветом в центре β -субъединицы). Клеточная мембрана на рисунке изображена в виде двух желтых решетчатых полос. Следует отметить, что исследователи из Университета Вирджинии, Онейл и Гришем (*O'Neil & Grisham*) создали отличную динамичную модель G-белка в режиме интерактивной графики под названием «*G Protein molecular nanomachine*».

Сигнальный каскад, опосредованный цАМФ

Установлено, что основная передача рецепторного сигнала происходит через посредство молекулы цАМФ (циклический аденозинмонофосфат). Рецептор обоняния, связывая одорант, изменяет свою форму и взаимодействует с G-белком. G-белки построены из трех субъединиц: α -субъединица выполняет активную роль, β - и γ -субъединицы — регуляторные функции. В неактивном состоянии α -субъединица связана с молекулой ГДФ (гуанозиндифосфат).

* Каналы — это особые мембранные белки, формирующие в мембране поры, через которые осуществляется транспорт ионов. При открывании и закрывании ионных каналов изменяется распределение зарядов и происходит сдвиг мембранного потенциала; передача сигналов некоторыми клетками зависит от каналов с регулируемой проницаемостью — так называемых каналов с воротами. — *Прим. пер.*

G-белки являются не рецепторами, а посредниками второй стадии сигнального процесса. Цикло-АМФ контролирует открытие ионных каналов, управляя электрофизиологическим состоянием нейронов в ответ на обонятельный стимул. Когда обонятельный рецептор взаимодействует с G-белком, ГДФ отделяется от α -субъединицы и с ней связывается ГТФ. При этом формируется активное состояние («включено»). Как только α -субъединица связала ГТФ, она отходит от β - и γ -субъединиц, соединяется с ферментом аденилатциклазой и активирует ее. Активированная аденилатциклаза превращает аденозинтрифосфат (АТФ) в нейротрансмиттер цАМФ (рис. 10).

Цикло-АМФ, чья внутриклеточная концентрация сильно увеличивается после работы аденилатциклазы, работает как внутриклеточный гормон («вторичный мессенджер», *second messenger*). Он распространяется по цитоплазме, активирует ионные белковые каналы (иногда говорят — насосы) и открывает доступ ионам Ca^{++} через клеточную мембрану в нейрон. После этого нейрон генерирует сигнал в виде мембранного потенциала и электрического сигнала (специалисты говорят — генерация «спайка», от англ. *spike potential* — пиковый потенциал), что, в конечном счете, и представляет собой перенос хемосенсорной информации через аксон в обонятельную луковицу. Затем концентрация цАМФ уменьшается, т. к. он гидролизует до АМФ (аденозинмонофосфат).

Возврат G-белка в неактивное состояние осуществляется следующим путем: α -субъединица G-белка является ферментом, гидролизующим ГТФ до ГДФ в процессе активации аденилатциклазы. Таким образом, α -субъединица эффективно блокирует собственную активность. Как только ГТФ гидролизует до ГДФ, α -субъединица опять комплексуется с β - и γ -цепями, а G-белок возвращается в неактивное состояние.

Ионные каналы

Как уже упоминалось, взаимодействие рецептора с одорантом активирует G-белок и затем аденилатциклазу, что приводит к повышению внутриклеточного цАМФ в обонятельных клетках. Такие последовательные процессы называют каскадными. Появление ионного тока после непосредственной активации катионного канала циклическим АМФ является конечным этапом процесса, начало которому дало пахучее вещество. В присутствии нормальной физиологической концентрации внеклеточного кальция Ca^{++} вторичный мессенджер (т. е. цАМФ) индуцирует открытие канала и ток ионов Ca^{++} внутрь клетки. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{++} , по-видимому, активирует ток ионов хлора, что приводит к деполяризации обонятельных клеток и последующей передаче сигнала [15, 16].

