

## مطالعه الکتروفیزیولوژیکی مراحل رشد و نمو لایه گلوبولوی

### در پیاز بویایی موش

دکتر فرهاد شفا و زهرا اوسطی آشتیانی

مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران

#### چکیده

از آنجا که مطالعات هیستولوژیکی و سورفولوژیکی وجود سلول یالایه و سیناپس را نشان میدهد ولی فعالیت فیزیولوژیکی آن را مشخص نمی‌نماید برآن شدیم مراحل رشد و نمو لایه گلوبولوی پیازبویایی را با روشهای الکتروفیزیولوژیکی مورد مطالعه قرار دهیم. این مطالعه بر اساس ویژگیهای «کاهش انتقال پتانسیل»<sup>۱</sup> و «انتقال محور پایه»<sup>۲</sup> که هر دو نماینده فعالیت لایه گلوبولوی پیازبویایی هستند انجام گرفت و چنین نتیجه شد که این لایه از سن ۱۲ روزگی به بعد خصوصیات الکتروفیزیولوژیکی بالغ بخود میگیرد و عبارت دیگر از نظر بلوغ الکتروفیزیولوژیکی سنین ۱۵-۱۲ روزگی مرحله حساسی میباشد و همچنین میتوان نتیجه گرفت که بلوغ فیزیولوژیکی کمی (حدود ۱ یا ۲ روز) بعد از بلوغ هیستولوژیکی و بیوشیمیایی پیاز انجام میپذیرد. با توجه باینکه سیناپسهای سیترال به گرانول و گرانول به سیترال و فعالیت خود بخود سلولهای سیترال و تافتد از ده روزگی به بعد ویژگیهای بلوغ را نشان میدهند میتوان گفت که مکانیزمهای داخل پیاز تقریباً همزمان به بلوغ میرسند. از تجاربی که بر روی حیوانات محروم از حس بویایی انجام گرفت این نتیجه بدست آمد که پیاز بویایی حیوان نابویا از نظر دو ویژگی کاهش انتقال پتانسیل و انتقال محور پایه کم و بیش شبیه حیوان نرمال است که با نتایج هیستولوژیکی مطابقت دارد. در این حیوانات علی‌رغم اینکه کاهش چشمگیری در ضخامت لایه ها و تعداد سلولهای سیترال و تافتد دیده میشود، در تعداد گلوبولوها تغییری پدید نمیآید و از این جنبه شبیه حیوانات عادی هستند و آزمایشهای ما نشان داد که از نقطه نظر دو ویژگی «انتقال محور پایه و کاهش انتقال پتانسیل» نیز این حیوانات شبیه حیوانات نرمال میباشند باین ترتیب این نتیجه وابستگی این دو پدیده را به ساختمان گلوبولوی تأیید میکند.

## **An Electrophysiological study on the development of the glomerular layer in Rat's olfactory bulb**

**Dr. F. Shafa and Z. Ousati - Ashtiani**

*Institute of Biochemistry and Biophysics Tehran University*

#### **Abstract**

When the electrophysiological response of the olfactory bulb to lateral olfactory tract stimulation is compared with its response to olfactory nerve stimulation, two major differences appear in the field potentials thus obtained. These have been investigated and ascribed to the activity of the glomerular layer by Freeman. In this study we explored the electrophysiological maturation of the glomerular layer in normal and anosmic bulbs of postnatal rats using these two characteristics, named the «Base line shift» and the «Transmission attenuation». The results revealed that both the transmission attenuation (which appear to be related to the glomerular structure as a whole and its glial encapsulation) and the base line shift began to show mature characteristics after day 12 and were



completely matured by day 15. This is in accord with anatomical findings which show histological maturation of glomerular structure and synapses precede the electrophysiological maturity by a few days.

In anosmic bulbs the responses with regard to the characteristics under consideration, are more or less like normal animals.

سازند و چون از طریق آنتی درومیک تحریک رسیده به جسم سلولی سلولهای میترا و تافتند برای ایجاد پتانسیل عمل در گلوبولها کافی نیست لذا سلولهای پری گلوبول تحریک نشده و امواج به زیر محور پایه تمایل دارند (Feeman, 1975) اختلاف دوم در پاسخ پیام به دو تحریک متوالی دیده میشود هنگامیکه تحریک از طریق عصب بویایی داده شود پاسخ به تحریک دوم کوچکتر از پاسخ اول است ولی هنگامیکه تحریک از طریق راه جانبی بویایی انجام گیرد پاسخ ها همگی دامنه های یکسان خواهند داشت (Freeman و 1974a, b) این تفاوتها مربوط به این است که تحریک از طریق عصب بویایی سلولهای پری گلوبول را نیز تحریک میکند و در نتیجه پاسخ های داخل گلوبول تحت تأثیر فعالیت این سلولها قرار میگیرد ولی تحریک از طریق راه جانبی بویایی تأثیری در فعالیت سلول پری گلوبول ندارد از این رو در مطالعه رشد و تکامل پیام میتوان از دو خصوصیت ذکر شده بعنوان نماینده فعالیت لایه گلوبول استفاده کرد.

