

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**BİR VE YEDİ GÜNLÜK CİVCİVLERİN HIPPOKAMPUSLARINDA
TOPLAM NÖRON SAYISININ OPTİK PARÇALAMA METODU
İLE HESAPLANMASI**

UZMANLIK TEZİ

T 88239

Dr. Hüseyin ASLAN

Samsun-1999

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**BİR VE YEDİ GÜNLÜK CİVCİVLERİN HİPPOKAMPUSLARINDA
TOPLAM NÖRON SAYISININ OPTİK PARÇALAMA METODU
İLE HESAPLANMASI**

UZMANLIK TEZİ

T 88239

Dr. Hüseyin ASLAN

Danışman: Doç. Dr. Süleyman KAPLAN

Samsun-1999

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

TEŞEKKÜR

Araştırma görevliliği sürem boyunca eksik etmediği hoşgörüsü, ikazları, yardımları, gösterdiği sabrı ve akademik eğitimime katkılarından dolayı Prof. Dr. Nusret ÇİFTÇİ'ye; maddi ve manevi desteğini her zaman hazır bulduğum, tez çalışmam boyunca gece gündüz hafta sonu demeden benimle birlikte çalışan, steorolojik metotları bana öğreterek akademik hayata bakış açımı değiştiren, Türkiye'de de bilimsel çalışma yapılabileceği ile ilgili inancımı pekiştiren, yabancı dil ve akademik eğitimime büyük katkıları olan tez danışmanım Doç. Dr. Süleyman KAPLAN'a; tez çalışmam esnasında, özellikle civcivlerin perfüzyonu, kesitlerin alınması ve boyanması aşamasında benimle birlikte büyük özveri ile çalışan, Araş. Gör. Sinan CANAN'a; hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan bana destek olan Araş. Gör. Dr. Bünyamin ÜNAL'a; laboratuvar çalışmalarımda yardımları olan teknisyen Recep İTKU'ya; Ayrıca büyük bir sabır ve fedakarlıkla her zaman beni destekleyen eşim Duygu'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKÜR	i
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1. Stereolojik Metotlar:.....	1
1.2. Araştırma konusu olarak neden Hippokampus seçildi?	2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kuşların Merkez Sinir Sistemleri:	3
2.1.1. Kuşlarda Hippokampus:	5
2.1.1.1. Hippokampusun Histolojisi:.....	5
2.1.1.1.1. Horizontal nöronlar (HN):.....	6
2.1.1.1.2. Kısa aksonlu multipolar nöronlar (MN-1):.....	7
2.1.1.1.3. Uzun aksonlu multipolar nöronlar (MN-2):	7
2.1.1.1.4. Piramidal nöronlar (PN):	7
2.1.1.1.5. Bipiramidal nöronlar (BN):	8
2.1.1.1.6. Periventriküler nöronlar (PvN):.....	8
2.1.2. Hippokampusun Bağlantıları:.....	8
2.2. Stereolojik Metotlar:.....	9
2.2.1. Sistematik Rastgele Örnekleme Stratejisi:	15
2.2.2. Tarafsız Sayım Çerçevesi:.....	15
2.2.3. Disektör:	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Hayvanlar:	21
3.1.1. Perfüzyon:.....	21
3.1.2. Histolojik işlemler:	22
3.1.2.1. Doku takibi:	22
3.1.2.2. Kesitlerin alınması:.....	22
3.1.2.3. Boyama:.....	23
3.2. Niçin Tek Cinsiyet ve Tek Taraf Hippokampus?.....	24

3.3. Optik Parçalama:	25
3.3.1. Kesit Örnekleme Payı:.....	26
3.3.2. Alan Örnekleme Payı:	26
3.3.3. Kalınlık Örnekleme Payı:	28
3.3.4. Optik Disektör:	29
3.3.5. Optik Parçalamanın Uygulanması:.....	31
3.3.5.1. Parçalama Örnekleme Şeması:	31
3.3.5.1.1. Kesit Örnekleme Payı (KEÖP):.....	31
3.3.5.1.2. Alan Örnekleme Payı (AÖP):.....	31
3.3.5.1.3. Kalınlık Örnekleme Payı (KaÖP):.....	33
3.3.5.2. Optik Disektör ile Sayım:	33
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
6. KAYNAKLAR.....	53

TABLO LİSTESİ**SAYFA**

Tablo I: Optik parçalama metodu ile bir ve yedi günlük erkek civcivlerin yalnızca sağ hippocampuslarındaki toplam nöron sayısı, hacimleri ve sayısal yoğunluklarının hesaplanması ve bu hesaplamalarda kullanılan parametreler.....	41
Tablo II: Bir günlük erkek bir civcivin sağ hippocampusundaki toplam nöron sayısının bulunması esnasında gözlenen hata katsayısının (HK) hesaplanması [53].....	42
Tablo III: Bir günlük erkek bir civcivin sağ hippocampus hacminin saptanması esnasında gözlenen hata katsayısının (HK) hesaplanması [53].....	43
Tablo IV A ve B: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerde sağ hippocampustaki toplam nöron sayıları, hippocampus hacimleri, sayısal yoğunluk değerleri ve bu değerlerin ortalamaları ile bunların elde edilmesi esnasında gözlenen standart sapmalar (SS), grup içi gözlenen varyasyon katsayıları (CV), hata katsayıları (CE) ve ortalamanın standart hata (SEM) değerleri gözlenmektedir.....	44
Tablo V: Değişik kuş türlerinin hippocampuslarında yapılan hacim ve toplam nöron sayısı çalışmalarının sonuçları, bu sonuçların elde edilmesinde kullanılan metotlar. Her bir türün önce Türkçe sonra İngilizce daha sonra ise Latince adları parantez içinde verilmiştir.....	49

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

- Şekil 1: Üç günlük civciv telensefalonundan yaklaşık 2,5 mm aralıkla alınmış transvers kesitler. Van Tienhoven ve Juhasz atlasından [(Debbeldam 1991 tarafından site edilmiştir)] değiştirilerek çizilmiştir. A Archistriatum, AL Ansa lenticularis, APH Area parahippocampalis, AS Area septalis, B(as) Nucleus basalis, CDL Area corticoidea dorsolateralis, DA Tractus dorso-archistriaticus, E Ectostriatum, FA Tractus fronto-archistriaticus, FPL Fasciculus lateralis prosencephali, HA Hyperstriatum accessorium, HD Hyperstriatum dorsale, IHA Nucleus intercalatus of HA, IMHV Nucleus medialis of HV, LFM Lamina frontalis suprema, LFS Lamina frontalis superior, LMD Lamina medullaris dorsalis, LPO Lobus parolfactorius, N Neostriatum, NC N, pars caudalis, Nf,d,l,v N, pars rostralis (frontale), dorsal, lateral, ventral zone, Ni,l N, pars intermedia, lateral zone, N,If Nucleus interfaccialis, PP Palaeostriatum primitivum, Tn Nucleus teniae, TSM Tractus septomesencephalicus, Val Valleculla telencephali [30]..... 4
- Şekil 2: Civciv hippocampusundaki nöron tipleri. HN: Horizontal nöron; MN-1: Kısa aksonlu multipolar nöron; MN-2: Uzun aksonlu multipolar nöron; PN: Piramidal nöron; BN: Bipiramidal nöron; PvN: Periventriküler nöron; PT: Pleksiform tabaka; GT: Granüler tabaka; ET: Ependimal tabaka (Molla ve ark., 1986'dan değiştirilerek çizilmiştir). 6
- Şekil 3: A) Sıfır (N), bir (U), iki (A) ve üç (H) boyuta sahip elemanları bulunduran bir yapıdan geçen iki boyutlu bir kesit düzleminin yapı elemanlarında boyut azalmasına neden olduğu (B) gözlenmektedir..... 10
- Şekil 4: Aynı ebatta, fakat farklı yönelimde olan iki partikül (A), uzun eksenlerinin kesit alma düzlemine dik ya da paralel olmalarına göre farklı sayıda izdüşüm verirler (B). 10
- Şekil 5: Büyük ve küçük ebatlı partiküllerin (A) kesit düzlemlerinde görülme oranları (B). Büyük partiküller, küçüklere göre daha fazla sayıda izdüşüm verirler..... 10

- Şekil 6: Holmes etkisi. Kesit kalınlığı arttıkça kesit düzleminde gözlenen partikül izdüşümlerinin sayısı değişmektedir. A doku dilimi, B' den daha fazla kalınlığa sahip olmasından dolayı daha fazla sayıda partikül izdüşümüne sahiptir (A' ve B')..... 13
- Şekil 7: Tarafsız sayım çerçeveleri. (A) Partikül izdüşümlerinin merkezi noktaları esas alınarak sayım yapılmaktadır. Buna göre (a) çerçevesinde bir, (b)'de iki, (c)'de dört ve (d)'de ise bir partikül sayılır. (B) Bu çerçevelerde ise (C)'de gözlenen tarafsız sayım çerçevesi kuralına göre sayım yapılır. Buna göre de sayılan partikül izdüşüm sayısı yine aynıdır. Fark, yalnızca bazı partiküllerin farklı çerçevelerce sayılmasıdır. Örneğin üçgen biçimli izdüşümün çoğu (b) çerçevesinde görülmesine rağmen (a) çerçevesince sayılmaktadır (Mayhew, 1991'den alınmıştır)..... 16
- Şekil 8: Disektör sayım metodunu gösteren 3D modelleme: A) Bir doku bloğu ve içindeki partiküllerin yandan görüntüsü, B) Doku bloğundan geçen kesitler ve bu ardışık kesitlerde gözlenen partikül son uçları (*)...... 17
- Şekil 9: Disektör sayım kuralının gösterildiği iki ardışık veya belirli bir mesafe ile birbirinden ayrılmış komşu kesitler (A ve B). Örnek kesitte (A) gözlenip, gözlem kesitte (B) görülmeyen partiküller (yıldızla işaretlenmiş) disektör partikülleridir (iki adet). Bu kesitlerin (A ve B) rolleri değiştirilirse yani gözlem kesiti örnek, örnek kesiti ise gözlem kesiti olarak alınırsa (C ve D) örnek kesitte üç adet disektör partikül sayılır (yıldız ile işaretlenmiş). X ile işaretlenmiş partiküller tarafsız sayım çerçevesi sayım kuralı gereği yasak kenara isabet ettiğinden dolayı, yalnızca örnek kesitte gözlenmesine rağmen sayılmazlar..... 18
- Şekil 10: Noktalı alan ölçüm cetveli (Howard ve Reed,1998'den değiştirilerek çizilmiştir). 19
- Şekil 11: Cavalieri Prensibi ile hacim hesaplaması..... 20
- Şekil 12: Optik parçalama için sistematik rastgele örnekleme (1/4) ile civciv beyninden horizontal düzlemde hippocampus bölgelerini içeren kesitlerin alınması. Civciv beyin hemisferlerinin ve hippocampuslarının sınırları kamera lusida (Nikon 105) ile çizilmiştir.

Koyu alanlar hippokampus bölgeleridir. Kesitler üzerinde çizilen kareler optik parçalamada kullanılan adımları, bu karelerdeki küçük çerçeveler ise optik disektörlerin yapıldığı tarafsız sayım çerçevelerini göstermektedir. 28

Şekil 13: Şekil 12'deki kesit 24 üzerinde optik parçalamada kullanılan optik disektörün gösterimi. (A) Adımlama ($300\ 000\ \mu\text{m}^2$) esnasında tarafsız sayım çerçevesi ortasında bulunan (+) işaretinin hippokampus dokusu üzerine isabet eden yerlerinde optik disektör yapılmaktadır. Bu şekilde adımlardan biri (B) daha büyük bir büyütmede şematize edilmiştir. Adımın bir bölümünde doku bulunmamasına rağmen tarafsız sayım çerçevesinin ortasına yerleştirilen (+) işaretinin hippokampus dokusunun üzerine isabet etmesinden dolayı bu adımda optik disektör yapılmaktadır. Kesitin üst yüzeyinden alt yüzeyine kadar olan mesafede üst ($5\ \mu\text{m}$) ve alt ($x\ \mu\text{m}$) yüzeylerde güvenlik kuşakları bırakılarak, (h) kadar bir derinlikte optik disektörler yapılmaktadır. (C) ve (D) Optik disektör uygulaması, kesit yüzeylerinde meydana gelen kayıp partiküllerden sakınmak için, kesitin her iki yüzeyinden de belirli bir mesafe uzaklaşarak kesitin merkezinde sayım yapılmasını önermektedir. Optik disektörde sayıma başlanacak yüzeydeki güvenlik kuşağının mesafesi daima sabit kalırken (örneğimizde üst yüzeydeki güvenlik kuşağı daima $5\ \mu\text{m}$), alt güvenlik kuşağı ise kesitin kalınlığına göre değişebilmektedir. (C) ve (D)'de çizilen şematik doku dilimlerinin (x) ile işaretlenen alt güvenlik kuşaklarının mesafeleri kesit kalınlıklarının birbirinden farklı olmasından dolayı değişik olduğunu göstermektedir. 30

Şekil 14: A) Bir günlük civciv beyninden horizontal düzlemde alınan bir kesitin görüntüsü. Kesik çizgiler arasındaki bölgeler hippokampustur (Hp); V, ventrikül. Cresyl violet boyaması. B) Işık mikroskobu altında kuş hippokampusunun tabakaları. Tabakalar Molla ve ark., (1986)'a göre isimlendirilmiştir. H, hiperstriatum; e, ventrikül duvarını astarlayan endodimal hücreler. Cresyl violet boyaması. Kesit kalınlığı $\cong 40\ \mu\text{m}$ 32

Şekil 15: A) Optik parçalama metodu kullanılarak hücre sayımı ve hacim hesaplamalarının yapıldığı sistemin genel görüntüsü. Sistem; mikroskop (Mik.), kamera (K), stagemeter (SM), mikrokator (MK) ve monitörden (M) oluşmaktadır. Mikroskop tablasının y (C) ve x (D) eksenlerindeki hareketi ölçen dial indikatörler (B). 34

Şekil 16: Optik disektör metoduyla sayım. Kesit üst (a) ve alt yüzü (m) ile disektör yüksekliği boyunca 2 µm aralıkla optik kesitlerin (b-l) fotoğrafı çekilmiştir. Sayımda kullanılan tarafsız sayım çerçevesinin yasak kenarları ve bu kenarların uzantıları kırmızı, serbest kenarlar ise yeşil olarak çizilmiştir. Çerçevenin ortasındaki (+) işareti hippokampusu isabet etmişse o çerçevede sayım yapılmıştır. Odak düzlemi kesit üstünden kesite doğru yaklaşırken, dokunun net görüldüğü ilk yer kesit üst yüzeyi (a) olarak belirlendi ve mikrokator göstergesi sıfırlandı. Bundan sonra kesit üst yüzeyinden kesit içine doğru 5 µm ilerleyerek üst güvenlik kuşağı bırakıldı. Nöron sayımında çekirdeklerin en geniş çaplı görünümünün olduğu seviyeler kriter olarak alındı. Çerçeve içine düşen ilk çekirdek [(kırmızı ok ile gösterilen (e))] yasak kenarla kesiştiği için sayılmadı. Yeşil ok ile işaret edilen çekirdek (g) çerçeve içine düşmüş ve çerçevenin serbest kenarı ile kesiştiği için disektör partikül olarak sayıma dahil edilmiştir. (i)'de gözlenen çekirdek yasak kenarın uzantısı ile (j)'de gözlenen partikül ise yasak kenarla kesiştiği için sayım dışı bırakılmıştır. (k)'de gözlenen yeşil okla işaretli çekirdek serbest kenarla kesiştiği için sayılmıştır. (l)'de disektör yüksekliğinin sonuna gelinmiş ve buradan kesit alt yüzeyine kadar olan mesafe alt güvenlik kuşağı olarak bırakılmıştır. Net olarak en son görülen görüntü düzlemi, kesitin alt yüzeyidir. Kesit üst ve alt yüzeyi arasındaki mesafenin (m) 33 µm olduğu ölçüldü. Cresyl violet boyaması. 36

Şekil 17: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerin sağ hippokampuslarında toplam nöron sayılarının karşılaştırılması ($P>0.05$). 38

Şekil 18: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerin sağ hippokampuslarında ortalama toplam nöron sayılarının karşılaştırılması ($P>0.05$). 38

Şekil 19: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerde toplam sağ hippocampus hacimlerinin karşılaştırılması.	39
Şekil 20: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerin ortalama toplam sağ hippocampus hacimlerinin karşılaştırılması ($P<0.01$).....	39
Şekil 21: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerde sayısal yoğunluk (N_v) değerlerinin karşılaştırılması ($P<0.01$).....	40
Şekil 22: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerde ortalama sayısal yoğunluk (N_v) değerlerinin karşılaştırılması ($P<0.01$).....	40



Bir ve yedi günlük civcivlerin hippocampuslarındaki toplam nöron sayısının optik parçalama metodu ile hesaplanması.

ÖZET

Çalışmamızın amacı, literatür taramalarımıza göre daha önce çalışılmamış bir konu olan, civciv hippocampusunda yaşla birlikte meydana gelebilecek nöron sayısındaki değişikliklerin **optik fraksiyonlama (parçalama)** metodu ile araştırmaktır. *Optik parçalama* metodu, ışık mikroskobu çalışmalarında partikül sayımları için kullanılan, halen en etkin ve tarafsız (gerçek değerden sistematik sapma göstermeyen) metottur. Çalışılacak hayvanlar, her birinde beşer adet erkek civciv olan, bir ve yedi günlük olmak üzere iki gruba ayrıldı. Önce bir günlük sonra da yedi günlük civcivler perfüze edildikten sonra, rutin takip işlemleri uygulandı. Parafine gömülen civciv beyinlerinden hippocampusları bitinceye kadar 40 µm kalınlıkta horizontal kesitler alındı. Hippokampus bulunan kesitler sistematik rastgele örnekleme ile ¼ oranında örneklenecek, Cresyl violet ile boyandı. Boyanan kesitlerin yalnızca sağ hippocampus alanları ve kesit kalınlıkları belli oranda örneklenecek nöron sayımı ve hippocampus hacim hesaplaması yapıldı.

Bir günlük civcivlerin sağ hippocampuslarında ortalama toplam nöron sayısı (N) 783 310±12 750, yedi günlüklerde 760 028±12 256 olduğu hesap edildi. İkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (P>0.05).

Optik parçalamayı uygularken alan örneklemesinde kullanılan adım alanı, noktalı test cetveli gibi kullanılarak ortalama toplam hippocampus hacimleri, bir günlük civcivlerde 2,48±0,08 mm³, yedi günlüklerde ise 2,80±0,04 mm³ olarak hesaplandı. Ortalama toplam hippocampus hacimleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi (P<0.01).

Her bir civciv için hesaplanan toplam nöron sayısı, hacimlerine bölünerek birim hacimdeki nöron sayısı (N_v), bir günlüklerde 317 837±14 612 nöron/mm³, yedi günlüklerde 271 843±6 188 nöron/mm³ olarak bulundu. Ortalama sayısal yoğunlukları birbiriyle karşılaştırıldığında, sayısal yoğunlukların da hacimler arasında gözlenen anlamlı farklılığı gösterdikleri gözlemlendi (P<0.01).

Yedi günlük civcivlerde bir günlüklere göre, hippocampuslarındaki toplam nöron sayısında gözlenen azalma, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düzeye ulaşmamakla beraber, postnatal yaşamda ihtiyaç duyulmayan nöronların ortadan kaldırılmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Aynı hayvan grubunun bir günlük civcivlere göre daha büyük bir hacme, daha az sayıda olan bir sayısal yoğunluğa sahip olması ise hayvanın büyümesi ile açıklanabilir.

Anahtar sözcükler: Civciv, hippocampus, stereoloji, optik parçalama, toplam nöron sayısı.



Estimation of Total Neuron Number of Hippokampus at One and Seven Day-old Chicks by Optic Fractionator.

SUMMARY

The aim of the present study is to investigate the probable changes in total neuron number of chick hippocampus in aging by using optical fractionator sampling scheme that is not studied before with respect to our literature knowledge. Optical fractionator is a combined sampling and counting method which is used to determine the total number of any given item in a reference volume in an unbiased manner (causing no systematic deviation from the true value). Animals used in this study were separated into two groups as one and seven day old chicks and there were five male chicks for each group. First one day old chicks and then seven day old chicks were perfused and subjected to routine tissue processing procedures. Section thickness was set to 40 μm on a rotary microtome and hippocampi of the brains of all chicks embedded in paraffin were sectioned exhaustively in horizontal direction. Sections contain hippocampal region were sampled with a known interval and stained with Cresyl violet staining. Only the right hippocampi and a known fraction of the thickness of sections were sampled and cell countings were performed in these sampled volume fractions.

The mean total number of nerve cells (N) in the right hippocampi of one day old chicks was estimated to be 783.310 ± 12.750 and for seven day old chicks, the mean total number of neurons in the right hippocampi was 760.028 ± 12.256 . The difference between two groups were not statistically significant ($p > 0,05$)

The mean total volume of hippocampi of chicks were estimated by using the steps used in counting as a point grid for volume estimation by Cavalieri principle and the mean hippocampus volume was found to be $2,48 \pm 0,08 \text{ mm}^3$ for one day old chicks and $2,80 \pm 0,04 \text{ mm}^3$ for seven day old chicks. There was a significant difference between the mean volume values of hippocampi of two groups of chicks ($p < 0,01$).

The numerical density of hippocampal neurons were also estimated by dividing the total numbers by the total volume values and it was found to be 317.837 ± 14.612 neurons / mm^3 for one day old group and 271.843 ± 6.188 neurons / mm^3 for seven day old group.

Although the difference in total numbers between two groups was not statistically significant, it can be thought to be depend on the destruction of unneeded nerve cells with aging. The increased volume and decreased density of neurons in seven day old group may be associated with enlargement during development.

Keywords: Chick, Hippocampus, Stereology, Optic Fractionator, Total Neuron Number.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kuş hippocampusu, homoloğu olan memeli hippocampusu gibi aynı pallial (Serebral korteks) hücrelerinden gelişirler [1 (Hampton ve Shettleworth, 1996 tarafından site edilmiştir)].

Kuşların, memelilerin serebral korteksinden daha küçük olan bir kortekse sahip olmaları, onların memelilerden daha az zeki olduklarını düşündürmüştür. Oysaki yapılan çalışmalar onların beyinlerinin diğer bölgelerini de kullanarak bu farkı azalttıklarını göstermiştir. Kuşların geri zekalı veya çoğu olayları kavrayamadıklarını özünde bulunduran "kuş beyinli" terimi bu hayvanlarda yapılan çalışmalar ile reddedilmektedir. Bu hayvan grubunun serebral korteksi daha iyi gelişmiş olan hayvanlara özgü olan bazı davranışları gerçekleştirebildikleri gözlenmiştir [2].

Hippokampal kompleks (hippokampus ve parahippokampal alan) kuş beyninde son yıllarda oldukça fazla çalışılan bir bölgedir. Hippokampusun yiyecek depolayan kuşlarda yiyecek depolamayan kuşlara göre hacimce daha büyük olduğu tespit edilmiştir [3, 4, 5, 6]. Ayrıca hippocampusları lezyona uğratılan yiyecek depolayan kuşların, yiyecek depolamaya devam ettikleri, fakat yiyeceği depoladıkları yeri bulamadıkları, yiyeceği rastgele yerlerde aradıkları gözlenmiştir [5, 6]. Memelilerdeki hippocampal formasyonla homolog olduğu düşünülen bu yapının, kuşlarda mekan hafızasında önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir [7]. Ayrıca, hippocampusun, mevsimlere göre mekan hafızasını kullanma ihtiyacının arttığı durumlarda, beynin diğer yapılarına oranla daha büyük bir hacme sahip olduğu ve bunun doğrudan hippocampusun kullanımına bağlı olduğu gösterilmiştir [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22].