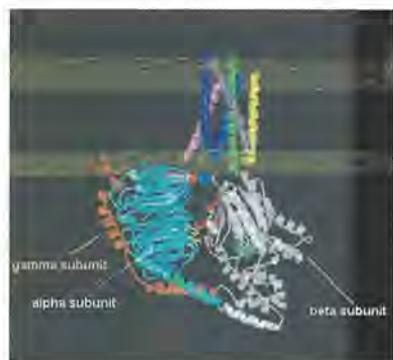


Рис. 9. G-белок и сопряженный с ним рецептор обоняния (GPCR) в клеточной мембране

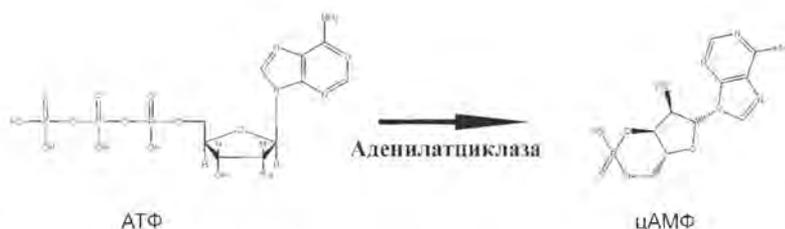


Рис. 10. Превращение АТФ в цАМФ под действием аденилатциклазы

Другие вторичные мессенджеры

У некоторых позвоночных животных запахи стимулируют быстрое увеличение концентрации как инозитолтрифосфата (ИТФ), так и цАМФ. Это указывает на то, что существуют два различных пути прохождения сигнала в обонятельных нейронах. Например, одоранты цитраль и эвгенол повышают уровень цАМФ, в то время как другие — лираль, лилиаль и этилванилин — повышают концентрацию ИТФ [16].

Инозитолтрифосфат

Таким образом, вторичный мессенджер, ИТФ, активно участвует в передаче сигнала запаха у млекопитающих. ИТФ-зависимый каскадный механизм в общих чертах сходен с тем, что описан выше для цАМФ-зависимого, но в химическом плане он имеет заметные отличия. В 1998 году Брир (*Breer*) с соавт. [18] установили, какой тип G-белка активируется при стимуляции изолированных обонятельных ресничек различными одорантами. Их результаты свидетельствуют о том, что отдельные одоранты запускают свои, специфические, каскады реакций, указывая на параллельные сигнальные пути в рецепции запаха. Один путь связан с генерацией цАМФ, другой — с генерацией ИТФ и диацилглицерина (ДАГ) [19]. Как ИТФ, так и ДАГ способны непосредственно влиять на уровень внутриклеточного кальция Ca^{++} . Таким образом, ясно, что системы, опосредованные цАМФ- и ИТФ/ДАГ, могут сосуществовать в одной и той же клетке, но активироваться разными одорантами [20]. Они могут даже иметь противоположные эффекты, т. к. повышение уровня кальция можно осуществлять путем активации Ca^{++} -зависимых K^+ -каналов, что может сильно поляризовать клетку, замедлить или вообще блокировать прохождение сигнала.

цГМФ

В сигнальном каскаде, опосредованном цАМФ, задействован также другой циклический нуклеотид — цГМФ (циклический гуанозинмонофосфат) [17]. Одоранты вызывают медленное, но продолжительное нарастание его уровня. Допускается, что частично это обусловлено активацией одной из двух рецепторных гуанилатциклазами кальция. Образующий цГМФ усиливает действие цАМФ путем активации аденилатциклазы, а цАМФ, наоборот, подавляет активность гуанилатциклазы и тем самым ограничивает эффекты цГМФ (см. роль окиси углерода).