### مواد و روش

آزمایشات بر روی موشهای سفید صحرایی<sup>۱</sup> در سنین مختلف از ۶-۵ روز انجام گرفت. این حیوانات در حیوانخانه مرکز تحقیقات بیوشیمی-بیوفیزیک در شرایط یکسان با حرارت ۲۵ درجه و نور ثابت که متناوباً ۱۲ ساعت نورو ۱۲ ساعت تاریکی است با غذاهای پیش ساخته پرورش یافته اند. جهت بیهوش کردن حیوانات از ماده یورتان به میزان ۳۵ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن استفاده شد. الکتروود شیشه ای ثابت با ابعاد ۱-۳ مگا اهم که در آزمایشگاه بوسیله دستگاه سازنده الکتروود از لوله های شیشه ای بقطر ۱/۵ میلیمتر و طول ۶ میلیمتر ساخته شده جهت ثبت پاسخهای الکتریکی بکار رفت. الکتروود محرك نیز فلزی و از نوع استیل زنگ نزن<sup>۵</sup> بود. برای شروع کار ابتداء حیوان را بیهوش کرده و سپس پوست سرو ماهیچه ای که روی پیام بویایی قرار دارد برداشته شد و استخوان سر را تراشیده و کنار زده تا پیام بویایی نمایان گردد. بعد از آماده شدن حیوان آن را در قفس فاراده قرار داده و بوسیله استرنوتاکسیس سر حیوان را ثابت کرده و الکتروود محرك، روی عصب بویایی یا راه

### مقدمه

در موش صحرایی<sup>۱</sup> پیامهای بویایی بصورت برجستگیهای گلابی شکل در جلوی مغز قرار دارند و در آن هفت لایه مشاهده میشود: ۱- لایه اعصاب بویایی ۲- لایه گلوبول ۳- لایه مشبک خارجی ۴- لایه سلولهای میترا ۵- لایه مشبک داخلی ۶- لایه گرانولی ۷- لایه دوربطنی. در شکل ۱ برش طولی از پیام بویایی بالایه های آن دیده میشود و در شکل ۲ این لایه ها و ارتباطات سیناپسی بطور شماتیک نشان داده شده است.

تحریک چه از طریق عصب بویایی<sup>۲</sup> و چه از طریق راه جانبی بویایی<sup>۳</sup> در پیام پدیده الکتریکی ایجاد میکند که از یک دسته امواج سینوسی تشکیل شده اند. دامنه این پتانسیلها بتدریج تقلیل مییابد. امواج سینوسی و تناوبات نتیجه تأثیر متقابل سلولهای میترا و گرانول است. سلولهای گرانول در اثر فعالیت خود بخودی سلول میترا و یا زمانی که سلول میترا تحریک شده شروع به فعالیت میکند و بر روی سلول میترا اثر باز دارندگی میگذارد (Mori & Tagahi, 1977) که باعث کم شدن فعالیت سلول میترا میشود و هنگامی که این اثر باز دارندگی کاهش یافته و یا از بین برود سلول میترا مجدداً فعالیت میکند و نتیجه این فعالیت سلول میترا و گرانول بصورت تناوبات دیده میشود.

(Nicoll, 1969, Shepherd, 1971, Shafa, & Bidanjiry, 1981).

بر خلاف شباهت امواجی که از طریق تحریک عصب بویایی حاصل میشود با پاسخی که از تحریک راه جانبی بویایی بدست میآید، دو تفاوت عمده بین این دو پاسخ دیده میشود: اول اینکه پتانسیل های حاصل از تحریک عصب بویایی در لایه گرانولی در مقایسه با پتانسیل های این لایه در پاسخ به تحریک راه جانبی بویایی همگی به سمت مثبت گرایش دارند (Freeman, 1972) یعنی در تحریک راه جانبی بویایی امواج به سمت منفی متمایل میشوند و این بعلاوه عدم تحریک و فعالیت سلولهای پری گلوبول است زیرا انشعابات انتهایی دندریت سلولهای تافتند و میترا که با سلولهای پری گلوبول سیناپس میکنند باید پتانسیل عملی ایجاد کنند که در نتیجه آن، سلولهای پری گلوبول را فعال