Kuş hippocampusunun diğer beyin bölgeleri ile yaptığı bağlantılar, memeli hippocampusu ile olan homoloji düşüncesini desteklemektedir. [13, 23, 24, 25, 26].

1.1. Stereolojik Metotlar:

Öncelikle morfometri ile stereolojik metotlar arasındaki ilişkinin anlaşılması gerekir. Morfometri, yapısal özelliklerin tanımlanmasında sayısal verilerin kullanılmasıdır. Morfometrik veriler, bir örneğe uygulanan ölçme işlemlerinin herhangi bir tipinden elde edilebildiği gibi, doku kesitlerinin stereolojik analizinden de sağlanabilir. Stereolojik metotlar ise, doku ve yapıların geometrik analizini ifade eden

ve iki boyutlu kesitlerden, yapıların metrik özelliklerini (sayı, hacim, yoğunluk, uzunluk vb.) bulmayı sağlayan metotlardır. Morfometri ve stereoloji birbiriyle yakın ilişkili fakat eş anlamlı olmayan terimlerdir [27].

Stereolojik metotlar, morfometrik çalışmalarda kullanılan eski ve taraflı (biased) metotlara karşın [28], yeni ve tarafsız (unbiased) metotları sunması ile morfometriye yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Yeni ve tarafsız stereolojik metotlar 1984'de Sterio tarafından disektörün yeniden tarif edilmesi ile bilim dünyasına duyurulmuştur [29]. Disektörün icadından önceki metotlara eski ve taraflı (gerçek değerden sistematik sapma gösteren) metotlar, disektör ve ondan geliştirilen metotlara ise yeni ve tarafsız (gerçek değerden sistematik sapma göstermeyen) stereolojik metotlar denilebilir.

Yeni stereolojik metotlar, sinir bilimleri başta olmak üzere, özellikle patoloji, fizyoloji ve histoloji gibi temel tıp bilimlerinde geniş kullanım alanları bulmaktadır. Bu metotların kullanıma girmesi ile birlikte, eski ve taraflı metotlar kullanılarak elde edilen verilerden yola çıkılarak varılan eski çalışma sonuçlarının değişmesi gündeme geldiği gibi, yeni çalışılan konularda da güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi mümkün olmaktadır. Ayrıca, çalışmanın stereolojik metotlarla yapılmamış olması durumunda yurt dışında yayın yapan bilimsel dergilerden kabul görmemesi, stereolojik metotların morfometrik çalışmalarda ne derece standartlaştığı konusunda bir fikir vermektedir. Bu çalışmada da, stereolojik metotların kullanılması bu sebeplerden dolayı tercih edilmiştir.

1.2. Araştırma konusu olarak neden Hippokampus seçildi?

Bu çalışmada, elde edilmesinin kolaylığı; ucuz olması; insan beyni ile anatomik ve fonksiyonel benzerlikler göstermesi; manipülasyonların kolay olması gibi özellikleri nedeni ile deney hayvanı olarak civcivler seçilmiştir.

Mevcut bilgilerimize göre civciv hippokampusundaki toplam nöron sayısını gelişimsel olarak araştıran başka bir çalışma yapılmadığından; bu konuda yapılacak çalışmalara başlangıç olması amacıyla, bu çalışmada, civciv hippokampusunda gelişme ile birlikte meydana gelebilecek nöron sayısındaki değişiklikler, stereolojik metotlardan olan optik parçalama (fraksiyonlama) metodu ile araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

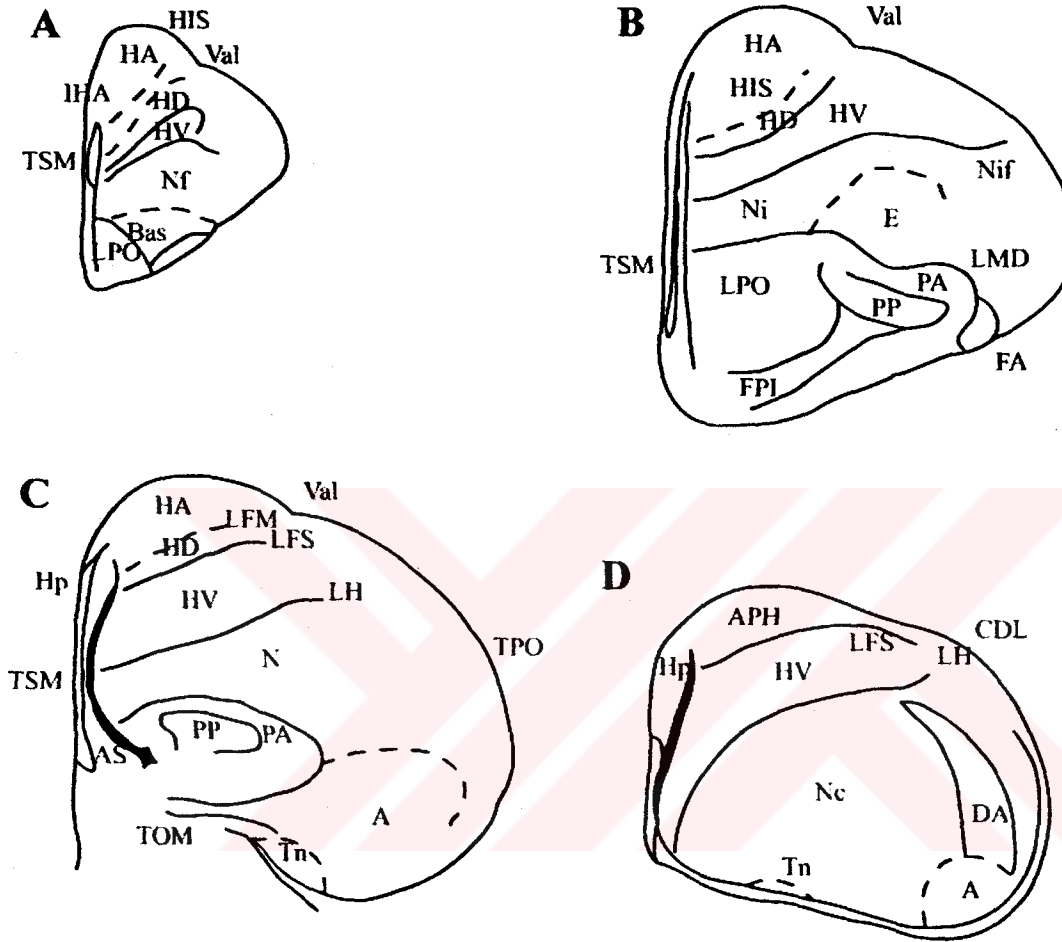
2.1. Kuşların Merkez Sinir Sistemleri:

Kuşlar, memeliler gibi omurgalı hayvanlar olup, birçok ortak özellikleri olmasına rağmen, bazı yönlerden dikkat çekici farklılıklar gösterirler. Her iki tür de, vücutlarına oranla büyük bir beyne sahip olmakla beraber, ön beyinlerinin kesitleri birbirinden oldukça farklılık gösterir. Kuşların ön beyni temel olarak sürüngenlerin ön beyine benzer şekilde olmasına karşın, memeli neokorteksinin organizasyonu daha yenidir [30].

1936'da Ariens Kappers [31 (Debbeldam 1991 tarafından site edilmiştir)] tarafından eminentia sagittalis ya da Wulst olarak isimlendirilen kuşların ön beyni uzun yıllar boyunca az gelişmiş bir korteks ile aşırı gelişmiş bir korpus striatumdan oluştuğu kabul edilmiştir [30]. Bu düşünce bu gün bile yaygın olarak kullanılan isimlendirmede etkisini gösterir. Transvers kesitlerde paleostriatum, neostriatum, hiperstriatum ve ekstostriatum denen birkaç hücre tabakası fark edilebilir. Ellili yıllardan sonra telensefalik organizasyonun yorumu çok değişmiştir. 1953'de Kallen [32 (Debbeldam 1991 tarafından site edilmiştir)] ilk kez, embriyolojik kanıtları kullanarak, Wulst kadar DVK'yı da içeren kuş ön beyninin, subpallial yapılardan ziyade, potansiyel olarak kortekse eşdeğer olan palliuma ait olduğunun kabul edilmesi gerektiğini savunmuştur [30]. DVK, dorsal ve orta ventriküler oluklar arasında gelişen, telensefalonun bir parçası olarak tanımlanabilir. Böylece kuş telensefalonunun çoğu bölgesi memeli neokorteksi ile eşdeğer olduğu kabul edilebilir [30].

1970'de Nauta ve Karten [33 (Debbeldam 1991 tarafından site edilmiştir)] internal ve eksternal striatumu ayırt etmişlerdir [30]. Bunlara göre internal striatum kuşlarda esas olarak lobus parolfactorius (LPO) içeren paleostriatal kompleksten oluşur ve memeli korpus striatumuna karşılık gelir. Wulst ve DVK'dan oluşan eksternal striatum, memeli neokorteksi ile homolog olan hücre grupları içerir ve getirici (ascending) sistem sonlanmaları, telensefalik motor çıkış alanları ve intratelensefalik bağlantılı alanlardan oluşur. Bu bölgelerdeki nöron topluluklarını korteksin belirli tabakalarındaki hücre grupları ile karşılaştırmak mümkündür. Hücrelerin düzenlenmesi ve onların afferent ve efferent bağlantıları kuşlarda ve memelilerde oldukça farklıdır, yine de bazı bölgelerde organizasyon yönünden güçlü benzerlikler fark edilebilir [30].

Değişik kuş türlerinin beyinleri arasında hücre mimarisi ve organizasyonu bakımından çarpıcı farklılıklar vardır. Bu farklılıklar kuş türlerinin davranış yönünden uzmanlaşmaları ile ilgili olabilir. Bu nedenle kuşlar, beyin organizasyonunun karşılaştırmalı fonksiyonel ve anatomik çalışmaları için oldukça elverişli bir gruba oluştururlar [30].



Şekil 1: Üç günlük civciv telensefalonundan yaklaşık 2,5 mm aralıkla alınmış transvers kesitler. Van Tienhoven ve Juhasz atlasından [34 (Debbeldam 1991 tarafından site edilmiştir)] değiştirilerek çizilmiştir. A Archistriatum, AL Ansa lenticularis, APH Area parahippocampalis, AS Area septalis, B(as) Nucleus basalis, CDL Area corticoidea dorsolateralis, DA Tractus dorso-archistriaticus, E Ectostriatum, FA Tractus fronto-archistriaticus, FPL Fasciculus lateralis prosencephali, HA Hyperstriatum accessorium, HD Hyperstriatum dorsale, IHA Nucleus intercalatus of HA, IMHV Nucleus medialis of HV, LFM Lamina frontalis suprema, LFS Lamina frontalis superior, LMD Lamina medullaris dorsalis, LPO Lobus parolfactorius, N Neostriatum, NC N, pars caudalis, Nf,d,l,v N, pars rostralis (frontale), dorsal, lateral, ventral zone, Ni,l N, pars intermedia, lateral zone, N,l Nucleus interfascicularis, PP Palaeostriatum primitivum, Tn Nucleus teniae, TSM Tractus septomesencephalicus, Val Valleculea telencephali [30].

2.1.1. Kuşlarda Hippokampus:

Wulst'un kaudal ve medial kısmının çoğunu dorsomedial korteks oluşturur. Van Tienhoven ve Juhasz (1962) [34 (Debbeldam 1991 tarafından site edilmiştir)] atlasında burayı iki alt bölgeye ayırmışlardır [30]. Daha sonraları hippokampus ve area parahippokampalis ismi bu bölgeleri belirtmek için kullanılmıştır (Şekil 1). Hippokampus; ventriküllerin laterale kıvrılma yerinden septuma doğru uzanan hemisferler arası parçadır. Parahippokampal bölge ise ön tarafta hiperstriatum aksesoriума uzanan, kaudalde lateral kortikoid tabaka ile zayıf bir geçiş bölgesi ile ayrılan ventriküler inkurvatur bölgesini de içeren dorsal parçadır. Hippokampus ve area parahippokampalisin ikisine birden hippokampal kompleks ismi verilmiştir. Hippokampus; sınırları tam olarak tanımlanmamış dört longitudinal alt bölgeye ayrılmıştır. Bu alt bölgelerin anatomik anlamlarında bazı fikir ayrılıkları olmasına karşın, bazı yazarlar, septuma en yakın olan alt bölgeyi memeli dentat girusu ile ilişkilendirmişlerdir. Bununla beraber bu alt bölgelerin tanımlanmaları sıklıkla kişilere göre değişiklik gösterir [30, 35].

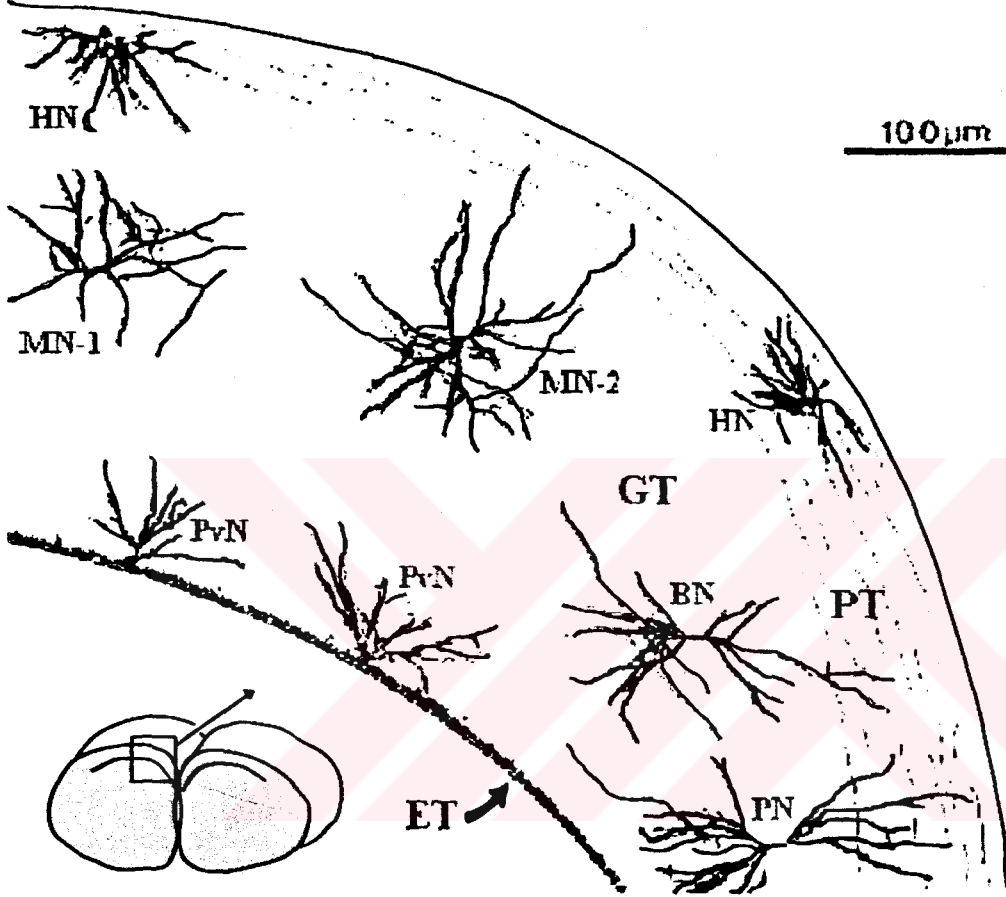
2.1.1.1. Hippokampusun Histolojisi:

Civcivlerde Nissl ve Külver-Barrera boyaması ile pleksiform ve granüler tabaka olmak üzere iki esas tabaka ayırt edilir. Granüler tabaka içinde ve hemen endependimal epitelin üzerinde ince bir periventriküler alt tabaka bulunur. Pleksiform tabaka temel olarak miyelinli ve miyelinizsinir liflerinden oluşur. Bu lifler transvers kesitlerde kesit yüzeyine paralel seyrederek. Fusiform gövdeli dağınık nöronlar da seyrek olarak gözlenir. Pleksiform tabaka en yüksek kalınlığa hemisferler arası bölgede ulaşır ve dorsal bölgeye doğru giderek azalır. Granüler tabaka; kortikal parankimin özellikle dorsal bölgesinin çoğunu işgal eder. Bazen ikili gruplar oluşturmalarına rağmen çoğu yerde izole, dağınık nöron gövdeleri gözlenir. Periventriküler alt tabaka sinir lifleri ve hücre gövdelerinden fakirdir [35].

Civciv hippokampusunda Golgi tekniği ile morfolojileri birbirinden farklı olan 6 tip nöron gözlenmiştir (Şekil 2):

1. Horizontal nöronlar (HN),
2. Kısa aksonlu multipolar nöronlar (MN-1),
3. Uzun aksonlu multipolar nöronlar (MN-2),

4. Piramidal nöronlar (PN),
5. Bipiramidal nöronlar (BN),
6. Periventriküler nöronlar (PvN) [35].



Şekil 2: Cıvciv hippocampusundaki nöron tipleri. HN: Horizontal nöron; MN-1: Kısa aksonlu multipolar nöron; MN-2: Uzun aksonlu multipolar nöron; PN: Piramidal nöron; BN: Bipiramidal nöron; PvN: Periventriküler nöron; PT: Pleksiform tabaka; GT: Granüler tabaka; ET: Ependimal tabaka (Molla ve ark., 1986'dan değiştirilerek çizilmiştir).

Granüler tabakada piramidal, bipiramidal, kısa ve uzun aksonlu multipolar nöronlar, periventriküler alt bölgede periventriküler nöronlar ve pleksiform tabakada ise horizontal yönelimli horizontal nöronlar bulunur.

2.1.1.1.1. Horizontal nöronlar (HN):

Horizontal nöronlar; dorsomedial kortekste yalnızca pleksiform tabaka içinde bulunurlar. Dendritik dallanmaları sıradan bir gözlem ile bipolar özellik gösterir, fakat

genel görünüm itibariyle diskoid ya da hemisferik yapı gösterirler. Dendritlerin çoğu beyin yüzeyine paralel bir şekilde seyrederken, bunlardan bazıları granüler tabakaya doğru inen bir yol izleyebilirler. Dendritik ağaç beş ila on ana daldan oluşur. Bu dalların çapları 200 ila 250 μm arasındadır. Yerleşimleri nedeniyle çok sayıda sinir lifi tarafından çevrelenmişlerdir. Dendritlerde her 100 μm 'de yaklaşık olarak 70 diken gözlenir. Akson başlangıçta pleksiform tabaka içinde beyin yüzeyine paralel seyrederek, sonra granüler tabakaya doğru ilerler [35].

2.1.1.1.2. Kısa aksonlu multipolar nöronlar (MN-1):

Bu nöronlar dorsomedial korteksin hem dorsal, hem de medial bölgesinin granüler tabakası içinde dağılmıştır. Dendritik ağaç az ya da çok küresel yapıda ve yıldızsı şekilli olup sıklıkla zayıf dallanma gösteren üç ila yedi ana daldan oluşur. Dendritik ağaç çapı 200 ila 250 μm arasında değişir. Dendritlerde her 100 μm 'de 25 diken bulunur. Bu nöronların aksonları kısa olup dendritik dallanmayı çevreleyen çok sayıda yan dallar verir [35].

2.1.1.1.3. Uzun aksonlu multipolar nöronlar (MN-2):

Bu tip nöronlar, özellikle dorsal bölgede olmak üzere bütün granüler tabaka boyunca yerleşmişlerdir. Dendritik ağaç tipik olarak yıldızsı şekillidir ve orta derece dallanma gösteren beş ila on ana daldan oluşur. Dendritik dal çapları değişkenlik gösterir. Dorsal bölgenin orta seviyelerinde 350 μm çapa ulaşabilir ki, bu eriştiği en yüksek çaptır. Ependimal tabaka veya pleksiform tabaka yakınlarında dendritik ağaç çapı daha küçüktür ve yaklaşık 200 μm civarındadır. Dendritler her 100 μm 'de 80 dendritik dikene sahiptirler. Bu hücreler uzun aksonludurlar. Bu aksonlar dendritik ağacı çevreleyen birkaç kısa dal verdikten sonra granüler tabaka içinde seyrederek dorsomedial korteksin lateral bölgesine doğru ilerlerler [35].

2.1.1.1.4. Piramidal nöronlar (PN):

Piramidal nöronlar; dorsomedial korteksin medial bölgesinde bulunurlar. Hücre gövdeleri granüler tabakanın orta kısmında yerleşiktir. Dendritik ağaç ışınsal tarzda yönelmiş ve hücre gövdesi net bir şekilde piramidal biçimde gözlenir. Apikalde dendritler, pleksiform tabakanın yelpaze şeklinde yayılmış bazal dendritlerine ulaşan bir kümelenme oluştururlar. Pleksiform tabakaya yükselen dendrit kümelenmesi bir ila üç

dendritik ana daldan çıkar ve burada geniş birkaç dala ayrılır. Bu dallar pleksiform tabakaya ulaşır ve yelpaze şeklinde yayılmış olan birçok ana dal ile karışır. Dendritik diken yoğunluğu her 100 µm'de 60 diken civarındadır. Bu nöronların aksonları granüler tabaka içinde dorsale doğru gider ve kendi bazal dendritik ağacı etrafında birçok kısa yan dallar verirler [35].

2.1.1.1.5. Bipiramidal nöronlar (BN):

Bipiramidal nöronlar; piramidal nöronlarla aynı bölgede bulunur. Dendritik ağaç fusiform bir hücre gövdesinden başlayan iki zıt dendritik kümelenme oluşturur. Apikal kümelenme pleksiform tabakaya ulaşır ve piramidal nöronların oluşturduğu kümelenmeye benzer bir düzenlenme gösterirler. Apikaldekilerden daha kısa fakat daha geniş bir dallanma gösteren bazal kümelenme, iki ila dört ana dal tarafından oluşturulur. Dendritik diken yoğunluğu her 100 µm de 60 diken civarındadır. Aksonlar granüler tabaka içinde dorsal bölgeye doğru ilerler, fakat hücre gövdeleri yakınında septuma doğru giden başka lifler verir. Aynı zamanda bazal kümelenme yakınlığında dallanan birkaç yan dal da gözlenebilir [35].

2.1.1.1.6. Periventriküler nöronlar (PvN):

Periventriküler nöronlar; en düşük impregnasyon yoğunluğu gösterirler. Ependimal tabakanın hemen üzerinde tüm dorsomedial kortekste yerleşiktirler. Hücre gövdeleri piriform ya da fusiform şekillidir. Dendritik ağaç 4 ila 5 ana daldan oluşturulur ve granüler tabaka içinde yelpaze tarzında dallanır. Dendritik diken yoğunluğu 100 µm de yaklaşık 60 dikendir. Bu nöronların, başlangıç kısmında yükselen ve birkaç kısa yan dal veren uzun aksonları vardır [35].

2.1.1.2. Hippokampusun Bağlantıları:

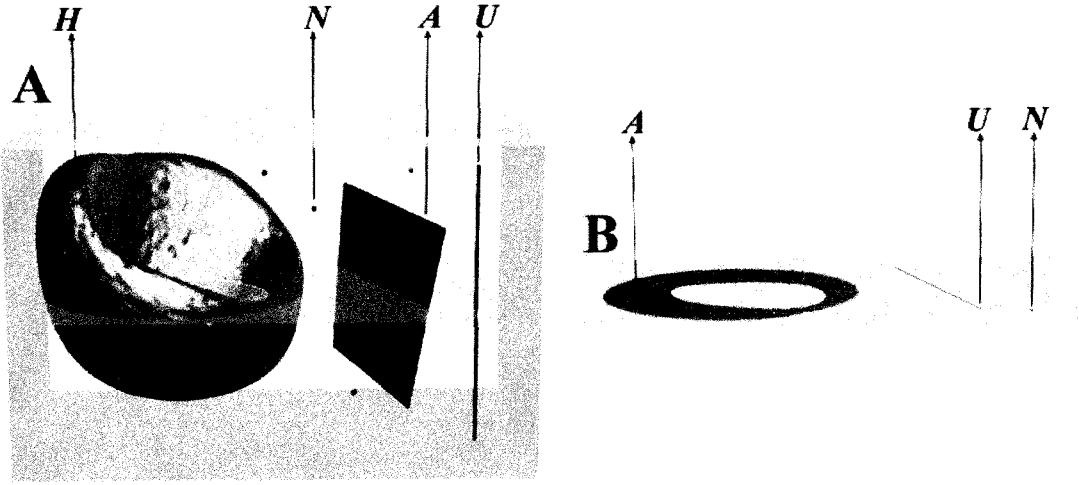
Hippokampus ve area parahippokampalis hiperstriatum aksesorium, Broca'nın diyagonal bandı, nucleus teniae ve area kortikoidea dorsolateralis (KDL)'den afferentler gelir; sağ ve sol hippocampuslar arasında olduğu gibi hippocampus ve area parahippokampalis arasında da resiprokal bağlantılar vardır [25]. Ayrıca Benowitz ve Karten area parahippokampalisin medial septal nucleus, lateral hipotalamus, talamik nucleus superfisialis parvosellularis ve locus coeruleusdan afferentler aldığını göstermişlerdir [23].