Окись азота и окись углерода

Окись азота (NO) и окись углерода (CO), по-видимому, играют определенную роль в системе обоняния. NO оказывает существенное влияние на биологию синапсов различных отделов мозга вследствие его влияния на уровень цГМФ. За синтез NO ответственен фермент нитрооксидсинтаза (НОС). Например, у овец НОС вырабатывается в нейронах, митральных клетках и клубочках, в то время как субъединицы гуанилатциклазы, требуемые для стимуляции синтеза цГМФ, вырабатываются только в митральных клетках. Окись азота действует, по-видимому, как тормоз и внутриклеточный мессенджер, выделяясь из митральных и «клеток-зерен», она влияет на уровень цГМФ и усиливает выброс глутамата из митральных клеток. Исходя из этого, Кендрик (*Kendrick*) [21] предположил, что эффекты, формируемые в обонятельной луковице, влияют на функцию памяти к запахам. Это также согласуется с данными Окир (*Okere*) и соавт. [22], которые продемонстрировали, что введение окиси азота самкам мышей в район обонятельной луковицы может индуцировать специфич-



ческую память на запах феромона, даже если не было спаривания (активность их синапсов меняется под действием феромонов после спаривания). Кроме того, NO выполняет важную функцию в установлении активных контактов при развитии и регенерации обонятельных нейронов [23].

Эксперименты показали, что СО также может выполнять функции нейронного мессенджера, имеющего влияние на продукцию ЦГМФ, вовлеченного в процессы прохождения обонятельного сигнала в нейрон [24]. Обнаружено, что сигналы от эндогенного СО/ЦГМФ вносят свой вклад в обонятельную адаптацию, влияют на уровень запахового сигнала и чувствительность восприятия.

Таким образом, описанные исследования проливают свет на механизм того, как может одиночный кратковременный контакт с одорантом преобразоваться в длительно протекающие внутриклеточные процессы, как сигнал от одоранта проходит в центральную нервную систему, преобразуясь в ощущение запаха [25].

В следующем номере будет опубликована 2-я часть статьи «Обоняние», где будут рассмотрены теории запаха и последние новости на этом фронте.

Литература

(оформление ссылок дано по оригиналу)