1 - Rat

2 - Olfactory Nerve = O. N

3 - Lateral olfactory tract = L. O. T

4 - Albino Rat

5 - Stainless Steel



مشخص نیست و نسبت سلولهای درشت در این لایه بیشتر است یعنی سلولهایی که در این لایه دیده میشوند از نوع سلولهای تافتد هستند و در حیوان ۵ روزه است که این لایه تاحدی مشخص شده و از این به بعد کاملتر میگردد بطوریکه تعداد گلوبولها بین ۱ تا ۶ روزگی ۱ برابر میشود و زیاد شدن گلوبولها همراه با افزایش سلول پری گلوبول است و انواع مختلف سیناپسهای گلوبولوی بخصوص آنهایی که بین اعصاب بویایی و سلولهای میترا ل وجود دارند، در زمان تولد دیده میشوند اما تعداد آنها در مقایسه با حیوان بالغ کمتر است (Hinds & Hinds, 1976) گرچه اولین سیناپسها که دیده میشوند در لایه گلوبولوی هستند ولی ساختمان گلوبولوی در حوالی ده روزگی شروع به نشان دادن ویژگیهای بلوغ میکند و بلوغ الکتریکی لایه گلوبولوی که «انتقال محور پایه» است رامیتوان با مقایسه پاسخهای حاصل از تحریک عصب بویایی و راه جانبی بویایی در سنین مختلف مشخص کرد. آزمایشهای مابین مسئله را روشن کرد که در حیوان بالغ تا سن ۱۵ روزه پاسخهای حاصل از تحریک عصب بویایی به سمت بالای خط پتانسیل تمایل دارند و پاسخهای حاصل از تحریک راه جانبی بویایی به سمت زیر خط پایه گرایش دارند که این امر عدم تحریک سلولهای پری گلوبول از این طریق را نشان میدهد. ولی در پاسخهای حاصل از تحریک عصب بویایی حیوان ۱۲ روزه مشاهده شد که از نقطه نظر انتقال محور پایه واکنشهای حاصله شبیه به پاسخی است که از طریق راه جانبی بویایی بدست میآید یعنی با وجودیکه تحریک از طریق عصب بویایی است ولی امواج به زیر خط پایه تمایل دارند. از این رو میتوان نتیجه گرفت که در حیوان ۱۲ روزه سلولهای لایه پری گلوبول بلوغ کافی ندارند و روزهای ۱۵-۱۲ از نظر بلوغ الکترو-فیزیولوژیکی سلولهای لایه گلوبولوی و سیناپسهای آنها با سلول میترا ل دوره حساسی است. در خصوص ویژگی کاهش انتقال پتانسیل نیز قبلاً ذکر گردید که چنانچه دو تحریک متوالی به عصب بویایی داده شود پاسخ دوم کوچکتر است که این خصوصیت بستگی به ساختمان گلوبولوی و جدار گلیایی آن دارد ولی در تحریک راه جانبی بویایی دامنه دو پاسخ یکسان است. آزمایشها تا سنین ۱۵ روز این خصوصیت را نشان داد و از آن به بعد یعنی در سنین ۱۲ روز و کمتر پاسخی که در اثر تحریک به دو محرک متوالی در عصب بویایی حاصل شد دامنه یکسان داشتند و مشابه پاسخهای حاصله از راه جانبی بویایی بود، که این خود نشانه دیگری در تأیید این امر است که در این سن لایه گلوبولوی بطور بالغ کار نمی کند.

در خصوص حیوانات محروم از حس بویایی میتوان چنین گفت که محرومیت در گلوبولها اثر کمی دارد و نتیجتاً واکنش الکتروفیزیولوژیکی مربوط به این لایه نیز تقریباً عادی است.

جانبی بویایی و الکتروود ثبات به فواصل مختلف از الکتروود محرک بر روی پیاز گذاشته شد جریانهای مربعی شکل ' توسط دستگاه محرک با مدت برابر ۱ هزارم ثانیه و به فاصله زمانی ۳ ثانیه ایجاد شده و به محل تحریک رسیده و پاسخهای حاصله بوسیله الکتروود ثبات گرفته و پس از تقویت و حذف امواج اضافی بر روی اسیلوسکوپ مشاهده گردید. برای ایجاد محرومیت از حس بویایی در حیوان، در سنین ۳ روزگی پس از بیهوش کردن حیوان یکی از سوراخهای بینی را توسط یک سیله داغ سوزانده شد و پس از چند ساعت نزد مادر برگردانده شد تا در سنین مورد نظر تحت آزمایش قرار گیرد.