Hippokampus ve area parahippokampaliden septal nucleuslara ve Broca'nın diyagonal bandına efferentler gider. Krayniak ve Siegel hipotalamus ve memeli fornixinin prekommissural parçasının eşdeğeri olarak kabul edilen efferent hippokampal sistem üzerinden hippokampal projeksiyonlar olmadığını göstermişlerdir [24]. Bununla beraber Cassini ve arkadaşları lateral nuc. mamillaris yakınında gözden kaybolan hipotalamus üzerinden az bir miktar projeksiyonların olduğunu bildirmişlerdir [25]. Hippokampus ve area parahippokampalis efferentlerinin diğer alıcıları nuc. teniae ve KDL'dir. Ayrıca hiperstriatum dorsale ve archistriatum, area parahippokampaliden efferentler alır [30].

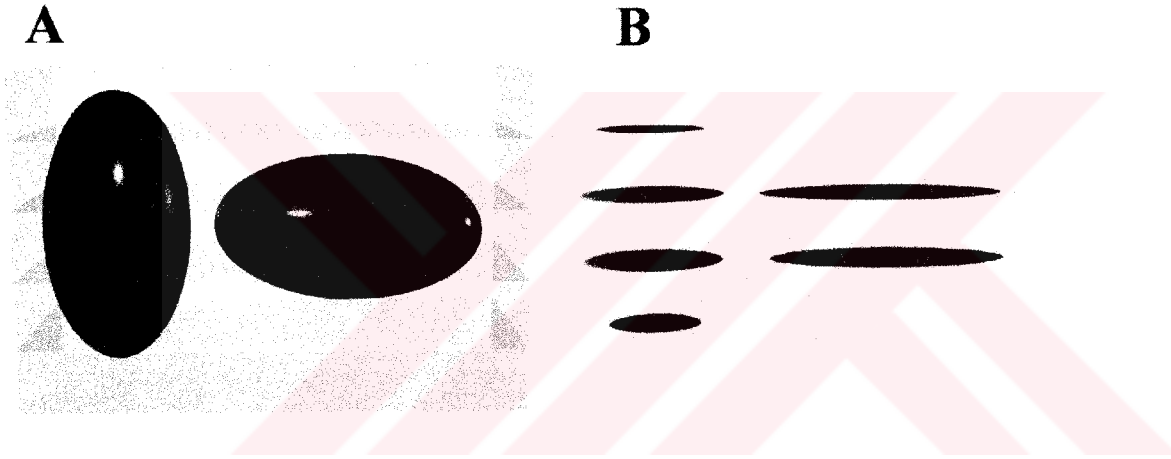
Kuşların dorsomedial korteksi ile memeli hippokampusunun bağlantı şekillerinin karşılaştırılmasında birçok paralellikler gözlenebilir. Memelilerde, hippokampusdan çıkan efferentler fornixten geçerek hipotalamusdaki mamiller cisim, septum ve Broca'nın bandına ulaşır. Hippokampal ve parahippokampal afferentlerin kaynağını medial ve lateral entorhinal korteks, septal çekirdekler, lokus soeruleus, dorsal ve medial raphe nukleusları ve supramamillar cisim oluşturur [36 (Debbeldam 1991 tarafından site edilmiştir)]. Her ne kadar bu karşılaştırmalar bazı cevapsız sorular bıraksa bile, kuş dorsomedial korteksi ile memeli hippokampusu ve area parahippokampalisi arasında bir çok paralelliğin bulunması, bu yapıların homolog olduklarını kuvvetle düşündürmektedir [30].

2.2. Stereolojik Metotlar:

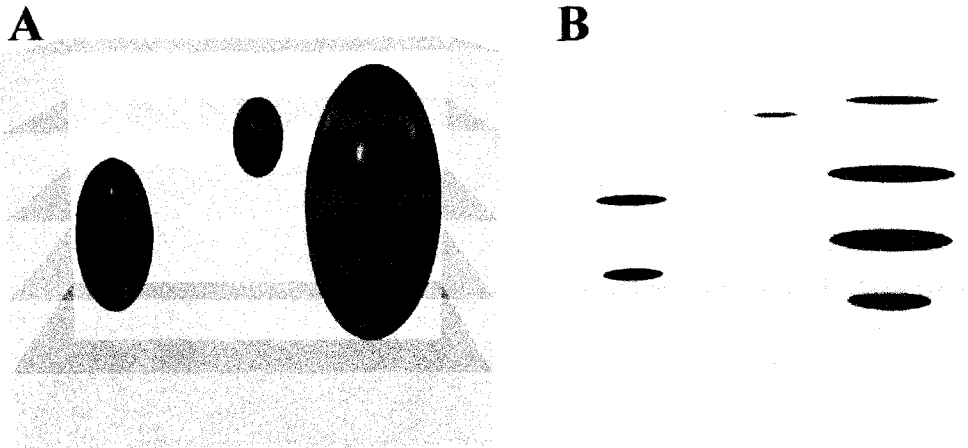
Stereoloji, gerçekte üç boyutlu olan beyin, böbrek, testis, akciğer, ince bağırsak, hücre gibi biyolojik yapılar ile maden filizi gibi metalurjik örneklerin iki boyutlu kesitlerinden elde edilen verilerden hareketle, onların üç boyutlu yapı ve özellikleri ile ilgili bilgiler sağlayan bilim dalıdır. Beyindeki toplam nöron sayısı, sinaps yoğunluğu veya toplam beyin hacmi; böbrekte korteks-medulla oranı, toplam glomerül sayısı veya bir glomerüldeki hücre sayısı; testisteki seminifer tübüllerin ve vücudumuzdaki kapiller damarların toplam uzunlukları, akciğerlerdeki alveollerin ve ince bağırsakların toplam yüzey alanları; bir hücredeki toplam mitokondri sayısı vb. gibi sayı, uzunluk, alan ve hacim gibi parametreler de niceliksel veriler elde edilerek somut yorumlar yapılabilmektedir.



Şekil 3: A) Sıfır (N), bir (U), iki (A) ve üç (H) boyuta sahip elemanları bulunduran bir yapıdan geçen iki boyutlu bir kesit düzleminin yapı elemanlarında boyut azalmasına neden olduğu (B) gözlenmektedir.



Şekil 4: Aynı ebatta, fakat farklı yönelimde olan iki partikül (A), uzun eksenlerinin kesit alma düzlemine dik ya da paralel olmalarına göre farklı sayıda izdüşüm verirler (B).



Şekil 5: Büyük ve küçük ebatlı partiküllerin (A) kesit düzlemlerinde görülme oranları (B). Büyük partiküller, küçüklere göre daha fazla sayıda izdüşüm verirler.

İki boyutlu sondalar olan kesit düzlemleri, üç boyutlu bir yapının içindeki elemanlarla kesiştiğinde, bu elemanlar, kesit düzleminde boyut kaybederek izdüşümler verirler. Başka bir ifadeyle üç boyutlu, yani bir hacmi olan bir yapı, iki boyutlu bir düzlemle kesildiğinde bir boyut kaybederek iki boyutlu bir alan olarak izdüşümler verir. Benzer şekilde iki boyuta sahip bir yüzey bir boyutlu çizgi olarak, tek boyutlu bir çizgi ise boyutsuz bir nokta olarak izdüşümler verir. Boyutsuz bir nokta ise izdüşüm veremez (bk. Şekil 3). Bu ifadeler kısaca şu şekilde formülize edilebilir:

$$d_o = d_t + d_p - 3$$

d_o = izdüşüm boyutu

d_t = izdüşüm veren elemanın gerçek boyutu

d_p = sondanın boyutu [27, 28].

İki boyutlu kesitler, üç boyutlu bir yapının içinden geçen ve yapının elemanları ile kesişen düzlemler olarak düşünülürse, yapının her bir elemanı, bu kesitlerde, sayısı, uzunluğu, yönelimi, kapladığı alan ve hacmiyle ilişkili bir biçimde izdüşümler oluştururlar. Yani çok sayıda olanlar az sayıda olanlara göre, uzun olanlar kısa olanlara göre, geniş alana sahip olanlar dar alana sahip olanlara göre, büyük hacimli olanlar küçük hacimlilere göre, kesit düzlemine dik olanlar paralel olanlara göre, daha fazla kesilme şansına sahip olduklarından, kesitlerde daha fazla izdüşüm verme şansına sahiptirler (bk. Şekil 4 ve 5). Bu nedenle, doğrudan kesitlerde gözlenen izdüşümlerden yola çıkarak yorumlar yapmak, bu izdüşümlerin ait oldukları elemanların üç boyutlu özellikleriyle ilgili gerçek verilerin olmamasından ötürü, hatalı olabilmektedir. Sözelimi, bir beyinde bulunan nöronların sayısını hesaplamak istediğimizde, bunu doğrudan nöron izdüşümlerinin bulunduğu iki boyutlu bir kesit üzerinde gerçekleştiremeyiz. Çünkü, nöronların kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri yukarıda da açıklandığı gibi, onların büyüklükleri, uzun eksenlerinin kesit alma yönüne dik ya da paralel olması, hacimleri gibi faktörlerle yakından ilişkilidir. Büyük nöronlar, küçüklere göre daha büyük bir ihtimalle kesit düzlemi tarafından kesilme, yani büyük nöronlar küçük nöronlara göre daha fazla izdüşüm verme şansına sahiptirler. Halbuki, sayı açısından bakıldığında, her bir partikül yani nöron "1" olarak sayımda gözükeceğinden, ister büyük olsun isterse küçük, tüm partiküller eşit örneklenme şansına sahip olmalıydılar. İki boyutlu düzlemler olan kesitlerdeki izdüşümlerden, bu izdüşümlerin ait oldukları yapılar hakkında bir fikir yürütmenin söz konusu olduğu hemen hemen tüm

durumlarda, benzer sorunlar araştırıcıların karşısına çıkmaktadır. Dizayna dayalı olan yeni stereoloji bilimi, etkin (kısa zamanda daha az hata payına sahip iř yapmayı sağlayan) ve tarafsız (gerçek değerden sistematik bir sapmaya sebep olmayan) metotları ile, bu ve benzeri sorunların üstesinden gelme şansına sahiptir [37].

Yeni stereolojik metotların kullanılmadığı çalışmalarda çeşitli hata kaynakları ile karşılaşılır. En fazla karşılaşılan hata kaynakları ise, hücrelerin küre biçimli çekirdeklere sahip ve kesitlerin kalınlıksız iki boyutlu düzlemler oldukları gibi çalışılan yapı ile ilgili ön kabullerin yapılmasıdır. Eğer bu ve benzeri hata kaynakları görmezden gelirse, çalışma sonuçları gerçek değerden sistematik bir biçimde sapma gösterebilir. Böyle bir yaklaşımda, her zaman yanlış sonuçlar elde edileceğini söylemek mümkün değilse de, tesadüfen gerçek değerdeki sonuçların elde edilmesi durumunda dahi, hataların etkileri gizli ve belirlenemez olduğu için, sonuçların ne derece gerçeği yansıttığı belirlenemeyeceğinden, bu tip çalışmaların güvenilirliğinden söz edilemez. Stereolojide, böyle hata kaynaklarından etkilenmesi muhtemel olan yöntemler, taraflı (biased) metotlar olarak nitelendirilmektedir [37].

Gerçekte "kesit" kavramı, üç boyutlu katı bir yapı içerisinden geçen ve kalınlığı olmayan iki boyutlu düzlemler için kullanılır. Halbuki biyolojik örneklerden herhangi bir mikrotomda alınan kesitler, aslında belli bir kalınlığa sahip olan dilimlerdir. Kesitlerin kalınlıkları ne kadar küçük olursa olsun, ihmal edilip doğrudan iki boyutlu düzlemler olarak değerlendirilemezler. Çünkü kesit kalınlığı arttıķa, kesit düzleminde gözlenen maksimum çaptaki partikül izdüşüm sayısında da artma gözlenmekte, dolayısıyla biyolojik örneklerden alınan kesitler, ister ışık, isterse elektron mikroskobu için olsun, kalınlıkları da dikkate alınarak değerlendirilmelidirler. Bu durum ilk kez 1927'de Holmes tarafından klasik kitabı olan Petrografik Metotlar'da tarif edilmiş olup "Holmes Etkisi" olarak bilinmektedir (şekil 6).

Holmes etkisinin fark edilmesinden sonra, çeşitli araştırıcılar bu problemin üstesinden gelmek için bir çok düzeltme faktörleri ne sürmüşlerdir. Bunlardan en ünlüsü ve en çok kullanılanı, Abercrombie'nin düzeltme faktörüdür. Abercrombie [38] kesit kalınlığına ve partikül büyüklüğüne bağlı olarak ortaya çıkan sayım hatalarını anlattığı çalışmasını 1946 yılında yayınlamıştır. Buna göre, sayımı yapılan partiküllerin gerçek sayısı; sayım sonucunda elde edilmiş olan partikül veya partikül parçalarının izdüşüm sayısının, kesit kalınlığı / (kesit kalınlığı + ortalama partikül yüksekliliği)

şeklinde ifade edilen bir düzeltme faktörü ile çarpımına eşit olmalıdır. Bu ifade, şu şekilde formülize edilmektedir:

$$N = N_s \times \frac{t}{t + \bar{D}}$$

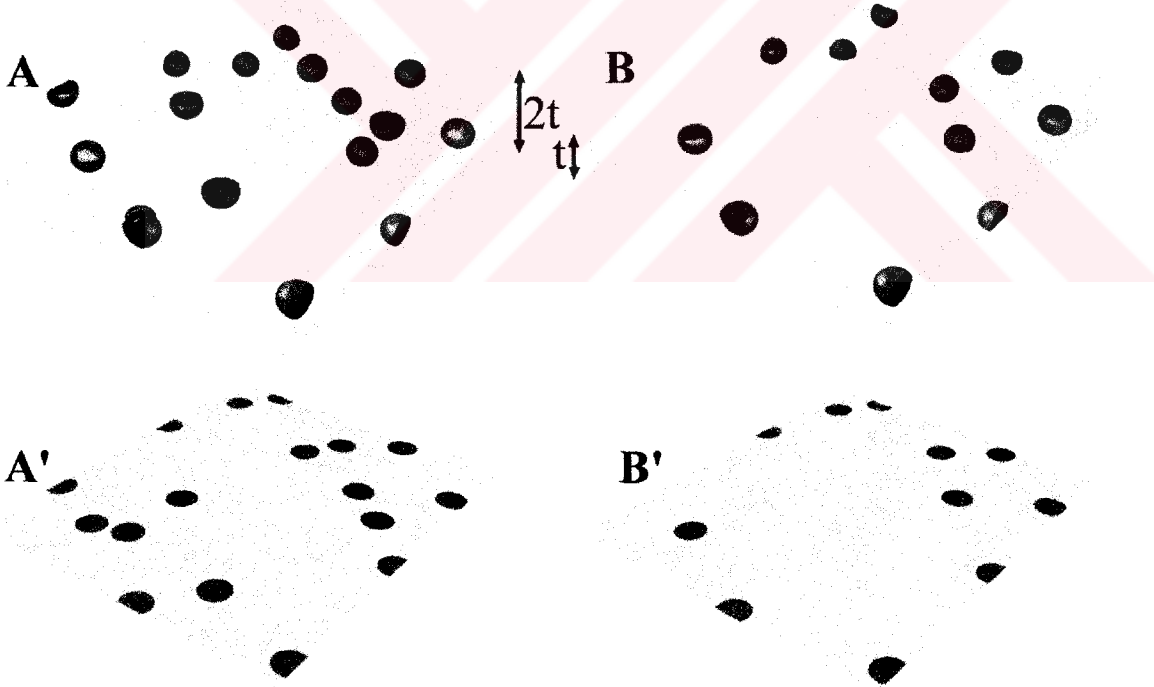
N = Düzeltme sonucu elde edilen partikül sayısı,

Ns = Sayım sonucu elde edilen partikül izdüşüm sayısı,

t = kesit kalınlığı,

\bar{D} = Ortalama partikül yüksekliği.

Bu duruma göre, örneğin, kesit kalınlığının ortalama partikül yüksekliğine eşit veya ona yakın ($t \cong \bar{D}$) bir değerde olması halinde, düzeltme sonucu elde edilen partikül sayısı, kesitlerde izdüşüm sayımı sonucunda elde edilen partikül sayısının yaklaşık yarısı kadar olacaktır. Bu düzeltme faktörünün çeşitlemeleri (modifikasyonları) sayılabilecek diğer bir çok denklem, farklı araştırmacılar tarafından değişik zamanlarda gündeme getirilmiştir [39, 40 (Willams ve Rakic, 1988 tarafından site edilmiştir.), 41].



Şekil 6: Holmes etkisi. Kesit kalınlığı arttıkça kesit düzleminde gözlenen partikül izdüşümlerinin sayısı değişmektedir. A doku dilimi, B' den daha fazla kalınlığa sahip olmasından dolayı daha fazla sayıda partikül izdüşümüne sahiptir (A' ve B').

Abercrombie'nin düzeltme faktörü, yıllar boyunca çok fazla sayıdaki (1991'e kadar ~1200 defa site edilmiştir) çalışmada referans olarak gösterilmiştir. Stereolojik metotların uygulama alanı bulmasından sonraki yıllarda bile, hatalı olan yanları ortaya konmuş olmasına karşın, yine bir çok araştırmacı tarafından kaynak olarak gösterilmeye devam edilmektedir [41].

Gerçekte, Abercrombie ve diğer araştırmacıların önerdikleri düzeltme faktörleri, hatalı sonuçlar elde edilmesine sebep olmaktadır. Abercrombie tarafından önerilen düzeltme faktörü, diğer araştırmacıların önerdikleri düzeltme faktörlerinin temelini oluşturduğu için, bu metodun hatalı sonuçlar üretmesine sebep olan özelliklerine göz atmak, diğer araştırmacıların önerdikleri metotların hata kaynakları hakkında da bir fikir edinmek için yeterli olacaktır.

Öncelikle, Abercrombie'nin yöntemi taraflıdır yani gerçek değerden sistematik olarak sapma göstermektedir. Bizzat Abercrombie, kendi metodunun, hücre sayısını %5-10 oranında fazla hesaplamaya meyilli olduğunu belirtmektedir [38]. Ayrıca, partikül yüksekliğinin belirlenmesi de önemli bir meseledir. Bu değer ölçülmesi, pratik olarak imkansız olduğundan, partikül yüksekliği yerine "partikül çapı" ölçülerek kullanılmaktadır. Bu ise, çalışılan partiküllerin küre biçimli oldukları gibi bir varsayımda bulunulduğunu göstermektedir. Özellikle partiküllerin küre şeklinde olmadığı, basık veya büzülmüş olduğu durumlarda, partikül yüksekliği ile partikül çapı arasında oldukça önemli bir fark meydana gelecektir. [41].

Bir diğer önemli husus, dokudan kesit alma işlemi esnasında, bıçağın kesit yüzeyindeki tüm partikülleri kestiği şeklindeki varsayımın gerçekte ne derece doğru olduğunun değerlendirilmesidir. Bıçak partiküle geldiği zaman, onu sadece "bazen" keser. Bazen ise, ki çoğunlukla da böyle olur, partikülleri ya olduğu yerde iterek veya yerinden çıkararak kesilmemesine veya yerinden düşmesine sebep olur. Dolayısıyla, kesit alma işlemi esnasında, partiküllerin hangi oranda kesilip kesilmediğini belirlemek mümkün olmadığından, bu durum da düzeltme faktörünün hatalı hesaplamasına neden olmaktadır [41].

Bir dokudan alınan kesitlerin kalınlığının ısı, nem, gömme ortamının tipi ve bıçağın kesme açısı gibi etkilere bağlı olarak oldukça farklılık gösterebilir. Bu metot kesitler arasında meydana gelebilecek kalınlık değişimlerinden de önemli oranda etkilenir [41].

Abercrombie ve diğer araştırıcılar tarafından önerilen düzeltme faktörleri, farkına varılmış olan sayım hatalarının düzeltilmesi amacıyla ortaya atılmış, fakat, özellikle yeni stereolojik metotların icadı ile birlikte, eksik yönleri daha iyi anlaşılmış ve tüm bu eksikliklerin üstesinden yeni stereolojik metotlar kullanılarak gelinmiştir.

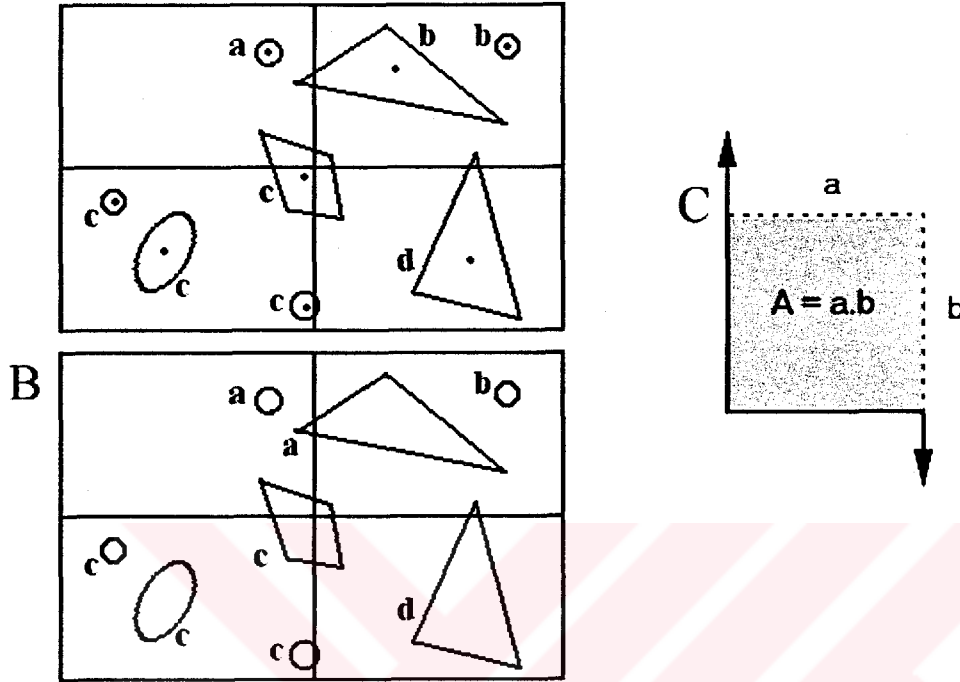
2.2.1. Sistematik Rastgele Örnekleme Stratejisi:

Stereolojik metotların etkinliğinin ana unsurunu sistematik rastgele örnekleme (SRÖ) stratejisi oluşturur. Bu örnekleme biçiminin temel özelliği, örneklemenin sistematik olmasına karşın ilgilenilen yapının her noktasına eşit örnekleme şansı tanınmasıdır. Histolojik çalışmalarda, araştırma konusu olan yapı ya da organdan elde edilen kesitlerin tümü tek tek incelenebilir, fakat genellikle bu tür bir çalışma gereksiz yere zaman ve emek kaybına neden olacağından, çalışmanın etkinliğinden söz etmek mümkün olmayacaktır. Böyle durumlarda elde edilen kesitler arasından belli oranlarda bir seçim yapılması gerekmektedir. Seçilen örneklerin ilgili yapıyı en iyi biçimde temsil edebilmesi için, yapının her bir noktasının eşit örnekleme şansına sahip olması gerekmektedir. SRÖ, belli bir örnekleme aralığı ile, ilk aralık içinden rastgele bir noktadan başlamak şartıyla, ilgilenilen yapının tamamının örnekleme şansına sahip olmasıdır (Şekil 12). Önceden belirlenen örnekleme aralığı, örneklemenin sistematik olmasını, ilk aralık içinde rastgele bir noktadan başlanması ise, örneklemenin rastgele olmasını sağlar. SRÖ' de örnek sayısı arttırıldıkça, yapının her noktasına eşit örnekleme şansı tanındığı için, örneklemenin yapıyı temsil edebilirliği de artar ve gerçek değere sistematik bir biçimde yaklaşılır [37, 42].