- Demole, E., H. Wuest, Synthèses stéréosélectives de deux trioxydes $C_{18}H_{30}O_3$, stéréoisomères, d'ambreinolide et sclaréol-lactone a partir de dérivés du (+)-manool. *Helv. Chem. Acta*, 50: 1314 (1967).
- Ohloff, G., *Scent and Fragrances*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1994.
- 2a. The diagrams of the «Olfactory Region» and the «Olfactory Bulb» are adapted from a drawing that appears at <http://www.sciencenet.org.uk/database/Social/Senses/s00122b.html>.
3. <http://www.cf.ac.uk/uwcc/momed/jacob/index.html>.
4. Ohloff, G., *Scent and Fragrances*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1994, p. 6.
5. Goldberg S., J. Turpin and S. Price, Anisole binding protein from olfactory epithelium evidence for a role in transduction, *Chem. Senses & Flavour*, 4:207 (1979).
6. Fesenko E.E., V.I. Nonoselov and L.D. Krapivinskaya, Molecular mechanisms of olfactory reception, *Biochem. Biophys. Acta*, 587:424 (1979).
- 6a. Lacazette E, Gachon AM, Pitiot G., A novel human odorant-binding protein gene family resulting from genomic duplicons at 9q34: differential expression in the oral and genital spheres, *Hum Mol Genet*, Jan 22;9(2):289-301 (2000).
- 6b. Price, S., Willey, A., Effects of antibodies against odorant binding proteins on electrophysical responses to odorants, *Biochem Biophys Acta*, 965: 127ff (1988).
- 6c. Langedijk AC, Spinelli S, Anguille C, Hermans P, Nederlof J, Butenandt J, Honegger A, Cambillau C, Pluckthun A., Insight into odorant perception: the crystal structure and binding characteristics of antibody fragments directed against the musk odorant traseolide, *J Mol Biol* 1999 Oct 1;292(4):855-69.
7. Linda Buck: Information Coding in the Olfactory System, <http://www.hhmi.org/science/neurosci/buck.htm>.
8. Richar Axel: The Molecular Logic of Olfaction, <http://www.hhmi.org/science/neurosci/axel.htm>.
9. Buck, L. and R. Axel, A novel multigene family may encode odor recognition: a molecular basis for odor recognition, *Cell*, 65:175 (1991).
10. <http://www.columbia.edu/cu/biology/faculty/firestein/index.html>.
11. Zhao, H., L.Ivic, J.M. Otaki, M. Hashimoto, K. Mikoshiba, S. Firestein, Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science*, Jan 9;279(5348):237-242 (1998).
12. *Columbia University Record*, 23(12), Jan.23, 1998; <http://www.columbia.edu/cu/record/23/12/16.html>.
- 12a. Travis, John. Making Sense of Scents, *Science News*, April 10, 1999, Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB; Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, Mar 5;96(5):713-23 (1999); <http://www.hhmi.org/news/buck.htm>.
- 12b. Ronhi, A. Maureen, *Chemical & Engineering News*, Dec. 23, 1996.
- 12c. Glusman G., Bahar A., Sharon D., Pilpel Y., White J, *Lancet D.*, The olfactory receptor gene superfamily: data mining, classification, and nomenclature., *Mamm. Genome*, Nov;11(11):1016-23 (2000).
- 12d. *Lancet*, Doron, et al., Molecular recognition and evolution in biological repertoires: from olfaction to the origin of life (2000) at <http://www.weizmann.ac.il/Biology/open-day/images/lancet.pdf>.
- 12f. Sergey Zozulya, Fernando Echeverri & Trieu Nguyen, The human olfactory receptor repertoire, *Genome Biology* 2001 2(6): research0018.1-0018.12.
- 12g. Zozulya, et. al. <http://www.genomebiology.com/2001/2/6/research/0018/gb-2001-2-6-research0018-S1.asp>.
- 12h. Glusman G, Yanai I, Rubin I, *Lancet D.*, The complete human olfactory subgenome, *Genome Res*. 2001 May;11(5):685-702.
- 12i. Fuchs T, Glusman G, Horn-Saban S, *Lancet D*, Pilpel Y, The human olfactory subgenome: from sequence to structure and evolution. *Hum Genet* 2001 Jan;108(1):1-13.
- 12j. Zhang X, Firestein S., The olfactory receptor gene superfamily of the mouse, *Nat Neurosci.*, Feb;5(2):124-133 (2002).
13. Rice, Ken, The Evolution and Classification of G-protein-coupled Receptors, <http://www.cis.upem.edu/~krice/receptor.html> (1998).
14. Anholt, R.R., Molecular neurobiology of olfaction, *Crit. Rev. Neurobiol.* 7(1): 1-22 (1993).
- 14b. Pilpel, Y. and D. Lancet. The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins., *Protein Sci.*, May;8(5):969-77 (1999).
- 14c. Singer, Michael S., Analysis of the Molecular Basis for Octanal Interactions in the Expressed Rat I7 Olfactory Receptor, *Chem. Senses* 25: 155-165, (2000).
- 14d. Floriano WB, Vaidehi N, Goddard WA 3rd, Singer MS, Shepherd GM., Molecular mechanisms underlying differential odor responses of a mouse olfactory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Sep 26;97(20):10712-6 (2000).
- 14e. Singer, M. S., Weisinger-Lewin, Y., *Lancet*, D. & Shepherd, G. M., Positive selection moments identify potential functional residues in human olfactory receptors., *Recept. Channels* 4, 141-147 (1996)
- 14f. Leffingwell & Associates, Canton, GA, Press Release, February 13, 2002; Leffingwell, J.C., manuscript in preparation.
- 14g. Teller, D. C., Okada, T., Behnke, C. A., Palczewski, K., Stenkamp, R. E.: Advances in Determination of a High-Resolution Three-Dimensional Structure of Rhodopsin, a Model of G-Protein-Coupled Receptors (Gpcrs) *Biochemistry* 40 pp. 7761 (2001).
- 14h. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., Miyano, M.: Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor *Science* 289 pp. 739 (2000).
- 14i. Edelsbrunner H, Facello M, Liang J. On the definition and the construction of pockets in macromolecules. *Disc. Appl. Math.* 88:83-102 (1998).; Liang J, Edelsbrunner H, Woodward C., Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Science*. 7:1884-1897 (1998).; J. Liang, H. Edelsbrunner, P. Fu, P.V. Sudhakar and S. Subramaniam., Analytical shape computing of macromolecules I: molecular area and volume through alpha shape. *Proteins*. 33, 1-17 (1998).; Liang J, Edelsbrunner H, Fu P, Sudhakar PV, Subramaniam S., Analytical shape computation of macromolecules. II. Identification and computation of inaccessible cavities in proteins. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 33:18-29 (1998); <http://east.engr.uic.edu/cast/>
15. Karahashi, T. and K.W. Yau. Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells, *Nature*. May 6, 363(6424):71-74 (1993).
16. Schild, D. and D. Restrepo, Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells, *Physiol. Rev.*, 78(2):429-466 (1998).