### نتایج

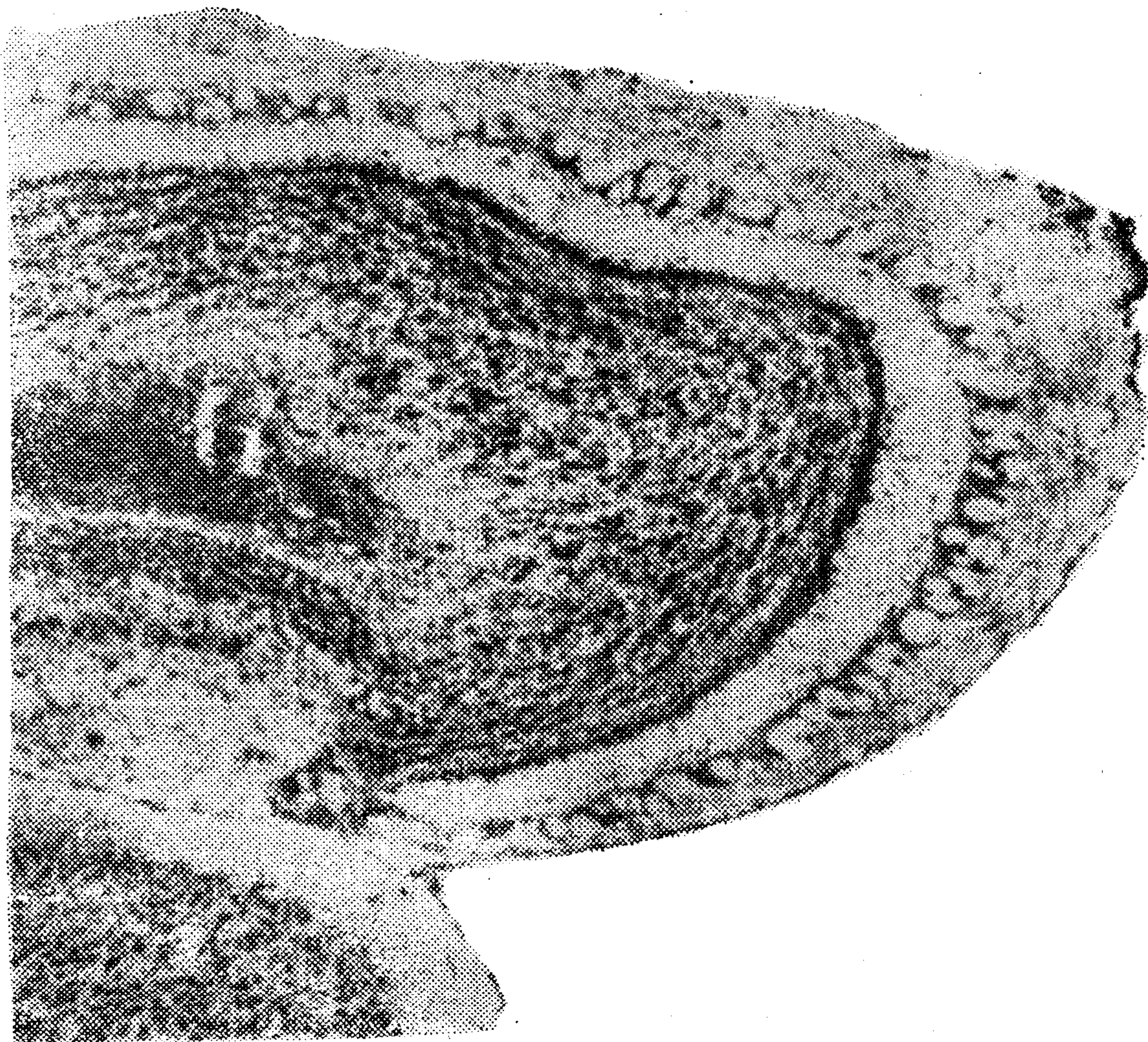
پاسخهای حاصل از تحریک عصب بویایی و راه جانبی بویایی در شکلهای ۳ و ۴ بطور خلاصه نشان داده شده است. همانطور که مشاهده میشود پاسخی که در اثر تحریک عصب بویایی در حیوان ۶-۱۵ روز دیده میشود نشان دهنده فعالیت الکتریکی سلولهای مختلف موجود در پیاز بویایی است و اثر فعالیت سلولهای پری گلوبول که نتیجه آن قرار گرفتن امواج حاصله در بالای خط پتانسیل صفر است بخوبی قابل مشاهده میباشد. پاسخهای حاصل از تحریک راه جانبی بویایی مشابه تحریک عصب بویایی است با این تفاوت که امواج حاصله به سمت پائین خط پایه گرایش دارند و این امر نشان دهنده عدم تحریک و فعالیت سلولهای پری گلوبول است. از سنین ۱۲ به پائین با وجودیکه تحریک از طریق عصب بویایی انجام گرفته ولی تاثیر سلولهای پری گلوبول مشاهده نمیشود و این امر نشان دهنده بالغ نبودن لایه پری گلوبولوی در این سن میباشد و در سنین ۷ روز و پائین تر نیز غیر فعال بودن سلولهای پری گلوبول و عدم تناوبات که مؤید نابالغ بودن سلولهای گرانول است مشاهده میگردد.

