

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**SIÇAN NUKLEUS OLİVARİS İNFERİÖRÜNDEKİ  
TOPLAM NÖRON SAYISININ FİZİKSEL DİSEKTÖR  
YAKLAŞIMLARIYLA BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

Pınar Naile GÜRGÖR

Samsun  
Temmuz 2008

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**SIÇAN NUKLEUS OLİVARİS İNFERİÖRÜNDEKİ  
TOPLAM NÖRON SAYISININ FİZİKSEL DİSEKTÖR  
YAKLAŞIMLARIYLA BELİRLENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

Pınar Naile GÜRGÖR

Danışman: Prof. Dr. Adnan KORKMAZ

Samsun  
Temmuz 2008

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından **Histoloji ve Embriyoloji** Programında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Adnan KORKMAZ

Üye : Prof. Dr. Nihal İÇTEN

Üye : Prof. Dr. Cem KOPUZ

Üye : Doç. Dr. Emin ÖZTAŞ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Bülent AYAS

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Süleyman ÇELİK  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora çalıŐmalarım sűresince bilimsel teŐvik ve yardımlarından dolayı deęerli hocam Prof. Dr. Nusret ÇİFTÇİ'ye, tez alıŐmamım pek çok alanında bana yol gűsteren Yrd. Doç. Dr. Bűlent AYAS'a, yardımlarını esirgemeyen Anatomi Anabilim Dalı űęretim űyeleri Prof. Dr. Cem KOPUZ'a ve Yrd. Doç. Dr. Mete EDİZER'e, istatistiksel hesaplamalarda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Yűksel TERZİ'ye, laboratuvar çalıŐmalarımdaki yardımlarından dolayı Doktora űęrencisi Zűleyha ERİŐİN'e, rahat bir çalıŐma ortamı için bize her tűrlű desteęi veren Histoloji-Embriyoloji ve Anatomi Anabilim Dallarının tűm çalıŐanlarına ve çalıŐmayı (T-544) destekleyen OMŪ AraŐtırma Fonu ilgililerine teŐekkűrlerimi sunarım.

## ÖZET

### SIÇAN NUKLEUS OLİVARİS İNFERİÖRÜNDEKİ TOPLAM NÖRON SAYISININ FİZİKSEL DİSEKTÖR YAKLAŞIMLARIYLA BELİRLENMESİ

**Pınar Naile GÜRGÖR, Doktora Tezi**

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Temmuz 2008**

Nukleus olivaris inferiördeki (NOİ) toplam nöron sayısının belirlenmesi, sinir sisteminde meydana gelen çok sayıdaki doğal olayın analiz edilmesi için zorunlu ve önemli bir ilk adım olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu parametre için bildirilen değerlerin tutarsızlığı konunun sorgulanmasını gündeme getirmiştir. Bu durum tarafsız stereolojik metotların kullanıldığı çalışmalar için de geçerlidir. Bu çelişkinin olası nedenlerini araştırdığımız bu çalışmada ayrıca bu parametreyi sayımda altın standart olarak kabul edilen fiziksel fraksiyonlama metodu ile yeniden hesapladık.

On adet sıçanın (beş dişi, beş erkek) beyin sapları, çalışma öncesinde belirlediğimiz optimal bir örnekleme şekline göre rutin parafin takibinden geçirildi. Nöronlar, bu pilot çalışmada belirlenen NOİ hacminin belirli bir fraksiyonunda (kesit ve alan fraksiyonları) sistematik şekilde örneklenmiş fiziksel disektörlerle sayıldı. Her bir NOİ'deki toplam nöron sayısı, sayılan toplam nöron sayısının bu fraksiyonların tersi ile çarpılarak hesaplandı.

Erkek ve dişi sıçanların sağ NOİ'lerindeki toplam nöron sayısı sırasıyla 37014 ve 38707, sol taraflarında 37014 ve 39614 olarak hesaplandı. Ne cinsiyetler arasında ve ne de sağ ve sol NOİ'ler arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Bu bulgular, daha önce bildirilmiş verilerdeki sağ ve sol NOİ değerleri arasında farklılık olmadığı noktasında uyumaktadır. Ancak şimdiye kadar bildirilmiş olan ve 17000 ila 30000 arasında değişkenlik gösteren nöron sayısı değerleriyle çelişmektedir. Bu parametre ile ilgili çelişki oluşturan olası nedenler tartışıldı.

## **ABSTRACT**

### **DETERMINATION OF THE NUMBER OF NEURONS IN THE RAT INFERIOR OLIVARY NUCLEUS WITH PHYSICAL DYSECTOR APPROACHES**

**Pınar Naile GÜRGÖR, Ph. D. Thesis**

**University of Ondokuz Mayıs Samsun, July 2008**

Determining the total number of neurons in the inferior olivary nucleus (ION) has so far considered to be a necessary and valuable first step to analyze a number of natural phenomena that take place in the nervous system. But since the reported numbers are in conflict, they are subject to criticism, a condition that also exists between unbiased stereological studies. To this end we have searched for the possible reasons for this discrepancy and reevaluated this parameter by using the gold standard in number estimation, namely the physical fractionator.

The brainstems of 10 Wistar rats involving equal numbers of males and females were processed for routine paraffin histology according to an optimal sampling scheme determined prior to the analysis. Based on this pilot study neurons were counted with systematically sampled physical disectors in a known fraction (section and areal fractions) of the volume of the ION. The total number of neurons in each ION was estimated by multiplying the counted neurons by the inverse of the used fractions.

The total numbers of neurons in the right IONs of male and female rats were 37014 and 38707 and the total numbers of neurons in the left IONs of male and female rats were 37014 and 39614, respectively. Neither significant difference between genders nor between the left and right olives was observed.

These results confirm previously made estimations in that no differences exist between the left and right olives. They do however contradict the so far reported numbers which range from 17000 to 30000. Possible causes that may lead to the discrepancies regarding this parameter are discussed.

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	III
<b>ÖZET</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	VI
<b>GİRİŞ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	7
1. NUKLEUS OLİVARİS İNFERİÖR (Nucleus olivaris inferior) .....	7
2. NOİ HİSTOLOJİSİ .....	11
2.1. Nissl Boyamaları İle Tanımlanan Nöronlar .....	12
2.2. Golgi Yöntemi Kullanılarak Yapılan Tanımlamalar .....	13
2.3. İmmünohistokimyasal İşaretlemelelere Göre NOİ Nöronları .....	16
2.4. Elektron Mikroskopik Görünüm .....	17
2.4.1. Nöronal gövde .....	17
2.4.2. Akson ve Dendritler .....	19
2.4.3. Nörogial hücreler .....	20
3. NOİ EMBRİYOLOJİSİ .....	23
4. NOİ BAĞLANTILARI .....	25
4.1. Tırmanıcı Lifler ve Fonksiyonları .....	27
<b>MATERYAL VE METOT</b> .....	31
1. HAYVANLAR .....	31
2. PİLOT ÇALIŞMA .....	31
2.1. NOİ Sınırlarının Belirlenmesi .....	32
2.2. Örnekleme Stratejisi .....	33
3. HİSTOLOJİK İŞLEMLER .....	39
3.1. Gluteraldehit çözeltisinin hazırlanması .....	39
3.2. Tespit .....	39
3.3. Doku Takibi .....	40
3.4. Kesit Alma .....	40
3.5. Boyama .....	41

3.5.1. Boya solüsyonlarının hazırlanması .....	41
3.5.2. Boyama prosedürü .....	41
4. REFERANS HACMİNİN VE NOİ NÖRONLARININ TANIMLANMASI ...	42
5. STEREOLOJİK UYGULAMA .....	45
5.1. Kesitlerin Örneklenmesi .....	45
5.2. Kesitlerde Sayım Alanlarının Örneklenmesi .....	45
5.3. Eşdeğer Sayım Alanlarının Eşzamanlı Örneklenmesi .....	48
5.4. Fiziksel Disektör İle Örneklem ve Nöron Sayımı .....	50
5.5. Toplam Nöron Sayısının Hesaplanması .....	51
6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ VE HATA KATSAYILARININ HESAPLANMASI .....	52
<b>BULGULAR .....</b>	<b>54</b>
1. PİLOT ÇALIŞMA BULGULARI .....	54
1.1. NOİ Boyamalarına Ait Görüntüler .....	54
1.2. Önsayım Sonuçları .....	54
2. GENEL GÖZLEMLER .....	57
3. TOPLAM NÖRON SAYISI VE HESAPLAMALARINA AİT BULGULAR ...	62
4. KARŞILAŞTIRMALARA AİT İSTATİSTİKSEL BULGULAR .....	65
<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>69</b>
1. NOİ’de HESAPLANAN TOPLAM NÖRON SAYISI DEĞERLERİNİN DİĞER ÇALIŞMALARDA BİLDİRİLENLER İLE KARŞILAŞTIRILMASI .	69
2. NOİ ÇALIŞMALARINDA NÖRON SAYIMI İÇİN KULLANILAN SAYIM METODOLOJİLERİNE AİT DEĞERLENDİRMELER .....	73
2.1. İnsan NOİ’indeki Sayım Çalışmaları .....	75
2.2. Fare NOİ’indeki Sayım Çalışmaları .....	78
2.3. Sıçan NOİ’indeki Sayım Çalışmaları .....	79
2.4. Diğer Türlerin NOİ’indeki Sayım Çalışmaları .....	82
3. SUNULAN ÇALIŞMAYA AİT METODOLOJİK DEĞERLENDİRMELER ..	83
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>85</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>87</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	



## GİRİŞ

Nukleus olivaris inferiör (NOİ) beyin sapındaki en büyük ve şekli bakımından dikkat çekici bir görüntü veren karakteristik bir çekirdektir. Çok sayıdaki yapı ile olan bağlantılarının yanı sıra; beyincikle olan bağlantılarının sıra dışılığı, NOİ'yi sinir sisteminin gelişim ve fonksiyonunu konu alan birçok araştırma modeli için tercih edilen ideal bir yapı durumuna getirmiştir. Şöyle ki: Somatomotor bilgilerin işlendiği karmaşık bir ara durak olan NOİ; talamus, korteks, beyin sapı ve omurilikten afferent bağlantılar alırken (Standring, 2005), nöronlarının ana projeksiyonu kontralateral beyincik korteksindeki Purkinje hücrelerinedir (De Zeeuw ve ark., 1998). Beyincikte tırmanıcı lif olarak adlandırılan uyarıcı afferent lif sisteminin tek kaynağını NOİ kökenli bu projeksiyonlar oluşturur (Nauta ve Feirtag, 1986; Voogd ve ark., 1990; Voogd, 2003). Bu liflerin bir başka önemli özellikleri ise beyincik içerisinde oldukça iyi tanımlanmış düzenli bir organizasyon göstermeleridir. NOİ'nin belirli bir bölgesinden çıkan lifler kontralateral taraftaki beyincik korteksinin belirli bir bölgesinde sonlanırlar (Gwyn ve ark., 1977; Azizi ve Woodward, 1987; Voogd ve ark., 1990). Dikkat çekici üçüncü bir özellik de gelişimin tamamlanması durumunda son halini alan bu olivoserebellar bağlantıdaki sayısal yapılanmadır: Her bir Purkinje hücresi bir tırmanıcı lif ile innerve edilir (Carpenter, 1985; Martin, 1989; Standring, 2005). Ancak Purkinje hücrelerinin sayısı NOİ'deki nöronlardan çok daha fazla olduğundan yaklaşık 5 -10 kadar Purkinje hücresine bir olivoserebellar lif düşmektedir (Ruigrok ve Voogd, 2000; Standring, 2005). Tırmanıcı lifler beyincik korteksine ulaşmadan önce medulladaki derin çekirdeklere uzanan yan dallar da verirler. Kortekse ulaştıklarında liflerden her biri kendisi ile ilişkili Purkinje hücrelerinin her birisinin gövde ve dendritleriyle yaklaşık 300 kadar sinaps yapar (Guyton ve Hall, 2007).

Bu anatomik organizasyon ve bağlantı şekli, merkez sinir sisteminin gelişim ve fonksiyonunu düzenleyen çok sayıdaki mekanizmanın araştırılması için oldukça elverişli özelliklerdir. Başta hedef ve kaynak hücre ilişkileri olmak üzere, gelişim sırasındaki akson yönelimleri, trofik etkiler, yetişkinde sinaptik bağlantıların düzenleniş mekanizmaları gibi birçok önemli konunun amaç edinildiği araştırmalarda olivoserebellar sistem bu sıra dışı özelliklerinden dolayı en çok tercih edilen çalışma bölgelerinden biri olmuştur. Bu çalışmaları irdelediğimizde, ilgilenilen amaca ulaşmada niceleyici verilerin önemli bir başlangıç adımı olarak değerlendirildiğini ve NOİ'de

gerçekleştirilmiş çalışmalar içerisinde kantitatif içerikte olanların büyük bir grubu oluşturduğunu gözlemledik. Bunların içerisinde de çoğunluğu NOİ ve nöronlarının ontolojik gelişimleri ile (Bourrat ve Sotelo, 1984; Delhaye-Bouchaud ve ark., 1985; King ve ark., 1998; Sjöbeck ve ark., 1999; Cunningham ve ark., 1999; Yamamoto ve ark., 2005; Rashed ve ark., 2007), kaynak-hedef hücre ilişkileri ve bunların etkileşimlerini ele alan hücre sayısına yönelik çalışmalar (Blatt ve Eisenman, 1985; Shojaeian ve ark., 1985; Frederic ve ark., 1992; Zanjani ve ark., 1994, 1997 ve 2004; Gudovic ve Milutinovic, 1996; Herrup ve ark., 1996) oluşturmaktadır. Hücre sayısı parametresi bunların yanı sıra, çok sayıdaki diğer deneysel ve klinik NOİ çalışmalarında ele alınmıştır (Napper ve West, 1995; Pine ve ark., 1997; Nishie ve ark., 2002 ve 2004; Zhang ve ark., 2003; Maier ve West, 2003; Tsuchiya ve ark., 2005; Viscomi ve ark., 2005). Olivocerebellar sistemde nöron sayısına ait elde edilen veriler ilgili çalışmaları gerçekleştirilen araştırmacılar için üzerinde durdukları mekanizmaların açıklığa kavuşturulmasında önemli bir basamak oluşturmuştur. Bununla birlikte, bu çalışmalarda irdelemelerimiz sonucunda önemli bir ayrıntı tespit ettik: Tüm bu NOİ çalışmalarında kullanılan kantitatif sayım metodlarının hem bizzat kendisinde hem de uygulamalarında önemli farklılıklar olduğunu ve bunun doğal bir sonucu olarak da bildirdikleri değerler arasında tutarsızlıklar olduğunu gözlemledik.

İnsan NOİ'si için bildirilen nöron sayısı değerleri ve ifade biçimlerindeki büyük farklılıklar (Pine ve ark., 1997; Sjöbeck ve ark., 1999; Nishie ve ark., 2002 ve 2004; Tsuchiya ve ark., 2005), söz konusu çelişkilerle ilgili çarpıcı örneklerden birini oluşturmaktadır. Bu çalışmaların hepsinde nöron sayısı aynı teknikle, yani histolojik kesitlerdeki nöron profillerinin sayımı ile belirlenmiştir. Bununla birlikte çalışmalarda kullanılan normal kontrol bireyleri için bildirilen NOİ'ye ait nöron sayısı verileri karşılaştırma yapılamayacak kadar farklılık göstermektedir. Bu çalışmalarda, insan NOİ'sini kapsayan tüm kesitleri ele alarak buradaki toplam nöron sayısı değerini hesaplamak yerine, her birisinde sınırları araştırmacılarca belirlenmiş farklı NOİ bölgelerinde belirli bir alanda nöron profili sayımı gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak da karşılaştırılamayacak veriler ortaya çıkmıştır. NOİ'nin tümünü ele alan ve mm<sup>2</sup>'ye düşen ortalama nöron profili sayısının bildirildiği iki çalışmada ise (Pine ve ark., 1997; Sjöbeck ve ark., 1999) değerler birbirlerinden oldukça uzaktır (sırasıyla 139'a karşılık 0,5).

Bu tarz farklılıkları, başta sıçan ve farelerin kullanıldığı hayvan çalışmalarının arasında da görmek mümkündür. Hücre sayımında profil sayımı (Floderus, 1944; Abercrombie, 1946; Coggeshall, 1992) yaklaşımını kullanarak NOI'deki postnatal gelişimi araştıran iki ontolojik çalışmada, yetişkin sıçan NOI'lerindeki toplam nöron sayısı değerleri 25000 (Bourrat ve Sotelo, 1984) ve 28500 (Delhaye-Bouchaud ve ark., 1985) olarak bildirilmiştir. Bu farklılığı daha da anlamlı hale getiren çelişki ise aynı çalışmalarda kullanılan diğer yaş gruplarında hesaplanan değerler arasında da farklılıkların olması ve bu farklılıklardaki yönelimin değişkenlik göstermesidir. Örneğin burada verilen değerlerde görüleceği gibi, 30 günlük sıçanlarda toplam nöron sayısı değerleri Delhaye-Bouchaud ve arkadaşlarının çalışmasında (1985) Bourrat ve Sotelo'nun (1984) bildirdiği değere göre 3500 nöron kadar daha fazladır. Halbuki 5 günlük sıçanlarda aynı parametre 7000 adet kadar daha düşük olarak beyan edilmiştir (sırasıyla 21000'e karşılık 28000). Her iki çalışmada kullanılan diğer yaş gruplarında da aynı şey söz konusudur. Aynı hayvan türü ve aynı yaş gruplarında aynı sayım yaklaşımı ile çalışıldığı halde yönelimleri de değişkenlik gösteren farklı değerler elde edilmiştir.

Fare NOI'sinde gerçekleştirilen ve yine profil sayımının kullanıldığı araştırmalara bakıldığında durumun sıçan çalışmalarından farklı olmadığı görülecektir. Bu türde tespit edebildiğimiz çalışmalardan kontrol grubu normal fare NOI'si için bildirilen toplam nöron sayısı değerlerinin hepsinin birbirinden oldukça farklı olduğunu tespit ettik. Örneğin Blatt ve Eisenman (1985) yetişkin fare NOI'si için toplam nöron sayısı değerini 37000 olarak bildirirken, Frederic ve arkadaşları (1992), aynı parametreyi 11700 olarak hesaplamışlardır. Zanjani ve arkadaşları ise 1997 yılında yayınladıkları çalışmalarında bu değeri 14250 olarak bildirmekte ve bu değer kendilerinin daha önce (Shojaeian ve ark., 1985a ve b; Zanjani ve ark., 1992) gerçekleştirdikleri benzer çalışmalarınki ile benzer olduğunu bildirmektedirler. Ancak 1994 yılındaki bir başka araştırmalarında aynı yaştaki sıçan NOI'si için bildirdikleri toplam 10025 adet nöron değerinin neden farklılık gösterdiğine açıklık getirmemişlerdir.

NOI nöron sayısına ait benzer çelişkilerin, modern tarafsız hücre sayımı yaklaşımları olarak değerlendirilen stereolojik metotların (Gundersen, 1986; Coggeshall, 1992; Dorph-Petersen ve ark., 2001) kullanıldığı çalışmalar arasında da var olduğunu gözlemledik. Sıçanlarda beyin gelişimi döneminde alkol kullanımına maruz

birakılmanın yetişkin dönemde NOİ'de nöron sayısına olası etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Napper ve West, 1995) stereolojik tekniklerden olan optik disektör kullanılmıştır. Napper ve West (1995) optik disektörler ile belirledikleri nöron yoğunluğunu NOİ'nin hacmi ile çarparak NOİ'deki toplam nöron sayısını hesaplamışlardır. Denek grubundaki bu toplam nöron sayısı değerinin kontrollerdekine göre 21000 adet daha düşük bir seviyede olduğunun belirlendiği bu çalışmada, kontrol grubuna ait değer 61910 olarak bildirilmiştir. Ancak bu çalışmadaki hesaplamada diğer bütün kantitatif NOİ çalışmalarından farklı olarak sağ ve sol NOİ'ler bir bütün halinde ele alınmış ve her ikisinin toplam değeri verilmiştir.

Stereolojik metotların kullanıldığı bir başka sıçan NOİ'si çalışmasında Cunningham ve arkadaşları (1999) postnatal dönemde (0, 5, 10, 15 ve 30 günlük dönemlerde) bu bölgedeki nöron sayısı değişimlerini araştırmışlardır. Bunlar da tıpkı Napper ve West'in (1995) yaptıkları gibi nöronların sayısal yoğunluğunu nukleus hacmiyle çarparak toplam nöron sayısını hesaplamışlardır. Ancak evvelkinden farklı olarak sayısal yoğunluğu optik disektör metodu yerine, bir başka stereolojik sayım metodu olan fiziksel disektör ile tespit etmişlerdir. Bu araştırmacıların yetişkin sıçan NOİ'si için hesapladıkları toplam nöron sayı değeri ise 17731 olarak açıklanmıştır. Bu değer, Napper ve West'in (1995) bildirdiği yaklaşık 30000 rakamından (sağ ve sol NOİ toplamı için bildirilen değer yarısı) oldukça uzaktır. İki çalışma arasındaki bir başka çelişki de NOİ hacmi değerlerinde karşımıza çıkmaktadır. Napper ve West (1995) kontrol grubunda bir taraftaki NOİ hacmini  $0,65 \text{ mm}^3$  (çalışmada bildirilen toplam değer olan  $1.305 \text{ mm}^3$ 'ün yarısı) olarak bildirirken, Cunningham ve arkadaşları (1999) bunun % 50'sinden daha düşük bir değer bildirmektedirler ( $0,229 \text{ mm}^3$ ).

Alkolün hücre ölümüne olan etkisini araştıran bir başka stereolojik NOİ çalışmasında yine aynı stereolojik yaklaşım (optik disektör ile belirlenen sayısal yoğunluğun NOİ hacmi ile çarpımı) kullanılmıştır (Maier ve West, 2003). Bu çalışmada embriyonal dönemde alkole maruz bırakılan sıçanlar postnatal 10. günde açılarak farklı merkez sinir sistemi bölgelerinde toplam nöron sayıları araştırılmıştır. Bunlardan biri olan NOİ için bildirilen kontrol grubu değeri 8880'dir. Cunningham ve arkadaşları'nın (1999) yukarıda değinilen çalışmada kullandıkları sıçanlardan 10 günlük olanlar için bildirdikleri değer ise bunun yaklaşık üç katı olan 24691'dir. Bu yaş grubunda

hesapladıkları NOİ hacmi (0,286 mm<sup>3</sup>) ise Maier ve West'in (2003) bildirdiği değerin (0,142 mm<sup>3</sup>) iki katıdır.

Tıpkı profil sayımı tekniklerini kullanan çalışmalarda olduğu gibi, stereolojik tekniklerin kullanıldığı bu araştırmalarda da aynı hayvan türünün aynı bölgesinde aynı sayım yaklaşımı kullanıldığı halde oldukça farklı sonuçlar elde edilmiş. Her ne kadar profil sayımına dayanan tekniklerin bünyelerinde gerçekleşme olasılığı az veya gerçekleşse bile tespit edilmesi oldukça güç olan çok sayıda varsayımı (hücre şekli, büyüklüğü, dağılımı vb hakkında) barındırdığı ve bu nedenle de tutarsız sonuçlar alınabileceği gösterilmişse de (Gundersen, 1986; Coggeshall, 1992; Mayhew ve Gundersen, 1996; Dorph-Petersen ve ark., 2001), benzer durumun herhangi bir varsayıma dayanmayan ve teorik olarak da tamamen tarafsız olduğu ispatlanan stereolojik teknikler için de geçerli olduğu açıkça görülmektedir. Burada değindiğimiz stereolojik çalışmalar arasındaki çelişkilerin tespit edildiği başka örnekler de vardır (Hatton ve von Bartheld, 1999; Dorph-Petersen ve ark., 2001; von Bartheld, 2002; Guillery, 2002; Mouton, 2002; Gardella ve ark., 2003; Geuna, 2005). Bu çelişkilerin olası nedenlerinin irdelendiği, ayrıca çözüm yollarının da önerildiği bu çalışmalarda stereolojik metotların teorik olarak tarafsız olmakla birlikte uygulamaya konduklarında çelişkili sonuçlar verebilecekleri gösterilmektedir. Bu çalışmalarda ortaya konulan ortak görüşü şu şekilde özetleyebiliriz; *'Stereolojik metotlar birçok özgün taraflarının ve avantajlarının yanı sıra, çelişkilere yol açabilecek uygulamaya yönelik bazı eksiklikleri de barındırmaktadırlar. Ancak önerilen kurallara uyulduğunda bu hata kaynaklarından da kaçınmak mümkündür'*.

Stereolojik sayım metotlarının hücre şekli, büyüklüğü, yönelimleri, dağılımları gibi ilgili doku ve hücrelere ait hiçbir konuda varsayımda bulunmayı gerektirmediği teorik olarak kanıtlanmış ve bu özelliklerinden dolayı da tarafsız yaklaşımlar olarak vasıflandırılmışlardır. Dolayısıyla bu teknikler ile farklı zamanlarda gerçekleştirilen tekrarlı sayımların ortalamaları gerçek değere yaklaşmalıdır. Halbuki yukarıda belirtilen sıçan NOİ'si örneklerinde olduğu gibi pek çok uygulamanın sonucu bunu doğrulamamaktadır. Uygulamadaki bu tutarsızlıkları araştıran yukarıdaki çalışmalarda bu durumun olası birçok nedeni beyan edilmiş olmakla birlikte (hücre ve referans hacmi sınırlarının tanımlamalarındaki problemler ve yanlış stereolojik uygulama gibi), son zamanlarda üzerinde en çok durulan bir başka çelişki oluşturucu neden de kalın

kesitlerin kullanıldığı stereolojik çalışmalarda ortaya atılmıştır. Sık kullanılan bazı tarafsız stereolojik metotların (optik disektör ve optik fraksiyonlama gibi) sorgulandığı bu araştırmalarda, kalın kesitlerde ortaya çıkabilecek deformasyonların da uygulamada taraflı sonuçlara neden olabileceği ve kontrol edilemeyeceği öne sürülmüştür. Eski tarihli NOİ çalışmalarının yanı sıra, yeni basılmış NOİ ile ilgi yayınlarda nöron sayısı değerlendirmelerinin bir çoğunun halen taraflı nitelikte olması, önemli bir ilk adım durumunda olan buraya ait kantitatif verilerin tarafsız stereolojik yöntemlerle ortaya konulması gereğini ortaya koymaktadır. Bu konuda yapılan stereolojik çalışmalar arasındaki çelişkiler ise, bu verilerin uygulamada da tarafsız olan stereolojik metotlar ile doğrulanması gerektiğini göstermektedir. Sunulan çalışmada bu konuya yönelik bir çalışma planlanmıştır. Şöyle ki:

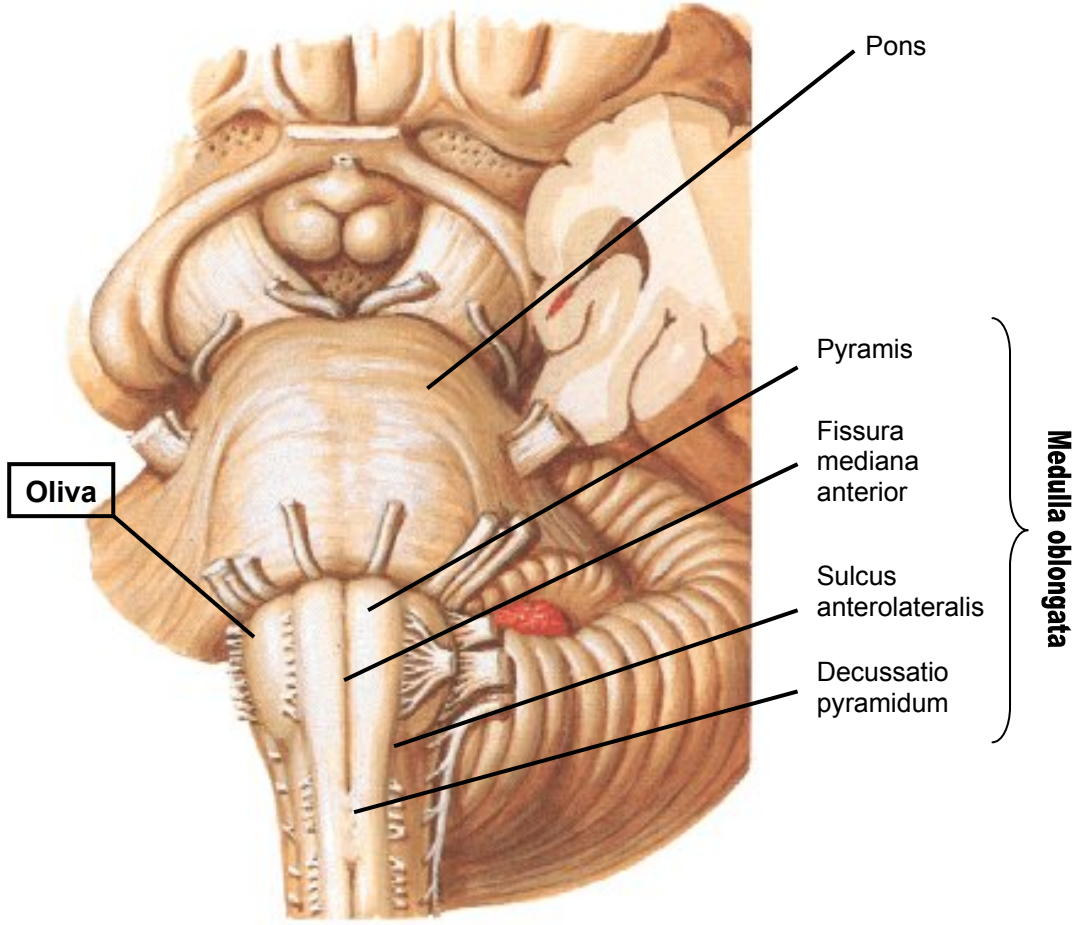
Stereolojik metotların içerisinde uygulamada ortaya çıktığı belirtilen problemlerin hiçbirinden etkilenmeyen ve bu özelliklerinden dolayı da sayımda altın standart olarak kabul edilen fiziksel disektör isimli bir metot ile onun fiziksel disektör-Cavalieri ve fiziksel fraksiyonlama gibi çeşitli varyasyonları da vardır (Dorph-Petersen ve ark., 2001). Aslında stereolojik tekniklerin öncüsü olan fiziksel yaklaşımların (Sterio, 1984; Gundersen, 1986) üstün özelliklerine rağmen sayım uygulamalarında tercih edilmemelerinin başlıca nedenleri, uygulanmalarındaki güçlükler ve oldukça zaman alıcı olmalarıdır. Yeni geliştirdiğimiz bir yaklaşımda ise bu metotların uygulamalarını pratik bir hale getirmeyi başardık (Ayas ve ark, 2008). İşte sunulan çalışmada, olivoserebellar sistemin beyin sapı parçası olan NOİ'deki nöron sayısı değerlerini fiziksel disektör metodunu yeni yaklaşımımız ile uygulamaya koyarak yeniden hesaplamayı ve bu şekilde bu bölge çalışmaları için oldukça önemli olan bir kantitasyon standardı tespit etmeyi amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### 1. NUKLEUS OLİVARİS İNFERİÖR (Nucleus olivaris inferior)

NOİ, medula oblongata ön yüzündeki sulcus anterolateralis'in lateralinde bulunan olivar cisimler (oliva) denilen kabartı içine yerleşiktir (Şekil 1). Arkada ventral spinoserebellar fasikulus tarafından posterolateral sulkustan ayrılmıştır. Nukleus yukarıda ponsun içine kadar uzanır. Medulla oblongata'nın üst seviyelerinden geçen kesitlerde görülen (Şekil 2) en belirgin yapıdır (Taner, 2002).