2.2.2. Tarafsız Sayım Çerçevesi:

Partikül sayımı yapmak için partikül izdüşümlerinden yararlanılan durumlarda, kesitlerde ortaya çıkan partikül izdüşümlerinin belli bir alanla sınırlandırılarak sayılmaları gerekmektedir. Eski metotlarda, kare veya dikdörtgen biçimindeki çerçeveler kesitler üzerine yerleştirilerek, doğrudan bu çerçeveler içine düşen partikül izdüşümlerinin sayılması yöntemi kullanılmıştır. Daha sonraları, bu tip bir yaklaşımın partikül sayısını fazla hesap etmeye sebep olduğu anlaşılınca köşegenlerinden biri boyunca ikiye ayrılmış olan bir sayım çerçevesi kullanılmaya başlanmıştır. Bu çerçevedeki sayım kuralı, çerçeve kenarlarının bir tarafına isabet eden partiküller sayılırken, diğer tarafa isabet edenler sayım dışı bırakılırlar. Yani iki yasak kenara, iki

de serbest kenara sahip bir sayım çerçevesidir. Bu yasak ve serbest kenarların kesiştiği köşelerden biri yasak köşe, diğeri de serbest köşe olarak belirlenmiştir. Fakat bu çerçevenin de gerçek partikül değerini vermekten uzak olduğu daha sonra tarafsız sayım çerçevesinin ortaya çıkışı ile matematiksel olarak ispatlanmıştır (bk. Şekil 7) [43] .



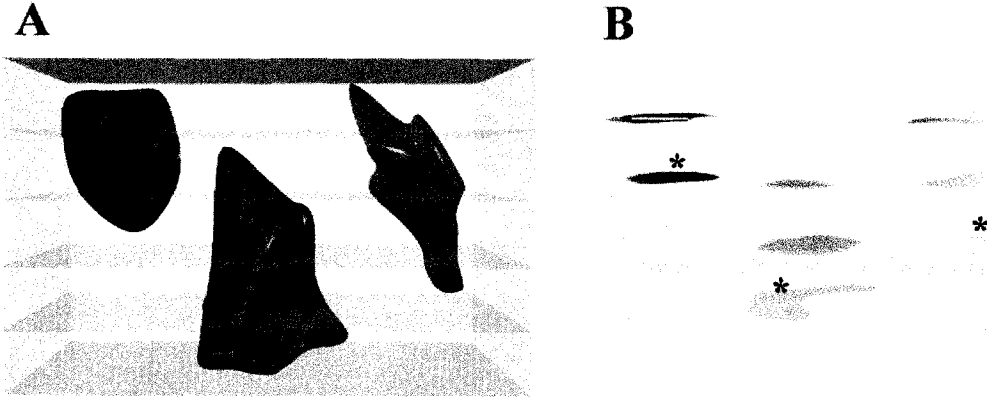
Şekil 7: Tarafsız sayım çerçeveleri. (A) Partikül izdüşümlerinin merkezi noktaları esas alınarak sayım yapılmaktadır. Buna göre (a) çerçevesinde bir, (b)'de iki, (c)'de dört ve (d)'de ise bir partikül sayılır. (B) Bu çerçevelerde ise (C)'de gözlenen tarafsız sayım çerçevesi kuralına göre sayım yapılır. Buna göre de sayılan partikül izdüşüm sayısı yine aynıdır. Fark, yalnızca bazı partiküllerin farklı çerçevelerce sayılmasıdır. Örneğin üçgen biçimli izdüşümün çoğu (b) çerçevesinde görülmesine rağmen (a) çerçevesince sayılmaktadır (Mayhew, 1991'den alınmıştır).

Tarafsız sayım çerçevesi, en genel olarak kullanılan şekliyle, bir kalın ve düz, bir de ince ve kesikli iki tip çizgi ile gösterilen dört kenara sahip basit bir dikdörtgen veya karedir. Görünüşte pek fazla bir değişikliği olmamasına rağmen, sayım kuralları açısından diğer sayım çerçeveleri ile oldukça farklılık gösterir. Temel olarak, ince ve kesikli çizgiler “serbest” kenarlar, kalın ve devamlı çizgiler de “yasak” kenarlardır. Yani kesikli çizgilere rastlayan izdüşümler sayılırken, devamlı çizgilere isabet eden izdüşümler sayım dışı bırakılır [44] (Şekil 7).

Tarafsız sayım çerçevesinin en önemli özelliği, yasak kenarların uzantıdır. Bu uzantılar, çerçevenin yerleştirildiği görüntü alanının tamamını kaplayacak şekilde, biri kendi doğrultusunda diğeri ise serbest kenar doğrultusunda uzanırlar [43] (Şekil 7-C).

2.2.3. Disektör:

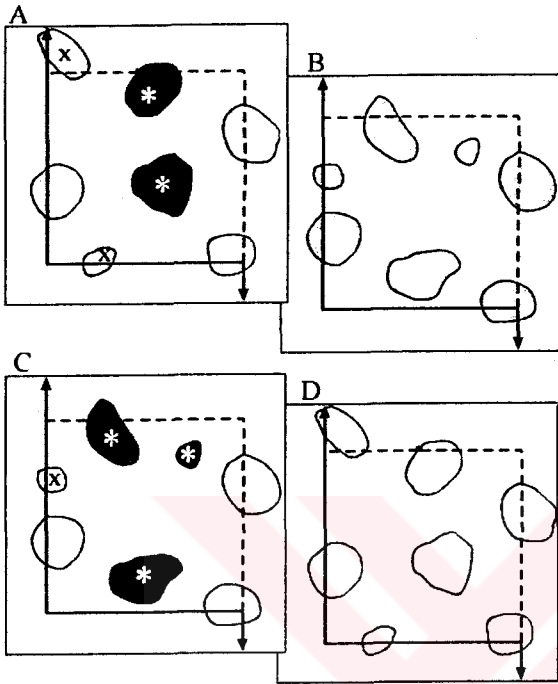
Partiküllerin sayımı için etkin ve tarafsız stereolojik metotların temeli 1984’de Sterio tarafından, disektörün yeniden tarif edilmesi ile atılmıştır [29]. Üç boyutlu stereolojik bir sonda olan disektörün en önemli özelliği, partikülleri büyüklükleri ile değil, sayıları ile orantılı bir olasılıkla örneklemesidir. Bunun için disektör sayım metodu, partiküllerin büyüklüğü, şekli ya da yönelimi hakkında herhangi bir varsayımda bulunmaksızın partikül sayımında kullanılabilir. Disektörün en basit şeklinde, iki ardışık veya birbirlerinden belli bir uzaklıkla ayrılmış olan iki kesit kullanılır ve bunun için disektör¹ adını alır [45]. İki kesit arasındaki mesafe “disektör yüksekliğidir”. Sayılmak istenen herhangi bir partikülün kesit çiftlerinden birinde bulunup, diğerinde bulunmayan izdüşümleri ilgili alana yerleştirilen tarafsız sayım çerçevesinin sayım kurallarına göre sayılır ve bu tip partiküllere disektör partikül (Q) adı verilir. Bu şekilde ilgilenilen yapının tümünden geçen seri kesitlerden sistematik olarak seçilerek elde edilen kesit çiftlerinde sayım yapılır. Sayım yapılan kesite örnek kesit (look-up section), kontrol yapılan kesite ise gözlem kesiti (reference section) denmektedir. Eğer partikül sayımı kesit çiftlerinden ilkinde yapılırsa kesit alma yönüne göre partiküllerin üst uçları, ikincisinde yapılırsa partiküllerin sonları sayılmış olur (Şekil 8). Burada gerekli olan, kesitlerde takip edilen partikül izdüşümlerinin aynı partiküle ait olup olmadığının belirlenmesidir. Disektörle yapılan sayım kayıp kep (lost caps) ve fazla yansıma (over projection)’dan etkilenmez [29, 44].



Şekil 8: Disektör sayım metodunu gösteren 3D modelleme: A) Bir doku bloğu ve içindeki partiküllerin yandan görüntüsü, B) Doku bloğundan geçen kesitler ve bu ardışık kesitlerde gözlenen partikül son uçları (*).

¹ 1986’da optik disektörün icadından sonra fiziksel disektör olarak bilinmektedir.

Disektörün temel uygulanma şekli, aralarında minimum partikül yüksekliğinden daha az bir mesafe olan iki kesitin alınarak karşılaştırılmalarıdır. Kesitler arası mesafenin, minimum partikül çapından daha küçük olmasının nedeni, partiküllerin, kesitler arasında kesilmeden kalarak örneklenmemesini önlemek içindir. Tek bir



Şekil 9: Disektör sayım kuralının gösterildiği iki ardışık veya belirli bir mesafe ile birbirinden ayrılmış komşu kesitler (A ve B). Örnek kesitte (A) gözlenip, gözlem kesitte (B) görülmeyen partiküller (yıldızla işaretlenmiş) disektör partikülleridir (iki adet). Bu kesitlerin (A ve B) rolleri değiştirilirse yani gözlem kesiti örnek, örnek kesiti ise gözlem kesiti olarak alınır (C ve D) örnek kesitte üç adet disektör partikül sayılır (yıldız ile işaretlenmiş). X ile işaretlenmiş partiküller tarafsız sayım çerçevesi sayım kuralı gereği yasak kenara isabet ettiğinden dolayı, yalnızca örnek kesitte gözlenmesine rağmen sayılmazlar.

partikülün bir kesit tarafından isabet alması, o partikülün kesit alma doğrultusundaki yüksekliğine bağlıyken; “bir kesit tarafından kesilip ardışık paraleli tarafından kesilmeme” şansı, büyük-küçük tüm partiküller için eşittir [46]. Disektör sayım metodu ile yapılan sayım sonucunda birim hacimde bulunan partikül sayısı yani sayısal yoğunluk (N_v) hesaplanır [29].

$$N_v = \frac{\sum Q^-}{h \cdot \sum a_{(cer)}}$$

Burada N_v , birim hacimdeki partikül sayısını yani partiküllerin sayısal yoğunluğunu; Q^- , disektör partikülleri; h , kesitler arasındaki mesafeyi yani disektör yüksekliğini; $a_{(cer)}$, sayımda kullanılan sayım çerçevesinin alanını belirtmektedir. Eğer bu formül sonucu toplam hacimle, yani $V_{(ref)}$ değeri ile N_v çarpılırsa, toplam partikül sayısı elde edilecektir [42, 47].

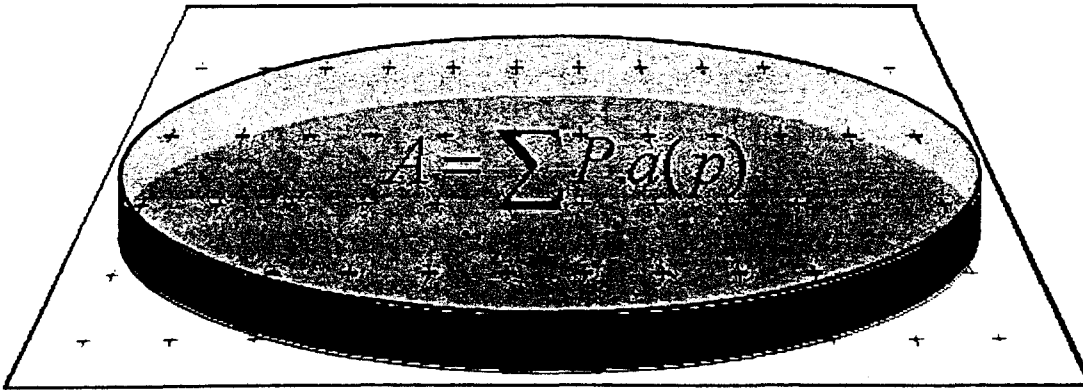
$$N = N_v \cdot V_{(ref)}$$

Disektör sayımı sırasında, örnek ve gözlem kesitleri, rolleri değiştirilerek, yani, örnek kesit gözlem, gözlem kesiti ise örnek kesit olarak değerlendirilip, çift yönlü bir sayım da yapılabilir. Bu da, ilave kesit almadan disektör sayısını iki katına çıkararak daha fazla örnek üzerinde çalışabilmeyi sağlar [48] (Şekil 9).

Disektör metoduyla yapılan sayım sonucunda, toplam partikül sayısını elde edebilmek için, referans veya toplam hacmin hesaplanması gerekir. İlgili yapının hacmini hesaplamak için, yapının özelliklerine bağlı olarak, değişik metotlar kullanılabilir. Eğer, çalışılan yapı, karaciğer ve böbrek gibi izole ve makroskobik boyutlarda ise, içinde su bulunan bir kaba daldırılarak taşıdığı su miktarı kadar hacme sahip olduğu, büzüşme derecesi saptandıktan sonra kolayca bulunabilir. Fakat, üzerinde çalışılan yapı, bir beyin çekirdeği veya tümöral bir kitle gibi etrafındaki yapılardan izole edilmesi mümkün olmayan bir özellikte ise, hacim hesaplaması için Cavalieri prensibi kullanılabilir [42]. Bu prensibe göre, hacmi hesaplanmak istenen yapı, başından sonuna kadar seri kesitlere ayrılır. Eğer az miktarda kesit varsa kesitlerin tümünde, çok fazla miktarda kesit varsa sistematik rastgele örnekleme ile seçilen kesitlerde, yapıya ait izdüşümlerin alanı hesaplanır. Alan hesaplaması, pahalı olan görüntü analiz sistemleri kullanılarak yapılabileceği gibi, *noktalı alan ölçüm cetveli* kullanılarak da aynı güvenilirlikte sonuçlar elde edilebilir. Alan ölçüm cetvelleri, her biri belli bir alanı temsil eden noktalardan oluşan kalıplardır. Bunların ilgilenilen yapının kesit görüntüleri veya alanı hesaplanmak istenen bir yüzey üzerine rastgele atılmaları ve ilgili alan içerisine düşen noktaların sayılması ile alan hesaplaması yapılır. Eğer hesaplamanın hata katsayısı yüksek çıkarsa, test cetvelindeki nokta sıklığı veya alınan kesit sayısı artırılarak hesaplama tekrarlanır. İlgili yapının kesit izdüşümüne isabet eden nokta sayısı, her bir noktanın temsil ettiği alan ile çarpıldığında, ilgili bölgenin alanı elde edilir [48] (Şekil 10).

$$A = \sum P_i \cdot a(p)$$

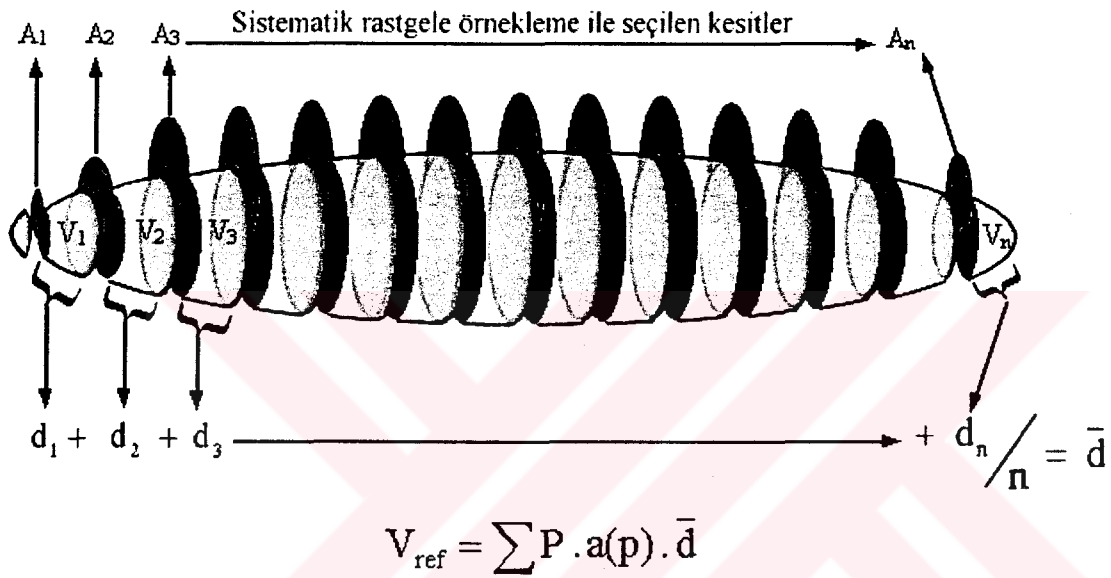
Burada P, nokta sayısını; a(p) ise tek bir noktanın temsil ettiği alandır.



Şekil 10: Noktalı alan ölçüm cetveli (Howard ve Reed, 1998'den değiştirilerek çizilmiştir).

Elde edilen tüm kesitlerdeki ilgili yapının izdüşümlerine isabet eden toplam nokta sayısı ile, bir noktanın temsil ettiği alan çarpılarak tüm kesitlerin toplam yüzey alanının hesaplandığını belirtmiştik. Eğer ortalama kesit kalınlığıyla hesap edilen toplam alan çarpılırsa ilgilenilen yapının referans hacmi hesaplanmış olur. Eğer kesitler örnekleme yolu ile elde edilmişse, ortalama kesit kalınlığı örneklenen kesitler arasındaki mesafe (\bar{d}) kadar olacaktır. Bu da ortalama kesit kalınlığı ile örnekleme oranının çarpımını sonucunda elde edilir [48] (Şekil 11).

$$V_{ref} = \sum P_i \cdot a(p) \cdot \bar{t}$$



Şekil 11: Cavalieri Prensibi ile hacim hesaplaması.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar:

KÖY-TÜR Tavuk İşletmeciliğinden alınan bir günlük 20 erkek Broiler cinsi civcivler (*Gallus domesticus*) rastgele olarak onarlı gruplara ayrıldı. Bir günlük 10 erkek civciv derin eter (eter sülfürik) anestezisi altında % 15'lik formalin ile intrakardiyal yoldan perfüze edildiler. İkinci grupta bulunan 10 erkek civciv ise 7 günlük olduktan sonra perfüze edildiler.

3.1.1. Perfüzyon:

Civcivler, içinde beze emdirilmiş eter bulunan kapaklı bir kavanoz içinde 1-2 dakika derin anesteziyeye girmeleri için bekletildiler. Derin anesteziyeye girdikten sonra dişli pens ve eğri uçlu makas yardımı ile toraks derisi ve toraks ön duvarı, kalbin atriumları ayırt edilecek şekilde ksifoid altından başlayıp yanlardan kesilerek boyuna doğru açıldı. Sol ventrikülden 0.5 ml heparin (Liquiemine) insülin enjektörü ile verildikten sonra, ince uçlu bir makas ile sağ atrium kesildi ve kelebek seti ile etüvde 37 °C' ye kadar ısıtılmış serum fizyolojik verilmeye başlandı. Dolaşımdan boşalan kan berraklaşınca kadar ~100 ml serum fizyolojik verilmeye devam edildi. Sonra yine etüvde 37 °C' ye kadar ısıtılmış %15'lik formalin ile fiksasyona başlandı. Fiksasyona başladıktan kısa bir süre sonra civcivin başında, ayaklarında ve kanatlarında kasılmalar gözlemlendi. Yaklaşık 100 ml fiksatif verildikten sonra cinsiyet kontrolü için civcivlerin karın arka duvarındaki cinsiyet organlarına bakıldı. Erkek civcivler sağ ve solda eşit büyüklükte gonatlara sahipken, dişilerin sol gonatları atrofiye uğramıştır². Bu şekilde cinsiyet kontrolleri yapılan civcivlerin kafaları makasla gövdelerinden ayrıldı ve kafa derileri soyulduktan sonra, kafa taslarını uzaklaştırmak için önce boynun fazla kısmı beyinciğin hemen altından kesildi, sonra ince uçlu bir makasla foramen magnumdan başlayarak orta hat ve yanlardan üç kesi ile kafatasını oluşturan kırkırdaklar uzaklaştırıldı ve beyinler, bazal kısımlarındaki sinirler önden arkaya doğru kesilerek çıkartıldıktan sonra aynı fiksatif içinde birkaç gün postfiksasyona tabi tutuldular [49].

² Prof. Dr. Musa SARICA (Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü Öğretim Üyesi) laboratuvarımızda bizlere civcivler üzerinde uygulamalar yaparak cinsiyet ayrımının nasıl yapılacağını göstermiştir.

3.1.2. Histolojik işlemler:

3.1.2.1. Doku takibi:

Doku takibi için aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Akar suda yıkama.....gün boyu
2. %70'lik Alkol.....1 gece
3. %80'lik Alkol.....1 saat
4. %96'lık Alkol.....1 saat (2 kez)
5. %100'lük Alkol.....1 saat (2 kez)
6. Ksilen.....½ saat (2 kez)
7. Paraplast.....1 gece oda sıcaklığında
8. Paraplast.....2 saat 60 °C
9. Paraplast.....3 saat 60 °C
10. Bloklama

3.1.2.2. Kesitlerin alınması:

Çalışmamız esnasında en fazla zaman alan kısım kesitlerin lama alınması aşamasında oldu. Kesitleri lama yapıştırabilmek için yaklaşık 300 civciv kullanıldı. Ön çalışma için alınan civciv beyinleri yukarıdaki takip işlemlerinden sonra paraplasta gömüldü. Çalışmada kalın kesitler kullanılacağı için (~40µm kalınlığında) albumin-mayer sürülmüş lamlara kesitler alındı, fakat kesitlerin periferlerinin hiç yapışmadığı ve boyama esnasında çoğunun döküldükleri görüldü. Bunun üzerine çeşitli fiksatifler, gömme ortamları ve kesit yapıştırıcıları ile işlemler tekrarlandı [50] fakat hiçbirinde başarılı olunamadı. En sonunda aşağıdaki yöntemle paraplasta gömülü beyinlerden alınan kesitler lama yapıştırıldı:

1. Kesitleri 45 °C' deki suya aldıktan sonra bir fırça ile kesitin üstünü örtecek şekilde su damlatıldı. Böylece kenarları kabaran kesitler düzleştiler.
2. Kesitler, önceden eşit oran ve miktarda karıştırılarak hazırlanmış olan formol-jelatin karışımından sürülüp, 1 saat 37 °C' de bekletilerek kurutulan lamlara alındı.

3. Lamlara alınan kesitlerin üzerinde bir fırçanın hafif bir şekilde bastırıp yuvarlatılması ile kesitlerin altındaki hava ve fazla su alınarak kesitlerin iyice yapışması sağlandı.
4. Lamlara alınan kesitlerin kurumasına izin vermeden, içinde bir miktar su bulunan cam şalelere alıp 60 °C deki etüvde paraplastları eriyinceye kadar bekletildi.
5. Paraplastları eriyen kesitler lam taşıyıcılara yerleştirilip bir gece 60 °C deki etüvde bekletildi.

Böylece lamlara kuvvetli bir biçimde yapışan kesitler boyanmaya hazır hale getirilmiş oldular.