در پاسخ به دو تحریک متوالی به عصب بویایی پیک دوم کوچکتر است که این خصوصیت بستگی به ساختمان گلوبولوی دارد ولی در پاسخ به دو تحریک متوالی راه جانبی بویایی این کاهش انتقال پتانسیل دیده نمیشود و دو پیک معمولاً دامنه یکسان دارند و گاهی پاسخ دوم قدری بزرگتر است ولی در سنین پائین این تقلیل واکنش در پاسخ دو تحریک به عصب بویایی دیده نمیشود (شکل ۵) این امر نیز نشانه بالغ نبودن ساختمان گلوبولوی است. پاسخهای حاصله در حیوان نابویا کم و بیش شبیه حیوان نرمال است ولی فعالیت سلولهای پری گلوبول کمی ضعیف است.

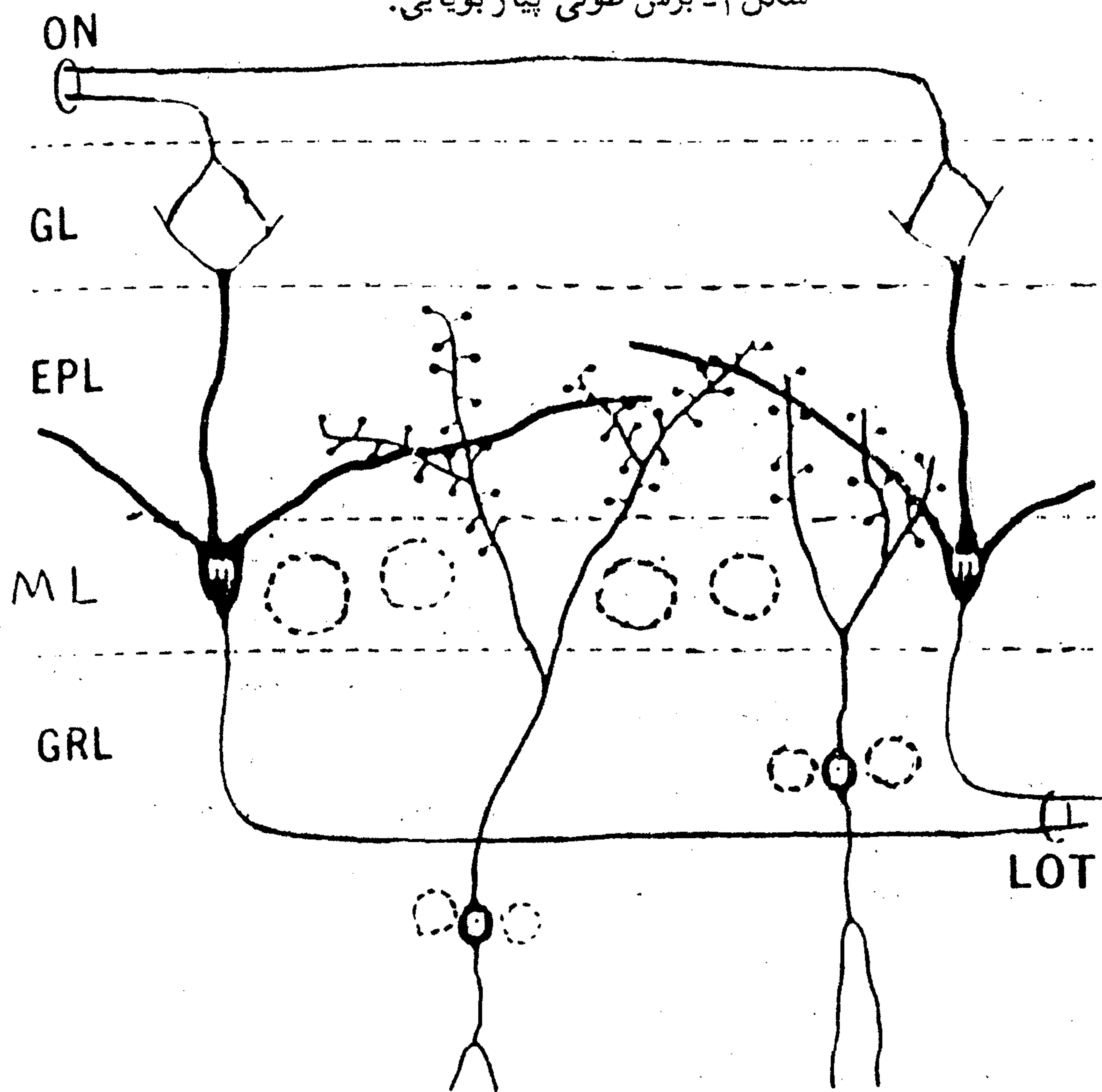
### بحث

همانطور که اشاره شد انتقال محور پایه در ارتباط با بلوغ لایه پری گلوبولوی است. مطالعات آناتومیسی و هیستولوژی (Meisami, 1979) نشان میدهد که در هنگام تولد لایه گلوبولوی





شکل ۱- برش طولی پیاز بویایی.