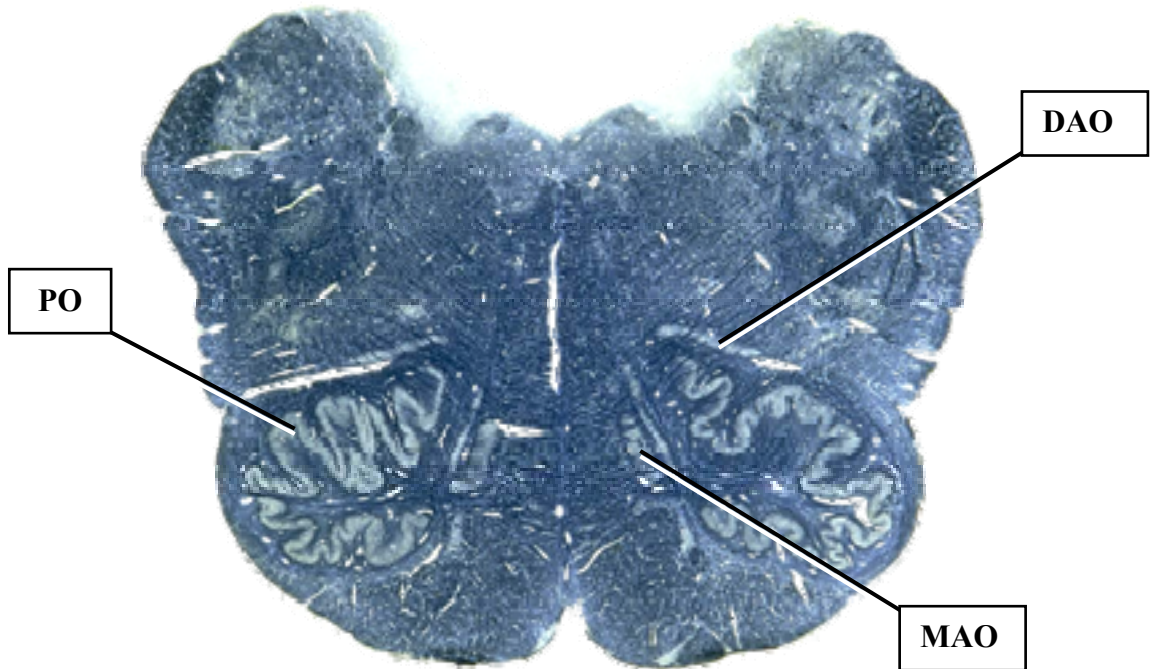
Bu nukleus ilk olarak 1664 yılında Gabriele Falopio tarafından korpora olivares veya olivar cisimler olarak isimlendirilmiştir (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).



Şekil 1. Medulla oblongata'nın ventralden görünüşü (Netter, 2002).

NOİ morfolojisi insanlar dahil pek çok memelide detaylı olarak araştırılmıştır (Kooy, 1917; Kappers ve ark., 1960; Taber, 1961; Breazile, 1967; Moatamed, 1968; Schild, 1970; Bowman ve King, 1973; Bowman ve Sladek, 1973; Martin ve ark., 1975; Watson ve Herron, 1977; Rutherford ve Gwyn, 1980; Saigal ve ark., 1983; Whitworth ve Haines, 1986; Azizi ve Woodward, 1987; de Zeeuw ve ark., 1998; Bukowska ve ark., 2002). Bu çalışmalara göre NOİ genel olarak 3 büyük alt nükleustan ve birkaç küçük hücre grubundan oluşur.

- 1. Nukleus olivaris principalis (PO):** MAO ve DAO arasında bulunan ve kesitlerde katlantılı bir görüntü veren nöron grubudur.
- 2. Nukleus olivaris accessorius medialis (MAO):** Piramidler ile PO'nun arasında uzanır.
- 3. Nukleus olivaris accessorius dorsalis (DAO):** PO'nun dorsalinde yerleşiktir.



**Şekil 2.** İnsan medulla oblongata üst seviyelerinden olivar cisimlerin ortasından geçen bir koronal kesit (Young ve Heath, 2000).



Bu üç ana alt nukleusa ilaveten kaudalden rostrale doğru dört küçük çekirdek grubu daha bulunmaktadır. Bunlar; dorsal başlık (DB), nukleus  $\beta$ , ventrolateral çıkıntı (VLÇ) ve dorsomedial hücre kolonu (DMHK) olarak isimlendirilirler. Bu dört küçük hücre grubu, MAO'nun parçası olarak düşünülmektedir (Taber, 1961; Breazile, 1967; Bowman ve Sladek, 1973; Azizi ve Woodward, 1987). Ancak bazı araştırmacılar DB ve VLÇ'yi PO'ya; nukleus  $\beta$  ve DMHK'yı ise MAO'ya ait birer bölüm olarak değerlendirmektedirler (Kawamura ve Hashikawa, 1970; Gwyn ve ark., 1977; Groenewegen ve ark., 1979; Brodal ve Brodal, 1981; Tan ve ark., 1995; Ruigrok, 1997 ve 2003; Bukowska ve ark., 2002; Voogd ve Wylie, 2004).

Afferent ve efferent bağlantılar dikkate alındığında ise daha farklı bir yapılanma şekli görmek mümkündür. Azizi ve Woodward (1987) kullandıkları akson izleme teknikleri ve immünohistokimyasal işaretlemeler sonrasında, aynı alt nukleus içerisinde yer alan hücre gruplarının ortak afferent ve efferent bağlantılara sahip olduklarını gözlemlemişler ve bu hücre gruplarını *lamella* terimi ile ifade etmişlerdir. Bu tarz bir yaklaşım nukleusun değerlendirilmesi açısından çok daha elverişli bulunduğundan birçok araştırmacı tarafından yukarıda tanımlanan klasik NOİ terminolojisine tercih edilmiştir. Azizi ve Woodward'ın (1987) geliştirdiği bu yeni terminoloji Tablo 1'de verilmiştir. Şekil 3'de de her iki sınıflandırmada kullanılan alt çekirdekler ve bunlara karşılık gelen lamellaların sıçan beyin sapından alınan koronal kesitlerdeki görüntüleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

PO, tüm memelilerde katlantılı bir lamella olarak çok benzer bir şekle sahiptir. PO kemirici NOİ'sindeki en küçük, insan NOİ'sindeki en büyük alt nukleustur (Moatemed, 1968; Armstrong, 1974; Azizi ve Woodward, 1987).

Çoğu memelide NOİ'nin üç büyük alt nukleusundan en büyüğü MAO'dur (Kooy, 1917; Moatemed, 1968; Armstrong, 1974; Azizi ve Woodward, 1987).

DAO ise genel olarak NOİ'nin küçük bir alt nukleusudur ve bir lamelladan oluşur. Rat DAO'su ise istisna olarak iki lamelladan oluşur (Schild, 1970; Delhaye-Bouchaud ve ark., 1985; Azizi ve Woodward, 1987).

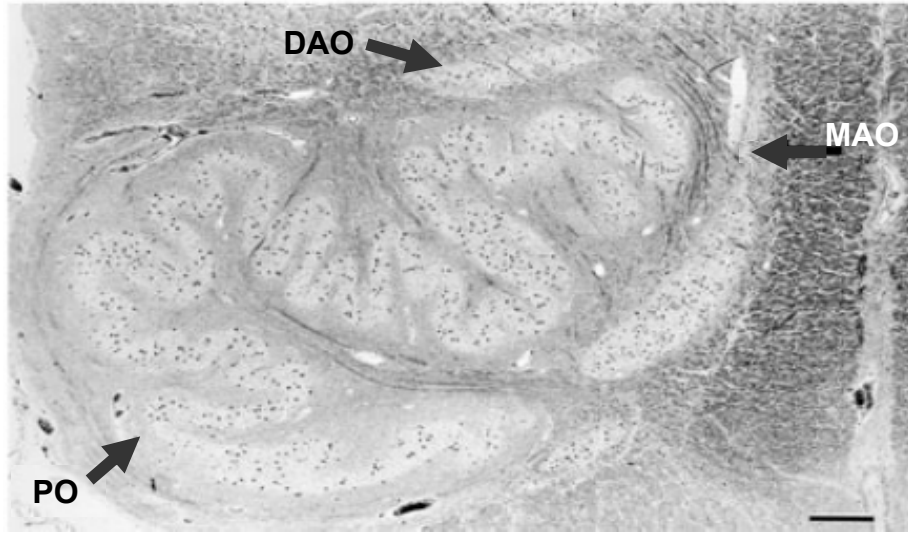
**Tablo 1.** Bağlantı şekilleri esas alınarak oluşturulan NOİ Terminolojisi (Azizi ve Woodward, 1987)

<b>Olivar Alt Üniteler</b>		<b>İlgili Lamellar Bölgeler</b>
<b>1</b>	<b>MAO</b>	
	a ve b	horizontal lamella
	c, β, DB, VLÇ ve DMHK	vertikal lamella
	MAO'nun anterior yüzü	rostral lamella
<b>2</b>	<b>DAO</b>	
	kaudal kısım	dorsal katlantı (lamella)
	rostral kısım	ventral katlantı (lamella)
<b>3</b>	<b>PO</b>	
	dorsal lamella	dorsal lamella
	ventral lamella	ventral lamella

(PO, nukleus olivaris principalis; DAO, nukleus accessorius dorsalis; MAO, nukleus accessorius medialis)

Tablo 1'de sol sütunda NOİ'nin klasik terminolojideki alt nukleusları, sağ sütunda ise bağlantı şekilleri esas alındığında bunlara karşılık gelen lamellar yerleşim gösterilmiştir. Her bir lamella kendine has afferent ve efferent bağlantılara sahiptir. Buna göre yapılan isimlendirmede her bir lamella, klasik sınıflandırmadaki alt çekirdekleri de kapsar. Örneğin, MAO'nun vertikal lamellası; c, β, dorsal başlık (DB), ventrolateral çıkıntı (VLÇ) ve dorsomedial hücre kolunu (DMHK) olarak isimlendirilen birkaç alt grubu da içeren bir yapıdan meydana gelmektedir. Tablo 1'de fark edilebilecek bir başka ayrıntı da, DAO tariflemesinde kullanılan katlantı terimidir. Bu terim lamella terimi ile eş anlamlıdır.



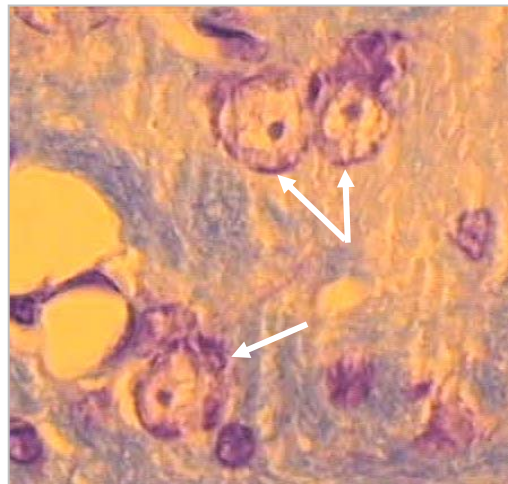


**Şekil 4.** Medulla oblongatadan alınan koronal bir kesitte NOİ profiline ait ışık mikrosafı. NOİ nöropili nöronlarla birlikte oldukça karakteristik bir yapı şekillendirir. Bar = 0.5 mm (Tsuchiya ve ark., 2005).

NOİ'de yer alan nöron tipleri ve bunların özellikleri ışık ve elektron mikroskobik düzeyde çeşitli boyama teknikleri kullanılarak ayrıntılı olarak tanımlanmıştır.

### **2.1. Nissl Boyamaları İle Tanımlanan Nöronlar**

Nissl boyama tekniği ile hazırlanan preparatlarda nöronlar tek tip olarak görüntü verirler. Bu boyamalarda nöronlar miyelinli liflerin oluşturduğu demetler arasında yuvarlak ve/veya oval şekilli hücreler olarak gözlenirler. Bazofilik bir sitoplazma ve soluk boyanan oldukça büyük bir nukleusa sahiptirler (Şekil 5). Nissl boyalarıyla ortaya çıkarabilen bu sınırlı özellikler NOİ'de farklı nöron tiplerinin ayırt edilmesi için yeterli değildir (Bozhilova-Pastirova ve Ovtscharoff, 2000).

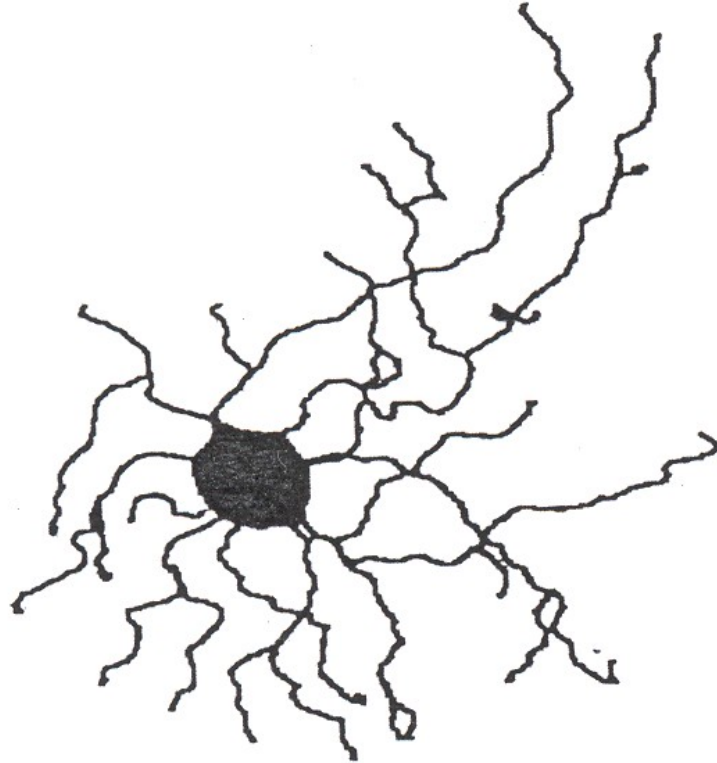


**Şekil 5.** Cresyl violet-luxol fast blue ile boyanan NOİ nöronları (oklar).

## 2.2. Golgi Yöntemi Kullanılarak Yapılan Tanımlamalar

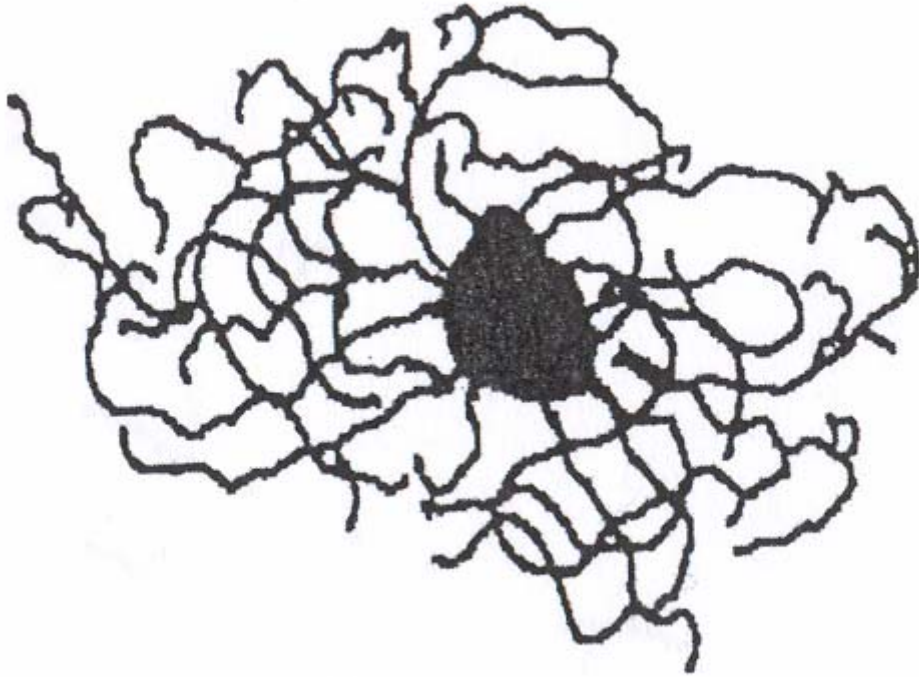
NOİ nöronları, Golgi impregnasyonu tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda da yuvarlak ila oval şekilli görülürler. Ancak dendritik dallanma şeklini görünür hale getiren bu teknik ile 3 tip hücre tanımlanmıştır (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

İlk tip nöronların dendritleri perikaryondan radial olarak uzanırlar ve eliptik veya sferik bir alan oluştururlar (Şekil 6). Üç ila beş arasında değişen sayıda primer dendritleri, sekonder ve tersiyer dendritleri oluşturmak üzere bir veya iki kez dallanırlar (Rashed ve ark., 2007). Daha çok NOİ'nin dorsalinde ve MAO'nun kaudal kısımlarında yer alan bu tip nöronlar insan olivar nukleusunda çok nadir bulunurlar (Scheibel ve Scheibel, 1955; Scheibel ve ark., 1956; Gwyn ve ark., 1977; Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 1979; Rutherford ve Gwyn, 1980; Foster ve Peterson, 1986; Bozhilova-Pastirova, 1990; Ruigrok ve ark., 1990; Ruigrok ve De Zeeuw, 1993; Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 1995 ve 2000).



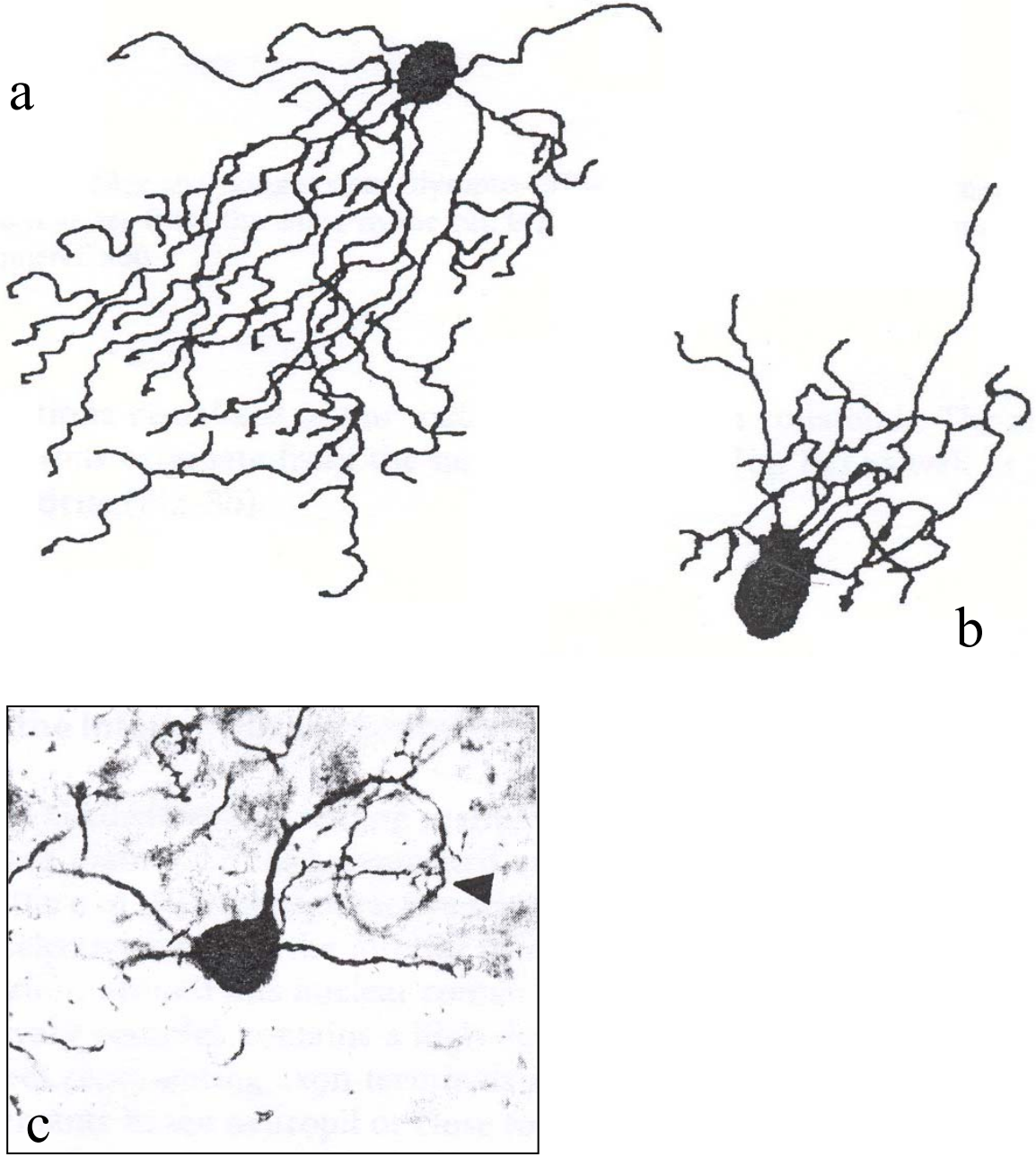
**Şekil 6.** Dendritleri radial olarak düzenlenmiş olan bir olivar nöron. Esas olarak NOİ'nin dorsalinde ve MAO'nun kaudal bölgelerinde yer alır (Golgi impregnasyonu; Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

Dendritik dallanma şekline göre tanımlanan ikinci bir tip nöron, küre benzeri olivar nöronlardır (Şekil 7). Altı veya daha fazla sayıda olan primer dendritleri, sekonder ve tersiyer dendritleri oluşturmak üzere bir veya iki defa dallanma gösterirler ve radial olarak uzanırlar. Kıvrıntılı bir seyir gösteren sekonder ve tersiyer dendritler ise hücreye yumağı andıran bir görünüm verirler. Daha çok MAO'nun rostral yarısında ve PO'da bulunurlar (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 1995 ve 2000).



**Şekil 7.** Dendritleri kendi üzerinde yumak oluşturmuş küre benzeri olivar nöron (Golgi impregnasyonu; Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

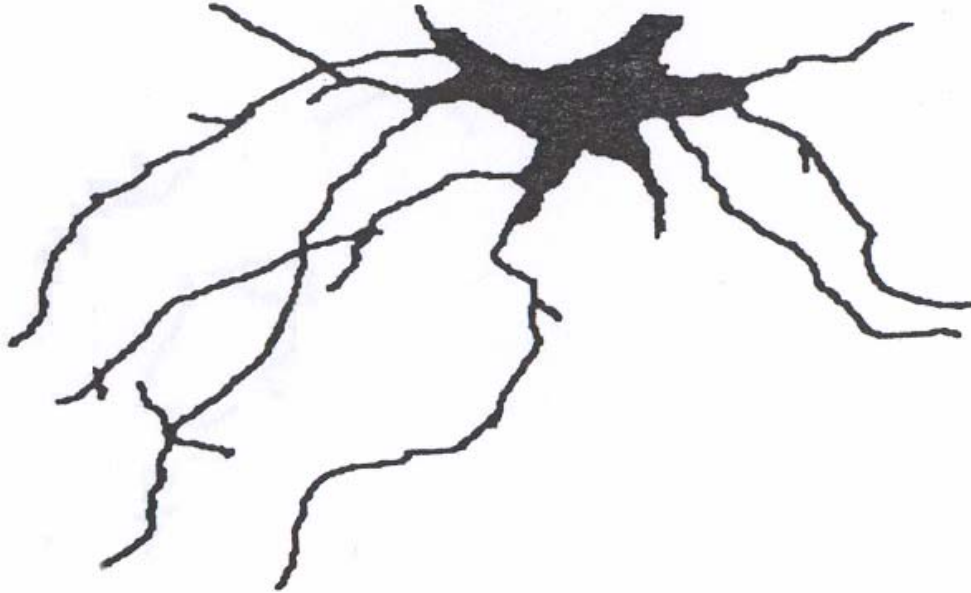
Üçüncü bir tip olivar nöron ise özellikle PO lamellalarında olmak üzere tüm alt nukleuslarda NOİ sınırları boyunca yer alır. Bu marjinal nöronların dendritleri esas olarak olivar lamellaların merkezine yönelmiştir. Bundan dolayı lamella sınırlarını oluşturan gövde bölgelerinde dendrit içermezler (Şekil 8a ve 8b). Zaman zaman sekonder ve tersiyer dendritlerinin seyirleri boyunca hafif kıvrılmalar da (Şekil 8c) gözlenmiştir (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).



**Şekil 8.** NOİ sınırları boyunca yer alan ve dendritleri çekirdeğin merkezine yönelen üçüncü tip olivar nöronlar (“a” ve “c”, sincap; “b”, insan). Siyah ok; kıvrılma gösteren sekonder ve tersiyer dendritler (Golgi impregnasyonu; Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

Bu üç nöron tipinin yanında güvercinlerde retiküler nöron adı verilen ilave bir tip daha tanımlanmıştır (Şekil 9). Dağılım olarak tek hücreler halinde NOİ sınırlarına oldukça yakın yerleşim gösterirler. Güvercinlerde tanımlanan bu nöronlar sincap, sıçan ve kedilerde de gözlemlenmiştir. Genellikle tek tek hücreler halinde dağılımı olan bu

nöronların zaman zaman piramitlerin yakınında küçük gruplar halinde kümelenmiş oldukları da belirlenmiştir. Dendritleri ağ şeklinde dallanan bu retiküler benzeri nöronlar genellikle tipik olivar nöronlardan belirgin derecede daha büyüktürler. İnsanlarda da MAO'nun kaudal kısımlarındaki bazı nöronların, diğer türlerdeki retiküler nöronlara benzer morfolojik özellikler gösterdikleri bildirilmiştir. NOİ çevresinde ya da iç kısmında dağılım gösteren bu nöronlar poligonal veya fuziform şekildedirler. Golgi impregnasyonu ile görüntülenen retiküler nöron dendritlerinin NOİ'nin sınırlarındaki nöronların dendritlerini kısmen kapladığı görülmektedir. Bu nöronal tipin dendritleri sadece uzun veya kısa dağınık dikenler içerir (Bozhilova-Pastirova ve Ovtscharoff, 2000).