3.1.2.3. Boyama:

Doku kesitlerinin boyanması için % 1'lik Cresyl fast violet kullanarak aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Ksilen.....30 dakika (4 değişim).
2. %100'lük Alkol.....10 dakika.
3. %96'lık Alkol.....10 dakika.
4. %80'lik Alkol.....10 dakika.
5. %70'lik Alkol.....10 dakika.
6. Distile su.....10 dakika.
7. Cresyl fast violet.....45 dakika (60 °C de).
8. Distile su.....1-2 dakika.
9. %96'lık Alkol.....Boyanın çoğu uzaklaşınca kadar.
10. Cresyl fast violet ayrıştırıcısı (60 ml kloroform + 44 ml % 96'lık alkol 9 damla glacial asetik asit) çekirdek ve Nissl farklılaşması sağlanıncaya kadar [51].
11. %96'lık Alkol.....5 dakika.
12. %100'lük Alkol.....10 dakika.
13. Ksilen.....10 dakika.
14. Ksilen.....1 saat.
15. Entellan ile kapatma.

3.2. Niçin Tek Cinsiyet ve Tek Taraf Hippokampus?

Kuş beynindeki bazı yapılar arasında bir lateralizasyonun [52] bulunduğu bilinmekle beraber, civciv hippocampusunda hacim [53] ve toplam nöron sayısı bakımından [53] sağ ve sol taraflar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir. Belirtilen çalışmada sağ ve sol hippocampuslar arasında anlamlı bir farklılığın olmamasından dolayı çalışmamıza yalnızca sağ hippocampuslar alındı. Sağ hippocampus için elde edilen sonuçların iki ile çarpılması ile her bir hayvan hippocampusunun sahip olduğu toplam nöron sayısı ve hacmi hesaplandı.

Eğer cinsiyetler arasında yiyecek depolama, yuva parazitliği [12] ve buna benzer davranışlarda bir farklılık yok ise, bunların hippocampusları arasında da bir farklılığın olmadığı kara-başlı baştankaralarda yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [54]. Çalışmamızda kullanılan hayvanların erkek ve dişileri arasında hippocampuslarının kullanımı bakımından, cinsiyetler arasında belirgin bir farklılık olmadığından dolayı çalışmaya yalnızca erkek civcivler alındı.

3.3. Optik Parçalama:

Optik parçalama, 3 boyutlu bir sayım sondası olan optik disektör ile parçalamanın örnekleme stratejisinin bir kombinasyonudur. Stereolojik literatüre “**optical fractionator**” olarak geçmiştir. Yeni stereolojik metotlardan olan optik parçalama, bir organda veya belirli bir yapıdaki toplam partiküllerin tarafsız ve etkin bir biçimde hesaplanmasını sağlayan metottur. Optik parçalama, incelenecek bölge hacminin uniform sistematik rastgele örneklemeyle elde edilen belli bir bölümünde optik disektörle nöron ya da herhangi bir hücre veya hücre topluluklarının oluşturduğu partiküllerin sayımından ibarettir. Pratikte, bu ilgilenilen bölgenin tümünden geçen kesitlerden sistematik rastgele örnekleme ile elde edilen belli bir bölümünün, nöron ya da herhangi bir partikül içerdiği düşünülen kesit alanlarının ve kesit kalınlığının belli bir oranının sistematik örneklenmesi ile uygulanmaktadır [42, 48, 55].

Optik parçalama, histolojik işlemlerin fiksasyon, takip, gömme, kesit alma, boyama gibi herhangi bir aşaması esnasında partiküller arası mesafede ve/veya partiküllerde oluşabilen büzüşme ya da genişlemeden etkilenmez. Optik parçalamanın bu özelliğinden dolayı, gömme ve boyama aşaması esnasında ölçümü oldukça zor olan büzüşmenin meydana geldiği frozen, vibratom, selloidin, ve parafin kesitlerin incelenmesini mümkün kılar [49].

Optik parçalamada, optik disektörün özelliklerinden dolayı organ ya da yapıdaki partiküllerin büyüklüğünden, şeklinden, yöneliminden, kesit alma yönünden etkilenmeden partikül sayımı yapılır. Çünkü her bir partikül bir kez sayılma şansına sahiptir [42].

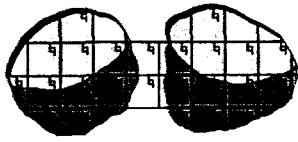
Partikül sayısını hesaplamak için parçalama örnekleme şeması kullanıldığı zaman ne ilgilenilen bölgenin hacmini ne de bölgenin kesitlerdeki izdüşüm alanlarını bilmeye gerek vardır. Sadece gerekli olan şey ilgilenilen bölgenin sınırlarının belirlenmesidir. $V_{(ref)} \times N_v$ ile toplam partikül sayısı (N) hesaplanmak istendiğinde $V_{(ref)}$ hesabı için bölgenin sınırlarının olabildiğince kesin bir biçimde belirlenmesi gerekir. Hücrelerin diffüz olarak organize olduğu ve ektopik kümelenme durumlarında ilgilenilen bölgenin kesin sınırlarının belirlenmesi sıklıkla problem oluşturur. Sınırların belirlenmesindeki varyasyon doğrudan $V_{(ref)}$ hesabının varyasyonunu, bu da toplam nöron sayısı hesabının varyasyonunu etkiler [37, 44, 49].

3.3.1. Kesit Örnekleme Payı:

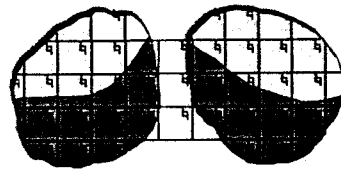
Parçalama örnekleme şeması ile ilgilenilen yapının toplam hacminin bilinmesine gerek duyulmadan, yapıdaki toplam partikül hesabı $V_{(ref)} \times N_v$ ile elde edilene göre daha kısa sürede ve daha az emek sarf edilerek elde edilir. Bunun için: İlgilenilen yapı başından sonuna kadar kesilir. Elde edilen tüm kesitlerden sistematik rastgele örnekleme ile en az 10 kesit elde kalacak şekilde kesit örnekleme yapılır. Örneklemin sistematikliği belli bir kesit örnekleme aralığında yapılması ile sağlanır. Bu ise şu şekilde belirlenir: Diyelim ki elimizde toplam olarak “n” tane kesit olsun. Bu kesitlerden en az 10 tanesi elimizde kalabilmesi için $n/10 = k$ 'dan yola çıkarak her k'ncı kesiti aldığımızda elimizde 10 kesit kalmış olur. Burada “k” kesit örnekleme aralığıdır. Örneklemin rastgele olabilmesi ise 0 ile k arasındaki örneklenecek ilk kesitin rastgele olarak belirlenmesi temeline dayanır. Bunun için 0 ile k arasındaki (k dahil) kesitlerden biri ya rastgele sayı tablosundan veya kesit numaralarının her biri ayrı bir kağıda yazılıp içlerinden biri rastgele çekilerek seçilir. 0 ile k arasındaki kesit m'inci kesit olsun. Bu durumda örneklenen kesit numaraları şöyle olur: $\{m, m+k, m+2k, m+3k, \dots, m+9k\}$. Kesitlerin sistematik rastgele örnekleme şeması ile örneklenmesi neticesinde, yapının her yerinin eşit kesilme şansına sahip olması sağlanır. Burada kesit örnekleme payı (KeÖP) $1/k$ olur [42]. (Şekil 13).

3.3.2. Alan Örnekleme Payı:

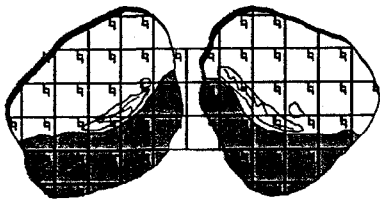
Sistematik rastgele örnekleme ile seçilmiş olan kesitlerdeki ilgilenilen bölgenin izdüşüm alanı önceden belirlenmiş aralıklarla x ve y eksenleri boyunca taranır. Her hangi bir eksen boyunca gerçekleştirilen her harekete *adım aralığı* denir. Her adımla izdüşüm alanı üzerinde bir alan taranır ki bu alana adım alanı denmektedir. X ve y eksenleri boyunca gerçekleştirilen uzunlukların çarpımı ile adım alanı elde edilir. Partikül sayımları bu alanın tamamında değil, partikül büyüklüğüne göre ebadı belirlenen ve adım alanı içine yerleştirilen tarafsız sayım çerçevesi alanında yapılır (Gundersen, 1977). İşte bu alan parçalama oranına, alan örnekleme payı (AÖP) denmektedir ve $AÖP = \frac{a(\text{çerçeve})}{a(\text{adım})}$ ile ifade edilir [42] (Şekil 12'deki kareler ve içindeki küçük sayım çerçeveleri).



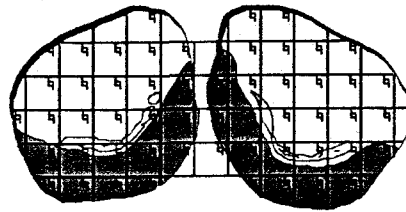
Kesit 4



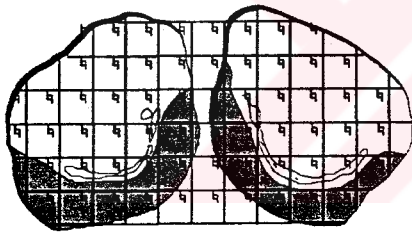
Kesit 8



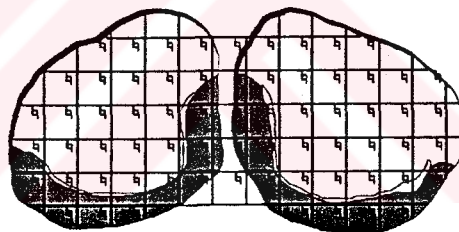
Kesit 12



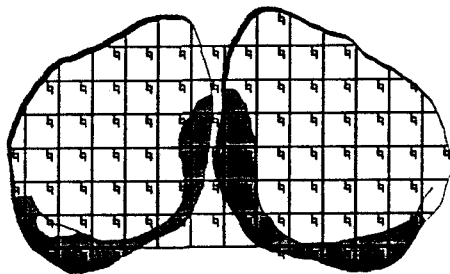
Kesit 16



Kesit 20

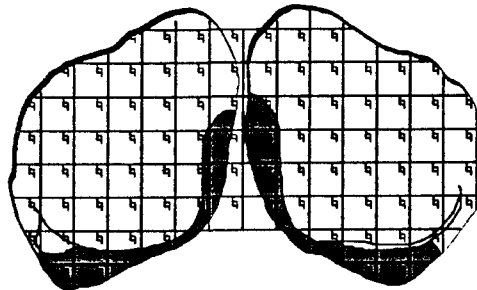


Kesit 24

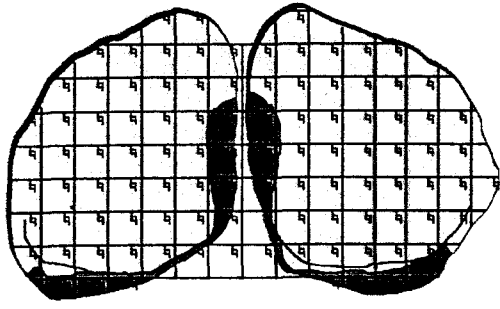


1 mm

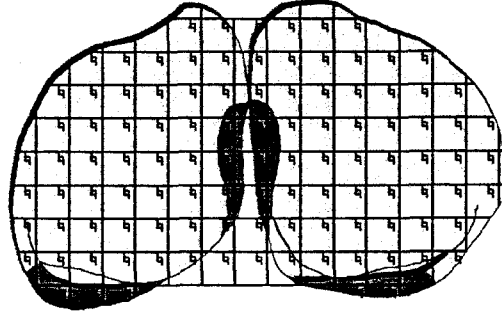
Kesit 28



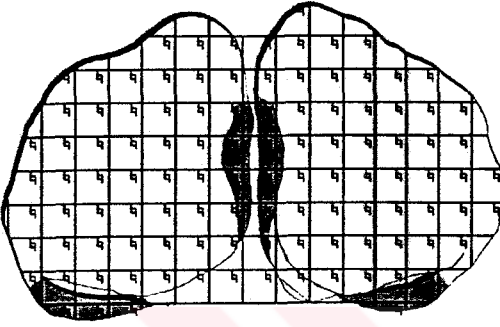
Kesit 32



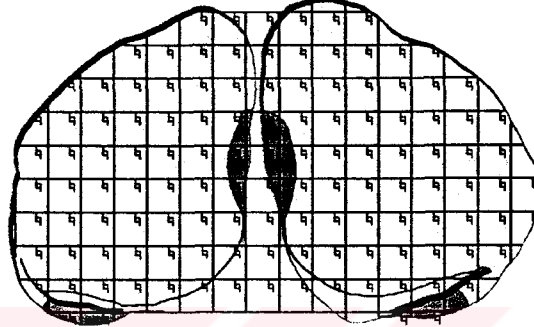
Kesit 36



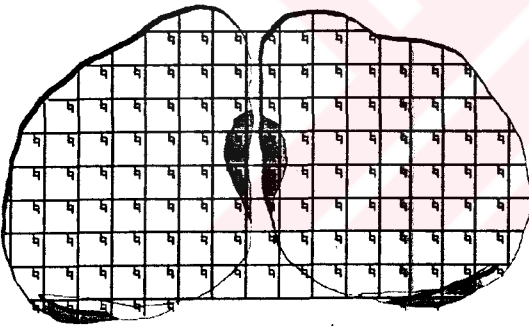
Kesit 40



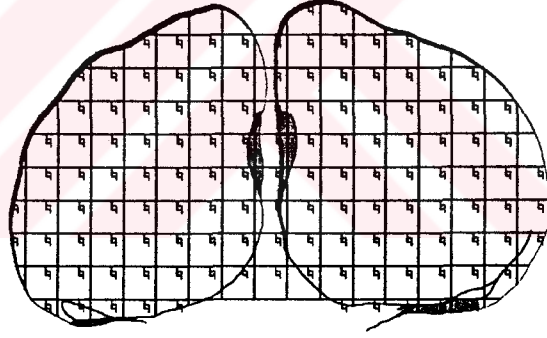
Kesit 44



Kesit 48



Kesit 52



Kesit 56

Şekil 12: Optik parçalama için sistematik rastgele örnekleme (1/4) ile civciv beyninden horizontal düzlemde hippocampus bölgelerini içeren kesitlerin alınması. Civciv beyin hemisferlerinin ve hippocampuslarının sınırları kamera lusida (Nikon 105) ile çizilmiştir. Koyu alanlar hippocampus bölgeleridir. Kesitler üzerinde çizilen kareler optik parçalamada kullanılan adımları, bu karelerdeki küçük çerçeveler ise optik disektörlerin yapıldığı tarafsız sayım çerçevelerini göstermektedir.

3.3.3. Kalınlık Örnekleme Payı:

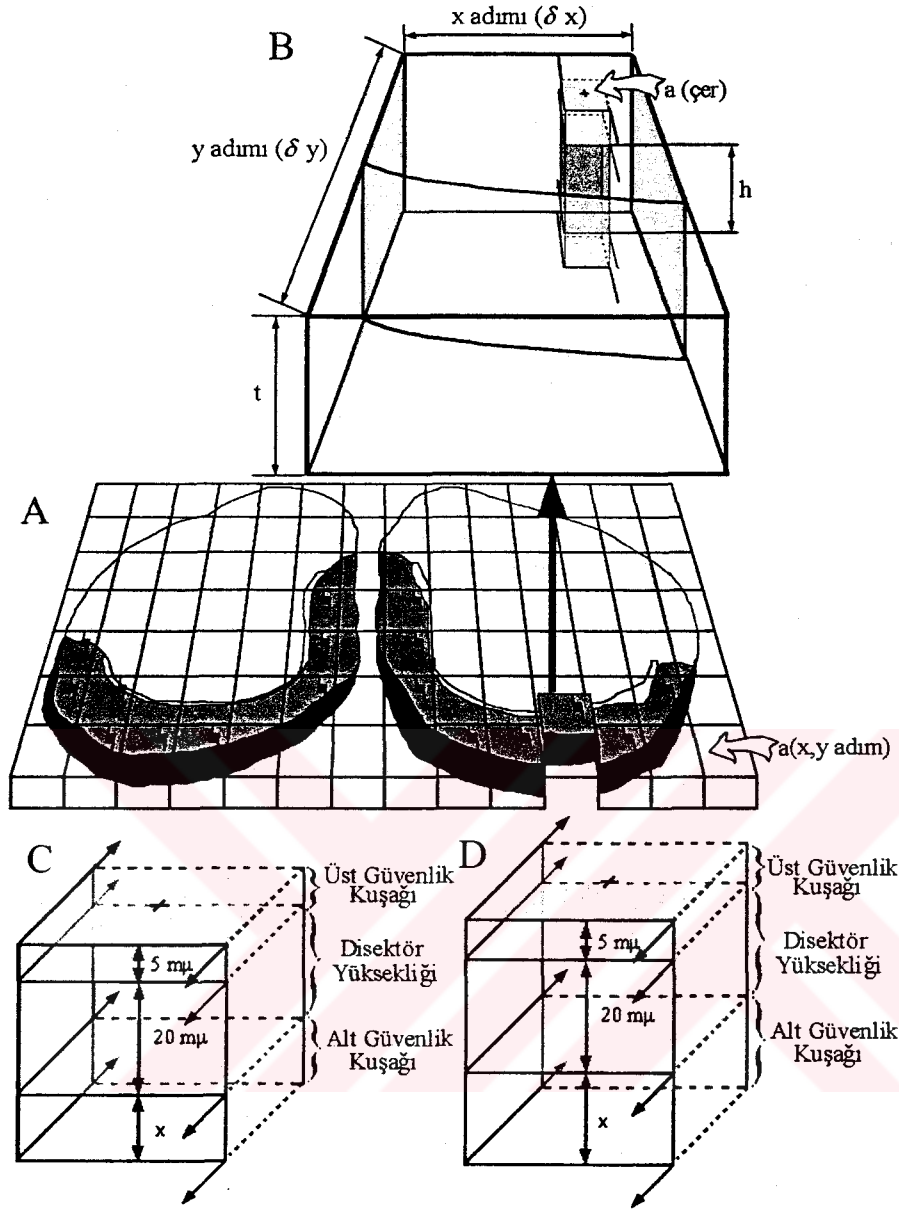
X ve y eksenleri boyunca gerçekleştirilen adımlama ile ilgilenilen yapının izdüşümüne isabet edilmişse, bu alanda tarafsız sayım çerçevesinin kurallarına göre

partikül sayımı gerçekleştirilir. Fakat optik disektör sayım kuralları gereği, kesit kalınlığının tamamı boyunca değil önceden belirlenmiş belli bir oranında sayım yapılmaktadır. Bu ise hem kesit alma esnasında kesit yüzeylerinden partikül dökülmesini ifade eden 'lost caps' problemini ortadan kaldırmakta, hem de kesit kalınlığını kesin bir biçimde bilinmesi gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır. Çünkü optik disektör kuralları gereği kesitin alt ve üst yüzeylerinden kesit içine doğru güvenlik mesafeleri bırakılmaktadır. Partikül sayımları bu güvenlik mesafeleri arasında, miktarı önceden belirlenmiş disektör yüksekliği boyunca yapılmaktadır (Şekil 13). İşte bu disektör yüksekliğinin kesit kalınlığına oranına kalınlık örnekleme payı (fraksiyonu) denmektedir ve aşağıdaki şekilde gösterilir [42]:

$$KaÖP = \frac{h(\text{disektör})}{t}$$

3.3.4. Optik Disektör:

Disektörün sayım kuralı olan birbirine paralel iki komşu ya da yakın kesit üzerindeki partikül izdüşümlerinin olup olmamasına bakılarak partikül sayımı 1984'de Sterio tarafından yeniden detaylı bir şekilde tanımlanmıştır. Bundan birkaç yıl sonra yüksek sayısal açıklığa sahip objektifler kullanılarak kalın histolojik kesitlerde ince optik kesitler alınabileceğinin farkına varıldı. Odak düzlemi veya optik kesit, kesit kalınlığı boyunca belli bir mesafede, kesit üst yüzeyinden alt yüzeyine veya alt yüzeyinden üst yüzeyine doğru hareket ettirilerek, birbirini takip eden optik kesit serilerinde disektör sayım kurallarının uygulanması ile partikül sayımı gerçekleştirilir. Partikül sayımı şu şekilde yapılır: Dokunun belli bir hacmi içinde odaklama ile hareket edilirken görüntü alanına giren yeni partiküller ya da gözden kaybolan partiküller disektör partikül olarak sayılırlar. Odaklama eksenini boyunca yapılan doku içindeki ilerleme mikroskop tablasına monte edilmiş bir mikrokator yardımı ile ölçülür. Kesitin kesilme yüzeylerindeki fiziksel bozukluklardan (lost caps) kaçınmak için sayım yapılan hacim kesit kalınlığının merkezi bölümü ile sınırlı tutulur, yani kesitin alt ve üst yüzeyinden kesit kalınlığı merkezine doğru partikül sayımının yapılmadığı birer mesafe bırakılır ki bunlara "alt ve üst güvenlik mesafeleri" adı verilir. Bu sayım metodu literatüre "optik disektör" olarak geçmiştir. Fiziksel olarak ayrı iki kesitin kullanıldığı orijinal yaklaşıma, optik disektörden ayırt etmek için artık "fiziksel disektör" denmektedir [42, 44, 56].



Şekil 13: Şekil 12'deki kesit 24 üzerinde optik parçalamada kullanılan optik disektörün gösterimi. (A) Adımlama ($300\ 000\ \mu\text{m}^2$) esnasında tarafsız sayım çerçevesi ortasında bulunan (+) işaretinin hippokampus dokusu üzerine isabet eden yerlerinde optik disektör yapılmaktadır. Bu şekilde adımlardan biri (B) daha büyük bir büyütmede şematize edilmiştir. Adımın bir bölümünde doku bulunmamasına rağmen tarafsız sayım çerçevesinin ortasına yerleştirilen (+) işaretinin hippokampus dokusunun üzerine isabet etmesinden dolayı bu adımda optik disektör yapılmaktadır. Kesitin üst yüzeyinden alt yüzeyine kadar olan mesafede üst ($5\ \mu\text{m}$) ve alt ($x\ \mu\text{m}$) yüzeylerde güvenlik kuşakları bırakılarak, (h) kadar bir derinlikte optik disektörler yapılmaktadır. (C) ve (D) Optik disektör uygulaması, kesit yüzeylerinde meydana gelen kayıp partiküllerden sakınmak için, kesitin her iki yüzeyinden de belirli bir mesafe uzaklaşarak kesitin merkezinde sayım yapılmasını önermektedir. Optik disektörde sayıma başlanacak yüzeydeki güvenlik kuşağının mesafesi daima sabit kalırken (örneğin üst yüzeydeki güvenlik kuşağı daima $5\ \mu\text{m}$), alt güvenlik kuşağı ise kesitin kalınlığına göre değişebilmektedir. (C) ve (D)'de çizilen şematik doku dilimlerinin (x) ile işaretlenen alt güvenlik kuşaklarının mesafeleri kesit kalınlıklarının birbirinden farklı olmasından dolayı değişik olduğunu göstermektedir.

Optik disektörün fiziksel disektöre göre en önemli avantajı, iki ayrı fiziksel kesitin iki mikroskopta gözlenerek bir kesitte (örnek kesitte) gözlenip, diğerinde (gözlem kesitte) gözlenmeyen partiküllerin belirlenmesindeki zorluğu ve buna bağlı olarak ortaya çıkan fazla zaman harcama problemini ortadan kaldırmasıdır [44].