17. Moon, C., P. Jaber, A. Otto-Bruc, W. Behr, K. Palczewski and G. V. Ronnett, Calcium-sensitive particulate guanylyl cyclase as a modulator of cAMP in olfactory receptor neurons, *J. Neurosci.*, 18(9): 3195-3205 (1998).
18. Jia, C. P. and M. Halpern, Subclasses of vomeronasal receptor neurons: Differential expression of G proteins (*Gia2* and *Goa*) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res.* 719, 117-128 (1996); and Schandar M., K.L. Laugwitz, I. Boekhoff, C. Kroner, T. Gudermann, G. Schultz, H. Breer, Odorants selectively activate distinct G protein subtypes in olfactory cilia., *J. Biol. Chem.*, Jul 3; 273(27):16669-16677 (1998); Breer H, Boekhoff I, Second messenger signalling in olfaction. *Curr Opin Neurobiol* 2:439-443 (1992); Schild D, Restrepo D, Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev* 78:429-466 (1998).
19. See also <http://www.monell.org/neuroscience.htm>.
20. Kashiwayanagi, M., K. Shimano, K. Kurihara, Responses of single bullfrog olfactory neurons to many odorants including cAMP-dependent and independent odorants: existence of multiple receptors in single neuron. *Brain Res.* 738, 222-228 (1996). See also http://www.anachem.umu.se/mirrors/CCAB97/1st/mini_review/mr008/kashiwayanagi.html#references.
21. Kendrick K.M., R. Guevara-Guzman, J. Zorrilla, M.R. Hinton, K.D. Broad, M. Mimmack, S. Ohkura, Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature*, Aug 14;388(6643):670-674 (1997).
22. Okere, C.O., H. Kaba, T. Higuchi, Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. *Neuroscience*, Mar;71(2):349-354 (1996).
23. Roskams A.J., D.S. Bredt, T.M. Dawson, G.V. Ronnett, Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons., *Neuron*, Aug;13(2):289-299 (1994).
24. Ingi T, Ronnett GV, J Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons. *Neurosci.*, Dec;15(12):8214-8222 (1995).
25. Zufall, F., T. Leinders-Zufall, Identification of a long-lasting form of odor adaptation that depends on the carbon Monoxide/cGMP second-messenger system. *J. Neurosci.*, Apr 15;17(8):2703-2712 (1997).

Справочная информация к статье «Обоняние»

Составитель: к. б. н. Виктория Гулимова (см. статью «Запах и подсознание: влияние обонятельных стимулов на эмоциональное восприятие и поведение человека», опубликованную в этом номере, стр.6–23)

Воздействие одорантов у животных может восприниматься пятью рецепторными системами: основным органом обоняния, дополнительной или вомероназальной системой, терминальным нервом, ветвями тройничного нерва, а также органом Мазера, открытым недавно и пока малоизученным. Основной орган обоняния состоит из периферической части, включающей обонятельный, или рецепторный, эпителий (ОЭ), и обонятельный нерв. К центральному отделу традиционно относят обонятельную луковицу (ОЛ) и обонятельный мозг (зоны проекции ОЛ в переднем мозге), который является частью лимбической системы. ОЭ расположен в верхней части носовой перегородки и покрывает верхнюю носовую раковину. Он представляет собой псевдомногослойный эпителий, клетки которого расположены в один ряд, а их ядра — на разных уровнях, что создает иллюзию многослойности. Ряд состоит из трех типов клеток: 1) чувствительных или рецепторных (обонятельных нейронов), 2) опорных или поддерживающих эпителиоцитов и 3) базальных клеток. Вомероназальный эпителий имеет сходное строение, однако рецепторы его отличаются от основных обонятельных и лежат не в носовых ходах, а в маленьких кармашках вомероназального органа (ВО), расположенных по бокам носовой перегородки в ее основании.