**Şekil 9.** Dendritleri ağ şeklinde dallanan ve ilk önce güvercinlerde tanımlanmış olan retiküler tipte olivar nöron (Golgi impregnasyonu; Bozhilova-Pastirova ve Ovtscharoff, 2000).

### **2.3. İmmünohistokimyasal İşaretleme Göre NOİ Nöronları**

İmmünohistokimyasal işaretleme ile hazırlanan preparatlarda NOİ'de büyük multipolar ve küçük internöronlar olmak üzere 2 tip nöron ayırt edilmektedir. Büyük multipolar nöronlar PO nöronlarının % 90'ını oluşturur. Merkezi olarak yerleşik yuvarlak bir nukleusa sahip bu nöronların çapları 25 µm'dir. Aspartat ve glutamat için pozitifler ve eksitatördürler (Szteyn, 1988; Fredette ve ark., 1992; Pine ve ark., 1997). İnsan olivar projeksiyon nöronları kortikotropin serbestleştirici hormon (Powers ve ark.,



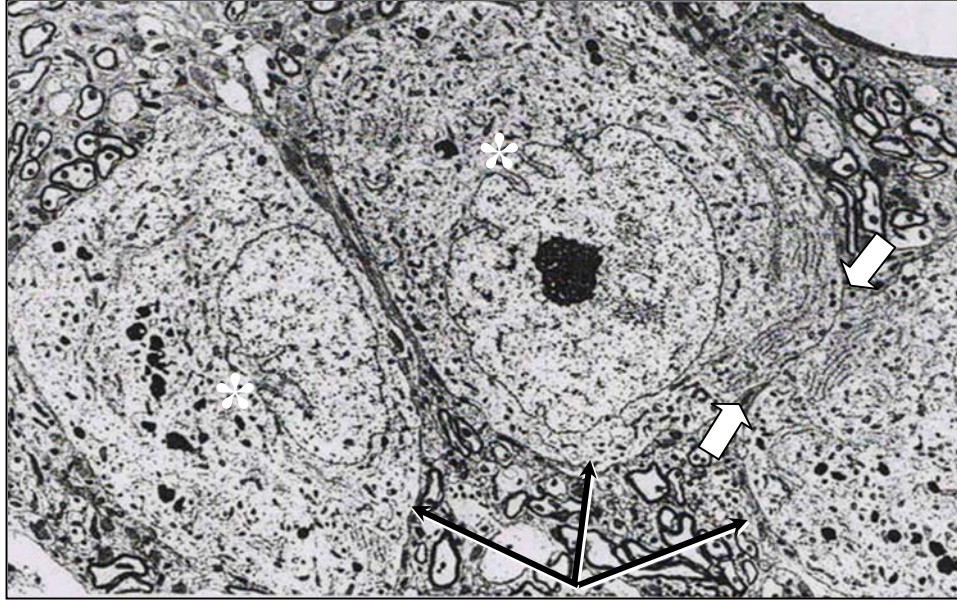
1987) ve insülin growth faktör-1 için de pozitifler (Bondy, 1991). Bu özellikleriyle olivoserebellar sistemde Purkinje hücreleri için modülatör transmitterler ve trofik faktörler olarak hizmet ederler. İkinci nöron popülasyonunu, sayısal oranları % 5 – 10 arasında değişen armut biçimli GABA-pozitif internöronlar oluşturur. Yaklaşık 7 – 10 µm çapında olan ve nukleus içinde sonlanan (Szteyn, 1988; Fredette ve ark., 1992) bu küçük internöronlar olivoserebellar sistemde inhibitör modülasyon sağlarlar (Lang ve ark., 1996; Ruigrok, 1997; Weigel ve ark., 1999). Büyük multipolar nöronlar sepet ve Golgi hücreleri (Scheibel ve Scheibel, 1954; Powers ve ark., 1987), serebellar nukleuslar (Szteyn, 1988) ve esas olarak ise kontralateral serebellar korteksteki Purkinje hücre dendritlerini (Powers ve ark., 1987) hedef alırlar. Bu aksonlar tırmanıcı lifler olarak adlandırılan afferent projeksiyonların tek kaynağıdır (Nauta ve Feirtag, 1986; Voogd ve ark., 1990; Voogd, 2003).

## **2.4. Elektron Mikroskopik Görünüm**

### **2.4.1. Nöronal gövde**

İnsanlar ve birçok farklı hayvan türlerinde gerçekleştirilen çalışmalar NOİ nöronlarının ortalama 10 – 25 µm arasında değişen bir çapta olduklarını göstermektedir. Bununla birlikte en yaygın olanlar 20 – 25 µm çapında olan orta büyüklükteki nöronlardır. Yuvarlak ila oval veya poligonal bir gövdeye ve bu şekle benzer bir çekirdeğe sahiptirler. Çekirdek, insanlarda merkezi; sıçan, sincap, kedi ve güvercin gibi çalışılan türlerin çoğunda ekzantrik olarak bulunur ve bir veya daha fazla invaginasyon gösterir (Şekil 10). Ökromatik özellikteki çekirdekte fibriler ve granüler komponentleri olan yoğun ve yuvarlak yapıdaki çekirdekçik belirgindir (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

Sitoplazmalarında mitokondrionlar, serbest ve kümeler halinde ribozomlar, granüllü endoplazmik retikulum ve iyi gelişmiş Golgi kompleksleri bulunur. Multiveziküler cisimler, lizozomlar ve lipofuksin granülleri sitoplazmada dağılmış haldedirler. Nörofilamentler ve nörotübüller, perikaryonda gevşek olarak düzenlenmiştir, fakat proksimal dendritlerde paralel bandlar oluştururlar (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).



**Şekil 10.** Kedi NOİ'sinde grup oluşturan üç nöron (siyah oklar). İki tanesinde hücre zarları yakın komşuluk (beyaz oklar) göstermektedir. Çekirdeklerine ait invaginasyonlar (\*) oldukça belirgindir (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

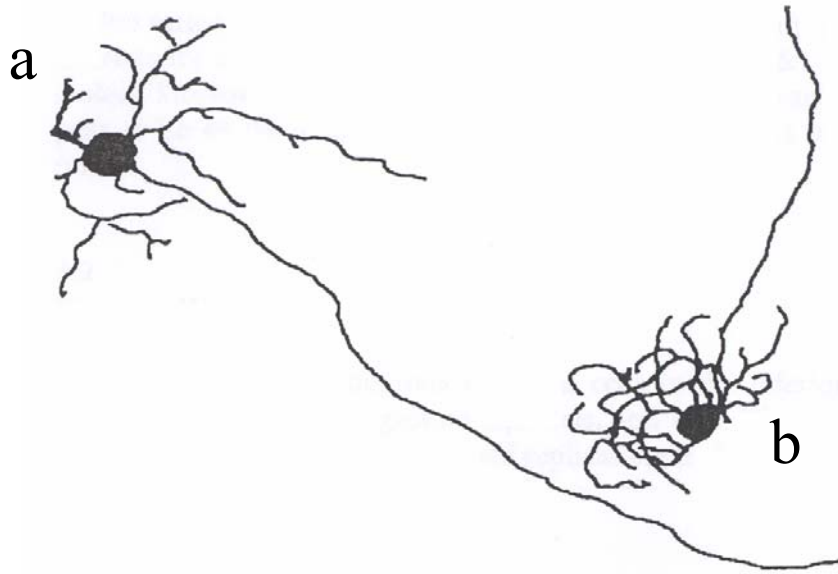
Olivar nöronların plazmalemmasının büyük bir kısmı, astrositler veya oligodendrositler ve bunların uzantıları ile örtülüdür. Genellikle gruplar halinde bulunurlar (Şekil 10). Yan yana duran bazı perikaryonların plazma membranları sıklıkla belirli bir mesafe boyunca yakın bir komşuluk gösterir. Sincaplarda yapılan çalışmalarda bazı nöronlarda silyalar da gözlenmiştir. Özellikle MAO'nun kaudal yarısında yerleşim gösteren bu nöronlar, 8+1 veya dokuz periferel mikrotübül şeklinde düzenlenme gösteren bir aksoneme sahiptirler (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

NOİ'deki nöronlar çok az sayıda aksosomatik sinapsa sahiptirler. Terminaller diken benzeri çıkıntılar veya diğer nöronal plazma zarı kısımları ile sinaps yaparlar. İki tip akson terminali bulunur. Bir kısım akson terminallerinin çapı 0,3 – 4 µm arasında değişir. Yaklaşık 350 – 500 A° çaplı yuvarlak veziküller içeren bu terminaller asimetric sinaptik bağlantılar oluştururlar. Bu akson terminalleri nadiren perikaryon ve proksimal dendritler ile sinaps yaparlar. Diğer bir kısım akson terminallerinin çapı ise 0,5 – 3,5 µm'dir. Bu terminallerde boyutları 280x400 A° ve 320x680 A° arasında değişebilen pleomorfik veziküller bulunmaktadır. Nöronal gövdeler ve somatik dikenlerle simetric sinaptik bağlantılar yaparlar. NOİ'de bu akson terminallerine ek olarak nadiren bulunan

bir üçüncü tip akson terminali daha gözlenmiştir. Bu terminallerin çapları ise 0,8 – 3,7  $\mu\text{m}$  arasındadır. Ortalama 550 A° çapında açık renkli ve 950 A° çapında olan koyu renkli vezikülleri vardır. Koyu renkli veziküller bazı profillerde vezikül topluluğunun % 25'ini oluşturabilmektedir. Bu akson terminalleri çapları 2  $\mu\text{m}$ 'dan küçük dendritik elementler ile sinaptik bağlantılar yapar ve genellikle sinaptik yığınlar da görülürler (Gwyn ve ark., 1977).

#### 2.4.2. Akson ve Dendritler

Primer dendritler hücre gövdesinden çıkmaktadır. Organellerinin çoğu proksimal dendritin aspal segmentine kadar uzanmaktadır. Proksimal dendritin taban kısmı (özellikle küre benzeri hücre tipinde) aksonun başlangıç segmenti ile devamlılık gösterir (Şekil 11).



**Şekil 11.** Aksonu gövdeden (a) ve proksimal dendritin taban kısmından (b) köken alan iki olivar nöron (Golgi impregnasyonu; Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

Akson başlangıç segmenti, kümelenmiş mikrotübülleri ve membranları altında gösterdikleri yoğunlaşmalar ile dendritlerden ayırt edilir. Buradaki akson başlangıç segmenti genellikle incedir (1  $\mu\text{m}$ ) ve sinaptik bağlantı kurmaz. Proksimal dendritler

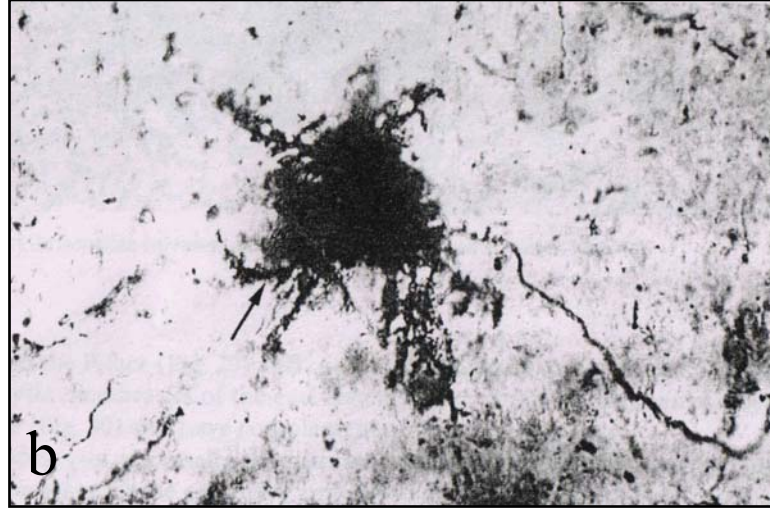
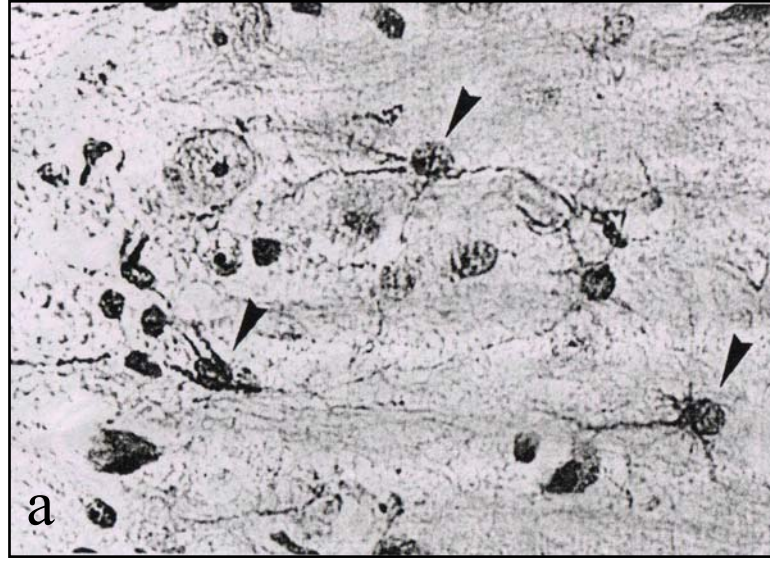
gövde ile benzer sitoplazmik organeller içerirler. Dendritik yüzeyler genellikle düzgün olmakla birlikte yer yer sinaptik terminallerle temasları olan kısa-künt spinler veya dendritik eklentiler gösterirler. Gövdede olduğu gibi, bu bölgedeki plazmalemmada da pleomorfik vezikül içeren akson terminalleri çok az sinaps yapar. Bu dendritlerin büyük bir kısmı astroglial uzantılar ile kaplanmıştır. Sekonder veya tersiyer dendritler (1 – 2 µm'den daha az çapta olanlar) çok az bir sitoplazmik organel içeriği ile karakterizedir. Bazı dendritik profiller çok sayıda mitokondrion ile doludur. Dendritlerin sitoplazmalarında yoğun özlü veziküller, multiveziküler cisimcikler ile dendritik lamellar cisimcikler yer alır. Bunların yanı sıra bazı dendritlerde az sayıda, farklı şekilli spinler de gözlenmiştir (kısa, dallı, ince boyunlu ve şişkin başlı gibi). İncelenen tüm hayvan türlerinde NOİ'deki dendritlerin sinaptik terminal alanları olduğu tespit edilmiştir (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

### **2.4.3. Nöroglial hücreler**

Gelişim sırasında glial hücreler ile henüz olgunlaşmasını tamamlamamış nöronlar benzer karakterlere sahiptirler. Ancak S100 ve glial fibriler asidik protein (GFAP) gibi hücre iskeleti proteinlerinin varlığıyla nöronlardan ayırt edilebilirler (Cunningham ve ark., 1999). Astrositler, bunların çıkıntıları ve oligodendrositler, NOİ nöropilindeki nöron ve elemanlarının yakın çevresini oluşturan bir topografik düzenlenme gösterirler (Sotelo ve ark., 1974).

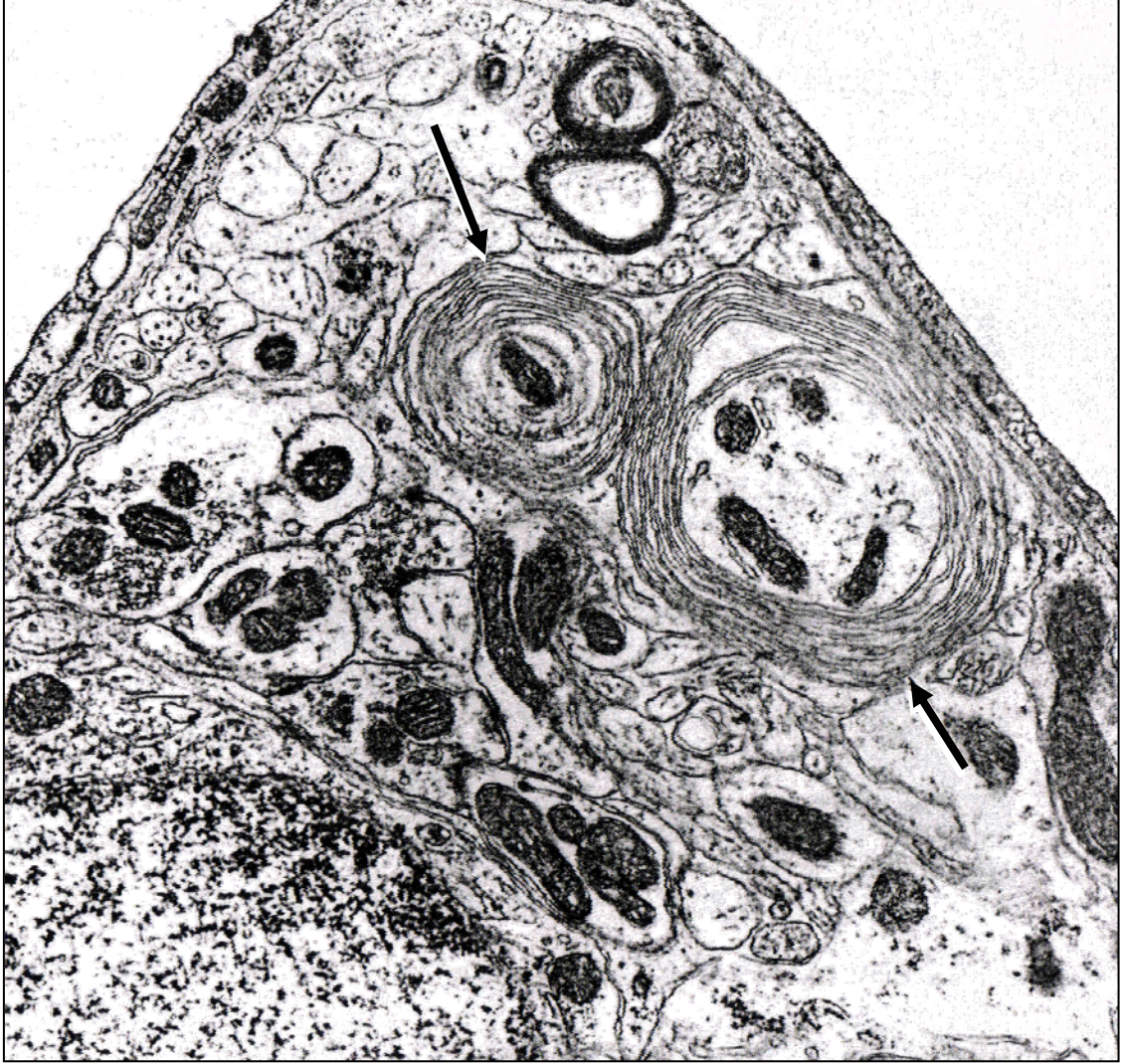
NOİ'de üç tip astrosit tanımlanmıştır. Bunlar; fibröz astrositler, protoplazmik astrositler ve protoplazmik astrositlerin bir çeşidi olan velate tip astrositlerdir (Chan-Palay ve Palay, 1972; Palay ve Chan-Palay, 1974; Chan-Palay, 1977; Bozhilova-Pastirova ve ark., 1991; Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

Fibröz astrositler; uzun çıkıntılara sahiptirler, GFAP immünreaktifler (Şekil 12a) ve miyelinize fibriler bandlar arasında yerleşiktirler (Bozhilova-Pastirova ve ark., 1989a ve 1991). Protoplazmik astrositler, fibröz astrositlere göre daha az ara filamana sahiptirler ve perivasküler ayaklar oluştururlar.



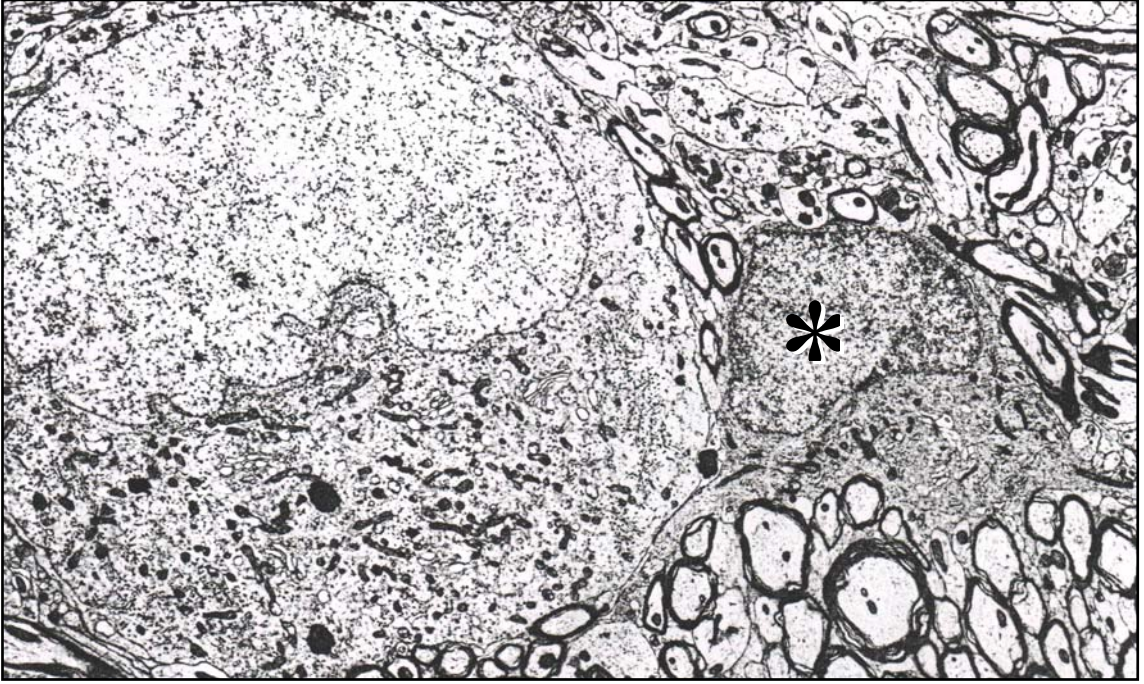
**Şekil 12.** GFAP pozitif bir astrosit (a) ve Golgi impregnasyon tekniği ile belirlenen velate (b) tipte bir astrosit (Bozhilova-Pastirova ve ark. 1991).

Sarkan membranlar şeklinde uzantılara sahip olan velate tipteki astrositler (Şekil 12b) ise sitoplazmalarında lamellalar içerirler. Bunlar nöropil elemanları etrafında tek veya multilamellar yapılar tarzda düzenlenme gösterirler (Şekil 13). Astrositik uzantılar ve lamellar yapılar arasında gap junction ve puncta adherentia tipinde membran özelleşmeleri vardır (Bozhilova-Pastirova ve ark., 1989b ve c).



Şekil 13. Astroitik lamellalar (oklar) (Bozhilova-Pastirova ve ark., 1989b ve c).

Oligodendrositler ise birkaç kısa çıkıntısı olan yuvarlak ila oval veya poligonal hücre gövdeli küçük hücrelerdir. Bu hücreler periferik kromatinli, ekzantrik yerleşimli bir çekirdeğe ve yoğun bir sitoplamaya sahiptirler. Çapları yaklaşık 25 nm olan çok miktardaki mikrotubülleri ile astroditlerden ayırt edilebilmektedirler. Bunlar gövdenin yanı sıra hücre çıkıntılarında da uzanır. Oligodendrositler perinöronal, perinöronal ve perifasiküler veya interfasiküler yerleşimlidirler (Şekil 14). Oligodendrositler ve uzantıları astroditlerle gap junction, diğer oligodendrositler ile sıkı bağlantılar gösterirler (Bozhilova-Pastirova ve Ovtsharoff, 2000).

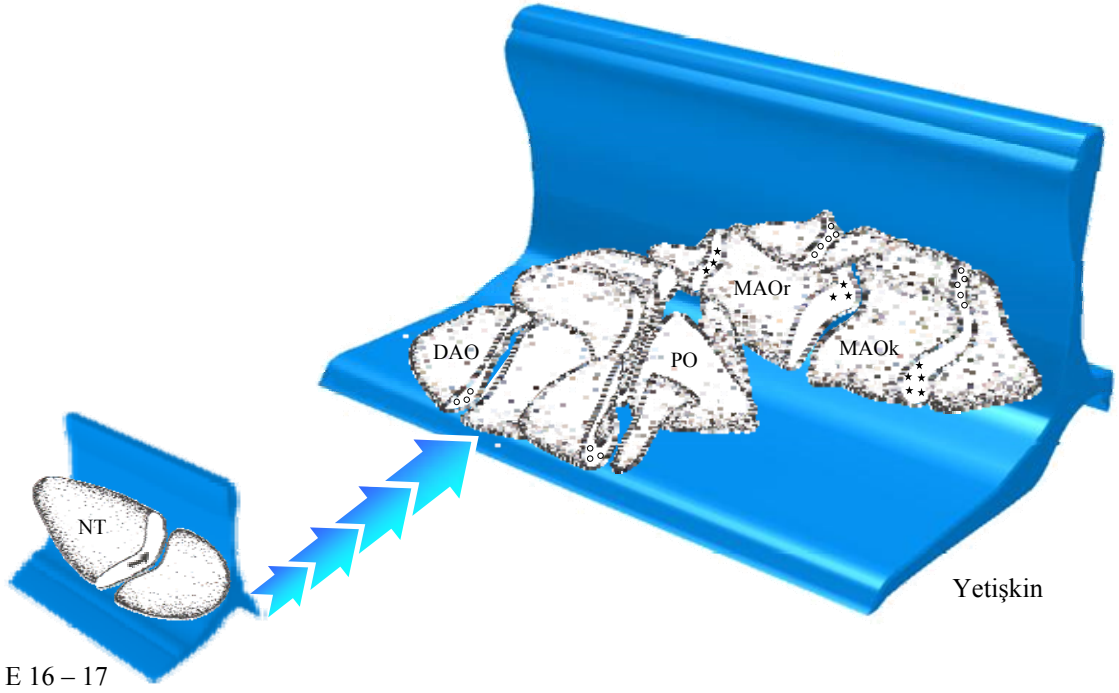


**Şekil 14.** NOI'de perinöronal-perifasiküler yerleşim gösteren bir oligodendrosit ve uzantılarına (\*) ait elektron mikrograf (Bozhilova-Pastirova ve Ovtscharoff, 2000).

### 3. NOİ EMBRİYOLOJİSİ

NOİ, beyinciğin de gelişim gösterdiği rombensefalik alar plağın aynı rostro-dorsal kısmından gelişir. Olivar nöronlar bu bölgedeki nöroepitelin dorsalinde şekillendikten sonra submarjinal ve marjinal bölgedeki hücre hareketleri sırasında ventrale doğru göç ederler (Nieuwenhuys ve ark., 1998). Sıçanlarda NOİ nöronları MAO'da 12., DAO'nun dorsal kısımları ve PO'nun ventral kısımlarında ise 13. embriyonik günde şekillendirilirler. Bu haliyle oluşturulan yapı embriyonal hayatın 18. gününe kadar kalır ve virgül şekilli bir yapı oluşturur (Şekil 15). Sıçanlardaki bu ilk taslak embriyonal hayatın 18 – 20. günlerinde yetişkindeki şekline dönüştürülür. (Bourrat ve Sotelo, 1988, 1990a ve b).

İnferior olivar kompleksin kısımlandırılması beyinciğin kısımlandırılması ile yakından ilişkilidir ve olivoserebellar bağlantıların gelişip olgunlaşması sırasında gerçekleştirilir (Robertson ve Stotler, 1974; Goffinet, 1983; Sotelo ve ark., 1984; Bourrat ve Sotelo, 1991; Landis ve ark., 1989; Heckroth ve ark., 1990; Sotelo ve Wassef, 1991; Armengol ve Lopes-Raman, 1996; Sotelo ve Chedotal, 1997).



**Şekil 15.** NOİ gelişimini gösteren diyagram (sadece beyin sapının sağ tarafı temsil edilmiştir). Embriyonal hayatın 16 – 17. gününde çomak şekilli olan NOİ taslağındaki nöronlar, lateralden gelerek siyah ok ile gösterilen yönde ilerlerler. Yetişkin NOİ’inde ise nukleusun kaudal ve rostral kısımlarındaki yerleşim farklılık gösterir. NOİ kaudal parçasında, daha sonra şekillenen nöronlar (siyah yıldızlar) lateralde kalırlar. Bu yerleşim tarzı embriyonal taslaktaki ile benzerlik gösterir. Erken şekillenen nöronlar (daireler) ise taslağa geliş sıralarına göre dorsomedial olarak yerleşim gösterirler. Nukleusun rostral üçte ikilik kısmında bu kronolojik yerleşim sırası tersine döner. NT, NOİ taslağı; DAO, nucleus olivaris accessorius dorsalis; PO, nucleus olivaris principalis; MAOr, nucleus olivaris accessorius medialis’in rostral kısmı; MAOk, nucleus olivaris accessorius medialis’in kaudal kısmı (Bourrat ve Sotelo’dan modifiye edilmiştir, 1991).