3.3.5. Optik Parçalamanın Uygulanması:

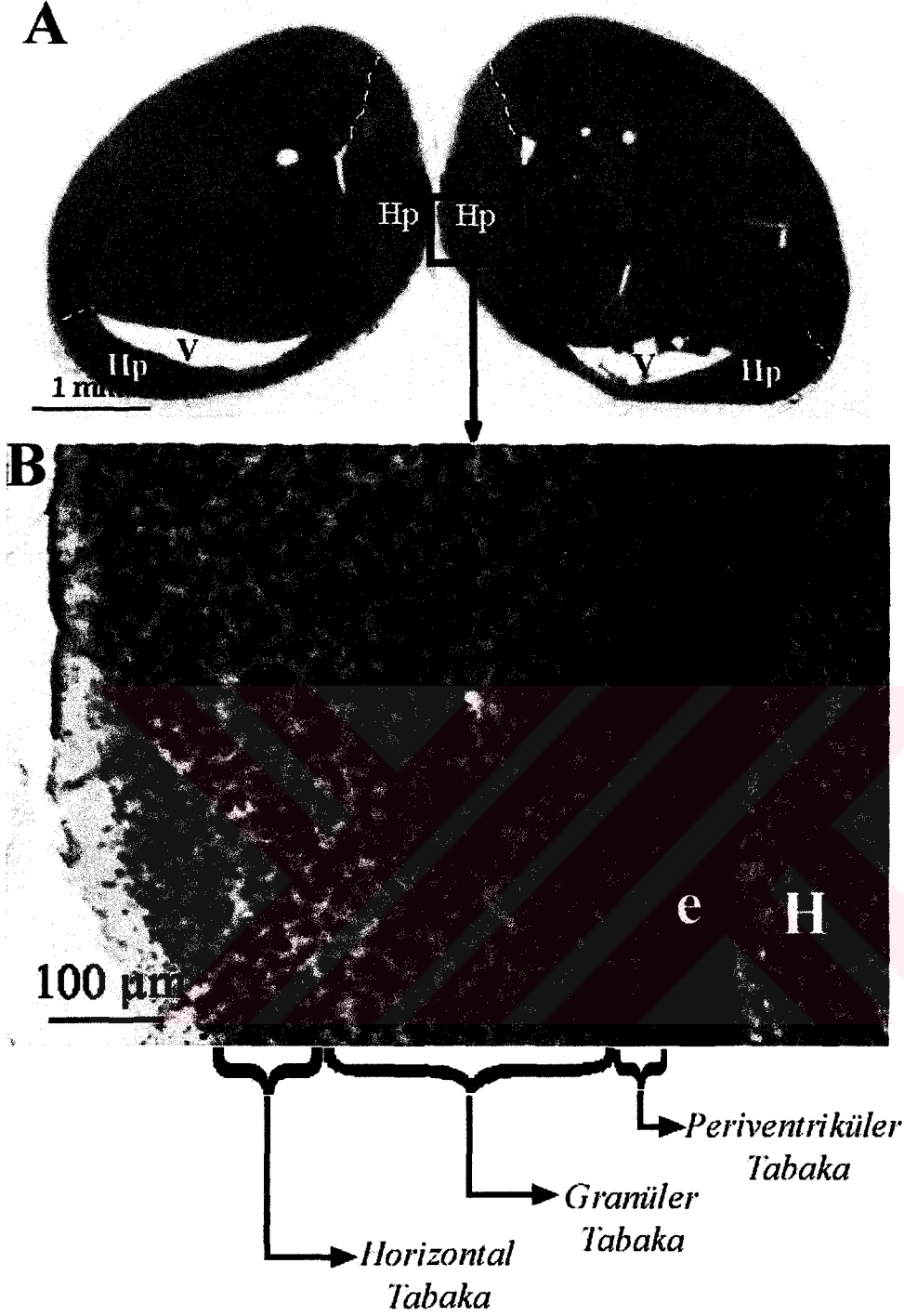
3.3.5.1. Parçalama Örnekleme Şeması:

3.3.5.1.1. Kesit Örnekleme Payı (KEÖP):

Hippokampusun sınırlarının ve toplam kesit sayısının belirlenmesi için yapılan ön çalışmada, hippokampusun horizontal kesitlerinden (Şekil 14), ~40 µm kalınlıkta alınan, toplam 65-85 kesit elde edildi. Optik parçalama için gerekli olan en az 10 kesiti elde edebilmek için 1/4 örnekleme yapmak gerektiği saptandı. Yani her 4 kesitte 1 kesit aldığımız zaman elimizde yaklaşık olarak 15-20 kesit kalmaktadır. Örnekleme artırıldığı zaman gerçek değere daha yakın sonuçlar elde edilebileceğinden dolayı, elde kalan kesit sayısı 10'dan daha fazla olmasına rağmen, kesit örnekleme payı (keöp) ¼ olarak belirlendi. Bu uygulama ile örneklemenin sistematik olması sağlandı. Alınacak ilk kesitin ilk 4 kesit içinden rastgele bir biçimde belirlenmesi ile de, örneklemenin rastgele olması sağlandı. Bunu sağlamak için 4 ayrı kağıda birden dörde kadar rakam yazılıp kağıtlar katlandı, içlerinden biri ilk kesiti belirlemek için seçildi ve her hayvan için bu işlem tekrar edildi. Sistematik rastgele örnekleme yaklaşımı ile örneklenen yapının her yerine eşit örnekleme şansı tanınmaktadır.

3.3.5.1.2. Alan Örnekleme Payı (AÖP):

Alan örneklemesi için öncelikle adım alanını belirlemek gerekir. Bunun için bir hayvandan örneklenen tüm kesitlerdeki hippokampus sınırları içinde, en az 200 nöron sayabilmek için (her adımda en az 1 nöron sayılacağından) 200 adımda sayım yapmak gerektiğinden, her noktası $P(a)$ 1 cm²'yi temsil eden noktalı bir sayım cetveli kullanılarak kesitlerin toplam yüzey alanı hesaplandı. Tüm kesitlerdeki hippokampusun toplam yüzey alanının 200'e bölünmesi ile de bir adım alanının 90 000 µm² olması gerektiği saptandı. Buradan da her bir x ve y eksenini için uzunluğunun 300 µm olması gerektiği hesaplandı.



Şekil 14: A) Bir günlük civciv beyninden horizontal düzlemde alınan bir kesitin görüntüsü. Kesik çizgiler arasındaki bölgeler hipokampustur (Hp); V, ventrikül. Cresyl violet boyaması. B) Işık mikroskobu altında kuş hipokampusunun tabakaları. Tabakalar Molla ve ark., (1986)'a göre isimlendirilmiştir. H, hiperstriatum; e, ventrikül duvarını astarlayan ependimal hücreler. Cresyl violet boyaması. Kesit kalınlığı $\cong 40 \mu\text{m}$.

Adım Alanı= Toplam Nokta Sayısı x p(a) x Büyütme Derecesi/200,

$$\text{Adım Aralığı} = \sqrt{\text{Adım Alanı}} = \sqrt{90\,000 \mu\text{m}^2} = 300 \mu\text{m}$$

Civciv hippocampusunun medial bölgesindeki nöronlar daha büyük olduğundan tarafsız sayım çerçevesinin ebadı bu hücrelere göre belirlendi. Bu işlem için immersiyon objektifi ile hücreler gözleendiği zaman bir çerçeve içine bir hücre düşebilmesi için en uygun alanın $400 \mu\text{m}^2$ olduğu hesaplandı. Bu durumda alan örnekleme payı:

$$AÖP = \frac{400 \mu\text{m}^2}{90000 \mu\text{m}^2} = \frac{1}{225}$$

3.3.5.1.3. Kalınlık Örnekleme Payı (KaÖP):

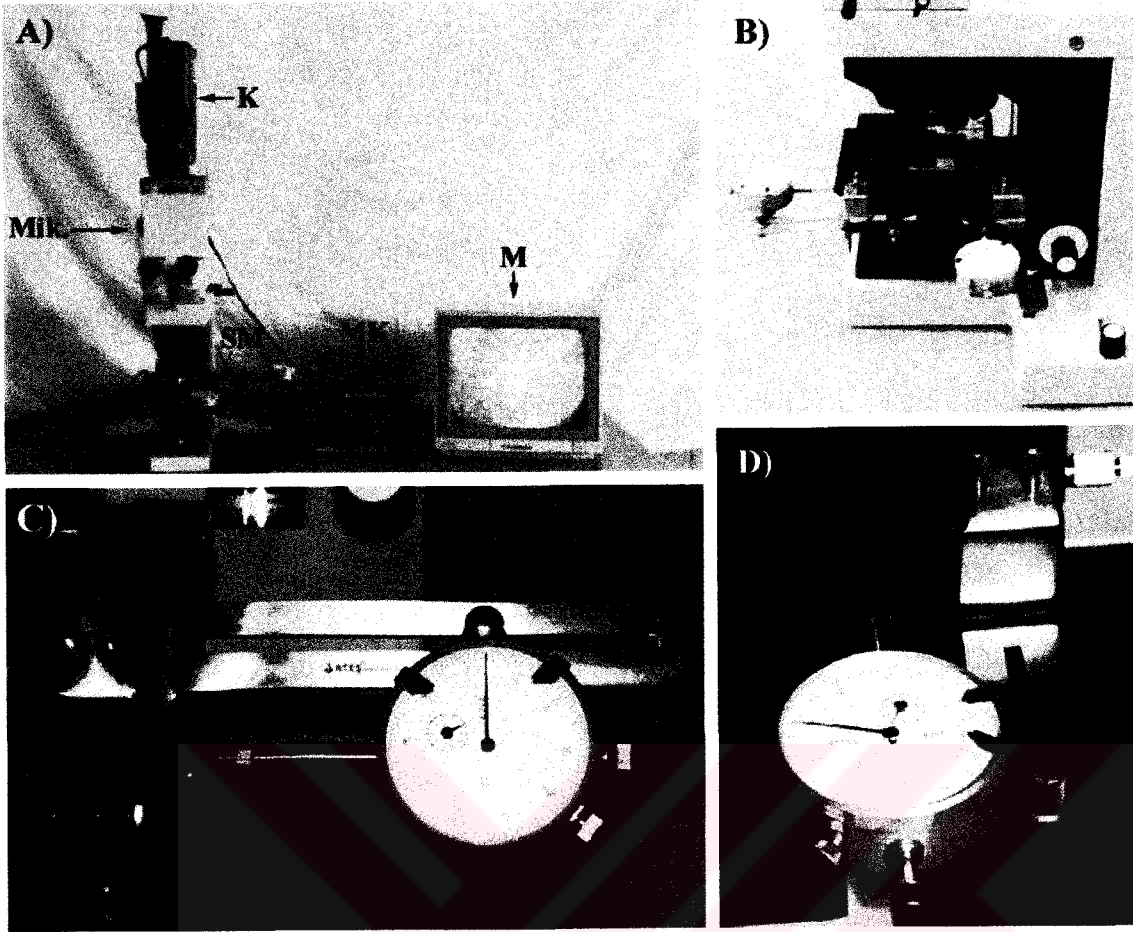
Kalınlık ölçümleri ile disektör yüksekliğinin ve güvenlik kuşağının ölçümünde Heidenhein marka mikroskop kullanıldı. Ortalama kesit kalınlıklarının (\bar{t}) 30-40 μm civarında olduğu tespit edildi. Disektör yüksekliğinin (h) 20 μm , üst güvenlik kuşağının ise 5 μm olmasına karar verildi. Bu durumda kalınlık örnekleme payı:

$$KaÖP = \frac{h(20 \mu\text{m})}{t}$$

3.3.5.2. Optik Disektör ile Sayım:

Kuş hippocampal kompleksi, dorsal telensefalonun orta hattına yakın yerleşmiş bir çift yapıdır. Hippokampus, striatumun kaudal sınırından striatumun kaudo-rostral uzanımının yaklaşık üçte ikilik kısmı boyunca uzanmaktadır [57]. Koronal kesitlerde, medialde orta hatla, ventralde ise septum ve ventrikülün lateral boynuzları ile sınırlanmaktadır. Karten ve Hodos'a (1967) [58 (Székely ve Krebs 1996 tarafından site edilmiştir)] göre hippocampus olarak tanımlanan bölge medial ve lateralde uzanan sıkıca paketlenen V-şekilli yapıdır [26, 30,]. Parahippokampal alanda büyük ve küçük nöronlar seyrek ve nonuniform dağılmışlardır. Parahippokampal alanın lateral sınırları nöronların ebat dağılımındaki çeşitlilik ile karakterizedir [35].

Hippokampus sınırlarının belirlenmesinde hata yapılan yer, lateral sınırlardır. Burada dikkat edilmesi gereken husus, hücre ebadındaki değişimin fark edilmesidir [8]. Bu hatadan sakınmak için çalışmamızda tüm kesit ve hayvanlarda aynı bölgeler (hücre ebadındaki değişimin görüldüğü yer) lateral sınır olarak alındı.



Şekil 15: A) Optik parçalama metodu kullanılarak hücre sayımı ve hacim hesaplamalarının yapıldığı sistemin genel görüntüsü. Sistem; mikroskop (Mik.), kamera (K), stagemeter (SM), mikrokator (MK) ve monitörden (M) oluşmaktadır. Mikroskop tablasının y (C) ve x (D) eksenlerindeki hareketi ölçen dial indikatörler (B).

Nöron sayımları Jena-Zeis marka mikroskop ile sayısal açıklığı 1,25 olan immersiyon objektifi kullanılarak yapıldı. X ve y eksenlerindeki adımlama ise mekanik stagemeter³ (adım ölçer) ile yapıldı. Adım ölçer, mikroskop tablasına monte edilebilen, her biri x ve y eksenlerindeki hareketi 10 µm hassasiyetle (Bir mikron hassasiyette olan dial indikatörler kullanılarak hassasiyet 1 mikrona yükseltilebilir.) gösterebilen bir sistemdir (Şekil 14). Adım ölçerin hassasiyeti tabla mikrometrik diskiyle test edildi. Adım ölçerin dial indikatörleri yaylı bir sisteme sahip olduğundan dolayı, sayım esnasında ne kadar sapma gösterdiğini belirlemek için, saatlik sapması hesaplandı. Tekrarlanan ölçümler neticesinde ortalama 0,31 µm²/saat sapma gösterdiği saptandı. Mikroskoptaki görüntü Loewe (Japon malı) marka kamera vasıtası ile monitöre

³ Anabilim Dalımız Öğretim üyesi Doç. Dr. Süleyman Kaplan ve arkadaşları tarafından dizayn edilmiştir.

nakledildi. Monitöre verilen görüntünün çizgisel nihai büyütmesi yine tabla mikrometrik disk ile ölçülerek 3000 olduğu bulundu. Sayımda kullanılan ve gerçekte bir kenarı 20 µm olan tarafsız sayım çerçevesinin monitör üzerindeki bir kenarının uzunluğu, toplam büyütme derecesi ile çarpılarak 6 cm olması gerektiği bulundu (20 µm x 3000 = 60 000 µm= 6 cm) ve bir asetat üzerine çizilerek monitör ekranına yapıştırıldı.

Sayımlara kesitin monitördeki görüntüsünün daima sağ alt köşesinden başlandı ve önce, x sonra da y eksenini boyunca adımlama yapıldı. X veya y eksenini boyunca hareket esnasında her adımın hippokampus sınırları içine düşüp düşmediğini belirlemek için tarafsız sayım çerçevesinin ortasına + işareti çizildi. Eğer, + işareti hippokampus sınırları içinde ise daima kesitin üst yüzeyinden başlayıp alt yüzeyine doğru optik disektör sayım kurallarına göre sayım yapıldı, içinde değilse yapılmadı. Hippokampus sınırları içine düşen her adım, disektör partikülü olsun veya olmasın, x ve y koordinatları ve kesit kalınlığı ile birlikte bir tabloya yazıldı. Bu adımlar noktalı alan ölçüm cetveli gibi kullanılarak kesitlerdeki toplam hippokampus izdüşüm alanı hesaplandı. Toplam izdüşüm alanı ile ortalama kesit kalınlığı (\bar{t}) çarpımı sonucunda hippokampus hacmi hesaplandı:

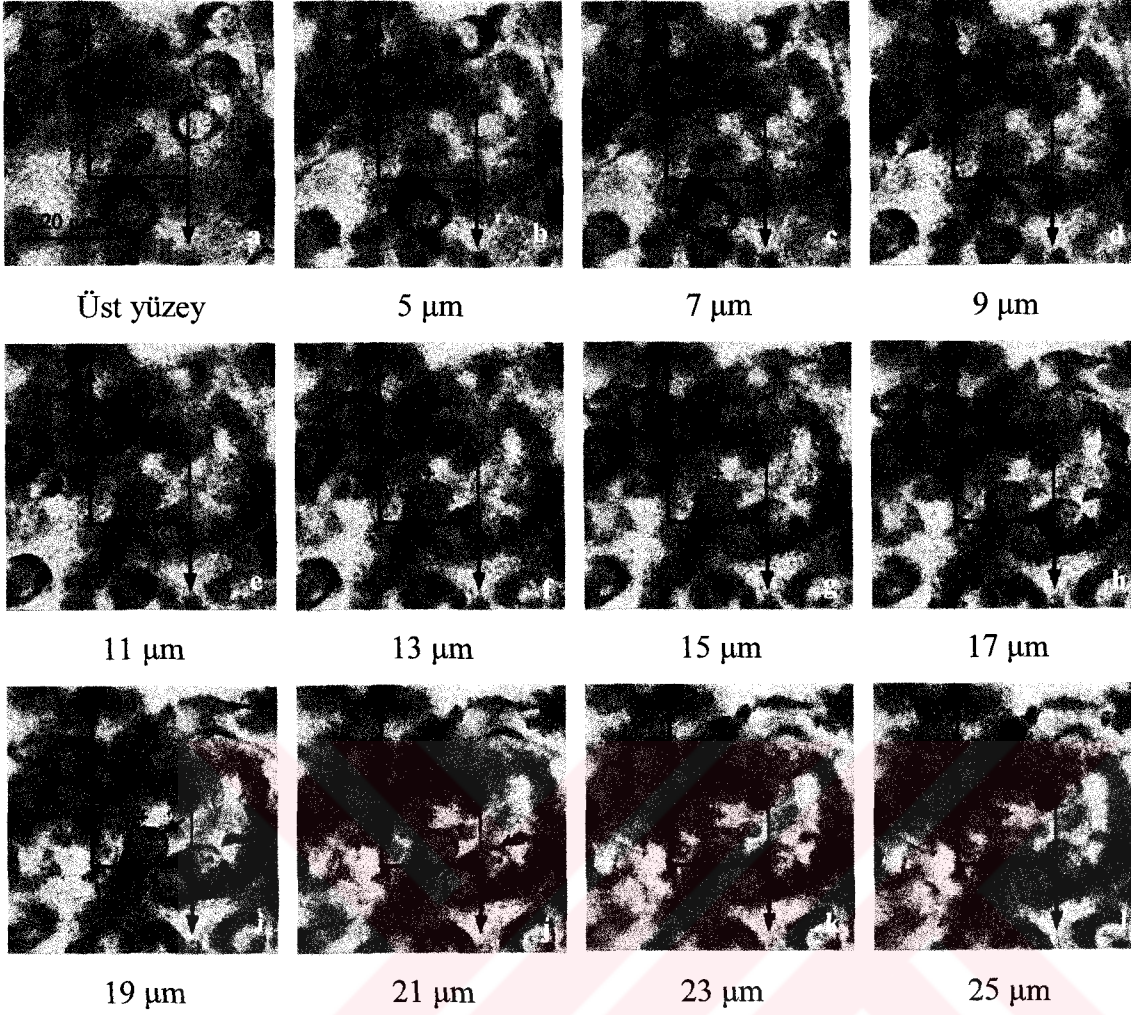
$$\sum \text{Alan (Hp)} = \sum \text{Adım sayısı} \times \text{adım alanı} (90\,000 \mu\text{m}^2)$$

$$\sum \text{Hacim (Hp)} = \sum \text{Alan (Hp)} \times \bar{t}$$

Tarafsız sayım çerçevesinin ortasına çizilen + işareti hippokampus sınırları içine düştüğü durumda aşağıda açıklandığı gibi optik disektör sayım kurallarına göre partikül sayımları yapıldı (Şekil 15).

Öncelikle görüntü alanındaki tarafsız sayım çerçevesi içinde (her hangi bir alanda değil) ilk netleşen nöron veya hücreler arası mesafe kriter alınarak kesitin üst yüzeyi belirlendi ve mikrokatorun göstergesi sıfırlandı.

Mikroskobun mikrovidası ile kesit içinde optik olarak ilerleyerek kesit yüzeyinin 5 µm altına inildi. Bu mesafede sayım yapılmayarak üst güvenlik kuşağı oluşturuldu. Bunun ile kayıp kep problemi çözüldü. 5. µm'de net nöron gözleniyorsa bu da sayım dışı bırakıldı (55).



Şekil 16: Optik disektör metoduyla sayım. Kesit üst (a) ve alt yüzü (m) ile disektör yüksekliği boyunca 2 µm aralıklı optik kesitlerin (b-l) fotoğrafları çekilmiştir. Sayımda kullanılan tarafsız sayım çerçevesinin yasak kenarları ve bu kenarların uzantıları kırmızı, serbest kenarlar ise yeşil olarak çizilmiştir. Çerçevenin ortasındaki (+) işareti hipokampusu isabet etmişse o çerçevede sayım yapılmıştır. Odak düzlemi kesit üstünden kesite doğru yaklaşırken, dokunun net görüldüğü ilk yer kesit üst yüzeyi (a) olarak belirlendi ve mikrokator göstergesi sıfırlandı. Bundan sonra kesit üst yüzeyinden kesit içine doğru 5 µm ilerleyerek üst güvenlik kuşağı bırakıldı. Nöron sayımında

çekirdeklerin en geniş çaplı görünümünün olduğu seviyeler kriter olarak alındı. Çerçeve içine düşen ilk çekirdek [(kırmızı ok ile gösterilen (e))] yasak kenarla kesiştiği için sayılmadı. Yeşil ok ile işaret edilen çekirdek (g) çerçeve içine düşmüş ve çerçevenin serbest kenarı ile kesiştiği için disektör partikül olarak sayıma dahil edilmiştir. (i)'de gözlenen çekirdek yasak kenarın uzantısı ile (j)'de gözlenen partikül ise yasak kenarla kesiştiği için sayım dışı bırakılmıştır. (k)'de gözlenen yeşil okla işaretli çekirdek serbest kenarla kesiştiği için sayılmıştır. (l)'de disektör yüksekliğinin sonuna gelinmiş ve buradan kesit alt yüzeyine kadar olan mesafe alt güvenlik kuşağı olarak bırakılmıştır. Net olarak en son görülen görüntü düzlemi, kesitin alt yüzeyidir. Kesit üst ve alt yüzeyi arasındaki mesafenin (m) 33 µm olduğu ölçüldü. Cresyl violet boyaması.

Bundan sonra 20 µm boyunca kesitin alt yüzüne doğru optik kesitler olarak tarafsız sayım çerçevesinin sayım kurallarına göre yani çerçeve içine düşen veya serbest çizgilerle kesişen fakat yasak çizgilerle ve onların uzantıları ile kesişmeyen nöronlar sayıldı. 20. µm'de net nöron görüntüsü varsa (Nöron sayımında çekirdek esas alındı. Eğer çekirdek en geniş çapta ve net görünüyorsa) bu kez sayıma dahil edildi.

Kesit alt yüzeyi, son olarak gözlenen (buzlu cam görüntüsünden hemen önceki) netlik kriter alınarak belirlendi ve kesit kalınlığı tespit edilerek not edildi. Bu şekilde her hayvan için örneklenen bütün kesitlerdeki hippocampusu isabet eden bütün adımlarda nöron sayımları ve kalınlık ölçümleri yapıldı.