Рецепторная клетка имеет тело и два отростка — аксон и дендрит. Поверхность дендрита обращена в полость носа (если это основной ОЭ) или в полость вомероназального органа (ВО). Она может формировать выпячивание (так называемую обонятельную булаву) и покрыта длинными подвижными ресничками (в ОЭ) или неподвижными тонкими выростами — микровиллами (в ВО). На этих выростах расположены рецепторы. По-видимому, в ОЭ также есть чувствительные микровиллярные клетки, а в ВО — ресничные, хотя и в небольшом количестве. Функциональная разница между ними состоит в том, что ресничные клетки воспринимают обычные запахи, а микровиллярные — неосознаваемые, обладающие способностью направленно влиять на половое, родительское и социальное поведение. Аксоны рецепторных клеток собираются в пучки обонятельного и вомероназального нервов. Эти нервы иногда называют безмиелиновыми, что не совсем точно: их волокна имеют миелиновую оболочку, но она значительно тоньше, чем у большинства других нервов. По аксонам сигнал передается из ОЭ в основную ОЛ, а из нее по обонятельному тракту в переднее обонятельное ядро и структуры лимбической системы (ЛС). От рецепторов ВО информация направляется в дополнительную ОЛ, из которой попадает в миндалу.

Опорные клетки, помимо чисто механической функции, секретируют слизь и, возможно, участвуют в переносе одорантов.

Базальные клетки остаются недифференцированными и обладают способностью к делению — с их помощью обновляются рецепторные и опорные клетки.

Сквозь ОЭ проходят и открываются в полость носа протоки трубчатого альвеолярного (Боуменовых) желез, которые выделяют слизь, содержащую мукопротеиды. Слизь увлажняет поверхность рецепторного эпителия и является жидкой средой, в которой растворяются молекулы одорантов.

ОЭ у большинства животных отличается по цвету от респираторного. Последний обычно розоватый, а ОЭ может быть даже черным с золотом (у рыб) или бурым (у амфибий). У большинства млекопитающих и человека он желтовато-коричневый, у птиц — желтый. Эта окраска может быть связана с наличием пигмента в клетках ОЭ или боуменовых желез, но не исключено и то, что цвет ОЭ обусловлен липоидными гранулами, содержащимися в апикальных частях опорных клеток. По-видимому, окраска ОЭ и острота обоняния между собой не связаны, хотя существуют и альтернативные точки зрения.

ОЛ построены по типу коры больших полушарий головного мозга и состоят из концентрически расположенных шести слоев клеток:

- 1) слой обонятельных волокон (состоит из аксональных пучков, образованных выростами рецепторных клеток;
- 2) клубочковый слой. Состоит из структур, напоминающих по внешнему виду клубочки, образованные окончаниями аксонов чувствительных клеток, наружными клетками-зернами, а также окончаниями митральных клеток и клеток с султанами;
- 3) наружный сетевидный (плексиформный) слой. Образован дендритами митральных клеток и клетками с султанами;
- 4) слой тел митральных клеток. Кроме них содержит отростки внутренних клеток-зерен;
- 5) внутренний плексиформный слой. Состоит из аксонов митральных клеток и клеток с султанами, а также из отростков внутренних клеток-зерен;
- 6) слой мякотных волокон и внутренних клеток-зерен. Волокна, выходящие из ОЛ по направлению к мозгу, образуют обонятельный тракт. По нему сигналы передаются в ЛС — комплекс структур переднего и промежуточного отделов мозга, составляющих субстрат эмоционально обусловленного врожденного поведения.