Olivar aksonların serebellum içerisine geçişleri ise prenatal dönemin 17. gününde başlar (Wassef ve ark., 1992). Bu aksonlar, beyinciğe geçmeleri ile birlikte hemen hedef nöronları olan Purkinje hücreleri ile temas kurarlar. Purkinje hücreleri ile olivar aksonlar arasında oluşan bu ilk temas, Purkinje hücreleri henüz serebellum korteksindeki yerlerini almadan meydana gelir. Olivar aksonlar başlangıçta Purkinje hücre gövdelerinin üzerinde yer alan bazı şişkince alanlar üzerinde temas kurarlar. Postnatal ilk iki haftalık dönemde ise Purkinje hücrelerinin gövde ve dendritleri etrafında sarılıp uzanarak çok sayıda sinaps yaparlar ve yetişkindeki son şekillerini alırlar (Chedotal ve Sotelo, 1992).



Gelişimin başlangıç dönemlerinde, Purkinje hücreleri birden çok tırmanıcı lifle innerve edilirler. Ancak serebellum olgunlaşırken, bu girişler dereceli olarak her Purkinje hücresinde tek bir tırmanıcı lifle sonuçlanacak şekilde elimine edilir (Carpenter, 1985; Martin, 1989; Standring, 2005).

NOİ nöronlarının hayatta kalması embriyogenez süresince Purkinje hücrelerinin varlığına bağlı değildir. Ancak doğumdan hemen sonra belirli bir süre için kritik bir bağımlılık gösterirler. Bu hedef hücre bağımlılığı yaşla birlikte azalır (Chu ve ark., 2000).

#### **4. NOİ BAĞLANTILARI**

NOİ'nin afferent ve efferent bağlantıları bulunmaktadır. Afferent bağlantıları çıkan ve inen olmak üzere ikiye ayrılır (Barr ve Kiernan, 1988).

Vücudun alt kısımlarından tamamen çaprazlaşarak çıkan lifler, impulsları spino-olivar yol içinde taşırlar. Bu yol genel olarak proprioseptörlerden ve bazı eksteroseptörlerden alınan impulsları taşır ve spinoserebellar sistemin bir parçasını oluşturur. Tractus spinoolivaris'e ait birinci nöronlar ganglion spinale'de bulunur. Bu yol ile ilgili birinci nöronların santral uzantılarının bir kısmı muhtemelen lamina IV, V, VII ve VIII'deki ikinci nöronlar ile sinaps yaparlar (Taner, 2002).

İkinci nöronların aksonları commissura alba anterior'da karşı tarafa geçer ve medulla spinalisin anterolateral kısmında yükselen tractus spinoolivaris anterior'u oluşturur. Bu yol ile ilgili aksonlar, DAO ve MAO'da sonlanır. Birinci nöronların santral uzantılarının bir kısmı ise tractus spinoolivaris posterior adını alarak ipsilateral funiculus posterior içerisinde yükselir. Bunlar medulla oblongata seviyesinde nucleus gracilis ve nucleus cuneatus'taki ikinci nöronlar ile sinaps yaparlar. Nucleus gracilis ve nucleus cuneatus'taki nöronların aksonları ise karşı tarafa geçerek DAO ve MAO'da sonlanır (Taner, 2002).

DAO ve MAO'dan başlayarak karşı tarafa geçen liflerin oluşturduğu tractus olivocerebellaris, pedunculus cerebellaris inferior'den geçer ve lobus cerebelli anterior'da sonlanır. Böylece tractus spinocerebellaris anterior ve tractus spinocerebellaris posterior dışında, tractus spinoolivaris ve tractus olivocerebellaris ile spinal seviyelerde serebelluma impuls taşıyan diğer bir yol oluştururlar (Taner, 2002).

NOİ üzerinde sonlanan inen lifler ise ipsilateral olarak serebral korteks, nucleus ruber ve mesencephalon'un periakuaduktal gri maddesinden gelirler. Kortiko-olivar lifler frontal, parietal, temporal ve oksipital korteksten çıkar, kortikospinal liflerle birlikte bilateral olarak santral tegmental olivar yola inerler. Periakuaduktal gri maddeden gelen lifler PO ve MAO'nun rostral kısmında sonlanırken, rubro-olivar lifler PO'nun dorsal lamellasında sonlanırlar (Carpenter, 1985). Mesencephalon'dan NOİ'ye uzanan yolun bir parçası olan santral tegmental yolun terminal kısmı PO'nun dorsal yüzeyi üzerinde yoğun bir tabaka oluşturur (Barr ve Kiernan, 1988). Miyelinize liflerin oluşturduğu bu yoğun tabaka amiculum oliva olarak isimlendirilen yapıyı oluşturur (Carpenter, 1985).

MAO'nun rostral yarısına, DMHK ve PO'ya eksitator özellikte olan (Jeneskog, 1987) mezensefalo-diensefalik projeksiyonlar gelmektedir (Walberg, 1956; Saint-Cyr ve Courville, 1980 ve 1982; Saint-Cyr, 1987; Spence ve Saint-Cyr, 1988; de Zeeuw ve ark., 1989a, b ve 1990; Ruigrok ve Voogd, 1995).

NOİ; nucleus vestibularis inferior (Saint-Cyr ve Courville, 1979), nucleus tractus spinalis nervi trigemini ve kontralateral derin serebellar nukleus kısımlarından da (Tolbert ve ark., 1976; Berkley ve Worden, 1978) lifler almaktadır. Serebellar nukleuslar ve bazı vestibular nukleuslar kontralateral NOİ'ye GABAerjik projeksiyon verirler (Gray, 2005). Bazı türlerde (sıçan, tavşan, kedi ve maymunlarda) vestibular projeksiyonların GABAerjik yanında kolinerjik özellikte de oldukları gösterilmiştir (Horn ve Hoffmann 1987; Nelson ve ark., 1986; Nelson ve Mugnaini, 1989; de Zeeuw ve ark., 1993; Barmack ve ark., 1998).

NOİ'nin spinal bölgesi retiküler formasyondan projeksiyonlar alır (Brown ve ark., 1977; Martin ve ark., 1977; Walberg, 1982; Courville ve ark., 1983; Bishop, 1984). Olivar döngüdeki medullar retiküler nöronların rolü inhibitördür (Llinás ve ark., 1974). Buna karşılık spino-olivar nöronlar spino-olivo-serebellar döngüdeki olivar nöronlar üzerinde eksitator etki sağlarlar (Oscarsson, 1969 ve 1980; Gellman ve ark., 1983).

Sıçanlarda yapılan otoradyografik işaretlemelerle serebello-olivar projeksiyonun topografik organizasyonu araştırılmıştır. Sonuçlar serebello-olivar liflerin topografik olarak düzenlenme gösterdiğini ve öncelikle kontralateral NOİ'de sonlandığını göstermektedir. Sadece nucleus fastigii'nin kaudo-ventral kısmı, MAO'nun

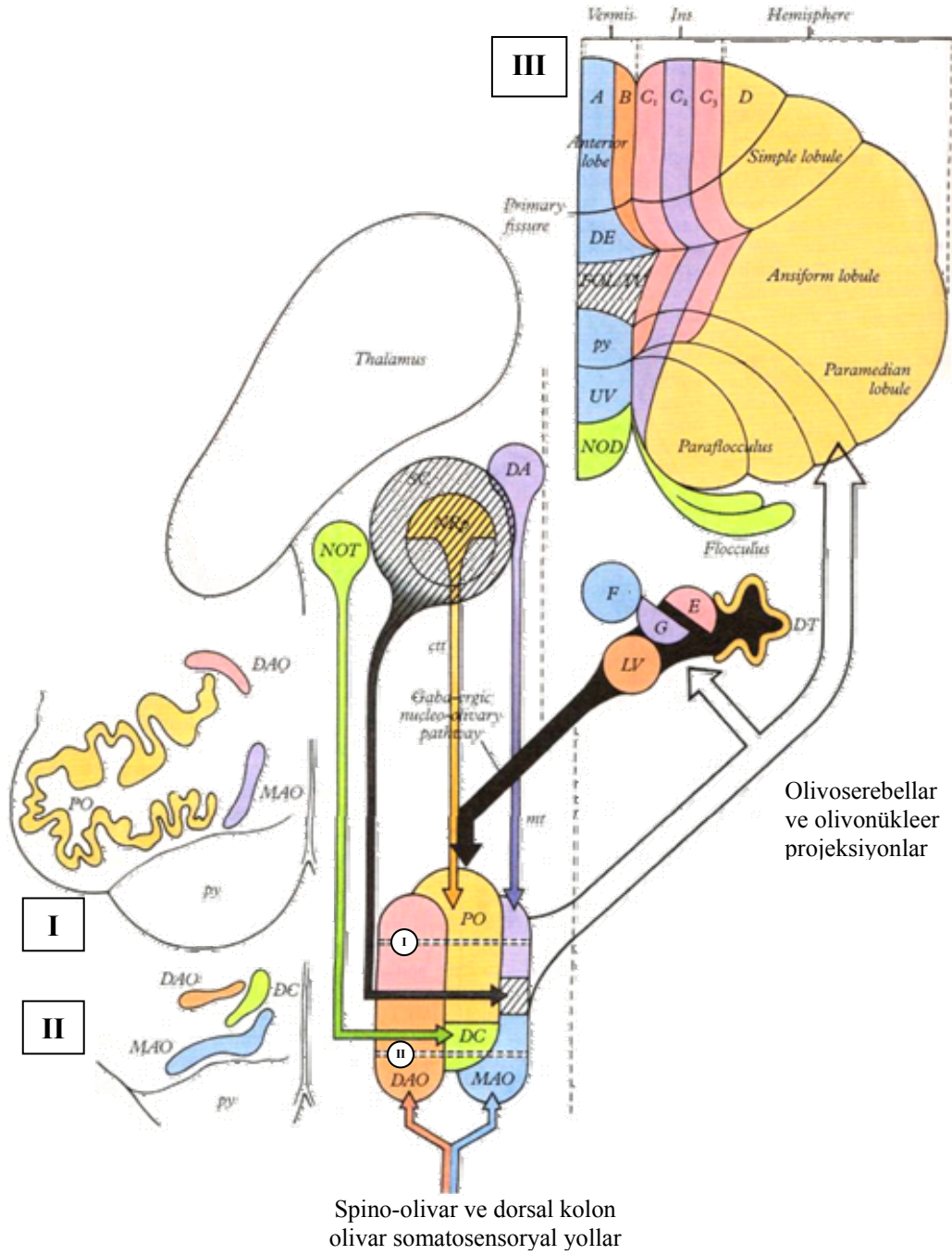
kaudal kısmına yönelir. Nucleus emboliformis ve nucleus globosus başlıca DAO ve MAO'nun rostral kısmına projekte olur. Ayrıca nucleus globosus'un medial kısmı, PO'nun ventral lamellasına ve DMHK'ye; nucleus emboliformis'in lateral parçası ise esas olarak DMHK'ye geçer. Nucleus dentatus'tan oliva'ya doğru olan projeksiyon da topografik olarak düzenlenme gösterir. Nucleus dentatus'un kaudali, PO'nun rostrali; rostrali ise PO'nun kaudali ile bağlantı kurar. Nucleus dentatus'un medial ve lateral kısımları ise sırasıyla PO'nun ventral ve dorsal lamellalarına; dorsal ve lateral kısımları ise, PO'nun medial ve lateral parçalarına projekte olur (Umetani, 1989).

Olivar nöron aksonları ise, kontralateral serebellar kortekste tırmanıcı lifte denilen olivoserebellar projeksiyonları oluştururlar. Ayrıca nucleus vestibularis lateralis ile serebellar nükleuslara da kollateraller gönderirler. Topografik düzenlenme serebellar nükleuslar ile NOI'nin alt nükleusları arasında bulunduğu gibi (Şekil 15), olivoserebellar ve Purkinje nükleer projeksiyonları arasında da vardır (Gray, 2005).

DAO ve MAO, vermis'e ve yakın hemisferlere projekte olurlar. DAO ve MAO'nun kaudalde kalan yarısı kısımları vermisini innerve ederler. Bunlardan DAO kısmı anterior vermisin B zonuna, MAO kısmı ise A zonuna ve nucleus fastigii'ye projekte olur. DAO'nun ve MAO'nun rostralde kalan yarısı ise pars intermedia'ya projekte olur. DAO'nun rostralinden kaynaklanan tırmanıcı lifler nucleus emboliformis'e kollateral projeksiyonlar verip, belirli zonlarda (C1 ve C3) sonlanırken; MAO'nun rostrali, C2 zonuna ve nucleus globosus'a projekte olur. PO ise kontralateral hemisfere (D zonuna) yönelir ve nucleus dentatus'a kollateraller verir (Gray, 2005).

#### **4.1. Tırmanıcı Lifler ve Fonksiyonları**

Tırmanıcı lifler sinir sisteminin en güçlü eksitator bağlantılarını yaparlar (Martin, 1989). Purkinje hücrelerine uzanmakta olan bu olivoserebellar lifler, serebellumun ana afferent kaynağıdır (Desclin, 1974; Barr ve Kiernan, 1988; de Zeeuw ve ark., 1988; Guyton ve Hall, 2007). Bu lifler serebellar nükleuslara da kollateraller gönderirler (van der Want ve Voogd, 1987; van der Want ve ark., 1989; de Zeeuw ve ark., 1997). Bu miyelinsiz lifler çok sayıda dala ayrılırlar ve Purkinje hücrelerinin dendritik dallarına tırmanır (Carpenter, 1985). Otoradyografik çalışmalar tırmanıcı liflerin NOI'den kaynaklandığını ve çaprazlaşarak karşı hemisfere geçtiklerini göstermiştir (Batini ve ark., 1979; Courville ve Faraco-Cantin, 1978).



**Şekil 15.** Olivoserebellar projeksiyonlara ait diagram. **I** ve **II**. Sol NOI'nin üç alt nükleusunu gösteren transvers kesitler. Kesit seviyeleri **III**'te gösterilmiştir. **III**. Üç silindir olarak çizilen PO, DAO ve MAO. Olivoserebellar projeksiyonlar beyaz renkli okla, GABA-erjik nükleo-olivar yol siyah ok ile gösterilmiştir. NOI'nin birbirleriyle bağlantılı olan alt bölümleri, temel afferent bağlantıları, vermis ve hemisferin Purkinje hücre zonları üzerinde tırmanıcı lifler olarak sonlanmaları ve serebellar nükleuslara olan kollateral projeksiyonları benzer renklerle belirtilmiştir. A, A Purkinje hücre zonu; B, B Purkinje hücre zonu; C<sub>1-3</sub>, C<sub>1-3</sub>Purkinje hücre zonu; ctt, santral tegmental yol; D, D Purkinje hücre zonu; DA, Darkschewitsch nükleusu; DC, dorsal başlık; DE, decliv; DT, nucleus dentatus; E, nucleus emboliformis; F, nucleus fastigii; FOL/TU, folyum/tuber; G, nucleus globosus; Int, pars intermedia; mt, medial tegmental yol; NOD, nodulus; NRp, parvocellular red nükleus; NOT, optik yolun nükleusları; on, olivonükleer kollateral bağlantı; py, piramidal yol; SC, colliculus superior; UV, uvula (Gray, 1995).

Tırmanıcı lifler topografik olarak düzenlenme gösterdiklerinden belirli bir lif grubu yine serebellumun belirli bir bölgesiyle bağlantı kurmaktadır. Serebellum foliumunun uzun eksenine dik olacak şekilde ak maddeden ve granüler tabakadan geçip Purkinje hücre tabakasındaki Purkinje hücreleri üzerinde sinaps yaparlar (Szentágothai ve Rajkovits, 1959; Eccles ve ark., 1966; Carpenter, 1985; Guyton ve Hall, 2007).

Her bir tırmanıcı lif tek bir Purkinje hücrelerini innerve eder. Bu topografik ilişki merkezi sinir sisteminin en sıra dışı bağlantılarından birisini oluşturur (Eccles ve ark., 1966; Sugihara, 2006). Her bir olivoserebellar lif 5 ila 10 tırmanıcı life ayrılır (Ruigrok ve Voogd, 2000; Standring, 2005). Pek çok tırmanıcı lif, Purkinje hücrelerinin dendritik dalları üzerine sinaps yapmadan hemen Purkinje hücre tabakası altında infraganglionik bir pleksus oluşturur (Carpenter, 1985). Bir tırmanıcı lif, Purkinje hücrelerinin dendritlerinin proksimal segmentlerinden dışarı çıkan kısa, kalın spinler üzerine (Gray, 2005) ve Purkinje hücre gövdesi üzerine 200 (Armstrong, 1974) ila 300 (Guyton ve Hall, 2007) sinaps yapmak üzere dallanır.

Tırmanıcı lif sistemi bağlantı özgünlüğünün yanı sıra fizyolojik özellikleri bakımından da kendisine has özellikler gösterir. Bu etkilerini serebellumun motor kontrol işlevinde görmekteyiz (Welsh ve ark., 1998; Rondi-Reig ve ark., 1997; Apps ve Lee, 1999; Lang ve ark., 1999; Lui ve ark., 1999).

Serebellum; kas kasılmasının başlamasına, bitişine ve kasılmanın zamanlamasına vereceği desteğin miktarını öğrenebilir. Kişi yeni bir motor aktiviteyi ilk defa yaptığında, serebellumun kasılmanın başlamasına ve kasılma sonundaki inhibisyona katkısı ve bunların zamanlanması, çoğu zaman hareketin doğru yapılmasına yetmez. Fakat hareketler birçok kez tekrarlandıktan sonra daha kusursuz hale gelir. İstenilen sonucun elde edilebilmesi için bazen sadece birkaç hareket yeterken, bazı durumlarda ise yüzlerce tekrar gerekebilmektedir (Guyton ve Hall, 2007).

Yapılan denemeler sonucunda serebellum devrelerindeki duyarlılığın aşamalı olarak uyum gösterdiği bilinmekle birlikte, kesin cevap bilinmemektedir. Özellikle, Purkinje hücrelerinin uzun süreli duyarlılığı granül hücrelerinden gelen paralel liflere cevap olarak değiştirilir. Bu duyarlılık değişimine NOİ'den serebelluma gelen tırmanıcı liflerin taşıdığı sinyaller sebep olmaktadır (Guyton ve Hall, 2007).

Olivar nöronlar gap junctionları aracılığı ile olan elektronik birleşimlerinden dolayı (Llinás ve Yarom, 1981) ritmik ve senkronize çalışırlar (Benardo ve Foster,

1986). Bu gap junction tipi bağlantılar birkaç olivar birimin spinleri aracılığı ile şekillendirilen dendro-dendritik bağlantılardır ve glia ile çevrili glomerüller oluştururlar (King, 1976; de Zeeuw ve ark., 1990). Her bir nöron 50 komşu nörona direkt olarak bağlanır (Devor ve Yarom, 2002).

MAO ve DAO, dengenin korunması ve postüral değişiklikler ile ilgili olan beyincik bölgelerine projekte olur (Barr ve Kiernan, 1988).

DB'nin rostral kısmı VLÇ ile birlikte vertikal kompensatuar göz hareketlerinin oluşmasından sorumludur (Leonard ve ark., 1988). DB'nin kaudal kısmı ise horizontal hareketlerden sorumludur (Rashed ve ark., 2007).

PO, özellikle hassaslık gerektiren istekli hareketlerin etkinliğini sağlayan beyincik bölümüne uzanır (Barr ve Kiernan, 1988). Motor hareketlerin ve öğrenmenin senkronizasyonu ve zamanlaması, egzersizle ilişkili öğrenme, hareketli uyarıların zaman aralığının ve hızının belirlenmesinde ve üç boyutlu ortamda kognitif işlemlerle ilgilidir (Weigel, 1999). Motor ve premotor korteksle ilişkili olivoserebellar devre, ipsilateral PO'da sonlanan nucleus ruber'in parvocellular parçası ile bağlantılıdır (Ulfig ve Chan, 2001). Bu yapılar ise dil öğreniminde, dil öğrenme devresini oluşturan kelime bulmada (kognitif fonksiyon) ve kelimeyi ifade etmede (motor) önemli rol oynarlar (Weigel, 1999).

## **MATERYAL VE METOT**

Sıçan NOİ'sinde stereolojik yaklaşımlarla gerçekleştirdiğimiz nöron sayımında parafin kesitler kullanıldı. Boya olarak miyelin ve Nissl boyalarının kombinasyonu tercih edildi. NOİ'nin bir bütün olarak ele alındığı uygulamamızda alt çekirdek ayrımı yapılmadı. Nöron sayımı için fiziksel fraksiyonlama (Gundersen, 1986) yöntemi kullanıldı. Disektör çiftlerinin karşılaştırılması işlemi, Anabilim Dalımızda geliştirilen eşzamanlı görüntüleme yaklaşımı (Ayas ve ark., 2008) ile gerçekleştirildi.

### **1. HAYVANLAR**

Çalışmamızda Üniversitemiz Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nden temin edilen 20 adet 30 günlük yetişkin Wistar cinsi albino sıçan kullanıldı. Eşit sayıda dişi ve erkekten oluşan bu hayvanların sekizi stereolojik kantitasyon öncesinde histolojik işlemlerin standardize edilmesi (özellikle de NOİ nöropilinin belirgin hale getirilmesi) ve örnekleme şeklinin belirlenmesi için gerçekleştirdiğimiz pilot çalışmalarımızda kullanıldı. Sayımın gerçekleştirildiği esas çalışmada ise, 12 adet sıçan yer aldı. Altışar adet erkek ve dişi sıçandan oluşan iki grup halindeki bu esas çalışma grubuna ait hayvanlar, gelişimleri boyunca Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nde kendi doğdukları kafesler içerisinde bırakıldı. Ancak perfüzyonun gerçekleştirileceği mevcut laboratuvar koşullarımıza alışabilmeleri ve herhangi bir strese maruz kalmalarını önlemek amacıyla işlem yapılmadan birkaç gün önce kendi laboratuvar ortamımıza alındı. Hayvanlara uygulanan işlemlerin tüm aşamaları OMÜ Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu yönergesine uygun etik kurallar doğrultusunda gerçekleştirildi.

### **2. PİLOT ÇALIŞMA**

Pilot çalışmamız iki aşamada gerçekleştirildi: NOİ sınırlarının ve örnekleme şeklinin belirlenmesi.

Obje sayımında belirlenmesi gereken en önemli kriterlerden birisi referans hacminin, yani sayım yapılan yapının sınırlarının her seviyede şüphe götürmez bir şekilde belirlenebilmesidir (Braendgaard ve Gundersen, 1986). Bu aşamadaki herhangi bir belirsizlik çalışmadan elde edilecek sonuçları tartışmalı hale getirecektir (Gahr,

1997; Smith ve ark., 1997; Howard ve Reed, 1998). Çalışmamızda kullandığımız ince parafin kesitlerindeki NOİ profillerinin sınırları rutin boyamaların modifiye edilmesi ile belirgin hale getirildi.

Obje sayımında göz önünde bulundurulması gereken bir diğer önemli konu, kullanılan yöntemin *tarafsız* olması yanında, *etkin* şekilde kullanımıdır. Aksi takdirde hesaplama yolu ile ulaşılan değerler tarafsız bir yöntemle elde edilmiş olsalar bile gerçek değerden çok uzakta olabilirler. Tarafsızlık sadece yapılan işlemde herhangi bir ön kabul ve yönlendirmenin olmadığı anlamına gelir. Etkinlik derecesi dikkate alınmadan elde edilen bu şekildeki veriler ancak ilgili örneklemin (birey, kesit, kesit alanı vb) artırılması ile giderek gerçek değere yaklaşabilir. Bu da örneklemin gereksiz yere büyük tutulmasını gerektirir (Gundersen, 1992, Howard ve Reed, 1998). Örnekleme şeklinin bir ön çalışma ile belirlenmesi uygulamanın hem ekonomik olmasını, hem de istenilen etkinlik düzeyinde gerçekleştirilmesine imkan verir. Bu nedenle asıl çalışmaya geçmeden önce NOİ'nin nasıl örneklenmesi gerektiğini belirlemek amacıyla bir pilot çalışma gerçekleştirildi. Bu amaç için ilgili literatürde (Gundersen ve Jensen, 1987; Gundersen ve ark, 1999; Howard ve Reed, 1998) önerilen yaklaşımlar kullanıldı.

Parafin bloklar haline getirilen beyin saplarından NOİ'nin tümünü kapsayacak şekilde 4 µm kalınlığında koronal seri kesitler alındı. Pilot çalışmada kullanılan hayvanlar ilgili amaç için ihtiyaç duyuldukça tek tek açıldı. Boyama prosedürünün belirlenmesi ve örnekleme stratejisi ile ilgili işlemlerin tamamlanmasından sonra beş hayvanda belirlenen örnekleme şekli ile ön sayım yapıldı.

## **2.1. NOİ Sınırlarının Belirlenmesi**

NOİ sınırlarının belirlenmesinde Azizi ve Woodward (1987) tarafından tanımlanan kriterler ve terminoloji kullanıldı. Beyin ve beyin sapı çekirdeklerinde gerçekleştirilen nöron sayımı çalışmalarında nöron gövdelerinin Nissl tekniği ile boyanması hem nöronları hem de ilgili çekirdeğin sınırlarını belirgin hale getirdiğinden, pilot çalışmamızda da öncelikle NOİ'yi tümüyle kapsayan bir preparat serisi sık kullanılan bir Nissl boyası olan cresyl violet acetate (Luna, 1968; Bancroft ve Stevens, 1996) ile boyandı. Ancak 4 µm kalınlığındaki bu parafin kesitlerinde NOİ sınırları her seviyede sağlıklı bir şekilde tespit edilemedi. Özellikle çekirdeğin orta seviyesinde



kalan kesitlerde NOİ nöronlarının diffüz bir dağılım gösterdiği, bunun da onları yakın çevrede yer alan diğer nöronlardan ayırt etmede güçlük oluşturduğu gözlemlendi. Bunun üzerine Nissl boyası, sinir lifleri için geliştirilen bir miyelin boyası ile birlikte kullanıldı. İkinci bir preparat serisi luxol fast blue ve cresyl violet acetate ile boyandı. Nöropilin de görünür hale geldiği bu ikili boyama ile NOİ sınırları oldukça belirgin şekle geldi. Ancak bu durumda da sayımı zorlaştıran bir başka problem kendini gösterdi. Nöronların arasında kalan ve mavi/koyu mavi renkte boyanan miyelinli lifler birçok yerde NOİ nöronlarını örttüğünden, nöronların her kesitte optimum şekilde tanımlanmasını engelledi. Bu sorun, boyama sırasında miyelin boyasının % 70'lik alkolde dereceli ve kontrollü diferansiyasyonu ile giderildi. Sonuçta nöronların yanı sıra, NOİ sınırları da her seviyede rahatlıkla belirlenebilen preparatlar elde edildi (Şekil 23).

## 2.2. Örnekleme Stratejisi

Örnekleme; hayvanlar, kesitler, kesit alanları ve sayılacak nöron sayısı seviyelerinde gerçekleştirildi. Bu konuda yapılan çalışmalar bu işlemin altın kuralının toplam varyansı en çok etkileyen faktörün üzerinde en çok durulması gerektiğini göstermektedir (Gundersen ve Østerby, 1981; Gupta ve ark., 1983; Kroustrup ve Gundersen, 1983; West ve ark., 1991; West, 1993 ve 1994; Howard ve Reed, 1998). Buna göre deneysel bir çalışmada ilgili bir grupta hesapla bulunan ortalama değer (sayı, hacim, yüzey alanı gibi) gösterdiği varyans (istatistiksel terminolojide *grupta gözlenen nisbi varyans* olarak isimlendirilir ve varyasyon katsayısının karesi ile ifade edilir); grupta beklenen (yani zaten var olan ve değişmeyen *biyolojik varyasyon*) ile yapılan örnekleme ve hesaplamalardan sonra elde edilen değer varyanslarının toplamıdır. Aynı çalışmalar mikroskopik örneklemenin hiyerarşik bir yapılanmaya sahip olduğunu ve bu yapılanmanın en üst seviyesinde de bireylerin yer aldığını göstermiştir. İkinci sırada da üzerinde çalışılan örnek doku yer almaktadır. Bunların toplam varyansı etkileme dereceleri ise sırasıyla % 70 ve % 20 olarak verilmiştir. Yani grupta gözlenen nisbi varyansı en çok etkileyen faktör biyolojik varyasyondur. Varyansın geri kalan % 10'luk kısmını kesitler arası, alanlar arası ve ölçümler arası farklılıkların toplamının bir ürünü olan *bireyde gözlenen nisbi varyans* (hata katsayısının karesi ile ifade edilir) oluşturmaktadır. Çalışma bölgemiz olan sıçan beyin sapları doğrudan kesit alınabilecek tek bir blok haline getirilebildikleri için; çalışmamızdaki örneklemeyle ait hiyerarşik yapılanmanın ikinci seviyesinde beyin sapından alınan kesitler yer almaktadır. Yani

çalışmamızda hesaplama sonucunda elde edilecek değere ait toplam varyansı en çok etkileyen iki parametre hayvan ve kesit sayılarıdır.