Neticede her hayvan için aşağıdaki formül kullanılarak hippocampusdaki toplam

nöron sayısı (N) hesaplandı:
$$N = \sum Q \times \frac{1}{KeÖP} \times \frac{1}{AÖP} \times \frac{1}{KaÖP}$$

$\sum Q$: Örneklenen kesitlerde hippocampus sınırları içine düşen disektörlerde sayılan nöronların toplam sayısı,

KeÖP: Kesit örnekleme payı,

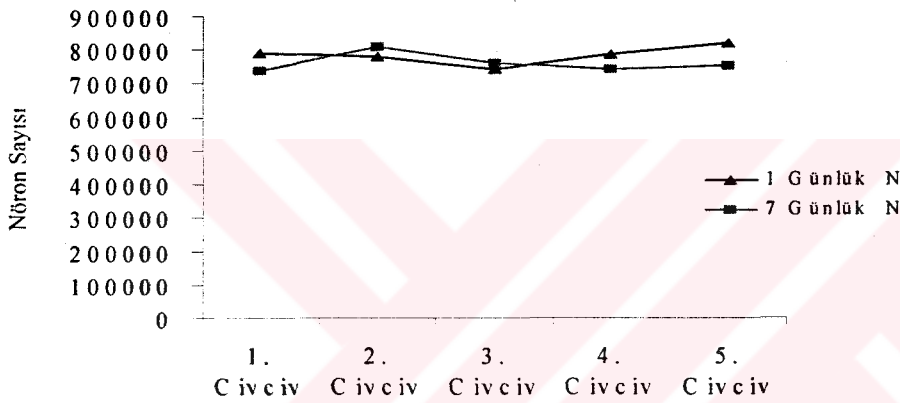
AÖP : Alan örnekleme payı,

KaÖP :Kalınlık örnekleme payıdır.

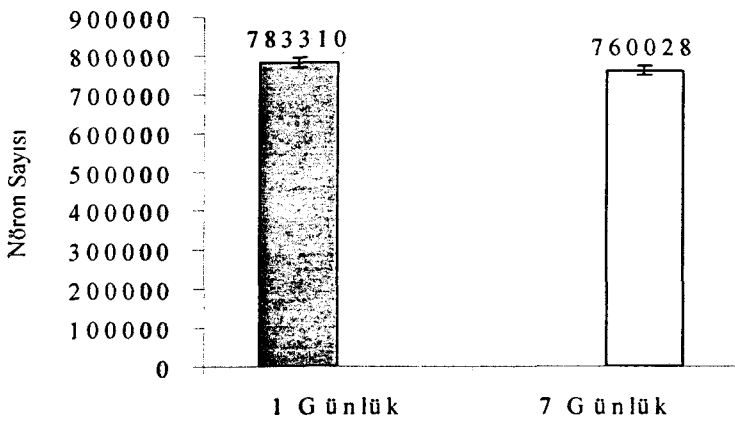
4. BULGULAR

Çalışmamızın amacı; son zamanlarda geliştirilen ve istatistiksel olarak gerçek değere yakın sonuçlar veren yeni stereolojik metotlar kullanarak daha önce belirtilen metotlar ile araştırılmamış bir ve yedi günlük civcivlerin hippocampuslarındaki toplam nöron sayısının hesaplanmasıdır.

Verilerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Her birinde beşer adet erkek civciv bulunan bir ve yedi günlük civcivlerin toplam hippocampus nöron sayıları birbiriyle karşılaştırıldığında yedi günlük civcivlerin toplam nöron sayılarında azalma olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı (Şekil 18 ve 19) gözlemlendi ($P>0.05$).

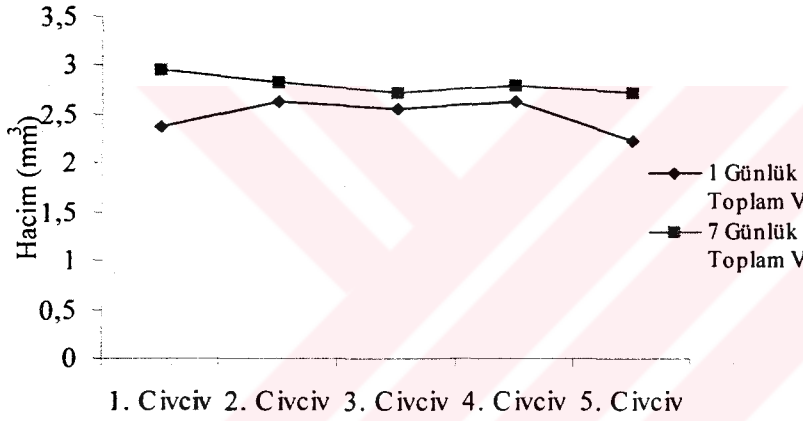


Şekil 17: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerin sağ hippocampuslarında toplam nöron sayılarının karşılaştırılması ($P>0.05$).

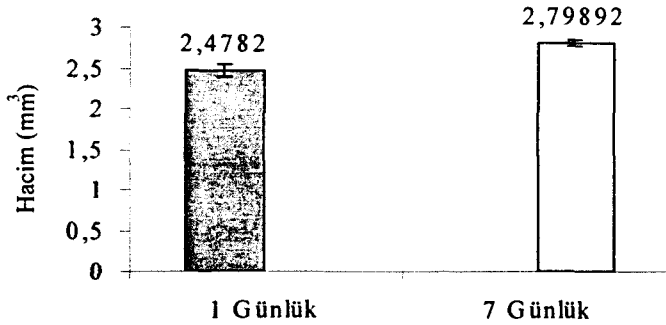


Şekil 18: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerin sağ hippocampuslarında ortalama toplam nöron sayılarının karşılaştırılması ($P>0.05$).

Çalışmamızda kullanılan civcivler arasında gün farkının fazla olmaması nedeniyle her iki grubun beyinlerinin doku takip işlemlerine benzer biçimde (şişme veya büzüşmeye) cevap verebileceği düşünülerek hacim hesaplamaları yapıldı. Optik parçalama metodu ile nöron sayımı esnasında kullanılan tarafsız sayım çerçevesinin merkezine yerleştirilen bir (+) işareti ile hippocampus hacimleri hesaplandı. Adımlama işleminde kesitlerde araştırılan dokuya isabet eden toplam nokta sayısının (ΣP) (Her bir noktanın temsil ettiği alan $90\ 000\ \mu\text{m}^2$ 'dir) ortalama kesit kalınlığıyla (\bar{t}) çarpılmasıyla bir civcivin hippocampus hacmi bulunur. Bu şekilde hesaplanan bir ve yedi günlük civciv hippocampuslarının hacimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark (Şekil 20 ve 21) gözlemlendi ($P < 0.01$).

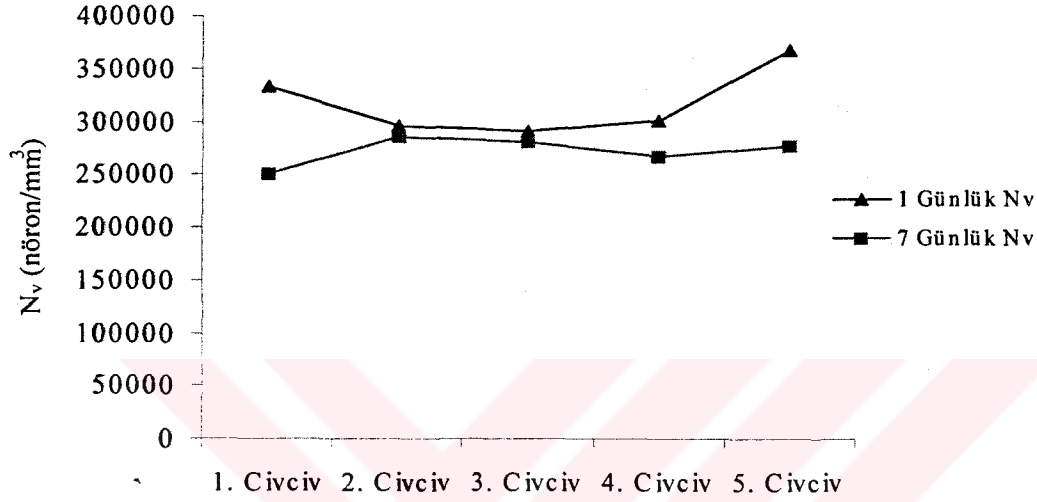


Şekil 19: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerde toplam sağ hippocampus hacimlerinin karşılaştırılması.

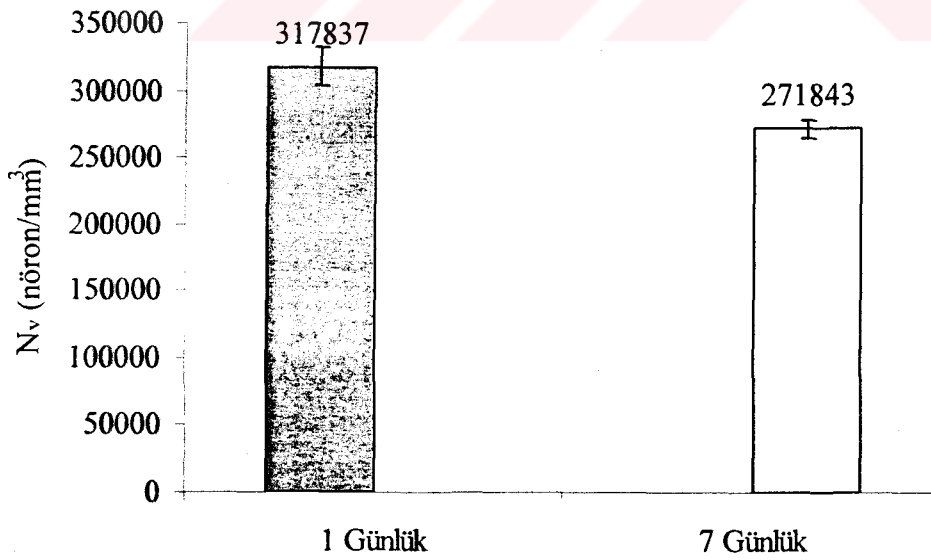


Şekil 20: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerin ortalama toplam sağ hippocampus hacimlerinin karşılaştırılması ($P < 0.01$).

Her bir civciv için hesaplanan toplam nöron sayısı, hacimlerine bölünerek birim hacimdeki nöron sayısı bulundu (Şekil 22). Bir ve yedi günlük erkek civcivlerin ortalama sayısal yoğunlukları birbiriyle karşılaştırıldığında, sayısal yoğunluğun da hacimler arasında gözlenen anlamlı farklılığı ($P<0.01$) gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 22 ve 23).



Şekil 21: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerde sayısal yoğunluk (N_v) değerlerinin karşılaştırılması ($P<0.01$).



Şekil 22: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerde ortalama sayısal yoğunluk (N_v) değerlerinin karşılaştırılması ($P<0.01$).

Toplam nöron sayısı, hacim ve sayısal yoğunluk verilerinin hesaplanması esnasında hayvanlar arasında gözlenen varyasyon katsayıları Tablo-I'de verilmiştir.

Tablo I: Optik parçalama metodu ile bir ve yedi günlük erkek civcivlerin yalnızca sağ hippocampuslarındaki toplam nöron sayısı, hacimleri ve sayısal yoğunluklarının hesaplanması ve bu hesaplamalarda kullanılan parametreler.

1 GÜNLÜK

Civciv	1	2	3	4	5
Kesit Kalınlığı (μm)	39,73	34,93	33,67	37,87	35,53
Adım Aralığı (μm)	300	300	300	300	300
Toplam Nokta Sayısı	166	209	210	192	174
h(dis) (μm)	20	20	20	20	20
a(adım) (μm^2)	90000	90000	90000	90000	90000
a(çerçeve) (μm^2)	400	400	400	400	400
Disektör Partikül	441	494	490	463	512
Hata Katsayısı	0,048	0,045	0,045	0,046	0,044
1/AÖP	225	225	225	225	225
1/KaÖP	1,99	1,75	1,68	1,89	1,78
1/KeÖP	4	4	4	4	4
Disektör Hacmi (μm^3)	8000	8000	8000	8000	8000
Toplam Nöron Sayısı	789831	778050	740880	787563	820224
Hp hacmi(mm³)	2,3742648	2,6281332	2,545452	2,6175744	2,2255992
Nv (nöron /mm³)	332663,4	296046,64	291060,29	300875,12	368540,75

7 GÜNLÜK

Civciv	1	2	3	4	5
Kesit Kalınlığı (μm)	41,36	41,36	34,73	39,71	37,53
Adım Aralığı (μm)	300	300	300	300	300
Toplam Nokta Sayısı	198	190	217	195	201
h(dis) (μm)	20	20	20	20	20
a(adım) (μm^2)	90000	90000	90000	90000	90000
a(çerçeve) (μm^2)	400	400	400	400	400
Disektör Partikül	396	433	485	415	445
Hata Katsayısı	0,05	0,048	0,045	0,049	0,047
1/AÖP	225	225	225	225	225
1/KaÖP	2,07	2,07	1,74	1,99	1,88
1/KeÖP	4	4	4	4	4
Disektör Hacmi (μm^3)	8000	8000	8000	8000	8000
Toplam Nöron Sayısı	737748	806679	759510	743265	752940
Hp hacmi(mm³)	2,9481408	2,829024	2,7131076	2,787642	2,7156708
Nv (nöron /mm³)	250241,78	285143,92	279940,98	266628,57	277257,46

Tablo II: Bir günlük erkek bir civcivin sağ hippocampusundaki toplam nöron sayısının bulunması esnasında gözlenen hata katsayısının (HK) hesaplanması [53].

HAYVAN No:1-1				
Kesit	Q	Q _i .Q _i	Q _i .Q _{i+1}	Q _i .Q _{i+2}
1	45	2025	2745	2610
2	61	3721	3538	3904
3	58	3364	3712	2842
4	64	4096	3136	1664
5	49	2401	1274	1764
6	26	676	936	702
7	36	1296	972	864
8	27	729	648	486
9	24	576	432	360
10	18	324	270	90
11	15	225	75	75
12	5	25	25	30
13	5	25	30	10
14	6	36	12	0
15	2	4	0	0
TOPLAM:	441	A:19523	B:17805	C:15401
NOISE:	441			
SRÖ _{var}	5,94583	HK:	0,04794	
TOPLAM _{var}	446,946	% NOISE:	98,6697	

$$SRÖ_{var} = (3.(A - Noise) - 4.B + C)/240$$

$$= (3.(19523 - 441) - 4.17805 + 15401)/240 = 5,94583$$

$$Noise_{var} = \sum Q = 441$$

$$Toplam_{var} = Noise_{var} + SRÖ_{var} = 5,94583 + 441 = 446,946$$

$$HK(\sum Q) = \frac{\sqrt{Toplam_{var}}}{\sum Q} = \frac{\sqrt{446,946}}{441} = 0,04794$$

Tablo III: Bir günlük erkek bir civcivin sağ hippocampus hacminin saptanması esnasında gözlenen hata katsayısının (HK) hesaplanması [53].

HAYVAN No:1-1				
Kesit	P	P _i .P _i	P _i .P _{i+1}	P _i .P _{i+2}
1	20	400	660	480
2	33	1089	792	660
3	24	576	480	360
4	20	400	300	160
5	15	225	120	135
6	8	64	72	48
7	9	81	54	72
8	6	36	48	30
9	8	64	40	40
10	5	25	25	25
11	5	25	25	20
12	5	25	20	15
13	4	16	12	4
14	3	9	3	0
15	1	1	0	0
TOPLAM:	166	A: 3036	B: 2651	C: 2049
NOISE:	7,4625			
SRÖ _{var}	2,2109	HK:	0,0187	
TOPLAM _{var}	9,6734	% NOISE:	77,145	

$$SRÖ_{var} = (3.(A - Noise) - 4.B + C)/240$$

$$= (3.(3036 - 7,4625) - 4.2651 + 2049)/240 = 2,2109$$

$$Noise_{var} = \sum Q = 7,4625$$

$$Toplam_{var} = Noise_{var} + SRÖ_{var} = 2,2109 + 7,4625 = 9,6734$$

$$HK (\sum P) = \frac{\sqrt{Toplam_{var}}}{\sum P} = \frac{\sqrt{9,6734}}{166} = 0,0187$$

Tablo IV A ve B: Bir ve yedi günlük erkek civcivlerde sağ hippocampustaki toplam nöron sayıları, hippocampus hacimleri, sayısal yoğunluk değerleri ve bu değerlerin ortalamaları ile bunların elde edilmesi esnasında gözlenen standart sapmalar (SS), grup içi gözlenen varyasyon katsayıları (CV), hata katsayıları (CE) ve ortalamanın standart hata (SEM) değerleri gözlenmektedir.

A)					
1 Günlük	N	N-CE	V	V-CE	Nv
1. Cıvciv	789831	0,048	2,374265	0,019	332663
2. Cıvciv	778050	0,045	2,628133	0,017	296047
3. Cıvciv	740880	0,045	2,545452	0,015	291060
4. Cıvciv	787563	0,047	2,617574	0,016	300875
5. Cıvciv	820224	0,044	2,225599	0,017	368541
Ortalama	783310±12749,96	0,046	2,478205±0,08	0,017	317837±14612,03
SS	28509,77		0,17		32673,49
CV	0,036397		0,070193		0,1028
B)					
7 Günlük	N	N-CE	V	V-CE	Nv
1. Cıvciv	737748	0,050	2,9491408	0,017	250242
2. Cıvciv	806679	0,048	2,829024	0,017	285144
3. Cıvciv	759510	0,046	2,713108	0,017	279941
4. Cıvciv	743265	0,049	2,787642	0,018	266629
5. Cıvciv	752940	0,047	2,715671	0,015	277258
Ortalama	760028±12256,06	0,048	2,798917±0,04	0,017	271843±6187,8
SS	27405,38		0,10		13834,79
CV	0,036058		0,034775		0,050893

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bulgularımızın genel bir özeti aşağıdadır:

1. Yedi günlük civcivlerin sağ hippocampuslarının toplam nöron sayısı, bir günlük civcivlerin aynı hippocampuslarından daha az sayıda nöron bulundurmasına karşın aradaki fark anlamlı değildi ($P>0,05$).
2. Yedi günlük civcivler, büyümelerine paralel olarak hippocampus hacimleri, bir günlük civcivlerin hippocampus hacimlerine göre anlamlı derecede artış göstermekteydi ($P<0,01$).
3. İki grup arasında toplam nöron sayıları bakımından anlamlı bir fark gözlenmemesine rağmen, iki grubun hacimleri arasında ortaya çıkan anlamlı farklılık, sayısal yoğunluklar arasında da anlamlı bir farklılığı netice vermesi beklenen bir sonuçtu.
4. Taramalarımıza göre daha önce civciv hippocampusundaki toplam nöron sayısını araştıran bir çalışma - Canan'ın (1998) [53] çalışması hariç - yapılmadığından sonuçlarımızı doğrudan karşılaştırabileceğimiz başka verilere rastlanamamıştır.

Kuş hippocampusunun saklanan yiyecek yerlerinin [14] ve yumurta bırakılan yuvaların hatırlanması [12], göç yollarının [59] ve yuva yerleşkesinin öğrenilmesi [7] işlemlerinde rol aldığı bilinmektedir. Bu yorum, bölgeyi kapsayan lezyon yahut hacim [5, 6] karşılaştırma çalışmalarından çıkartılmaktadır. Deneysel çalışmalar, gerek etik açıdan, gerekse yeterli sayıda gönüllü denek bulunamamasından dolayı çoğu zaman insan üzerinde yapılamamaktadır. Organizmadaki esas mekanizmaların normal veya patolojik durumlardaki işleyiş biçimlerinin anlaşılması ile ancak patolojik durumlar tedavi edilebilirler. Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı insanlarda bu mekanizmaların çoğu doğrudan araştırılmamaktadır. Bu ise, araştırmacıları değişik hayvan modelleri üzerinde çalışarak temel mekanizmaları anlamaya yönlendirmektedir. Çalışmamızın amacı giriş bölümünde de belirtildiği gibi, çoğu bölgesi memeli hippocampusu ile homolog olan civciv hippocampusunu araştırmaktır. Bu konunun araştırılmasını hedefleyen çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları Canan'ın (1998) [53] sonuçları dışında doğrudan karşılaştırabileceğimiz başka bir civciv hippocampusu nöron sayısı ve hippocampus hacim çalışması bulunmamaktadır. Bundan dolayı

sonuçlarımızı kuşların başka türlerinden elde edilen hippocampusun toplam nöron sayısı ve hacim sonuçları ile karşılaştıracaktır. Bu yaklaşımda ise karşımıza iki handikap çıkmaktadır. Biri yukarıda belirtildiği gibi aynı hayvan türünde, Canan (1998) [53] 'ın çalışması dışında başka bir çalışmanın olmaması, diğeri ise farklı kuş türlerinin hippocampusundan elde edilen toplam nöron sayısı ve hacimlerinin hesaplanmasında stereolojik olmayan metotların kullanılmasıdır. Stereolojik olmayan metotların kullanılması, aynı hayvan türü üzerinde çalışılmasına karşın, araştırmacıların sonuçları arasında önemli farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (bk. Tablo V). Oysaki son on yıllık bir zaman diliminde geliştirilen tarafsız stereolojik metotlar, etkin ve gerçek değere daha yakın sonuçlar verebilmektedir. Buna karşın, kullanılan nonstereolojik metot, ne kadar gerçeğe yakın ön kabullerle hesaplama yapıyorsa, sonuçları o kadar gerçek değere yaklaşacaktır. Tablo V'den de görüleceği gibi, stereolojik metotların kullanılmadığı çalışmalarda, mikrotomda alınan kesitlerin kesit kalınlıklarının tüm kesitlerde aynı olduğu; kesit içi varyasyonun olmadığı; aynı işlemlerden geçirilen genç ve yaşlı birey beyinlerinin aynı oranda büzüleceği; kesme ve boyama işlemleri esnasında kesitlerin alt ve üst yüzeylerinden partiküllerin düşmeyeceği; partikül izdüşümlerinin partiküllerin bizzat kendileri olarak sayılabileceği; fazla sayım ile sonuçlandırıldığı bilinen kare veya dikdörtgen biçimli sayım çerçevelerinin fazla sayıma neden olmayacakları ve kesit kalınlığındaki artışa bağlı olarak maksimum çapta gözlenebilecek partikül sayısının artmayacağı gibi ön kabuller, aynı hayvan grubu üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçların birbirinden farklılığını önemli oranda arttırmaktadır. Ayrıca keskin bir tabii sınıra sahip olmayan hippocampusun lateral sınırının belirlenmesindeki farklılıklar da araştırmacıların sonuçları arasındaki farklılıklara neden olabilmektedir [8]. Oysaki sınırları belirgin olarak izlenebilen yapılarda stereolojik metotlar kullanılarak aynı tür üzerinde farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışma sonuçları çoğu zaman birbirine yakın olacaktır.

Yaş ve tecrübenin artmasına paralel olarak hippocampus hacminin arttığı, bunun ise bu bölgede nöron yoğunluğu ve toplam nöron sayısındaki bir artıştan kaynaklandığı görüşü savunulmaktadır [59]. Çalışmamızda kullanılan civcivlerde, yaşa paralel olarak hippocampus hacminin artış gösterdiği gözlenmesine karşın, yukarıdaki araştırmacıların gözlemlerindeki gibi, bunun sinir hücrelerinin yoğunluğu ve toplam nöron sayısının artışından kaynaklanmadığı gözlemlendi (bk. Tablo V).

Parafine gömülü dokulardan alınan kesitlerden elde edilen hacim sonuçlarımızı, frozen kesitlerden hesaplanan hacim sonuçları ile karşılaştırmamız doğru olamaz, çünkü parafin takip işlemleri sonucunda dokular frozena göre daha fazla oranda büzüşür. Parafin ve frozen kesitler arasındaki büzüşme farkını minimuma indirmek için frozen kesitlerden hesaplanan hacimlerin ~%23 oranında azaltılması önerilmektedir [60 (Basil ve ark., (1996) tarafından site edilmiştir.)] [21]. Bu tarzdaki bir hesaplama değerleri Tablo V'de verilmiştir. Yukarıda belirtilen yaklaşım kullanılsa bile, bizim hacim sonuçlarımız ile diğer araştırmacıların sonuçları arasında gözlenen anlamlı farklılıkların nedenlerini şöyle açıklayabiliriz:

1. Türler arasında bulunan farklılıklar,
2. Hesaplamalarda kullanılan metotların farklılığı,
3. Hippokampusun lateral sınırlarının belirlenmesindeki farklılıklar,
4. Boyamalar arasındaki farklılıklar,
5. Yaşlar arasındaki farklılıklar.