شکل ۲- دیاگرام شماتیک ارتباطات سیناپسی در لایه‌های مختلف پیاز بویایی.

ON = Olfactory Nerve

GL = Glomerular Layer

EPL = External Plexiform Layer

ML = Mitral Layer

GRL = Granular Layer

لایه عصب بویایی

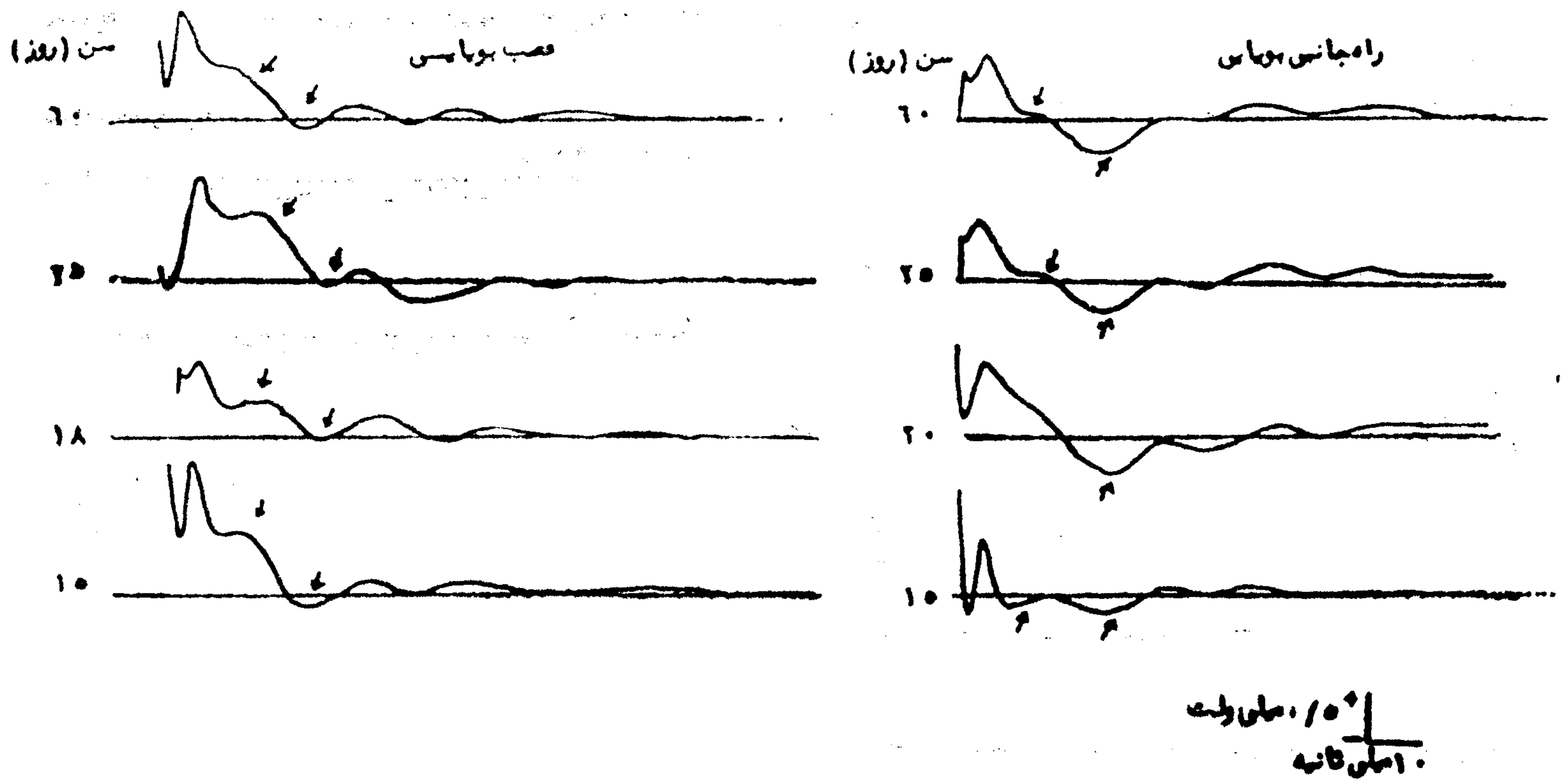
لایه گلوبرولی

لایه مشبک خارجی

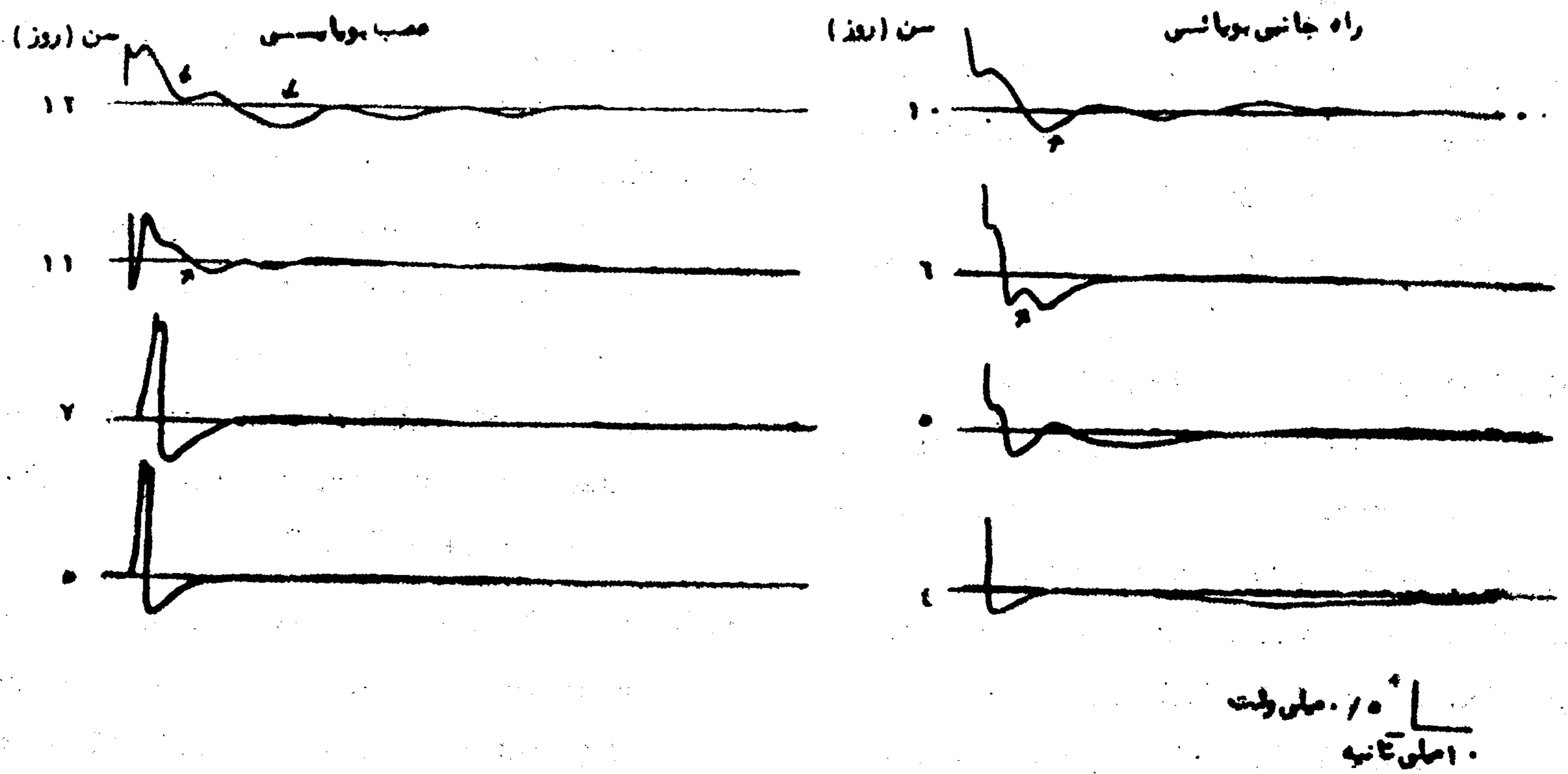
لایه میترال

لایه گرانولی

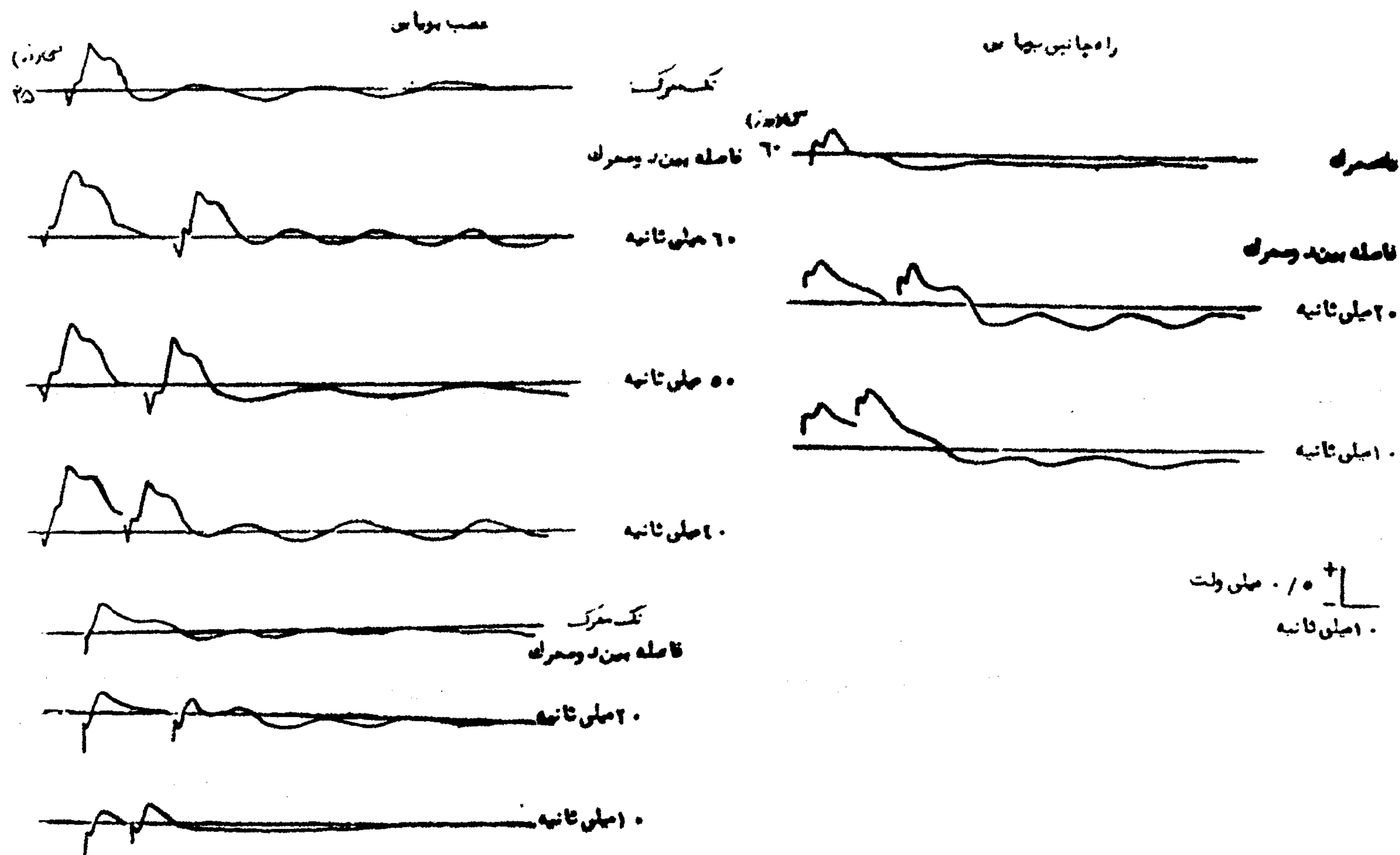




شکل ۳- مقایسه تحریک راه جانبی بویایی و عصب بویایی در سنین مختلف (ثبت از لایه گرانول)



شکل ۴- مقایسه تحریک راه جانبی بویایی و عصب بویایی در سنین مختلف (ثبت از لایه گرانول)



شکل ۵- دو محرک متوالی به عصب بویایی و راه جانبی بویایی (ثبت از لایه گرانول)

### References

- Freeman W. J. (1972) Measurement of oscillatory responses to electrical stimulation in olfactory of cat. *J. Neurophys.* **35**, 762 - 779.