Gerek hayvan çalışmaları için istatistiksel açıdan önerilen en az denek sayısının (Cruz-Orive ve Weibel, 1990), gerekse sıçanlarda yapılan stereolojik çalışmaların çoğunda yeterli görülen hayvan sayısının beş olmasından dolayı çalışmamızda başlangıç adımı için sıçan sayısı beş olarak alındı.

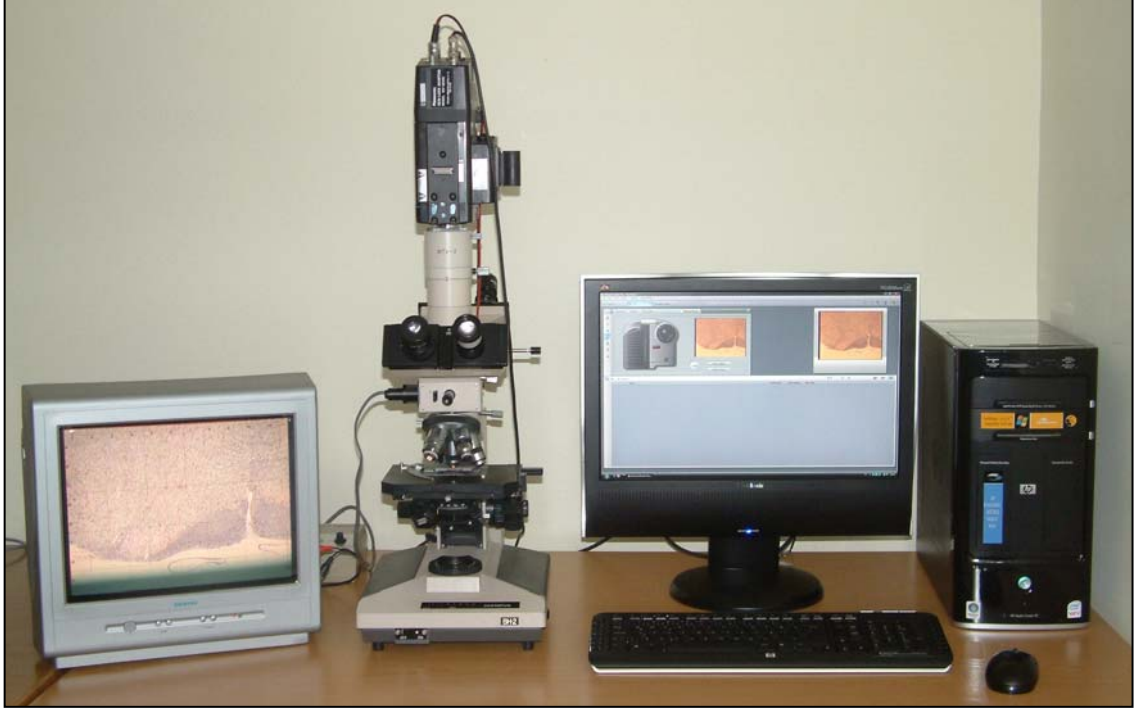
Kesit sayısı seviyesindeki örnekleme için öncelikle kullanacağımız sayım metodu olan fiziksel fraksiyonlama ve gerekleri göz önünde bulunduruldu. Bu metot ile olan sayımda kullanacağımız disektör sayım kuralı gereği (Sterio, 1984) disektör çiftleri arasındaki mesafenin, sayımı söz konusu olan objelerin kesit alım yönündeki yüksekliklerinin yarısından fazla olmamalıdır. Çalışmamızda disektör olarak kullanmayı planladığımız kesit çiftleri ardışık kesitlerden oluşacağından, 'disektör çiftleri arasındaki mesafe' kesit kalınlığına karşılık gelecektir. Her ne kadar çalışmamız toplam nöron sayısının hesaplanmasına yönelik ise de, sayımda nöron gövdeleri yerine (her nöronun sadece bir çekirdek içereceği kabul edilerek) nöron çekirdekleri esas alındı. Çünkü nöron gövdelerini kesitlerde verdikleri profillerden yararlanarak tanımlamak çoğu zaman değişken sonuçlar vermektedir. Nöron gövdesine göre çok daha belirgin sınırlar gösteren nöron çekirdekleri daha sağlıklı bir seçenek oluşturmaktadır. Preparatlarımızda yaptığımız ölçümlerde nöron sayımında esas aldığımız NOİ nöron çekirdeklerinin en küçüklerinin ~10-12 µm kadar bir çapa sahip oldukları tespit edildi. Buna göre kullanacağımız kesit kalınlığı 5-6 µm'den daha fazla olamaz. Gömme ortamı olarak kullandığımız Paraplast® ile seri şekilde rahatlıkla alınabilen kesit kalınlığı 4 µm'ye kadar inebildiğinden, kesit kalınlığı olarak daha ihtiyatlı bir değer olan bu kalınlık kullanıldı. Bu şekilde, NOİ'de eğer varsa çapları 8 µm kadar küçük olabilecek nöron çekirdeklerinin de sayım kapsamına alınmış olunması amaçlandı.

Bundan sonraki adım, bu kalınlıktaki kesitler ile NOİ'nin nasıl örnekleneceğidir. Stereolojik çalışmaların etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda işlemin bu aşaması detaylı şekilde araştırılmış ve örneklenmiştir (Gundersen ve Jensen, 1987; Gundersen ve ark., 1999). Buna göre; ilgilenilen bir objeye ait hata katsayısının ~ 0,05 civarında olabilmesi için, ilgili objelerin yer aldığı yapıdan sistematik rasgele örnekleme ile yaklaşık 10 kesitin alınması (bu sayı kompleks şekilli olmayan birçok yapı için

5-6'ya kadar düşebilmektedir) ve bunlarda yine sistematik rasgele örnekleme ile 100-150 objenin sayılması yeterli olacaktır. Sıçan NOİ'sinden histolojik kesitlerin alındığı çalışmaları (Bourrat ve Sotelo, 1984; Delhaye-Bouchaud ve ark., 1985; Azizi ve Woodward, 1987) incelediğimizde koronal kesitlerde NOİ'nin rostro-kaudal uzunluğunun ~ 2400-2800 µm arasında değişen değerlerde olduğunu gözlemledik. Bu verilere göre, belirlediğimiz kesit kalınlığı (4 µm) ile bu ekseninde yaklaşık 10 kesit elde edebilmek için her 60. – 70. kesit çiftinin alınmasının yeterli olduğu görülmektedir (2400 µm / 4 µm = 600 adet NOİ profili içeren kesit; 600 / 10 = 60). Bir başlangıç adımı oluşturan bu aralıklarla, çalışmamızda kullandığımız blokları (30 günlük sıçanlara ait beyin saplarının parafin blokları) örneklediğimizde NOİ'yi içeren ortalama 7 – 8 kesit elde edildi. Bu adet genel olarak yeterli görülmeyle birlikte yine ihtiyatlı bir değer olan 10 adedine ulaşabilmek için kesit örnekleme aralığımızı 40'a düşürdük. Bu aralıkla yaptığımız örnekleme ile NOİ'yi içeren ortalama 10 – 12 adet kesit elde edildi. Bu şekilde birinci fraksiyon değerimiz ( $f_1 = köf = \text{kesit örnekleme fraksiyonu}$ ) belirlenmiş olundu. Yani,  $köf = f_1 = 1/40$ .

Bu aşamadan sonra, her bir NOİ'de örneklenen kesitlerde sistematik rasgele örnekleme ile yaklaşık 100-150 adet nöron çekirdeğinin sayılabilmesi için kesit alanlarının hangi adımlarla örnekleneceği ve bu adımlarda kullanılacak tarafsız sayım çerçevesinin (Gundersen, 1977 ve 1986) hangi ebatlarda olması gerektiği belirlendi. İşlemin bu aşamasında Pakkenberg ve Gundersen'in (1988) çalışmalarında kullandıkları örnekleme yaklaşımından yararlandı. Buna göre nöronlar sistematik rasgele örnekleme ile belirlenmiş ~50 kadar adımda fiziksel disektörler ile sayılır. Yaklaşık 100-150 nöronun sayılması yeterli görüldüğünden (Gundersen ve ark, 1999) bu örneklenmiş alanlardaki sayım çerçevesinin büyüklüğü de ona göre ayarlanır. Kesit alanlarının örneklenmesi ve nöronların sayımıyla ilgili bu aşama bilgisayar ortamında gerçekleştirildi. Bu amaç için kullandığımız düzenek Şekil 16'da gösterilmiştir. İlgili düzenek, kamera (Panasonic F10 CCD) ilaveli bir mikroskop (Olympus BH-2), bir monitör ve örneklenen sayım alanlarının kaydedildiği yakalama kartı (Pinnacle, Studio Movie Box Plus 710) olan bir bilgisayardan (Pentium Core2 Duo) oluşmaktadır.

Her hayvanda örneklenen ortalama 10 – 12 adet kesitte ~50 kadar alan örnekleme için öncelikle bunlardaki toplam NOİ alanı hesaplandı. Bu amaçla bir hayvanda örneklenen kesit çiftlerinden birindeki NOİ profilleri mikroskobun 4x



**Şekil 16.** Kesit alanlarının örneklendiği ve sonrasında sayım alanlarının kaydedilip sayıldığı mikroskop ve bilgisayar düzeneği. Her kesit çiftinden birindeki tek taraflı NOİ profili sırayla önce küçük büyütmede monitörde görüntülendi. Bu aşamada örneklenen referans alanları daha sonra büyük büyütmede görüntülendi ve kaydedildi. Bu alanın diğer kesit çiftindeki eşdeğeri olan gözlem alanı da bulunarak kaydedildikten sonra bilgisayarda eşzamanlı görüntülenerek değerlendirildi.

objektifi (kamera oküleri 3.2) kullanılarak sırayla monitörde görüntülendi ve nokta sayımı (Gundersen ve ark., 1988a) ile bunlardaki toplam NOİ alanı hesaplandı. Bunun için monitör üzerine yerleştirilen bir asetat nokta sondasından yararlanıldı. NOİ profilleri üzerine rasgelen toplam nokta sayısı, her noktanın doku seviyesinde temsil ettiği alan ( $41800 \mu\text{m}^2$ ) ile çarpıldı ve bir hayvanda örneklenen kesitlerin bir tarafındaki NOİ profillerinin yaklaşık toplam alanı hesaplandı. Bu alan, yaklaşık 50-60 kadar sayım alanı elde edebilmek için bu değerlerin ortalamasına bölündü ( $3011580 \mu\text{m}^2 / 55 = 54756 \mu\text{m}^2$ ). Elde edilen bu değer yaklaşık  $230 \times 230 \mu\text{m}^2$ 'lik bir adım şeklinde ifade edilebilir. Yani NOİ alanı bu adımlarla taranacak olunursa yaklaşık 50-60 adımda tüm alan tamamlanır.

Kesit alanlarının bu adımlarla örneklenmesinde Korkmaz ve arkadaşlarının (2000), örneklenen alanlardaki eşdeğer sayım bölgelerinin bulunup eşzamanlı karşılaştırılmasında ise Ayas ve arkadaşlarının (2008) geliştirdiği yaklaşım kullanıldı. Buna göre sayım yapılacak alanlar öncelikle ilgili referans bölgesinin (bizim çalışmamızda NOİ) tümüyle görüntülenebildiği bir küçük büyütmede belirlenir.

Sonrasında da büyük büyütmede sırayla görüntülenerek değerlendirmek üzere kaydedilir. Bu amaca yönelik olarak da aşağıdaki adımlar takip edildi.

Preparatlarımızdaki NOİ profillerinin monitörde tek parça halinde görüntülenebildiği büyütme mikroskobun 4x objektif ile elde edildiğinden, örnekleme için bu objektif kullanıldı. Bu büyütmede, belirlediğimiz adım alanımızın kullanacağımız örnekleme asetadı üzerindeki gerçek ebatları hesaplandı. Bu kalibrasyon işlemi 0,01 mm aralıklı birimlerden oluşan bir tabla mikrometresiyle gerçekleştirildi. Sonuçta, doku seviyesinde  $230 \times 230 \mu\text{m}^2$  olması gereken adım alanının kullanacağımız örnekleme asetadındaki gerçek değerinin  $2,53 \times 2,53 \text{ cm}^2$ 'ye karşılık geldiği bulundu. Daha sonra sayımın gerçekleştirileceği büyütme ve sayım çerçevesinin büyüklüğü belirlendi. NOİ nöronlarının rahatlıkla tanımlanabildiği görüntülerin mikroskobumuzun 60x immersiyon objektifi ile oluşturulduğu gözlemlendi. Oluşan bu görüntüde yaptığımız değerlendirmeler, tarafsız sayım çerçevesi ile birkaç nöron sayabilmek için bir başlangıç değeri olarak  $60 \times 60 \mu\text{m}^2$  ebatlarındaki bir çerçevenin yeterli olabileceği öngörüldü. Bu alanlar küçük büyütmede belirleneceği için; uygulama öncesindeki son aşamada, bunların küçük büyütmede kullanılacak asetattaki gerçek değeri hesaplandı ( $0,66 \times 0,66 \text{ cm}^2$ ). Büyük büyütmede sayımın yapılacağı disektör alanlarını temsil eden bu küçük kareler, örnekleme asetadındaki adım alanların sağ üst köşesine yerleştirildi (Şekil 17). Sayımlar her adımın sadece küçük çerçeve kadar olan bir alanında gerçekleştirildiği için, her ikisinin oranı 2. fraksiyon ( $f_2 = a\text{öf} = \text{alan örnekleme fraksiyonu}$ ) değerimizi oluşturacaktır. Yani,  $a\text{öf} = f_2 = 60 \times 60 / 230 \times 230$ .

Bu şekilde uygulama için gereken tüm adımlar belirlenmiş oldu. Esas sayıma geçmeden önce, belirlediğimiz bu örnekleme değerlerinin uygunluğu beş hayvanın tek taraflı NOİ'sinde bir ön sayım ile test edildi. Detayları 'Stereolojik Uygulama' başlıklı bölümde verilen uygulama basamakları ile gerçekleştirilen bu ön sayımda sayılan ortalama nöron sayısı yaklaşık 75 – 80, bunlara ait hata katsayısı da 0.11 olarak bulundu. Bulduğumuz değer sayım için önerilen 100 – 150 hücre sınırının altında olduğu için, sayılacak nöron sayısını artıracak şekilde örneklemede küçük bir değişikliğe gidildi. Bu amaç için sayım çerçevesi ebatlarının artırılmasının yeterli olacağı öngörüldü ( $60 \times 60 \mu\text{m}^2$ 'lik çerçeve yerine ebatları  $70 \times 100 \mu\text{m}^2$  olan bir sayım çerçevesi). Sayılan toplam nöron sayısının ortalama 125'e çıktığı bu değişiklik sonucunda hata katsayısının da yaklaşık 0,089'a gerilediği gözlemlendi. Bu durumda ikinci fraksiyonumuz  $f_2 = 70 \times 100 / 230 \times 230$  şeklinde değişmiş oldu.



### 3. HİSTOLOJİK İŞLEMLER

Hayvanlar tamponlanmış gluteraldehit ile perfüzyona tabi tutularak tespit edildi. Rutin parafin doku takibine tabi tutulan beyin saplarından 4 µm kalınlığında kesitler alınarak Luxol fast blue ve Cresyl violet acetate ile boyandı.

#### 3.1. Gluteraldehit çözeltisinin hazırlanması

100 cc'lik gluteraldehit çözeltisi hazırlamak için;

A solüsyonu

84 cc Millonig fosfat tamponu

B solüsyonu

16 cc % 25'lik gluteraldehit çözeltisi

A ve B solüsyonları karıştırılarak 100 cc'lik % 4'lük gluteraldehit çözeltisi hazırlandı. Kristal oluşumunu engellemek için çözelti + 4 °C'de renkli bir cam şişede muhafaza edildi (Kaya, 1984; Bancroft ve Stevens, 1996).

#### 3.2. Tespit

Hayvanlar ketalar enjeksiyonu ile sağlanan anestezi sonrasında tartıldı. Derin anestezi altına alınan sıçanlar (ekstremiter refleksi ile kontrol edildi) sırtüstü bir ızgara üzerine sabitlendi. Diyaframın altından sağa ve sola doğru göğüs kafesi açıldı. Kalbin sol ventrikülüne bir kanül batırılıp pıhtılaşmanın engellenmesi için 0,5 cc heparin verildi. Heparin enjeksiyonunu takiben damarlardaki mevcut kanın boşalması için daha rahat geçebilmesi için dolaşıma ~ 35 °C'ye kadar ısıtılmış % 0,9'lük serum fizyolojik verildi. Bu sırada sağ atrium kesildi ve damarlardaki kanın boşalması sağlandı. Kalpten çıkan kan berraklaşınca, serum fizyolojik yerine ~ 35 °C'ye kadar ısıtılmış ~ 200 cc tespit solüsyonu verildi. Perfüzyon işlemi takiben her sıçanın beyini kafatasından çıkarıldı ve beyincikle beraber tartıldı. Beyinler beyincikle beraber iki hafta boyunca + 4 °C'de aynı solüsyonda bekletildi. Bu arada tespit solüsyonu birkaç kez değiştirildi. Sonrasında, koronal bir kesi ile beyinden uzaklaştırılan beyincik ve beyin sapları histolojik takip işlemine alındı.

### 3.3. Doku Takibi

Tespit solüsyonundan çıkarılan beyin sapları bir gün süresince akar suda yıkandı. Yıkama işleminin ardından Tablo 2’de gösterilen rutin doku takibi işlemlerine geçildi. Takip işlemlerinden sonra spesmenlerin Paraplast® blokları hazırlandı.

**Tablo 2.** Beyin saplarının takibinde kullanılan kimyasallar ve süreleri

<b>KİMYASAL MADDELER</b>	<b>SÜRELERİ</b>
Alkol % 70	1 saat + 1 saat
Alkol % 80	1 saat + 1 saat
Alkol % 90	1 saat + 1 saat
Alkol % 96	1,5 saat + 1,5 saat
Alkol % 99,5	1,5 saat + 1,5 saat
Kloroform	4 saat + 4 saat + 4 saat
Kloroform-Paraplast	1 saat + 1 saat
Paraplast ( Vakumlu etüv ~ 400 – 500 mbar)	1 saat + 1 saat + 1 saat + 1 saat

Dokuda kalmış olabilecek kloroform, eser miktardaki su ve hava kabarcığını daha iyi uzaklaştırmak ve bu sayede daha etkili bir parafin infiltrasyonu sağlamak için vakumlu etüv ile infiltrasyon sırasında dokulara yaklaşık 400 – 500 mbar’lık bir vakum uygulanmıştır.

### 3.4. Kesit Alma

Rotary mikrotom (Thermo Shandon) ile bloklardaki beyin sapları koronal düzlemde rostralden kaudale doğru fiziksel disektör kuralına uygun olacak şekilde 4 µm kalınlıkta kesilerek örneklendi. Her blok için kesitlerin örneklenmesine henüz NOİ belirmeden başlandı ve tükeninceye kadar devam edildi. Yaklaşık 45 °C’lik sıcak su



bulunan havuza alınan kesitler tamamen açılana kadar bekletildi. Mayer'in albümin solüsyonu (Luna, 1968) sürülmüş lamlara alınan kesitler, daha sonra 1 – 2 saat süreyle 60 °C'lik etüvde bekletilerek kesitlerin lamlara yapışmaları sağlandı.

### **3.5. Boyama**

Etüvden çıkarılan kesitler ksilen ile deparafinize edildi ve % 95'lik alkole kadar getirilerek Klüver–Barrera metodu (Luna, 1968) ile miyelin ve Nissl cisimciği boyamaları yapıldı.

#### **3.5.1 Boya solüsyonlarının hazırlanması**

Luxol fast blue solüsyonu: 0,1 gr Luxol fast blue + 100 cc % 95'lik alkol

Boya alkolde çözüldü ve % 10'luk 0,5 cc glacial asetik asit eklendi. Her kullanımdan önce boya filtre edildi.

Cresyl violet acetate solüsyonu: 0,1 gr Cresyl violet acetate + 100 cc distile su

Boya suda çözüldükten sonra kullanımdan hemen önce % 10'luk 15 damla glacial asetik asit eklendi.

Lityum karbonat solüsyonu: 0,05 gr Lityum karbonat + 100 cc distile su

#### **3.5.2 Boyama prosedürü**

Kesitlerin boyanmasında, çalışmamızın amacına yönelik olarak pilot çalışmada belirlediğimiz süreler kullanıldı. Bu şekliyle, yararlandığımız kaynaktaki (Luna, 1968) Klüver–Barrera metodunun orjinal prosedürü hafifçe modifiye edildi. Miyelin boyasının hem boyama süresi kısaltıldı (gece boyu yerine 2 saat), hem de diferansiyasyon basamağındaki süreler boyama aşamasındaki nöropil görüntüsünün istenen düzeyde olup olmamasına göre kontrol edilerek belirlendi. İzlenen basamaklar şu şekildedir:

Deparafinize edilen ve % 95'lik alkole kadar getirilen kesitler;

1. 56 – 60 °C'lik etüvde bekletilen luxol fast blue solüsyonunda 2 saat boyandı.
2. Boya sonrasında % 95'lik alkolde çalkalanarak üzerlerindeki boyanın fazlalığı giderildi.
3. Distile suda çalkalandı.

4. Lityum karbonat solüsyonuna hızla daldırıp çıkarılarak diferansiye edildi. Bu aşama kesitlerin mikroskopta incelenerek NOİ nöropilinin görüntüsü kontrol edilerek gerçekleştirildi. Gri ve ak madde ayırt edilene kadar % 70'lik alkolde diferansiyasyona devam edildi. Ancak NOİ nöropilinde koyu renkli lif görüntülerinin kalmamasına özen gösterildi. Bu şekilde hem NOİ sınırlarının belirgin hale getirilmesi, hem de ikinci aşamada Nissl boyası ile boyanacak olan nöronların gölgelenmemesi sağlandı. Bu sonucun sağlanması için diferansiyasyon işlemi ihtiyaca göre birkaç kez tekrarlandı.
5. Distile suda yıkandı.
6. 56 – 60 °C'lik etüvde bekletilen cresyl violet asetate ile 6 dakika süre ile boyandı.
7. % 95'lik alkolden 3 defa seri şekilde geçirildi. Ancak bu aşamadaki nöron boyası diferansiyasyonu da yine mikroskop gözlemi ile kontrol edildi. İlk (veya ilk iki) diferansiyasyon yeterli görüldüyse diğerlerine geçilmedi.
8. Absolü alkolde iki kez 15'er dakika dehidrate edildi.
9. Ksilende iki kez 5'er dakika, bir kez 1saat süreyle tutuldu.
10. Entellan® (Merck) ile kapatıldı.

#### **4. REFERANS HACMİNİN VE NOİ NÖRONLARININ TANIMLANMASI**

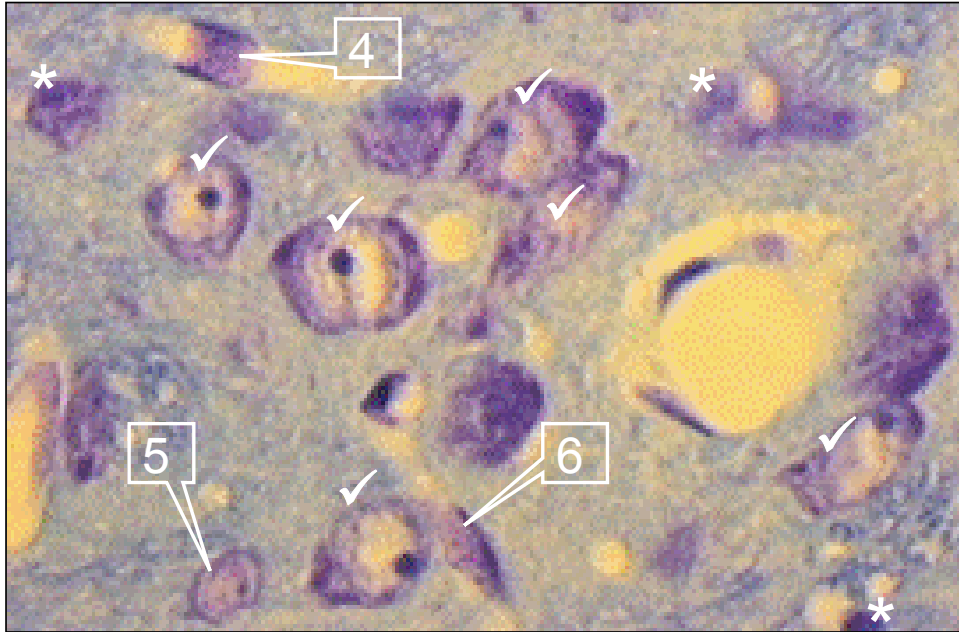
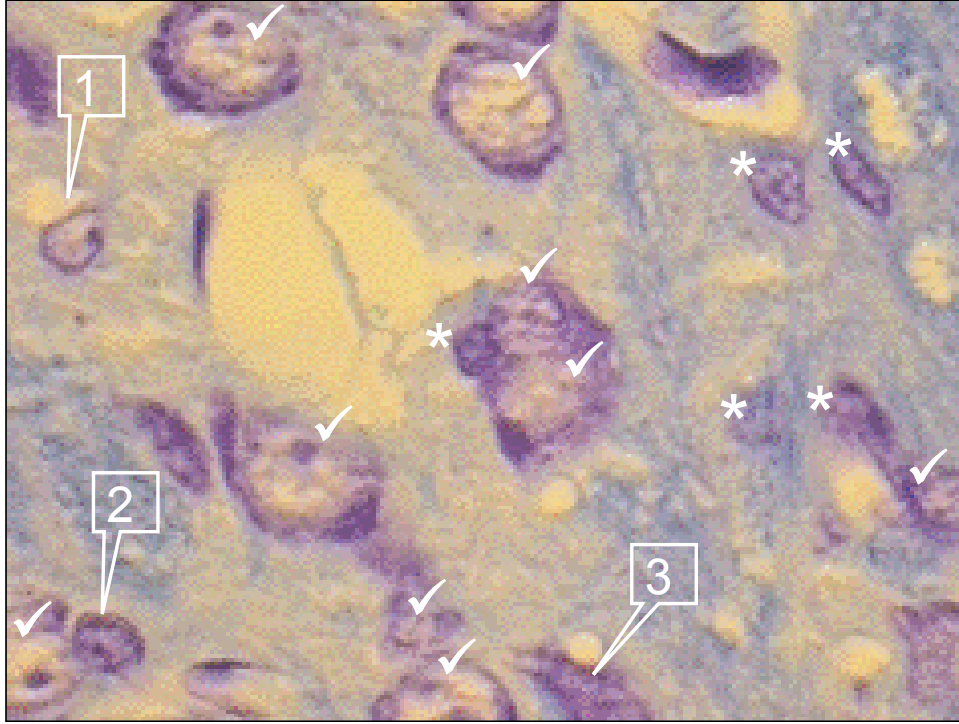
Stereolojik sayım çalışmalarının en önemli gereklerinden olan referans hacminin tanımlanması (Braendgaard ve Gundersen, 1986; Gundersen, 1992; Howard ve Reed, 1998) çalışmamızın en önemli basamaklarından birini oluşturmaktadır. NOİ ile ilgili ontolojik çalışmalarda bu nukleusun beyin sapında yerleşik olanlar içerisinde sınırları en belirgin olanı olduğu şeklindeki tanımlamalar genel olarak doğru olmakla birlikte stereolojik çalışmalar için tam anlamıyla yeterli değildir. Çünkü bu tür çalışmalar bu sınırların sadece seçilen kesitlerde değil, sistematik ve rasgele olarak örneklenmiş tüm kesitlerde kesin bir şekilde tanımlanmasını gerektirir. Rutin boyaları kullandığımızda bu durumun kullandığımız ince (4 µm) kesitlerdeki her seviyede (özellikle rostro-kaudal eksenin ortalarına rastgelen kesitlerde) gerçekleşmediğini veya

çelişkilere yol açtığını gözlemledik. Ancak pilot çalışmamız sonucunda geliştirdiğimiz değişikliklerle bu gerek de sağlanmış oldu (Şekil 24a ve b). Bununla birlikte bu durum NOİ'nin ana sınırları için geçerli olup, akson izleme teknikleri ile belirlenen (Azizi ve Woodward, 1987) NOİ alt nukleusları (bkz. Tablo 1 ve Şekil 3) için geçerli değildir. Bu nedenle çalışmamızda NOİ tek bir yapı halinde değerlendirildi.