Kuşlarda kuluçka sonrası hippocampus hacminin ve sahip olduğu toplam nöron sayısının gelişim süresi boyunca nasıl bir değişim gösterdiğinin anlaşılması, bu bölge ile ilgili yapılacak deneysel çalışmalar için gerekli olan temel verileri sağlayacaktır. Biz de bu çalışmamızla öğrenme ve iskemi araştırmalarında çok sık kullanılan bir ve yedi günlük civcivlerin hippocampuslarının araştırılmasının uygun olacağını düşündük. Bir yapının normal gelişiminin yeterli oranda anlaşılabilmesi için en az dört ayrı dönemdeki hayvan grubunun çalışılması gerektiğini düşünmekle beraber, yukarıda da belirttiğimiz gibi bizim ve diğer bir çok araştırmacının öğrenme ve iskemi modellerinde kullandıkları civcivlerin yaşları yedi günü geçmiyordu. Bu nedenle, civcivlerde yalnızca bu iki dönemi (bir ve yedi günlük) kapsayan bir çalışma yapıldı. Ancak yukarıda da belirttiğimiz gibi hippocampusun gelişiminin daha iyi anlaşılabilmesi için ilave grupların olması gerektiğini düşünmekteyiz.

Göçmen, yiyecek depo eden ve yuva parazitliği gibi özellikleri nedeniyle hippocampuslarını etkin bir biçimde kullanan kuşların bu yapılarında yeni nöronların yapıldığı hatta bu yenilenmenin memeli hippocampusunda gözlenenden daha fazla sayıda olduğu bildirilmektedir [61]. Eğer çalışmamızda göçmen, yuva paraziti veya yiyecek depo etme gibi özelliklerden birine sahip olan bir kuş türünü kullanmış olsaydık, Barnea ve Nottebohm (1996)'ın sonuçlarına benzer bir sonucu alabilirdik [61].

Oysa hippocampuslarını araştırdığımız civcivler yukarıda özellikleri belirtilen kuşlar gibi belirli bir davranışın gereği olarak hippocampuslarını kuvvetli bir biçimde kullanmadıkları bilinmektedir. Clayton ve Krebs [16], yiyecek depolama özelliği olmayan kuşların bu özelliğe sahip olanlara göre yalnızca daha küçük hippocampus ve daha az sayıda nöron bulundurmadıklarını, aynı zamanda daha fazla sayıda apoptotik hücre de bulduklarını saptamışlardır. Civciv hippocampusundaki toplam nöron sayısının hayvan yaşının ilerlemesine bu bölgelerini kuvvetli bir biçimde kullanmalarına bağlı olarak azalmasını gösteren çalışma sonucumuz, Clayton ve Krebs'in sonuçları ile uyumluluk göstermekteydi.

Daha önce de belirtildiği gibi kuş hippocampusunun lateral sınırlarının belirlenmesi esnasında araştırıcılar arasında farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Canan (1998) [53] 7 günlük civcivlerde nöron sayısı ve hacim hesaplamasında (bk. Tablo V) sistematik rastgele biçimde seçtiği kesitlerde lateral sınır olarak çalışmamızda belirlediğimizden daha az bir alanı hippocampus olarak almıştır. Bu nedenle belirtilen araştırıcının hacim ve toplam nöron sayısı değerleri bizim değerlerimizden daha düşük çıkmıştır. Bu farklılık kullanılan metodun taraflılığından değil de, çalışmalar arasında hippocampusun sınırlandırılma farklılığından kaynaklanmaktadır.

Sonuç : Bir ve yedi günlük civciv hippocampuslarının toplam nöron sayıları arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlendi. Civcivlerin kuluçkadan sonraki gelişimleri boyunca hippocampuslarındaki toplam nöron sayısının nasıl bir değişim gösterdiğinin daha iyi anlaşılabilmesi için çalışmamızda kullandığımız gruplara ilave olarak en az iki grubun daha çalışması gerektiğini düşünmekteyiz.

Tablo V: Değişik kuş türlerinin hippocampuslarında yapılan hacim ve toplam nöron sayısı çalışmalarının sonuçları, bu sonuçların elde edilmesinde kullanılan metotlar. Her bir türün önce Türkçe sonra İngilizce daha sonra ise Latince adları parantez içinde verilmiştir.

Kuş Türü	Hp Hacmi (mm ³) (Frozen)	Hp Hacmi (mm ³) ** (Parafin)	Toplam Nöron Sayısı	Vücut Ağırlığı (g)	(SÇ)/(NSÇ)	Kullanılan Metot ve Kesit Tipi	Kaynak
Civciv (<i>Gallus domesticus</i>) 1 günlük (Erkek)		4,94	1 566 620		SÇ	Optik parçalama, parafin kesitler.	Bu çalışma
Civciv (<i>Gallus domesticus</i>) 7 günlük (Erkek)		5,58	1 520 056				
Civciv (<i>Gallus domesticus</i>) 7 günlük (Erkek)		4,36	1 034 263		SÇ	Optik parçalama, parafin kesitler.	[53]
Bataklık baştankarası (Marsh tit) (<i>Parus palustris</i>)	14,26	10,9802			NSÇ	25 µm kalınlıkta frozen kesitler alınmış, her 10.kesit seçilerek hacim hesaplaması yapılmış. Kesitler Cresyl violet ile boyanmış.	[8]
Büyük baştankara (Great tit) (<i>Parus major</i>)	11,2	8,624					
Bataklık baştankarası (Marsh tit) (<i>Parus palustris</i>)	22,06	16,9862	1,2x10 ⁸ *		NSÇ	25 µm kalınlıkta frozen kesitler alınmış, her 10.kesitler seçilerek hacim hesaplaması yapılmış. Kesitler Cresyl violet ile boyanmış.	[16]
Bataklık baştankarası (Marsh tit) (<i>Parus palustris</i>)	17,18	13,2286	0,75x10 ⁸ *				
Küçük karga (Jackdaw)(<i>Corvus monedula</i>)	4	3,08	~220 000 *		NSÇ	25 ve 50 µm kalınlıkta frozen kesitler alınmış. Her 50. veya 10. kesitler seçilerek hacim hesaplaması yapılmış. Kesitler Cresyl violet ile boyanmış.	[14]
Saksağan (Magpie) (<i>Pica pica</i>)	7,5	5,775	~300 000 *				
Kara-başlı baştankara (Black-capped chickadee) (<i>Parus atricapillus</i>)	11,74	9,0398			NSÇ	25 ve 50 µm kalınlıkta frozen kesitler alınmış. Her 50. veya 10. kesitler seçilerek hacim hesaplaması yapılmış. Kesitler Cresyl violet ile boyanmış.	[15]
Mavi baştankara (Blue tit) (<i>Parus caeruleus</i>)	14,52	11,1804					
Kömür baştankarası (Coal tit) (<i>Parus</i>)	14,63	11,2651					
Büyük baştankara (Great tit) (<i>Parus major</i>)	15,63	12,0351					
Bataklık baştankarası (Marsh tit) (<i>Parus palustris</i>)	19,57	15,0689					
Söğüt baştankarası (Willow tit) (<i>Parus montana</i>)	26,99	20,7823					

Kara-başı baştankara (Black-capped chickadee) (Parus atricapillus)	14,5	11,165	10 g	NSÇ	30 µm kalınlıkta frozen kesitler alınmış. Her dördüncü kesit seçilerek ACHE'de inktübe edilmiş.	[62]
Meksika baştankarası (Mexican chickadee) (Parus sclateri)	10,53	8,1081	11 g			
(Bridled titmouse) (Parus wollweberi)	9,65	7,4305	9,61 g			
Gri alakarga (Gray breasted jay) (Aphelocoma ultramarina) Erişkin		41,5		NSÇ	Beyinler parafine gömülmüş. Parafin bloklarından 20 µm kalınlıkta transvers (coronal) kesitler alınmış ve HE ile boyanmış.	[21]
Gri alakarga (Gray breasted jay) (Aphelocoma ultramarina) Erişkin		26,7				
Çalı kargası (Scrub jay) (Aphelocoma coerulescens) Erişkin		26,8				
Çalı kargası (Scrub jay) (Aphelocoma coerulescens) Erişkin		22,9				
(Pinion jay) Erişkin		30,9				
(Pinion jay) Erişkin		30,9				
(Clark's nutcracker) (Nucifraga colombiana) Yaşlı		31,8				
(Clark's nutcracker) (Nucifraga colombiana) Erişkin		63,6				
(Clark's nutcracker) (Nucifraga colombiana) Erişkin		36,2				
(Clark's nutcracker) (Nucifraga colombiana) Erişkin		47				
Kara-başı baştankara (Black-capped chickadee) (Parus atricapillus) (Erkek)	10,96	8,4392	11,75 g	NSÇ	15 µm kalınlıkta olan frozen kesitler Cresyl violet ile boyanmış. Kesitlerdeki sağ ve sol hippokampus alanları 120 µm aralıkla tesbit edilmiş. Görüntüler video kamera ile monitör ekranına yansıtılmış. Hiperstriatum aksesorium ile hippokampus arasındaki sınır direkt mikroskoba bakılarak belirlenmiş.	[54]
Kara-başı baştankara (Black-capped chickadee) (Parus atricapillus) (Dişi)	9,99	7,6923	11,18 g			
Bataklık Baştankarası (Marsh tit) (Parus palustris)		~10 *		NSÇ	Beyinler % 4'lük paraformaldehit ile tespit edilmiş. Parafine gömülmüş. 6 µm kalınlıkta kesitler alınmış. Her 10. Kesit seçilerek Cresyl violet ile boyanmış. Truncated cone formülü kullanılanlarak hippokampus hacimleri bulunmuş.	
Bataklık Baştankarası (Marsh tit) (Parus palustris)		~8 *				

(Shiny cowbirds) (M. bonariensis) Dişi	~29,5*	22,715		46,8 g	NSÇ	40 µm kalınlıkta coronal düzlemde frozen kesitler alınmış. Her 5. kesit seçilerek Cresyl violet ile boyanmış. Truncated cone ile hippokampus hacimleri hesaplanmıştır.	[63]
(Shiny cowbirds) (M. bonariensis) Erkek	~27,7*	21,329		51,6 g			
(Bay-Winged cowbird) (M. badius) Dişi	~250*	192,5		41,5 g			
(Bay-Winged cowbird) (M. badius) Erkek	~250*	192,5		40,6 g			
Söğüt baştankarası (Willow tit) (Parus montana)		15,79	1 536 991		NSÇ	Parafine gömülen beyinlerden koronal düzlemde 15 µm kalınlıkta kesitler alınmış, her 10. kesit seçilmiş, bulunan sayısal yoğunluk ve hippokampus hacminden toplam nöron sayısı hesaplanmıştır.	[20]
Söğüt baştankarası (Willow tit) (Parus montana)		18,96	1 637 210				
Kara-başlı baştankara (Black-capped chickadee) (Parus atricapillus) 4,5 aylık genç		4,96	210 249	Tek Hp	NSÇ	Parafine gömülü beyin bloklarından koronal düzlemde 15 µm kalınlıkta alınan kesitler Cresyl violet ile boyanmış. Her 10. kesitteki hippokampus sınırları belirlenmiş. Sayısal yoğunluk ve hippokampus hacminden her hayvan için toplam hippokampus nöron sayısı hesaplanmıştır.	[61]
Kara-başlı baştankara (Black-capped chickadee) (Parus atricapillus) Erişkin		4,2	135 240	Tek Hp			
Bataklik baştankarası (Marsh tit) (Parus palustris) (Erişkin)		~17 *			NSÇ	Dokular parafine gömülmüş. 15 µm kalınlıkta coronal kesitler alınmış. Her 10. kesit Cresyl violet ile boyanmış. Truncated cone ile hippokampus hacmi hesaplanmıştır.	[16, 17]
Mavi baştankara (Blue tit) (Parus caeruleus) (Erişkin)		~12,5 *					
Bataklik baştankarası (Marsh tit) (Parus palustris) (Genç)		~10 *					
Mavi baştankara (Blue tit) (Parus caeruleus) (Genç)		~9 *					
Çalı bülbülü (Garden warblers) (Sylvia borin)	13,96	10,7492	3 260 000		NSÇ	Frozen kesitlerde hippokampus hacimleri hesaplanmıştır.	[59]
Çalı bülbülü (Garden warblers) (Sylvia borin)	15,28	11,7656					
Kara-başlı baştankara (Black-capped chickadees) (Parus atricapillus) (Dark-eyed Juncos) (Junco hyemalis)	14,22	10,9494			NSÇ	Jelatin-glukoza gömülmüş. 40 µm aralıkla kesit alınmış. Her 4. kesit Cresyl violet ile boyanarak bilateral hippokampus alanı ölçülmüş. Hacim, yüzey alanı ile kesit aralığı çarpılarak bulunmuştur.	[5, 6]
	12,81	9,8637					

(Brown-headed Cowbird) (Molothrus ater) (Erişkin, Dişi)	~5,75 *	4,4275	35,5 g	NSÇ	Beyinler -40 °C'deki isopenthan ile dondurulmuş. Kızaklı mikrotomda 40 µm kalınlıkta frozen kesitler alınmış ve kesitler Cresyl violet ile boyanmış.	[12]
(Brown-headed Cowbird) (Molothrus ater) (Erişkin, Erkek)	~7 *	5,39	43,9 g			
(Red-Winged Blackbird) (Agelaius phoeniceus) (Erişkin, Dişi)	~4,3 *	3,311	39,6 g			
(Red-Winged Blackbird) (Agelaius phoeniceus) (Erişkin, Erkek)	~4,5 *	3,465	55,8 g			
(Common grackle) (Quiscalus quiscula) (Dişi)	~4,2 *	3,234	77,5 g			
(Common grackle) (Quiscalus quiscula) (Erkek)	~4,2 *	3,234	107,5 g			

* : Grafikten çıkartıldı.

** : Frozen kesitlerden hesaplanan hacim hesaplamaları Fite ve arkadaşları (1993)'na göre parafin kesitlerden elde edilebilecek hacimlere dönüştürülmüştür.

SC : Stereolojik Çalışma.

NSÇ : Nonstereolojik Çalışma.

1. KAYNAKLAR

1. Källén B. Embryogenesis of brain nuclei in the chick telencephalon. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte Wiesbaden* 1962; 36: 62-82.
2. Stettner LJ, Matyniak KA. The Brain of Birds. *Sci Am* 1968; 218: 64-76.
3. Clayton NS. The neuroethological development of food-storing memory : a case of use it, or lose it!. *Behav Brain Res* 1995; 70: 95-102.
4. Clayton NS. Development of memory and hippocampus: Comparison of food-storing and nonstoring birds on a one trial associative memory task. *J Neurosci* 1995; 15: 2796-2807.
5. Hampton RR, Shettleworth SJ. Hippocampal lesions impair memory for location but not colour in passerine birds. *Behav Neurosci* 1996; 110: 831-835.
6. Hampton RR, Shettleworth SJ. Hippocampus and memory in a food-storing and in a non storing bird species. *Behav Neurosci* 1996; 110: 946-964.
7. Sherry DF, Duff SJ. Behavioral and neural bases of orientation in food-storing birds. *J Exp Biol* 1996; 199: 165-172.
8. Krebs JR, Sherry DF, Healy SD, et al. Hippocampal specialisation of food-storing birds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 1388-1392.
9. Sherry DF, Vaccarino AL. Hippocampus and memory for food caches in black-capped chickadees. *Behav Neurosci* 1989; 103: 308-318.
10. Wieraszko A, Ball GF. Long-term potentiation in the avian hippocampus does not require activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Synapse* 1993; 13: 173-178
11. Sherry DF, Jacobs LF, Gaulin SJC. Spatial memory and adaptive specialisation of the hippocampus. *Trend Neurosci* 1992; 15: 298-303.
12. Sherry DF, Forbes MR, Khurgel M, et al. Females have a larger hippocampus than males in the brood-parasitic brown-headed cowbird. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7839-7843.
13. Montagnese CM, Krebs JR, Székely AD. A subpopulation of large calbindin-like immunopositive neurones is present in the hippocampal formation in food-storing but not in non-storing species of bird. *Brain Res* 1993; 614: 291-300.
14. Healy SD, Krebs JR. Development of hippocampal specialisation in a food storing bird. *Behav Brain Res* 1993; 53: 127-131.

15. Healy SD, Krebs JR. Food-storing and the hippocampus in paridae. *Brain Behav Evol* 1996; 47: 195-199.
16. Clayton NS, Krebs JR. One trial associative memory: Comparison of food-storing and nonstoring species of birds. *Anim Learn Behav* 1994; 22: 366-372.
17. Clayton NS, Krebs JR. Hippocampal growth and attrition in birds affected by experience. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7410-7414
18. Healy SD, Suhonen J. Memory for locations of stored food in willow tits and marsh tits. *Behaviour* 1996; 133: 71-80.
19. Clayton NS. Development of food-storing and the hippocampus in juvenile marsh tits (*parus palustris*). *Behav Brain Res* 1996; 74: 153-159.
20. Cristol DA. Food storing does not affect hippocampal volume in experienced adult willow tits. *Behav Brain Res* 1996; 81: 233-236.
21. Basil JA, Kamil AC, Balda RP, et al. Differences in hippocampal volume among food storing corvids. *Brain Behav Evol* 1996; 47: 156-164
22. Volman SF, Grubb TC, Schuett KC. Relative hippocampal volume in relation to food-storing behavior in four species of woodpeckers. *Brain Behav Evol* 1997; 49: 110-120.
23. Benowitz LI, Karten HJ. Organization of the tectofugal visual pathway in the pigeon: A retrograde transport study. *J Comp Neurol* 1976; 167(4): 503-20.
24. Krayniak PF, Siegel A. Efferent connections of the hippocampus and adjacent regions in the pigeon. *Brain Behav Evol* 1978; 15: 372-388.
25. Casini G, Bingman VP, Bagnoli P. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and H-proline. *J. Comp Neurol* 1986; 245: 454-470.
26. Székely AD, Krebs JR. Efferent connectivity of the hippocampal formation of the zebra finch (*Taenopygia guttata*): An anterograde pathway tracing study using phaseoleus vulgaris leucoagglutinin. *J. Comp Neurol* 1996; 368: 198-214.
27. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 1969; 26: 235-302.
28. Royet JP. Stereology: A method for analysing images. *Prog Neurobiol* 1991; 37: 433-474.
29. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984; 134: 127-136.

30. Dubbeldam J L. The Avian And Mammalian Forebrain Correspondances And Differances. In: Andrew RJ (ed.) Nueronal and Behavioural Plasticity. Newyork, Oxford University Press, 1991; 67-91.
31. Ariens kappers CU, Huber GC, Crosby EC. The comparative anatomy of nervous system of vertebrates, including man. Hafner, Newyork, 1936.
32. Källén B. On the nuclear differentiation during ontogenesis in the avian forebrain and some notes on the amniote strio-amygdaloid complex. *Acta Anatomica* 1953; 17: 72-84.
33. Nauta WSH, Karten HS. A general profil of the vertebrates brain, with sidelights on the ancestry of cerebral cortex. In: Schmitt FO (ed.) *The Neurosciences: Second study program*, Newyork, Rockefeller Univercity Press, 1970; 7-26.
34. Van Tienhoven A, Juhasz LP. The chicken telencephelon, diencephalon and mesencephalon in stereotaxic coordinates. *J Comp Neurol* 1962; 118: 185-197.
35. Molla R, Rodriguez J, Calvet S, et al. Neuronal types of the cerebral cortex of the adult chicken (*Gallus gallus*): A Golgi study. *J. Hirnforsch* 1986; 27: 381-390.
36. Segal M, Laudis S. Afferents to the hippokampus of the rat studied with the metod of retrograd transpart of horseradish peroxidase. *Brain Res* 1974; 78: 1-15.
37. Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: Three dimensional measurement in microscopy*. Oxford, Bios Scientific Publishers, 1998; 1-37.
38. Abercrombie M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec* 1946; 94: 239-247.
39. Konigsmark MW. Methods for the counting of neurons. In: Nauta WSH, Ebesson SOE (ed.) *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*. Springer, Newyork 1970; 315-340.
40. Floderus S. Untersuchungen über den Bau der menschlicken Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1944; 53:1-276.
41. Willams WR, Rakic P. Three-dimensional counting: An accurate and direct method to estimate numbers of the cells in sectioned material. *J. Comp Neurol* 1988; 278: 344-352
42. Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. *J. Microsc* 1986; 143: 3-45.

43. Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: The edge effect. *J Microsc* 1977; 111: 219-223
44. Mayhew TM. Review article: The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol* 1991; 76: 639-665
45. West MJ. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 1993; 14: 275-285.
46. Pakkenberg B, Gundersen HJG. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *J. Microsc* 1988; 150: 1-20.
47. Andersen BB, Korbo L, Pakkenberg B. A quantitative study of the human cerebellum with unbiased stereological techniques. *J. Comp Neurol* 1992; 326: 549-560.
48. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, et al. The new stereological tools: Disector, Fractionator, nucleator, and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 857-881.
49. Hopwood D. Fixation and fixatives. In: Bancroft JD, Stevens A (ed.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. First Published, Churchill Livingstone, Pearson Professional Limited, 1996; 23-47.
50. Anderson G, Gordon KC. Tissue processing, microtomy and paraffin sections. In: Bancroft JD, Stevens A (ed.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. First Published, Churchill Livingstone, Pearson Professional Limited, 1996; 47-69.
51. Lowe J. Techniques in neuropathology. In: Bancroft JD, Stevens A (ed.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. First Published, Churchill Livingstone, Pearson Professional Limited, 1996; 341-383.
52. Rogers LJ. Development and lateralization. In: Andrew RJ (ed.) *Neuronal and Behavioural Plasticity*. Newyork, Oxford University Press, 1991; 307-335.
53. Canan S. Geçici Serebral İskemi Sonrası Cıvıv Hippokampusunda Meydana Gelen Nöron Sayısı Değişimlerinin Optik Fraksiyonlama Yöntemi İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1998.

54. Petersen K, Sherry DF. No-sex difference occur in hippocampus, food-storing, or memory for food caches in black-capped chickadees. *Behav Brain Res* 1996; 79: 15-22.
55. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231: 482-497.
56. Mayhew TM, Gundersen HJG. If you assume, you can make an ass out of you and me: A decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat* 1996; 188: 1-15.
57. Kuenzel WJ, Masson M. *A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Chick (Gallus domesticus)*. Baltimore-London, The Johns Hopkins University Press, 1988; 144-149.
58. Karten HJ, Hodos W. *Stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (Columba livia)*. Baltimore, Jhon Hopkins Press, 1967.
59. Healy SD, Gwinner E, Krebs JR. Hippocampal volume in migratory and non-migratory warblers: effect of age and experience. *Behav Brain Res* 1996; 81: 61-68.
60. Fite KV, Bengston L, Donaghey B. Experimental light damage increases lipofucin in the retinal pigment epithelium of Japanese quail (*Coturnix Corturnix Japonica*). *Exp Eye Res* 1993; 57: 449-460.
61. Barnea A, Nottebohm F. Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: An addition to the theory of hippocampal learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 714-718.
62. Hampton RR, Sherry DF, Shettleworth SJ, et al. Hippocampal volume and food-storing behavior are related in parids. *Brain Behav Evol* 1995; 45: 54-61.
63. Reboveda JC, Clayton NS, Kacelnik A. Species and sex differences in hippocampus size in parasitic and non-parasitic cowbirds. *NeuroReport* 1996; 7: 505-508.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