- Freeman. W. J. (1974 a) Attenuation of transmission through glomeruli of olfactory bulbi on paired shock stimulation. *Brain Res.* **65**, 77 - 99.
- Freeman W. J. (1974 b) Relation of glomerular neuronal activity to glomerular transmission - attenuation. *Brain Res.* **65**, 91 - 107.
- Freeman, W. J. (1975) *Mass action in the nervous system.* Academic press. New York. , 285-291.
- Hinds, J. W & Hinds, P. L. (1976). Synapse formation in the mouse olfactory bulb. I. quantitative studied. *J. comp. Neuro.* **169**, 15 - 40.
- Meisami E. (1979) The developing rat of olfactory bulb: Prospect of new model system for developmental neurobiology. *Neural Growth and Differentiation.* Meisami & Brazier Eds. Raven Press New York. , 183 - 206.
- Mori, K. & Tagaki, S. F. (1977) . An intercellular study of dendrodendritic inhibitory synapses on mitral cell in the rabbit olfactory bulb. *J. Physiol (London).* **279**, 569 - 588.
- Nicoll. R.A. (1969). Inhibitory mechanisms in the rabbit olfactory bulb : dendrodendritic mechanisms, *Brain Res.* **14**, 157 - 172.
- Shafa, F & Bidanjiry, A (1981). Development of spontaneous activity in the olfactory neurons of postnatal Rats. *Brain Res.* **223** (2), 409 - 415.
- Shepherd G, M. (1971). Physiological evidence for dendrodendritic synaptic interaction in the rabbit's olfactory glomerulus. *Brain Res.* **32**, 12 - 217.