Nöron sayımında NOİ nöropili içerisinde kalan tüm nöronlar sayıldı. Herhangi bir nöron tipi ayırımı yapılmadı. Çekirdekler nöron somalarına göre çok daha rahat tanımlanabildiğinden nöron sayımında nöron çekirdekleri esas alındı. Her ne kadar nöronlar karakteristik bir çekirdek yapısı sergilese de, her çekirdek profilinde tanımlama yapmak ve onları glialardan ayırt etmek her zaman standart bir durum oluşturmamaktadır. Bu durum özellikle de büyüklükleri glialardan çok az bir fazlalık gösteren ve rutin histolojik preparasyonlarda glialar ile oldukça benzer özellikler sergileyen küçük çaplı nöronlar için geçerlidir. Bu tanımlama problemini en aza indirmek için sayımda çözünürlük gücü oldukça yüksek olan 1.4 sayısal açıklıklı SPlan Apokromatik 60x büyütme sağlayan bir objektif kullanıldı. Ayrıca, değişken olmayan bir sayım gerçekleştirmek amacıyla nöron çekirdeklerinin tanımlanması ve glia hücrelerinden ayırt edilmesinde aşağıdaki kriterler esas alındı (Braendgaard ve ark., 1990; Bjung ve Gundersen, 1993). Bu kriterlerden hiçbirine sahip olmayan profiller nöron çekirdeği olarak değerlendirilmedi.

- Çekirdek büyüklüğü ve kromatin dağılımı: Nöronların çekirdekleri genellikle glialarınkinden daha büyüktür ve ökromatik bir çekirdeğe sahiptirler.
- Sitoplazmik görüntü: Sitoplazmasında Nissl cisimciği içerenler ve çekirdek etrafında boyanmış belirgin bir sitoplazması olanlar nöron olarak değerlendirildi.
- Çekirdekçik: Sitoplazması seçilemeyen ancak belirgin bir çekirdekçiğe sahip hücreler yine nöron olarak değerlendirildi.

Bu kriterlerin kullanımı, Şekil 18'de NOİ'ye ait farklı kesitlerdeki profillerde örneklendi.



**Şekil 18.** Nöron sayımında esas alınan tanımlama kriterlerinin kullanımına ait örnekler. Sayımda nöron çekirdekleri esas alındığı için sadece çekirdek profillerine bakıldı. Soma özelliklerine sadece ilgili çekirdeğin nörona ait olup olmadığına karar vermek için bakıldı. Mikrograflarda rahatlıkla nöron olarak tanımlanan profiller ‘✓’ , glia olarak tanımlananlar ise ‘\*’ işareti ile gösterilmiştir. ‘1’ numara ile gösterilen profil küçük olmakla birlikte ökromatik çekirdek yapısı, çekirdekcik ve ince bir sitoplazmik halkası içerdiği için; ‘2’ numaralı çekirdek profili koyu görünmekle birlikte diğer kriterlerin hepsini sağladığından; ‘3’ ile gösterilen profil çok büyük olması ve belirgin bir sitoplazma ile çevrelenmiş olmasından dolayı; ‘5’ numaralı profil ise küçük olmak ve belirgin bir sitoplazmik halka göstermemekle birlikte, belirgin bir çekirdekcik sergilediği için nöron olarak değerlendirildi. ‘4’ ve ‘6’ numaralı profilleri damar endoteline ait olarak değerlendirildi.

## 5. STEREOLOJİK UYGULAMA

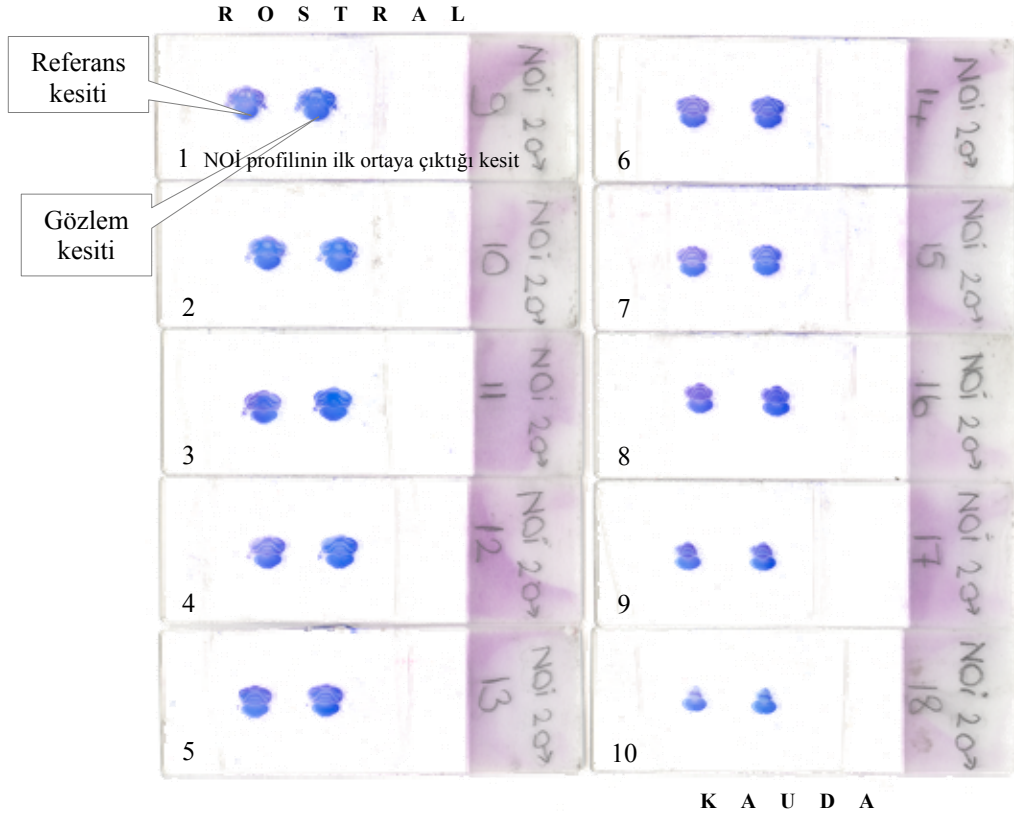
Nöron sayımında kullandığımız fiziksel fraksiyonlama metodu (Gundersen, 1986), stereolojik sayım metotları içerisinde altın standart olarak kabul edilir (Dorph-Petersen ve ark., 2001) ve fraksiyonlama (Gundersen, 1986) ile fiziksel disektörün (Sterio, 1984) kombinasyonundan oluşur. Buna göre, ilgilenilen yapının belirli bir kısmında (stereolojik literatürde *fraksiyonunda*) fiziksel disektör sayım kuralına göre nöronlar sayılır. Sayılan bu nöronlar daha sonra ilgili yapının ne kadarlık bir kısmında sayıldıysa o değerin (yani fraksiyonun) tersi ile çarpılarak o yapıdaki toplam nöron sayısı elde edilir. Bu başlık altında, pilot çalışmamızda belirlediğimiz örnekleme değerlerini kullanarak gerçekleştirdiğimiz nöron sayımı uygulamasının pratik detayları tanımlanacaktır.

### 5.1. Kesitlerin Örnekleme

Birinci fraksiyonumuz ( $f_1$ ) olan kesit örnekleme fraksiyonumuz 1/40 olarak belirlendiği için kesit alımı sırasında sistematik olarak her kırkıncı kesit çifti örneklendi. Kesit çiftlerini eşzamanlı görüntülemek için kullandığımız yaklaşımın (Ayas ve ark., 2008) gereği olarak bu kesit çiftleri aynı lam üzerine alındı. Bu sırada kesit çiftlerinin lam üzerinde aynı hiza ve açı ile yer almalarına özen gösterildi. Örnekleme işleminin stereolojik örnekleme kurallarına (Gundersen, ve Jensen, 1987) uygun olması için ise, sistematik örnekleme işlemine 1 – 40 arasında rasgele belirlenen bir sayıdan ve henüz bloktaki NOİ belirmeden başlandı. NOİ tükeninceye kadar devam eden bu işlem sonunda elde edilen kesitler boyandı. NOİ'yi içermeyenler ayırt edildi (Şekil 19).

### 5.2. Kesitlerde Sayım Alanlarının Örnekleme

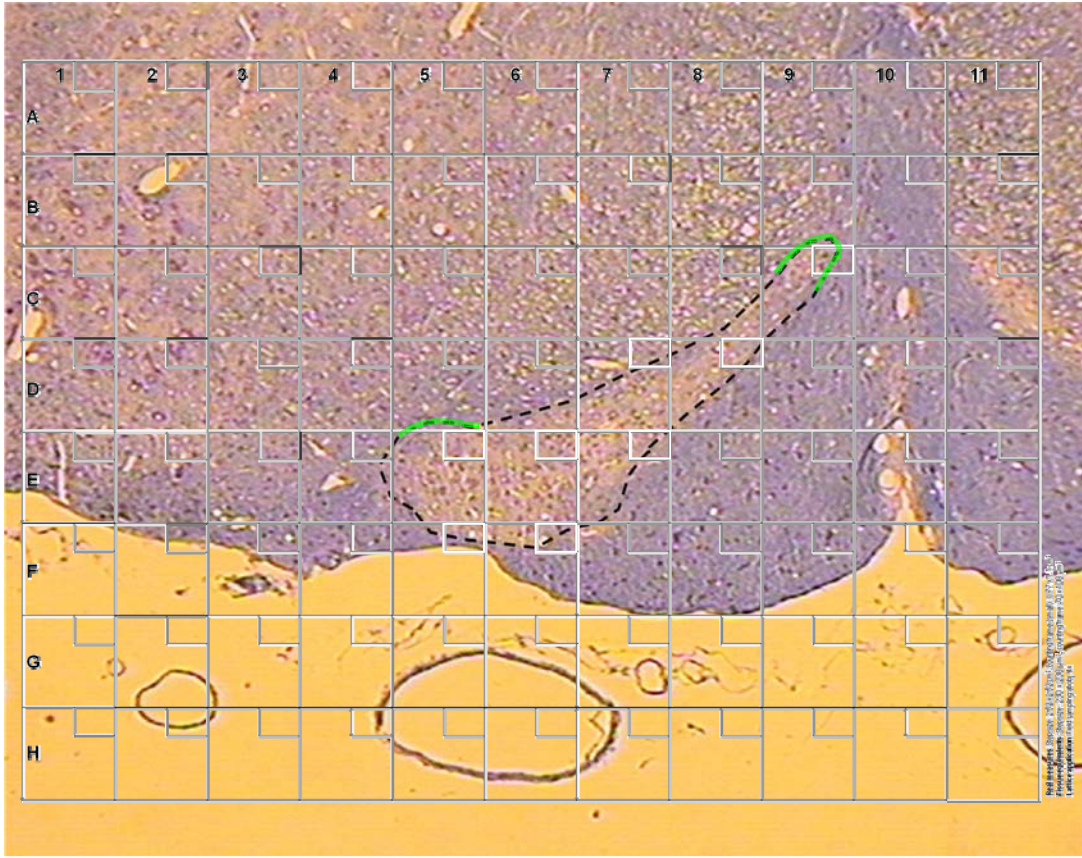
Kesitlerin örnekleme sonrasında tüm işlemler Şekil 16'da gösterilen bilgisayar donanımlı mikroskop düzeneğinde gerçekleştirildi. Bu şekilde örneklemediğimiz kesitlerdeki NOİ profillerinin ne kadarlık bir kısmında nöron sayımı yapmamız gerektiği ile ilgili çalışmalarımız, her  $230 \times 230 \mu\text{m}^2$ 'lik NOİ alanının  $70 \times 100 \mu\text{m}^2$ 'lik kısmında yapılacak bir sayımın yeterli olabileceğini gösterdiğinden; öncelikle, örnekleme gerçekleştirileceği monitör üzerinde kullanılacak bu ebatların eşdeğerindeki koordinatlı bir örnekleme aasetatı hazırlandı (Şekil 17B). Sonrasında sayım alanlarının örnekleme alanına geçildi.



**Şekil 19.** Erkek sıçanlardan birinde sistematik (40 µm'lik aralıklarla) rasgele örnekleme ile alınmış kesit çiftlerinden NOİ'yi içerenler (rostralden kaudale doğru). Kullandığımız görüntüleme yaklaşımının gereği olarak kesit çiftleri (referans – gözlem kesitleri) aynı lam üzerine alındı. Bu sırada çiftlerin aynı oryantasyonda tutulmalarına özen gösterildi. Sayım sırasında çiftlere atfedilen isimler değiştirilerek de kullanıldı (gözlem–referans kesitleri şeklinde). Buradaki örnekte NOİ'yi içeren 10 adet kesit (1 – 10) elde edilmiştir. Örneklemeye henüz NOİ başlamadan rasgele belirlenmiş bir seviyeden başlandığı için kesit alımı sırasında örneklenen kesitlerden ilkinde (veya ilk sırada yer alanlarda) NOİ yer almayacaktır. Ancak boyama sonrasında belirlenebilecek bu durum sonrasında NOİ'yi içermeyenler ayırt edildi. Örneğin buradaki örnekte ilk NOİ profili, preparat numarası 9 olarak verilmiş kesitte (sıra numarası 1 olan kesit) gözlenmeye başlamıştır.

Alanların örneklenmesinde Korkmaz ve arkadaşlarının (2000) geliştirdiği yaklaşım kullanıldı. Bunun için, hazırladığımız örnekleme asetatı monitör üzerine yerleştirildikten sonra, kesit çiftlerinden (referans ve gözlem kesitleri) oluşan praperat serilerinden birindeki tek taraflı NOİ profili öncelikle küçük büyütmede (obj. 4x) tek parça halinde görüntüledi (Şekil 20). Bu şekilde asetat ile NOİ profilinin rasgele örtüşmesi sağlandı. NOİ profilinin bu büyütmedeki konumuna ait yardımcı koordinat bilgileri ve NOİ üzerine rasgelen küçük çerçeveler not edildi. Uygulamada kolaylık sağladığı için, NOİ profilinin konumuna ait belli başlı yapılar (nukleus kenarı, belirgin damar gibi) asetat kalemleri ile ayrıca doğrudan asetat üzerinde de işaretlendi. Daha sonra NOİ üzerine rasgelen alanlar sırayla büyük büyütmede (obj. 60x immersion) görüntüledi. Bu alan JPEG resim formatında kaydedildikten sonra, komşu kesitteki (gözlem kesitindeki) eşdeğer alan da bulundu ve kaydedildi. Bir alandaki bu işlem

tamamlandıktan sonra küçük büyütmeye geçildi. NOİ konumuna ait notlardan yararlanarak preparat eski konumuna getirildi ve bir sonraki örneklenen alan için yukarıda tariflenen işlemler tekrarlandı. Bir preparatta örneklenen alanlar bu şekilde belirlenip büyük büyütmede kaydedildikten sonra, aynı işlemler sırayla örneklenen diğer preparatlarda da gerçekleştirildi. Bu şekilde bir hayvanın bir tarafındaki NOİ alanları örneklenip, sayım yapılabilecek bir büyütmede resim şeklinde elde edilmiş olundu.



**Şekil 20.** Alanların örneklenmesinde kullandığımız büyütmede (obj. 4x) referans kesitindeki NOİ profilinin monitördeki görüntüsü (burada tanımlama açısından kesintili çizgi ile sınırlandırılmıştır) ve bu görüntüde sayım alanlarını örnekleme için monitör üzerine yerleştirerek kullandığımız koordinatlı örnekleme asetatı. NOİ profili üzerine rasgelen alanlar (beyaz olarak gösterilmiştir), sayım yapılması gereken alanlardır. Bu alanlar sırayla büyük büyütmede görüntülenerek gözlem kesitindeki eşdeğer alanlarla birlikte kaydedildi (sonrasında aynı işlemler diğer kesitte gerçekleştirildi). Bu işlemin başında öncelikle NOİ konumuna ve örneklenen çerçevelere ait koordinat bilgileri not edildi. Yardımcı olması bakımından NOİ profiline ait bazı önemli görülen sınır bilgileri doğrudan asetat üzerine işaretlendi (yeşil ile gösterilen çizgiler). Örneğin; örneklenen alanlardan biri olan C9 alanı bu büyütmede (obj. 4x) ekranın ortasına getirilerek büyük büyütme (obj. 60x immersion) geçildi. JPEG resim formatında saklandıktan sonra, aynı preparat üzerinde bulunan gözlem kesitine geçilerek C9'un eşdeğer alanı da bulundu ve kaydedildi (işlemin bu kısmı Şekil 21'de tariflenmiştir). Sonrasında tekrar 4x objektife geçilerek referans kesiti görüntüldü. İşlemin başında tutulan kayıtlar yardımıyla NOİ profili ilk konumuna getirildi. Örneğin (burada örneklenen görüntü için); NOİ profilinin sağ üst ucunun önceden asetat üzerine çizilen izdüşümüne (üste kalan yeşil hat) getirilmesi bu işlemi oldukça kolaylaştırmıştır. Sonrasında aynı işlemler diğer çerçevelere de uygulandı.

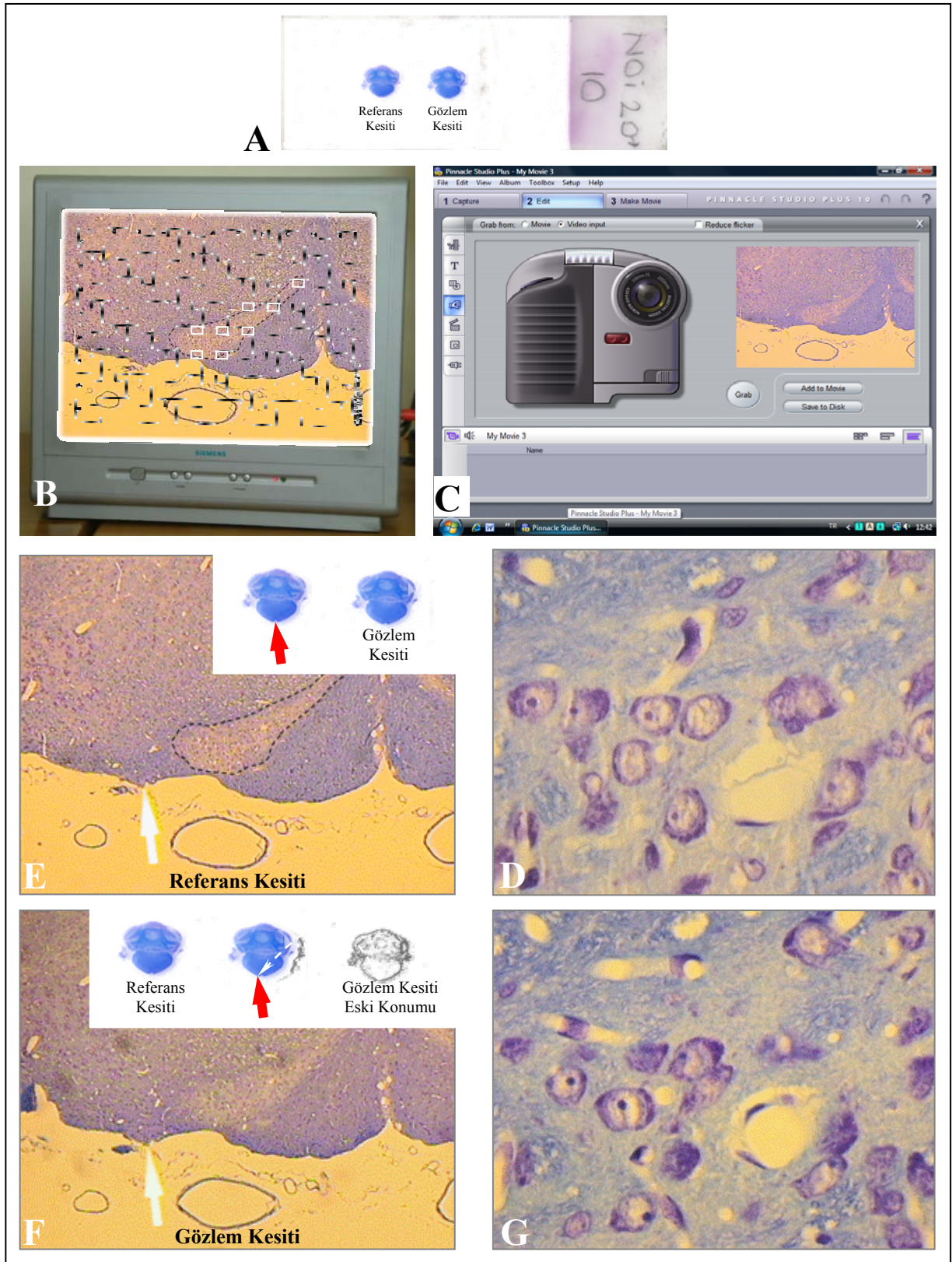
### 5.3. Eşdeğer Sayım Alanlarının Eşzamanlı Görüntülenmesi

Fiziksel disektörün gereklerinden olan kesit çiftlerinden birinde (yani referans kesitinde) örneklenen bir alanın eşdeğerinin komşu kesitte (gözlem kesitinde) bulunması ve sonrasında eşzamanlı görüntülenmesi işlemi Ayas ve arkadaşlarının (2008) geliştirdiği yaklaşımla gerçekleştirildi. Şöyle ki:

Monitördeki görüntülerin aynısı eşzamanlı olarak kullandığımız görüntü yakalama kartının arayüzünde de görüntülenmektedir (Şekil 21 B ve C). Ancak bu arayüz küçük olduğundan örnekleme işlemi monitör üzerinde gerçekleştirildi. Bilgisayar arayüzündeki görüntü sadece kayıt amaçlı kullanıldı. Küçük büyütmede, monitörde görüntülenen referans kesitindeki NOİ'den örneklenen bir alan büyük büyütmede görüntülendi (Bölüm 5.2. ve Şekil 20'de tariflendiği şekilde) ve JPEG resim formatında kaydedildi (Şekil 21 D). Sonrasında, mikroskop tablasının herhangi bir şekilde hareket ettirilmemesine özen göstererek küçük büyütmeye geçildi. Referans kesitine ait bu küçük büyütmede mikroskobun ışıklı okunun ucu gözlem kesitinde de bulunabilecek bir referans noktasına (NOİ sınırı, beyin sapı kenarlarına ait uygun kısımlar, belirgin hücreler, kan damarı gibi) getirildi (Şekil 21 E). Bu sefer de ok sabit bırakıldı ve ok ucu aynı preparat üzerinde yer alan gözlem kesitindeki benzer referans noktasına gelene kadar mikroskop tablası hareket ettirildi. Benzer referans noktasının bulunması için preparat hareketi monitörde gözlemlendi. Bu aşamada önemli olan tablanın ne yönde ve nasıl hareket ettirildiği değildir. Gözlem kesitindeki aynı noktanın, ok hareket ettirilmeden ok ucuna getirilmesi yeterlidir (Şekil 21 F). Bu aşamadan sonra, kullandığımız büyük büyütmeye geçildi (Şekil 21 G). Böylece, referans kesitinde örnekleyip kaydettiğimiz alanın eşdeğeri elde edilmiş olundu. Bu alan kaydedilmeden önce, referans kesitindeki kaydedilen eşdeğeri (Şekil 21 D'deki alan) kıyaslamak üzere ayrı bir pencerede açık tutuldu. Bu şekilde, manuel yapılan bu işlemde kaynaklanabilecek ufak yer sapmaları giderilmiş olundu.

Sonrasında, yeniden alanların örneklendiği küçük büyütmeye geçilerek referans kesiti görüntülendi. Eldeki kayıtlar kullanılarak NOİ profili ilk konumuna getirildi ve Şekil 20'de tariflendiği şekilde sıradaki diğer alan büyük büyütmede görüntülendi. Bu şekilde aynı işlemler örneklenen alanların hepsi bitene kadar tekrarlandı.

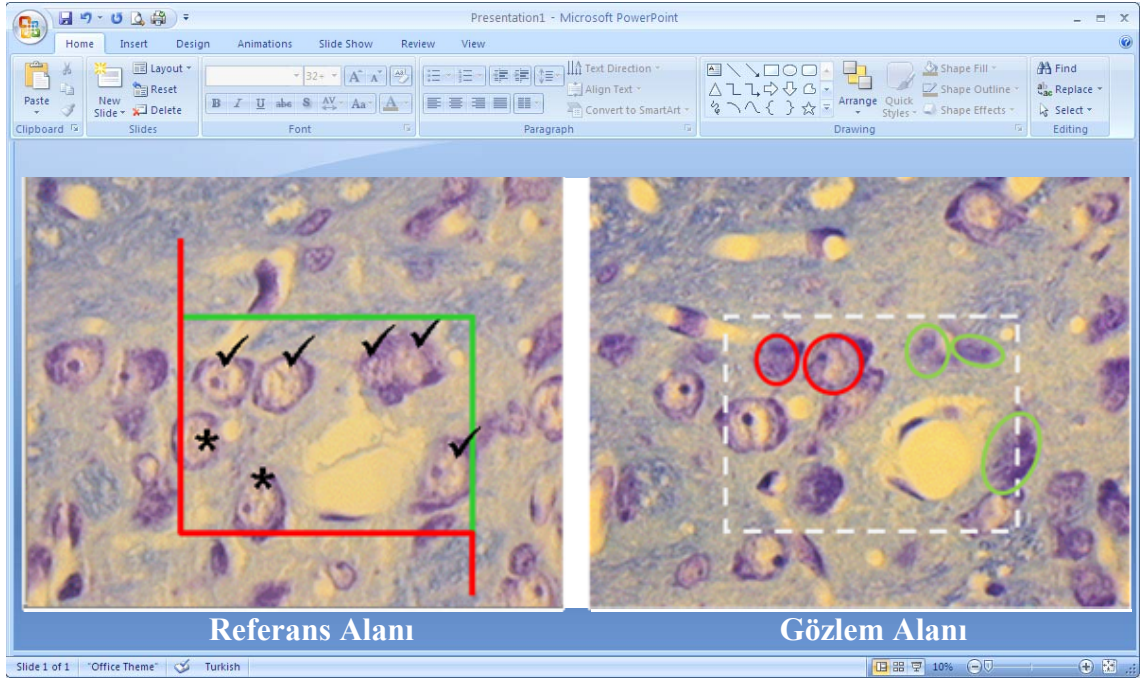




**Şekil 21.** Kesit çiftlerinde eşdeğer alanların örneklenmesi için kullanılan basamaklar. **A,** Uygulama gereği kesit çiftleri tek lam üzerine alındı. **B,** Kullandığımız sayım düzeneğinde NOI profillerinin örneklenmesi, üzerine örnekleme asetatı yerleştirdiğimiz monitör üzerinde gerçekleştirildi (bkz. Şekil 20). **C,** Aynı görüntü kullandığımız görüntü yakalama kartının arayüzünde de görüntülenmektedir. Bu arayüzdeki görüntü küçük olduğundan örneklemede monitör tercih edildi. **D,** Küçük büyütmede örneklenen alanlardan birinin büyük büyütmedeki görüntüsü. Bu görüntü kaydedildikten sonra mikroskop tablası hareket ettirilmeden tekrar küçük büyütmeğe geçildi. **E,** Bu aşamada karşılaşılabilecek görüntüde mikroskopun ışıklı oku bir referans noktasına getirildi (bu büyütmede preparat seviyesindeki okun konumu sağ üst köşede gösterilmiştir). **F,** Ok ucu, ok hareket ettirilmeden gözlem kesitindeki benzer noktaya getirilir (preparatın bu hareketi yine sağ üst köşede temsil edilmiştir). **G,** Bu aşamada tekrar büyük büyütmeğe geçildi ve referans kesitindeki alanın eşdeğeri ile karşılaştırıldı. Bu alan da kaydedildikten sonra diğer alanlar için işlemler tekrarlandı.

#### 5.4. Fiziksel Disektör İle Örneklem ve Nöron Sayımı

Son aşamada bu görüntülerin fiziksel disektör kuralına (Sterio, 1984) göre karşılaştırılması ve nöronların sayılması gerçekleştirildi. Bu işlem bilgisayar monitöründe Power Point® programında gerçekleştirildi. Örneklenen eşdeğer sayım alanları bu programda resim şeklinde yan yana görüntüledikten sonra, üzerlerine yine bu programda hazırlanan bir tarafsız sayım çerçevesi (Gundersen, 1977) düşürüldü. Bu çerçeve, örnekleme basamağında kullandığımız asetattaki sayım alanlarının büyüklüğüne (yani doku seviyesinde  $70 \times 100 \mu\text{m}^2$ 'ye) eşdeğer ebatlara sahip olacak şekilde hazırlandı (Şekil 22). Bu kalibrasyon işlemi de yine tabla mikrometresiyle gerçekleştirildi.



**Şekil 22.** Eşdeğer alanların eşzamanlı görüntülenip değerlendirilmesinde PowerPoint® programı kullanıldı. Eşdeğer alanlar sırayla yan yana görüntülenirlerken üzerlerine yine bu programda hazırlanmış bir sayım çerçevesi düşürüldü. Etkinliği artırmak amacıyla sayımdan sonra kesitlerin rolleri değiştirildi. Bu ikinci durumda gözlem kesiti referans kesiti olarak değerlendirildi ve burada örneklenen nöron çekirdeklerinin diğer kesitte (önceden referans olarak kabul edilende) olup olmadığına bakıldı. Buradaki örnekte Şekil 21'de örneklenen alanlar kullanılmış olup, soldaki alan referans alanı olarak alınmıştır. Bunun üzerine düşürülen çerçeve ile örneklenen nöron çekirdekleri '✓' işareti ile gösterilmiştir. Çerçevenin içerisinde yer almakla birlikte yasaklanmış kenarlara (kırmızı ile gösterilmiştir) temas ettikleri için örneklenmeyen çekirdekler yıldız (\*) ile gösterilmiştir. Daha sonra örneklenen bu çekirdeklerin gözlem kesitinde yer alıp almadıklarına bakıldı. Gözlem kesiti üzerinde aynı yere yerleştirilen benzer ebatlı çerçeve bu amaca yardım etmektedir (burada beyaz kesintili). Örneklenen çekirdeklerden ikisi (en soldaki iki çekirdek) gözlem kesitinde de yer aldığından (kırmızı daireler) disektör sayımına dahil edilmedi. Örneklenen çekirdeklerden en sağda kalan üçü gözlem kesitinde yer almadıklarından (yeşil daireler) sayıldı. Sonuçta bu iki eşdeğer alanda üç hücre sayılmış olundu.

Disektör sayım kuralına göre, önce referans alanında çerçeve içerisinde kabul edilen nöron çekirdekleri örneklendi. Şöyle ki: çerçevenin içerisinde olsa bile, çerçevenin sol ve alt kenarlarına temas eden çekirdekler örneklemeye dahil edilmedi. Çerçevenin dışında olsa bile, çekirdeği çerçevenin sağ ve üst kenarlarına temas eden nöron çekirdekleri de sayıma dahil edildi. Sayıma dahil edilmenin bir diğer kuralı da bu çekirdeklerin çerçevenin sol ve alt kenarı ile bunların uzantılarına temas etmemesidir. Referans kesitinde örneklenen bu nöron çekirdeklerinden gözlem kesitinde yer almayanlar o alan çiftine ait nöron sayısı olarak kaydedildi. (Şekil 22). Çalışmanın etkinliğini artırmak için disektör çiftlerindeki referans ve gözlem alanları literatürde önerildiği şekilde (Gundersen, 1986; Pakkenberg ve Gundersen, 1988) ters çevrilerek de kullanıldı. Yani gözlem alanı referans olarak alınırken, önceki referans alanı gözlem alanı konumunda ele alınmıştır (Şekil 22). Bu şekilde tamamen farklı görüntü ve değerler elde edileceğinden, çalışmanın etkinliği çok az bir ek çalışmayla artırılmış olundu.

### 5.5. Toplam Nöron Sayısının Hesaplanması

Disektör metodu ile yapılan değerlendirmede kesit çiftleri kullanıldığı ve sayımda kesit çiftlerinden (veya alanlarından) birinde yer alıp diğerinde yer almayan objeler sayıldığından, sayılan objeler  $Q^-$  ile belirtilir. (burada Q, sayılan objeleri; ‘ $-$ ’ işareti ise komşu kesitte kaybolanları ifade eder). Çalışmamızda da, tariflenen şekilde *sayılan nöronlar*  $Q^-$  ile ifade edildi. Ancak örneklenen alanlarda etkinliğin artırılması amacıyla her iki yönde de sayım gerçekleştirildiğinden, kullandığımız fraksiyonlarda yer alan toplam sayılan nöron sayısını ( $\Sigma Q^-$ ) elde etmek için *sayılan nöronların* toplamı ikiye bölündü ( $Q^-/2$ ). Sonuçta elde edilen değer ( $\Sigma Q^-$ ), NOİ'nin belirli bir fraksiyonunda ( $f_1 \times f_2$ 'lik kısmında) sayılan nöronların toplam sayısını verecektir. Başka bir ifade ile, NOİ'den örneklenen kesitlerde ( $f_1$ ; her 40. kesitte) bulunan NOİ profillerinden örneklenen alanlardaki ( $f_2$ ; her  $230 \times 230 \mu m^2$ 'lik NOİ alanının  $70 \times 100 \mu m^2$ 'lik kısmında) nöron sayısını verecektir. NOİ'deki toplam nöron sayısı (N) ise,  $\Sigma Q^-$ 'nin örneklenen fraksiyonların tersi ile çarpılarak elde edildi.

$$N = \Sigma Q^- \times 1/f_1 \times 1/f_2$$

## 6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ VE HATA KATSAYILARININ HESAPLANMASI

İstatistiksel analize geçmeden önce, karşılaştırmalarda kullanılacak testi belirlemek için her iki grupta hesaplanan ortalama toplam nöron sayılarına ait değerlerin normal dağılım gösterip göstermediği ve varyanslarının homojen olup olmadığı kontrol edildi. Normallik dağılımları hem Kolmogorov–Smirnow, hem de Shapiro-Wilk testleriyle; varyansların homojenliği ise Levene istatistiği ile değerlendirildi (Rosner, 1990; Hayran ve Özdemir, 1996). Sonuçlar verilerimizin normal dağılımda olduğunu gösterdiğinden; toplam nöron sayılarının karşılaştırılmasında gruplar arası bağımsız değerler için Student t – testi, bağımlı değerler için (grup içi sağ sol karşılaştırmalarında) ise eşleştirilmiş t – testi kullanımının uygun olacağına karar verildi. Verilerin varyansları da homojenlik gösterdiğinden, testlerde ilgili tablo değerleri kullanıldı.

Çalışmanın etkinliğini ilgili literatür doğrultusunda değerlendirmek üzere grupta gözlenen nisbi varyansı en fazla etkileyen parametre de belirlendi (Gundersen ve Østerby, 1981; Gupta ve ark., 1983; Kroustrup ve Gundersen, 1983; West ve ark., 1991; West, 1993 ve 1994; Howard ve Reed, 1998). Pilot çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz sayım sonrasında bu gruptaki varyasyon katsayısı (CV) 0,14 olarak hesaplandı. Sistemik rasgele örnekleme sonucunda hesaplama yoluyla belirlenen toplam nöron sayısına ait hata katsayısı ise (CE) 0,11 olarak bulundu. İlgili literatüre göre; bireyde gözlenen nisbi varyansı oluşturan bu değerın karesi, grupta gözlenen nisbi varyansın (varyasyon katsayısının karesi) yarısından fazla olduğundan örneklemin artırılması yoluna gidildi. Bu amaçla sayım çerçevesi büyütülerek daha fazla nöron sayılmış oldu. Sonuçta hata katsayısı 0,08'e kadar düşürüldü.

Hata katsayılarının hesaplanmasında Gundersen ve Jensen tarafından 1987 yılında geliştirilen ve Gundersen ve arkadaşları tarafından 1999'da gözden geçirilerek yeniden düzenlenen ve önerilen formül (Gundersen ve ark, 1999) kullanıldı. Bu formülde hangi parametrelerin yer aldığı, bu parametrelerin nasıl oluştuğu, bir sıçan NOİ'sinde yapılan nöron sayımı sonrasında ilgili CE değerinin nasıl belirlendiği ve sonuçta toplam nöron sayısının nasıl hesaplandığına ait detaylar Tablo 3'te gösterildi. Aynı işlemler her hayvanda gerçekleştirildikten sonra ilgili grubun ortalama CE'si olarak ifade edildi.

**Tablo 3.** Bir dişi sıçanın sağ NOI'sinde örneklenen preparatların herbirinde sayılan nöron çekirdeği sayıları, sayılan toplam nöron çekirdeği sayısı ( $\Sigma Q^-$ ), toplam nöron sayısı (N) ve buna ait hata katsayısının (CE) hesaplanması\*.

Preparat sırası, i	$Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	11	144	132	110
2	12	144	120	264
3	10	100	220	180
4	22	484	396	308
5	18	324	252	216
6	14	196	168	168
7	12	144	144	132
8	12	144	132	72
9	11	121	66	33
10	6	36	18	12
11	3	9	6	0
12	2	4	0	
<b>TOPLAM</b>	<b><math>\Sigma Q^- = 133</math></b>	<b>A = 1850</b>	<b>B = 1654</b>	<b>C = 1495</b>

$$\begin{aligned}
 CE(\Sigma Q^-) &= \frac{\sqrt{\Sigma Q^- + [(3 \times (A - \Sigma Q^-) - (4 \times B) + C) / 240]}}{\Sigma Q^-} \\
 &= \frac{\sqrt{133 + [(3 \times (1850 - 133) - (4 \times 1654) + 1495) / 240]}}{133} \\
 &= \mathbf{0.0867}^{\S}
 \end{aligned}$$

<b>1. köf</b> .....	<b>1/40</b>
<b>2. aöf, a (çerçeve alanı) / á (adım alanı)</b> .....	<b>0,1323</b>
a (çerçeve alanı), $\mu m^2$ .....	7000
á (adım alanı), $\mu m^2$ .....	52900

Toplam nöron sayısı,  $N = \Sigma Q^- \times 1/\text{köf} \times 1/\text{aöf}$

$$N = 120^{\dagger} \times 40 \times 7,56 = \mathbf{36288}$$

\* CE'nin hesaplanmasında her i. kesitte sayılan nöron çekirdeklerinin sayısı esas alınır. İlk i. kesit NOI'nin yer aldığı ilk kesittir. Burada kullanılan formülde 4 değişken yer alır;  $\Sigma Q^-$ , A, B ve C.  $\Sigma Q^-$ , her hayvanda NOI'nin yer aldığı kesit serisinde sayılan toplam çekirdek sayısını; A, serideki her kesitte sayılan çekirdek sayılarının kareleri toplamını ( $Q_i^- \times Q_i^-$ ); B, her kesitteki toplam  $Q^-$ 'nin peşisıra gelen kesitteki ile çarpımlarının toplamını ( $Q_i^- \times Q_{i+1}^-$ ); ve C, seride yer alan her kesitteki toplam  $Q^-$ 'nin kendisinden iki sıra sonra gelen kesitteki toplam  $Q^-$  ile çarpımlarının toplamını ifade eder ( $Q_i^- \times Q_{i+2}^-$ ).

<sup>§</sup> Bu CE, bu preparat serisinde bir yönde yapılan sayımın sonucuna aittir. Aynı seride referans ve gözlem alanlarında yer değiştirilerek yapılan sayımın CE si 0,0972'dir. Bir sıçana ait kullanılan CE değeri ise, her ikisinin ortalamasıdır.

<sup>†</sup>  $\Sigma Q^-$ 'ya ait bu değer her iki yönde yapılan sayımın ortalamasıdır. Yani  $133 + 106 / 2$ .

## BULGULAR

### 1. PİLOT ÇALIŞMA BULGULARI

Esas çalışma bulgularımıza geçmeden önce, kullandığımız metodolojinin uygulama şeklinde belirleyici olan pilot çalışmamıza ait bazı bulgulara yer verilecektir. Bu önçalışmaya ait detaylı bulgular büyük oranda Materyal ve Metot bölümünde verilmiştir. Burada sadece, o bölümdeki konunun işlenişi içerisinde yer verilemeyen bazı detaylar sunulacaktır.

#### 1.1. NOİ Boyamalarına Ait Görüntüler

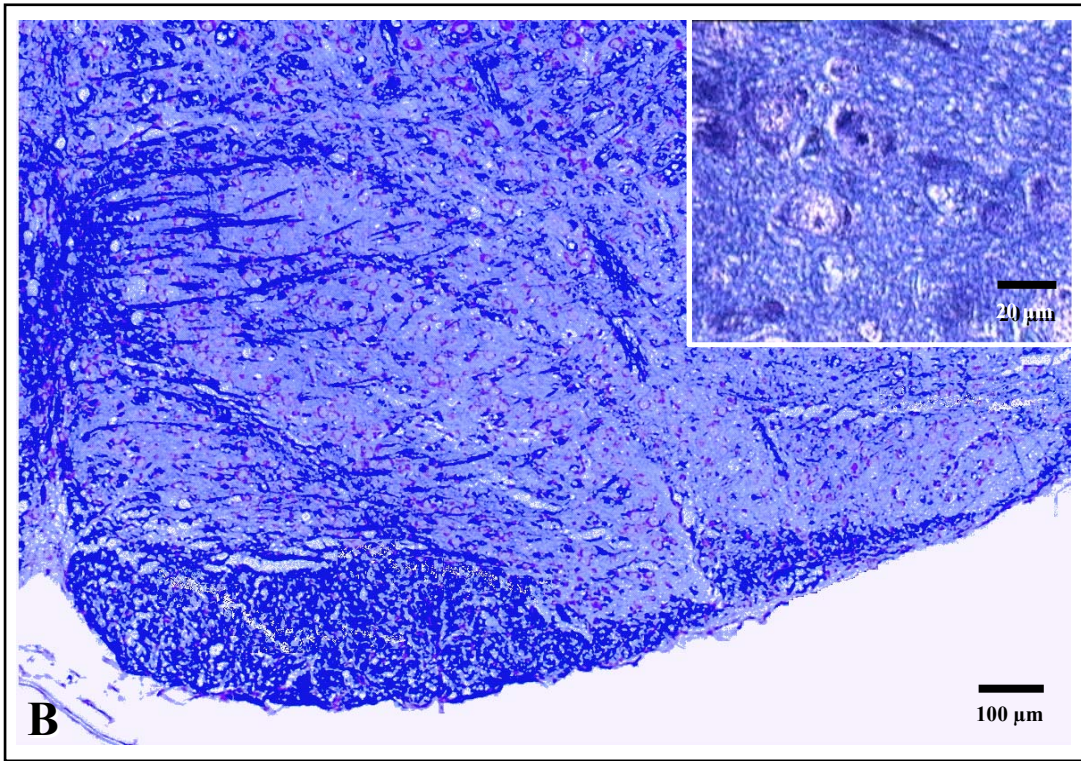
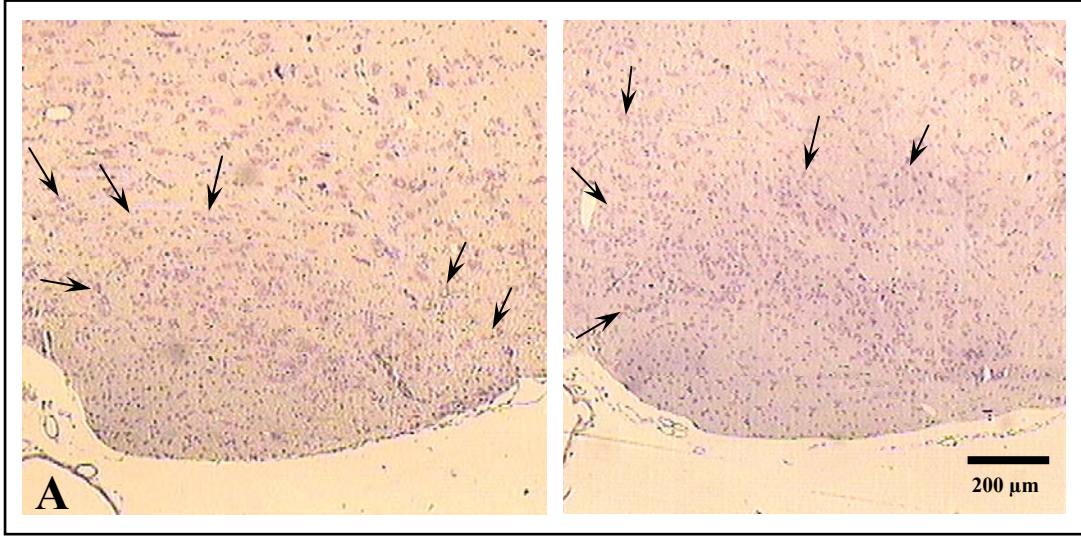
Sıçan NOİ'sinin sınırlarını belirlemek üzere yapılan farklı boyamalara ait mikrograflar Şekil 23'te verilmiştir. Nöronların yanı sıra NOİ sınırlarının da her seviyede rahatlıkla belirlenebildiği görüntüler, miyelin boyasının (luxol fast blue) % 70'lik alkolde dereceli ve kontrollü diferansiyasyonu ile elde edildi.

#### 1.2. Önsayım Sonuçları

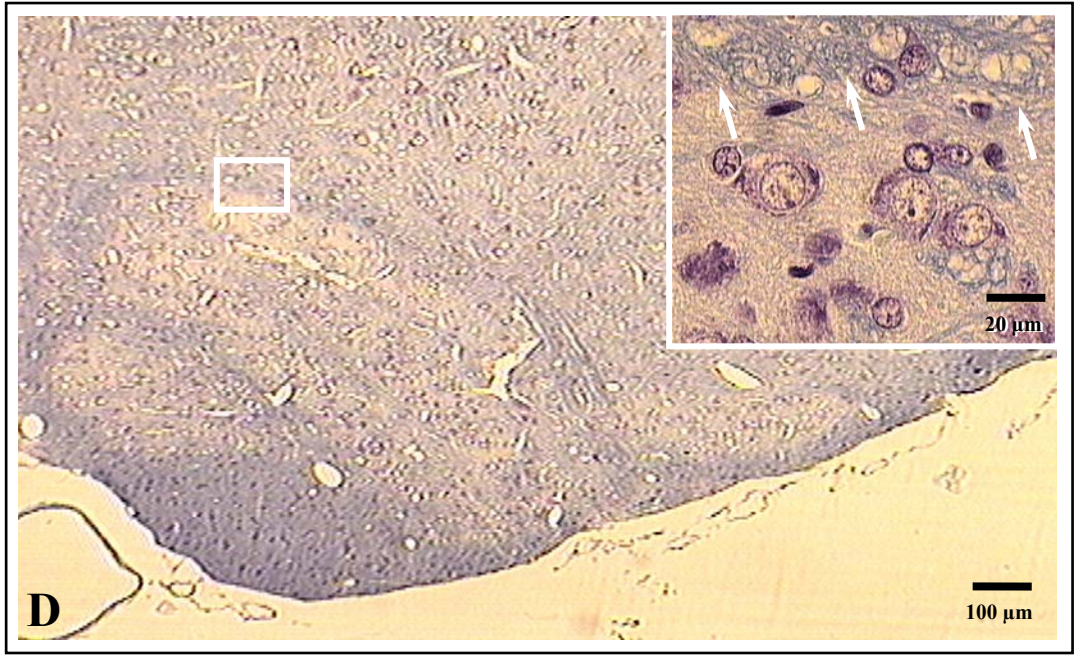
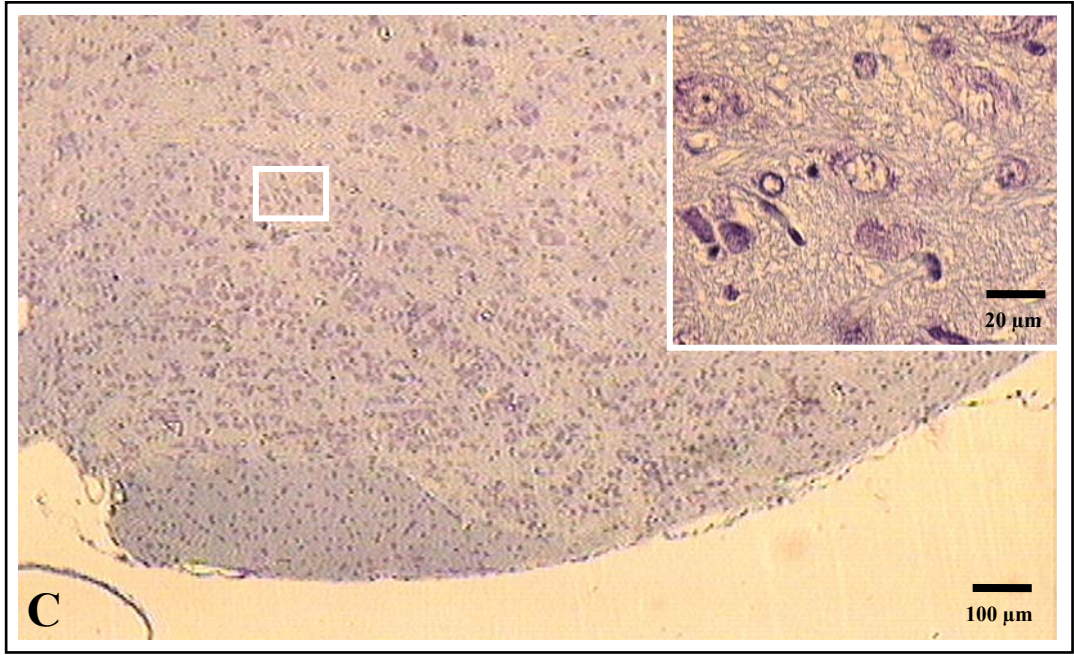
Örnekleme stratejimiz sonrasında belirlenen örnekleme değerleri, bu değerlerin doku ve asetat düzeyindeki karşılıkları ile birlikte Tablo 4'te özetlenmiştir.

**Tablo 4.** Pilot çalışmada kullanılan örnekleme değerleri

Parametreler	
Örnekleme asetatında kullanılan adım aralığı (cm <sup>2</sup> )	2,53 x 2,53
Adım aralığının doku seviyesindeki eşdeğeri (µm <sup>2</sup> )	230 x 230
Örnekleme asetatında kullanılan sayım çerçevesi alanı (cm <sup>2</sup> ) (Örnekleme aşamasında kullanılan küçük çerçeveler)	0,66 x 0,66
Sayım çerçevesi alanının doku seviyesindeki eşdeğeri (µm <sup>2</sup> )	60 x 60
Sayımın gerçekleştirildiği PowerPoint programında sayım çerçevesi alanının eşdeğer ebatları (cm <sup>2</sup> )	6 x 6
$1 / AÖF = (1 / [(60 \times 60) / (230 \times 230)])$	14,69
$1 / KÖF$	40
Monitörde sayım alanlarının örneklendiği büyütme (Obj. 4x)	107x
Monitörde sayım büyütmesi (Obj. 60x)	1630x



**Şekil 23a.** Sıçan NOİ'sinin sınırlarını belirlemek üzere yapılan farklı boyamalara ait mikrograflar. **A,** Sadece cresyl violet acetate ile boyanan kesitlerde NOİ sınırları bir çok seviyede sağlıklı şekilde tespit edilemedi (oklar ile gösterilen bölgelerin NOİ sınırlarına dahil olup olmadığını belirlenmesi gibi). **B,** Cresyl violet acetate, Luxol fast blue isimli miyelin boyasıyla birlikte kullanıldığında NOİ sınırları belirgin hale gelmekle birlikte, boyanan lifler nöronları örttüğünden (üst köşe mikrografi) tanımlanmalarını güçleştirdi. Bu durum da sayım açısından olumsuz bir durumdur.



**Şekil 23b.** Sıçan NOI'sinin sınırlarını belirlemek üzere yapılan farklı boyamalara ait mikrograflar. **C**, Luxol fast blue – cresyl violet acetate ile boyanan, ancak nöron kamuflajını önlemek üzere luxol fast blue boyasına daha kısa süre maruz bırakılarak boyanan kesitler. Nöropil hafifçe boyandığından sınırların belirginliği korumuş durumda. Bu boyama şekli, nöron tanımlama problemini gidermekle birlikte, sayımda kullanılan büyük büyütmede nöropil boyanmasında oluşturduğu yetersiz kontrast nedeniyle bu aşamada sınır tanımlamalarını zorlaştırmıştır (üst köşe mikrografı). **D**, Süre kısıtlaması yerine mikroskop gözlemleriyle gerçekleştirilen kontrollü diferansiyasyon sonucunda istenen sonuca ulaşıldı. Hem küçük, hem de büyük büyütmelerde NOI sınırları rahatlıkla tanımlanabildi; nöronlar lif boyasıyla örtülmedi. Sağ üst köşedeki mikrografda sayım büyütmesinde de NOI nöropilinin çevreden rahatlıkla ayrıldığı (oklar) gözlenmektedir.



Bu örnekleme değerlerini test ettiğimiz beş adet erkek sıçanda NOI'yi içeren ortalama 11 adet kesit elde edildi. Bunların sağ NOI'sinde gerçekleştirilen örneklemede ortalama 70 alan elde edildi. Bu alanlarda 60 x 60  $\mu\text{m}^2$ 'lik sayım çerçevesi ile yapılan disektör sayımlarında ortalama 72,6 nöron çekirdeği sayıldı. Hata katsayısı ortalamaları ise 0,11 olarak bulundu. Bu önçalışmada yer alan sıçanların herbirine ait verilerin detayları Tablo 5'te gösterilmiştir. Bu sayım sonucunda ortalama nöron sayısı ise yaklaşık 42000 olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 5.** Sıçanların sağ NOI'sinde gerçekleştirilen pilot çalışmadaki örnekleme sonucunda elde edilen preparat ve alan sayıları ile bunlarda sayılan nöron çekirdekleri ve CE değerleri

Erkek sıçan no	Preparat sayısı	Alan sayısı	Sayılan çekirdek $\Sigma Q^-$	CE
1	12	78	75	0,1149
2	10	58	79	0,1127
3	10	70	69	0,0959
4	12	74	70	0,12
5	13	70	70	0,1102
<b>Ortalama</b>	<b>11,4</b>	<b>70</b>	<b>72,6</b>	<b>0,11</b>

## 2. GENEL GÖZLEMLER

Çalışmamızda kullanılan 30 günlük erkek ve dişi sıçanlara ait ortalama vücut ve beyin (beyin + beyin sapı + beyincik ağırlıkları) ağırlıkları standart hataları ile birlikte Tablo 6'da verilmiştir. Dişi ve erkeklerin gerek vücut, gerekse beyin ağırlığı ortalamalarının birbirlerine oldukça yakın oldukları gözlemlendi.

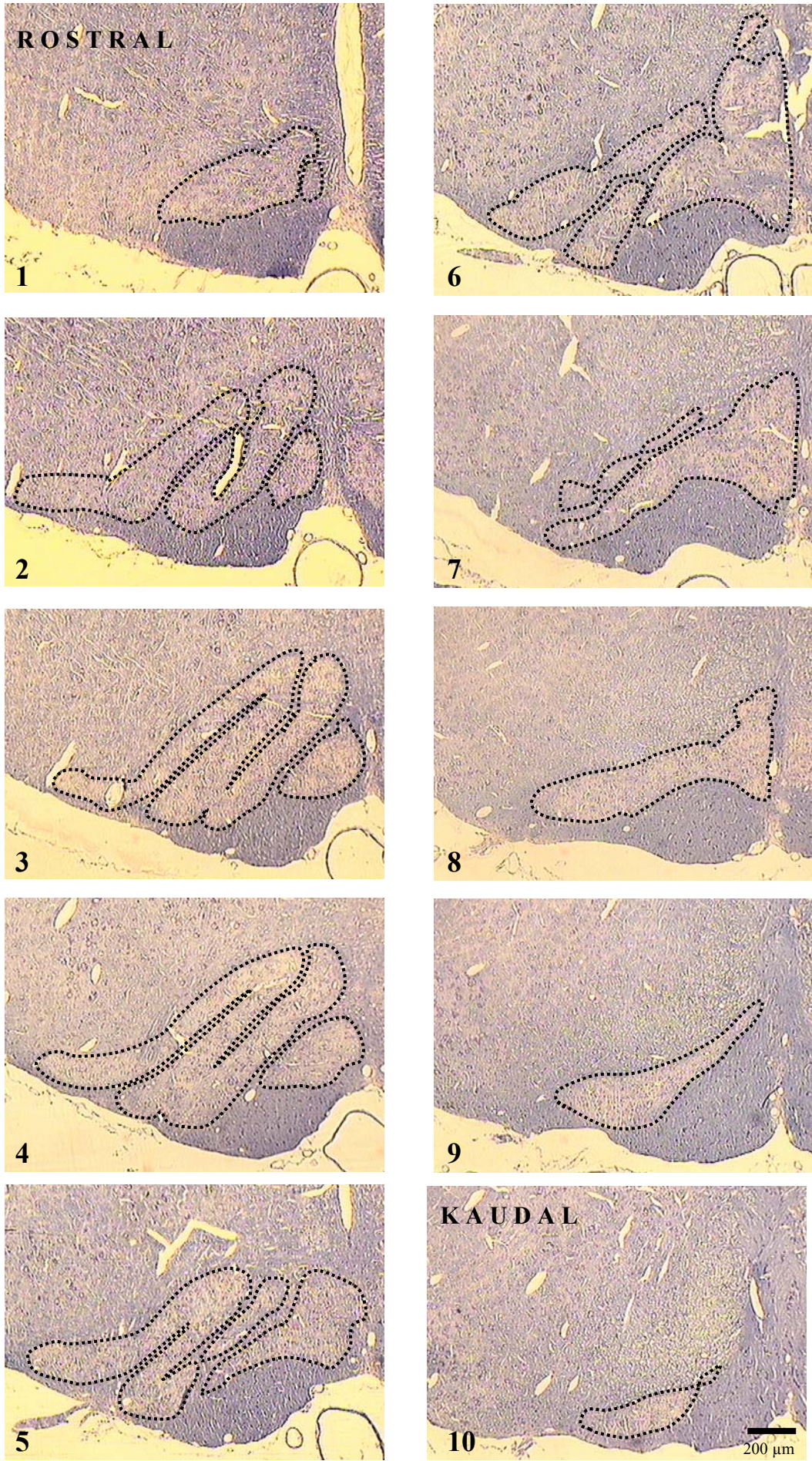
**Tablo 6.** Çalışmada kullanılan hayvanlara ait vücut ve beyin ağırlıkları (Ortalama  $\pm$  SEM)

	Erkeklere ait	Dişilere ait
Vücut Ağırlıkları (g)	62,75 $\pm$ 5,3	60,67 $\pm$ 3,27
Beyin Ağırlıkları (g)	1,55 $\pm$ 0,06	1,57 $\pm$ 0,05

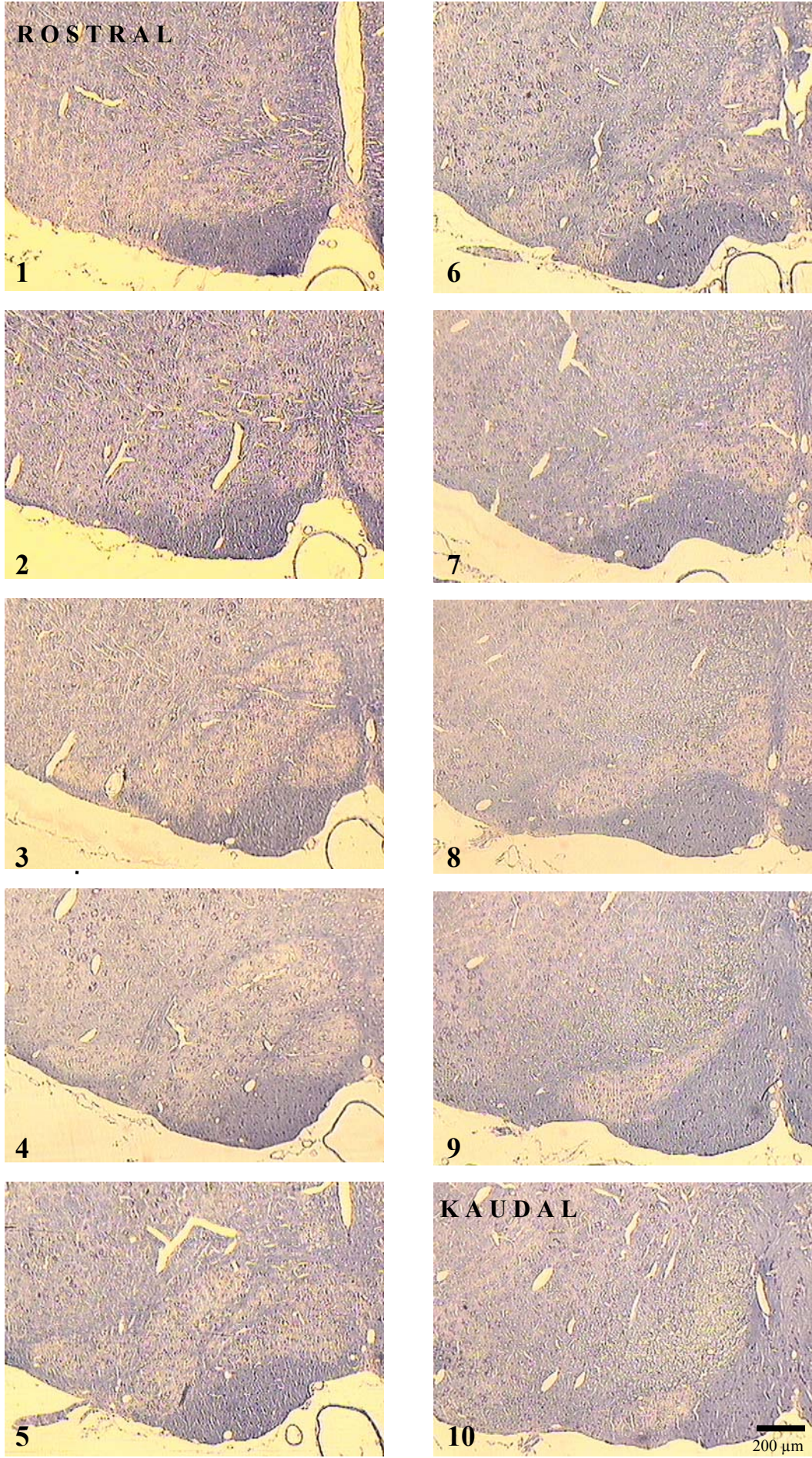
Sayım işlemi başlangıç adımı için karar verilen her gruptaki 5 adet sıçanda gerçekleştirildi. Esas çalışma için her grupta 6 olmak üzere 12 adet sıçan kullanılmakla birlikte; her grupta bir adet sıçan, histolojik işlemler sırasında oluşabilecek muhtemel bir teknik aksaklık için yedek olarak ayrıldı. Çalışmamızda intrakardiyak perfüzyon, doku takibi ve kesit alma işlemleri süresince herhangi bir problem ile karşılaşılmadı. Kesit alımı esnasında kesit çiftlerinin aynı oryantasyonda olmalarına (Şekil 19) dikkat edilerek fiziksel disektör uygulamalarında en zor aşama olarak tanımlanan kesit çiftlerinde eşdeğer kesit alanlarının bulunup örneklenmesi işlemi başarı ile gerçekleştirilebildi.

Uygulanan boyama protokolü ile çalışma bölgemiz olan NOI, örneklenen tüm kesit serilerinde rahatlıkla belirlenebildi. Bu özelliğin hem sayım alanlarının örneklenildiği hem de sayımın gerçekleştirildiği küçük ve büyük büyütmelelerde korunduğu gözlemlendi. NOI sınırlarına ait bu belirginlik Şekil 24a'da bir hayvandan örneklenen tüm kesitlerde gösterilmiştir. Şekil 24b'de aynı seri, doğal görüntüsüyle NOI sınırları belirtilmeden verilmiştir. Bu kesitlerde sayım büyütmesinde nöron profillerine ait görüntüler Şekil 18 ve Şekil 21 – 22'de verilmiştir. Yüksek sayısal açıklıklı bir objektifle (N.A. 1.4) elde edilen bu çözünürlükteki görüntülerde, kullandığımız nöron tanımlama kriterlerinin belirlenmesinde herhangi bir güçlükle karşılaşılmadı.

Fiziksel disektör uygulamalarının en vakit alıcı ve sıkıcı aşaması olarak tanımlanan eşdeğer görüntü alanlarının örneklenip eşzamanlı görüntülenmesi işlemleri bizim çalışmamızın da en çok vakit alan kısmını oluşturdu. Ancak kullandığımız yaklaşım ile bu basamağın oldukça etkin şekilde tamamlanabildiği gözlemlendi. Bir sıçanda örneklenen kesitlerin bir tarafındaki (sağ veya sol) NOI'sinde sayım yapılacak eşdeğer alanların örneklenmesi (yaklaşık 70 – 75 alan), kaydedilmesi, eşzamanlı görüntülenmesi ve sayılması yaklaşık 4 – 4,5 saat kadar sürdü. Bu işlemin başlangıçta (pilot çalışmadaki sayımlar sırasında) çok daha uzun sürdüğü, bununla birlikte işleme aşına olduktan sonra (birkaç hayvandaki örnekleme sonucunda) burada bildirilen süreye düştüğü gözlemlendi.



**Şekil 24a.** Dişi sıçanlardan birinin beyin sapından rostro-kaudal yönde sistematik rasgele örnekleme (4µm kalınlığındaki her kırkıncı kesit) ile alınan koronal kesitlerde NO1 profillerinin sınırları (kesintili çizgiler).



Şekil 24b. Şekil 24a'daki kesitlerde NOİ profilleri.

Her iki grupta, her bir sıçanda NOI'yi içeren kesitler ile bunlarda örneklenen kesit alanı (sayım alanı) sayıları ve ortalamaları Tablo 7 – 10'da verilmiştir. Buradaki alan sayıları örneklenen orijinal sayıları göstermektedir. Sayım sırasında gözlem ve referans alanları tersi yönde de kullanıldığından bunların iki katı kadar olan farklı alanda sayım yapılmış olundu.

**Tablo 7.** P(30) günlük erkek sıçanların sağ NOI'lerinde örneklenen toplam kesit ve sayım alanı sayıları

Erkek Sıçan No	1	2	3	4	5	Ortalama
<b>Sayım alanı</b>	78	58	73	84	82	<b>75</b>
<b>Kesit sayısı</b>	12	10	10	12	13	<b>11,4</b>

**Tablo 8.** P(30) günlük erkek sıçanların sol NOI'lerinde örneklenen toplam kesit ve sayım alanı sayıları

Erkek Sıçan No	1	2	3	4	5	Ortalama
<b>Sayım alanı</b>	82	54	71	83	83	<b>74,6</b>
<b>Kesit sayısı</b>	12	10	10	12	12	<b>11,2</b>

**Tablo 9.** P(30) günlük dişi sıçanların sağ NOI'lerinde örneklenen toplam kesit ve sayım alanı sayıları

Dişi Sıçan No	1	2	3	4	5	Ortalama
<b>Sayım alanı</b>	74	78	75	78	71	<b>75,2</b>
<b>Kesit sayısı</b>	12	11	10	12	11	<b>11,2</b>

**Tablo 10.** P(30) günlük dişi sıçanların sol NOI'lerinde örneklenen toplam kesit ve sayım alanı sayıları

Dişi Sıçan No	1	2	3	4	5	Ortalama
<b>Sayım alanı</b>	69	76	68	77	82	<b>74,4</b>
<b>Kesit sayısı</b>	12	11	11	12	11	<b>11,4</b>

### 3. TOPLAM NÖRON SAYISI VE HESAPLAMALARINA AİT BULGULAR

Sıçan NOI'sinde toplam nöron sayısının belirlenmesinde kullandığımız örnekleme değerleri, bu değerlerin doku ve asetat düzeyindeki karşılıkları, ayrıca bu işlemlerde kullanılan nihai büyütme Tablo 11'de verilmiştir. Kullandığımız örnekleme ve sayım yaklaşımının kombinasyonu (Korkmaz ve ark., 2000; Ayas ve ark., 2008) büyük büyütmede (yani sayım sırasında) gerçekleştirilen işlemleri küçük büyütmede görünür hale getirdiğinden, her iki büyütmede oluşturulacak olan alan örnekleme fraksiyonlarının birbirleriyle tamamen örtüştüğü gözlenecektir.

Fiziksel fraksiyonlama tekniği ile toplam nöron sayısının (N) hesaplanmasında ( $N = 1/f_1 \times 1/f_2 \times \Sigma Q$ ) bilinmesi gereken tek şey kullanılan fraksiyonlar ve sayılan nöron sayısı olduğundan (Gundersen, 1986), Tablo 11'de verilen örnekleme ve büyütme değerleri sadece tanımlama ve bilgilendirme amaçlıdır.

**Tablo 11.** P(30) günlük dişi ve erkek sıçan NOI'lerinde toplam nöron sayısının belirlenmesinde kullanılan parametreler

Parametreler	
Örnekleme asetatında kullanılan adım aralığı (cm <sup>2</sup> )	2,53 x 2,53
Adım aralığının doku seviyesindeki eşdeğeri (µm <sup>2</sup> )	230 x 230
Örnekleme asetatında kullanılan sayım çerçevesi alanı (cm <sup>2</sup> ) (Örnekleme aşamasında kullanılan küçük çerçeveler)	0,77 x 1,1
Sayım çerçevesi alanının doku seviyesindeki eşdeğeri (µm <sup>2</sup> )	70 x 100
Sayımın gerçekleştirildiği PowerPoint programında sayım çerçevesi alanının eşdeğer ebatları (cm <sup>2</sup> )	7 x 10
$1 / AÖF$ ( $1 / [(70 \times 100) / (230 \times 230)]$ )	7,56
$1 / KÖF$	40
Sayım alanlarının örneklendiği büyütme (Obj. 4x)	107x
Sayım büyütmesi (Obj. 60x)	1630x

Dişi ve erkek gruplarını oluşturan sıçanların her birinin sağ ve sol taraflarına ait hesaplanan toplam nöron sayısı (N), sayılan nöron çekirdeği sayısı ( $\Sigma Q^-$ ), hesaplanan toplam nöron sayısına ait hata katsayıları (CE) ve bunların ortalamaları Tablo 12 – 15’de verilmiştir.

**Tablo 12.** Erkek sıçanların sağ NOİ kısımlarına ait toplam nöron sayıları (N), nöron sayısına ait hata katsayısı (CE) ve sayılan nöron sayıları ( $\Sigma Q^-$ ) değerleri

ERKEK SAĞ NOİ	Hayvan No	1	2	3	4	5	Ortalama
	Parametreler						
	Nöron sayısı (N)	36288	41731	34171	34474	38405	<b>37013,8</b>
	Hata katsayısı (CE)	0,092	0,086	0,094	0,095	0,089	<b>0,091</b>
	( $\Sigma Q^-$ )	120	138	113	114	127	<b>122,4</b>

**Tablo 13.** Erkek sıçanların sol NOİ kısımlarına ait toplam nöron sayıları (N), nöron sayısına ait hata katsayısı (CE) ve sayılan nöron sayıları ( $\Sigma Q^-$ ) değerleri

ERKEK SOL NOİ	Hayvan No	1	2	3	4	5	Ortalama
	Parametreler						
	Nöron sayısı (N)	32054	35381	32054	40219	45360	<b>37013,6</b>
	Hata katsayısı (CE)	0,097	0,093	0,097	0,087	0,082	<b>0,091</b>
	( $\Sigma Q^-$ )	106	117	106	133	150	<b>122,4</b>

**Tablo 14.** Dişi sıçanların sağ NOİ kısımlarına ait toplam nöron sayıları (N), nöron sayısına ait hata katsayısı (CE) ve sayılan nöron sayıları ( $\Sigma Q^-$ ) değerleri

DİŞİ SAĞ NOİ	Hayvan No	1	2	3	4	5	Ortalama
	Parametreler						
	Nöron sayısı (N)	36288	39614	44755	40219	32659	<b>38707</b>
	Hata katsayısı (CE)	0,092	0,088	0,083	0,087	0,098	<b>0,089</b>
	( $\Sigma Q^-$ )	120	131	148	133	108	<b>128</b>

**Tablo 15.** Dişi sıçanların sol NOİ kısımlarına ait toplam nöron sayıları (N), nöron sayısına ait hata katsayısı (CE) ve sayılan nöron sayıları ( $\Sigma Q^-$ ) değerleri

DİŞİ SOL NOİ	Hayvan No	1	2	3	4	5	Ortalama
	Parametreler						
	Nöron sayısı (N)	40824	33869	42638	42941	37800	<b>39614,4</b>
	Hata katsayısı (CE)	0,087	0,096	0,085	0,084	0,090	<b>0,088</b>
( $\Sigma Q^-$ )	135	112	141	142	125	<b>131</b>	

Pilot çalışmada belirlediğimiz değerlerde yapılan tek değişiklik, sayım çerçevesinin büyütülmesi oldu. Adım alanı aynı kalmakla birlikte, bu durumda esas çalışmadaki alan örnekleme fraksiyonu değişmiş oldu. Sonuç olarak; pilot çalışmada ortalama 70 alanda sayılan ~72 nöron değeri, esas çalışmada ortalama 75 alanda sayılan ~125 nörona çıkmıştır. Hesaplanan ortalama toplam nöron sayısı ise pilot çalışmada 42000 iken, esas çalışmada 38000 olarak bulundu. Hesaplanan bu değerlerle ilgili hata katsayısının da sırasıyla 0,11'den 0,09'a düştüğü gözlemlendi.

Tablo 16'da çalışmamızda kullanılan grupların sağ ve sol NOİ'lerindeki ortalama toplam nöron sayıları ile bunlara ait hata ve varyasyon katsayıları verilmiştir. Tablo 7 – 10 ve Tablo 12 – 15'te özetlenen esas çalışmaya ait kesit, alan ve sayılan nöron sayılarına ait değerlerin stereolojik çalışmalar için önerilen değerlerle (5 – 6 ve yukarısı, yani ~10 kesitte 100 – 150 objenin sayılması; Gundersen ve ark., 1999) uyum

**Tablo 16.** Erkek ve dişi grup sıçanların sağ ve sol NOİ'lerine ait ortalama toplam nöron sayıları (N), hata katsayıları (CE) ve varyasyon katsayıları (CV).

Gruplar	SAĞ			SOL		
	N	CE	CV	N	CE	CV
<b>ERKEK</b>	37014 ± 1401	0,091	0,08	37014 ± 2567	0,091	0,16
<b>DİŞİ</b>	38707 ± 2026	0,089	0,12	39614 ± 1703	0,089	0,09



içerisinde olduğu gözlemlendi. Bu uygunluk ayrıca önerilen formüllerle de doğrulandı. Tablo 16'daki varyasyon ve hata katsayıları Materyal ve Metot bölümünde (bkz. 2.2. Örneklem Stratejisi) bildirilen eşitlikte yerlerine konulduğunda, pilot çalışma sonucunda belirlediğimiz ve çalışmada kullandığımız örneklemin optimum düzeyde olduğu gözlemlendi. Başka bir ifade ile; çalışmamızdaki her bir grupta gözlenen nisbi varyans (varyasyon katsayısının karesi ile ifade edilir;  $CV^2$ ), esas olarak bireyler arasında var olan biyolojik varyanstan etkilenmiştir. Bireyde gözlenen nisbi varyansın (bireylerde yapılan örnekleme sonucunda oluşur ve hata katsayısının karesi ile ifade edilir;  $CE^2$ ), toplam varyansa olan katkısının buna göre daha düşük kaldığı gözlemlendi.

#### 4. KARŞILAŞTIRMALARA AİT İSTATİSTİKSEL BULGULAR

İstatistiksel analizler öncesinde gerçekleştirdiğimiz grup verilerinin normallik dağılımının (Kolmogorov – Smirnov ve Shapiro – Wilk testleri) ve varyanslarının homojenliğinin (Levene testi) kontrol edilmesine ait sonuçlar Tablo 17 ile Tablo 20 ve Tablo 22'de verilmiştir. İlgili tablolarda, erkek ve dişi hayvanlardan oluşan iki gruba ait verilerin hem normal dağılım gösterdikleri ( $P > 0,05$ ) hem de varyanslarının da homojen olduğu ( $P > 0,05$ ) gözlenmektedir.

**Tablo 17.** Dişi ve erkeklerden elde edilen verilerin normallik testi

GRUP*	Shapiro – Wilk Testi			Kolmogorov – Smirnov		
	İstatistik	df	P (Sig.)	İstatistik	df	P (Sig.)
Erkekler <sup>§</sup>	,933	10	,478	,166	10	,200
Dişiler <sup>§</sup>	,960	10	,784	,145	10	,200

df: serbestlik derecesi, P: olasılık değerleri

\* Sağ ve sol verileri birlikte

<sup>§</sup> Erkeklerin sağ ile dişilerin sağ, erkeklerin solu ile dişilerin soluna ait veriler de normal çıktı ( $p > 0,05$ )

Hesapla bulunan toplam nöron sayısı değerlerinin grup içerisinde sağ ve sol taraftaki NOİ'ler arasında fark gösterip göstermediğine ait karşılaştırmalar her iki grupta da bu parametre açısından sağ ve sol taraflar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlendi (erkeklerde  $p = 1,00 > 0,05$ ; dişilerde  $p = 0,687 > 0,05$ ). Grup ortalamaları standart sapma ve standart hataları ile birlikte Tablo 18'de; karşılaştırma sonuçları ise Tablo 19'da verilmiştir.

**Tablo 18.** Grup ortalamaları, birey sayısı (n), standart sapma (SD) ve ortalamanın standart hatası (SEM)

GRUP	Ortalama	n	SD	SEM
Erkek Sağ NOİ	37013,80	5	3132,34316	1400,826
Erkek Sol NOİ	37013,60	5	5740,15743	2567,076
Dişi Sağ NOİ	38707,00	5	4530,92049	2026,289
Dişi Sol NOİ	39614,40	5	3807,00753	1702,546

**Tablo 19.** Erkek ve dişi sıçan gruplarında grup içi sağ – sol karşılaştırması (eşleştirilmiş t-testi) ile ilgili istatistiksel veriler

GRUP	Paired Differences					t	df	P (Sig) (2-tailed)
	Mean	SD	SEM	%95 Güven aralığı				
				Lower	Upper			
Erkek Sağ NOİ – sol NOİ	,20000	6002,24947	2684,288	-7452,58	7452,977	,000	4	1,000
Dişi sağ NOİ – sol NOİ	-907,400	4684,66384	2095,045	-6724,18	4909,378	-,433	4	,687

Sağ ve sol NOİ değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında yine benzer sonuçlar elde edildi. Student t–testi ile yapılan karşılaştırmada erkek ve dişi hayvanların sağ NOİ'leri için  $p = 0,511$  iken, sol NOİ'ler için  $p = 0,423$  olarak bulunmuştur. Her iki değer de 0,05'ten büyük olduğundan ilgili değerler arasındaki fark anlamlı seviyede değildir. Bu karşılaştırmalarla ilgili sonuçlar, varyansların homojenliğini gösteren sonuçlar ile birlikte Tablo 20'de verilmiştir.

**Tablo 20.** Erkek ve dişi sıçan gruplarında gruplararası sağ – sol karşılaştırması (bağımsız t-testi; 2-tailed) ve varyansların homojenliği ile ilgili istatistiksel veriler

		Levene İstatistiği		t - testi						
		F	P (Sig)	t	df	P (Sig)	Ort. arası fark	SH Farkı	%95 Güven aralığı	
									Alt Sınır	Üst Sınır
SAĞ NOİ'ler	Varyanslar homojen olduğunda	,521	,491	-,687	8	,511	1693,200	2463,3641	7373,73	3987,328
	Varyanslar homojen olmadığında			-,687	7,113	,514	1693,200	2463,3641	7499,51	4113,105
SOL NOİ'ler	Varyanslar homojen olduğunda	1,367	,276	-,844	8	,423	2600,800	3080,3478	2463,36	4502,495
	Varyanslar homojen olmadığında			-,844	6,948	,427	2600,800	3080,3478	2463,36	4694,034

df: serbestlik derecesi, P: olasılık değerleri

NOİ'ye ait toplam nöron sayısı değerleri gruplar içerisinde anlamlı bir farklılık göstermediğinden (erkeklerde aynı çıkmıştır) sağ ve sol tarafların verileri birleştirilerek de karşılaştırma yapıldı. Bu durumda erkek sıçan grubunda NOİ'ye ait ortalama nöron sayısı 37013,7 olurken, dişilerdeki değer 39160,7 olarak çıkmıştır. Ancak verilerin birleştirildiği bu durumda da gruplar arasındaki farklılık anlamlı düzeyde çıkmamıştır (varyanslar homojendir,  $p = 0,742 > 0,05$ ; olasılık değeri  $p = 0,265 > 0,05$ 'dir). Birleştirilmiş verilere ait grup ortalamaları, standart sapma ve standart hataları ile birlikte Tablo 21'de verilmiştir. Bunların karşılaştırmasına ait sonuçlar ise, varyansların homojenliği ile ilgili sonuçlarla birlikte Tablo 22'de verilmiştir.

**Tablo 21.** Grup ortalamaları, birey sayısı (n), standart sapma (SD) ve ortalamanın standart hatası (SEM)

GRUP	n	Ortalama	SD	SEM
Erkek NOİ	10	37013,7	4359,45873	1378,582
Dişi NOİ	10	39160,7	3974,20326	1256,753

**Tablo 22.** Sağ ile sol NOI değerleri birleştirilmiş erkek ve dişi sıçan gruplarında toplam nöron sayısı karşılaştırması (bağımsız t-testi; 2-tailed) ve varyansların homojenliği ile ilgili istatistiksel veriler

		Levene İstatistiği		t - testi						
		F	P (Sig)	t	df	P (Sig)	Ort. arası fark	SH Farkı	%95 Güven aralığı	
									Alt Sınır	Üst Sınır
NOI'ler	Varyanslar homojen olduğunda	,112	,742	-1,151	18	,265	-2147,000	1865,4536	-6066,17	1772,173
	Varyanslar homojen olmadığında			-1,151	17,848	,265	-2147,000	1865,4536	-6068,57	1774,565

df: serbestlik derecesi, P: olasılık değerleri

Pilot çalışma sonucunda NOI'de hesaplanan ortalama toplam nöron sayısı olan 42000 ile esas çalışma sonucunda hesaplanmış birleştirilmemiş (erkeklerde sağ ve sol 37000; dişilerde sağ 38700, sol 39600) ve birleştirilmiş (erkeklerde 37000; dişilerde 39000) veriler arasında da anlamlı bir farklılık belirlenmedi ( $p > 0,05$ ).

Bulgularımız genel olarak değerlendirildiğinde; sıçan NOI'sinde hesapladığımız toplam nöron sayısı değerleri erkek ve dişiler arasında ve sağ ile sol taraflar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi şeklinde özetlenebilir.

## TARTIŞMA

Sunulan çalışma, olivoserebellar sistemin beyin sapı parçası olan NOİ için literatürde bildirilen tutarsız ve çelişkili toplam nöron sayısı değerlerinin olası nedenlerini araştırmak ve bu parametre için altın standart olarak kabul edilebilecek bir kantitasyon standardı tespit etmek üzere planlanmış metoda yönelik bir çalışmadır. Bu amaçla, öncelikle uygulamada da tarafsız olan ancak uygulanmasındaki zorluklarından dolayı pek tercih edilmeyen fiziksel fraksiyonlama isimli stereolojik metodun kullanılması tercih edildi. Nöron sayısının belirlenmesinde, ilgili metodun kullanımını kolaylaştıran ve etkin bir hücre sayımı yapılmasını sağlayan anabilim dalımızda geliştirilen bir yaklaşımdan yararlanıldı. Uygulamada ayrıca, NOİ'de gerçekleştirilen kantitatif çalışmalar arasındaki veri tutarsızlığına sebep olduğunu tespit ettiğimiz tanımlama problemlerinin giderilmesine ve stereolojik çalışmalar için öngörülen uygulama kurallarına uymaya özen gösterildi. NOİ çalışmalarında sıçanlar sıkça tercih edilen hayvan türü oldukları için çalışmamız bu türde gerçekleştirildi. Her iki cinsiyetin, üstelik sağ ve sol tarafları ile birlikte ele alınması ise olası bir farklılığı ortaya koymak, sonuçları karşılaştırmak, ayrıca (fark çıkmaması durumunda) veri sayısını artırma amaçlarına yönelikti.

Çalışmamız esas olarak hücre sayımına yönelik metodoloji üzerine bina edildiğinden bu tartışma bölümünde ağırlıklı olarak bu konu üzerinde durulacaktır. Ancak bunun öncesinde çalışmamızda elde edilen toplam nöron sayısı bulguları kısaca diğer NOİ çalışmalarında bildirilenlerle karşılaştırılacaktır. İkinci alt başlık altında, kantitatif NOİ çalışmalarında belirlenen farklı nöron sayısı değerlerinin olası nedenleri tartışılacaktır. Son olarak sunulan çalışmaya ait metodoloji değerlendirilecektir.

### **1. NOİ'de HESAPLANAN TOPLAM NÖRON SAYISI DEĞERLERİNİN DİĞER ÇALIŞMALARDA BİLDİRİLENLER İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Bu başlık altında; tespit edebildiğimiz kantitatif NOİ çalışmalarındaki metodolojik farklılıklar göz önünde bulundurmadan, bildirdikleri verileri çalışma sonuçlarımız ile karşılaştıracamız. Oldukça farklı amaçlarla gerçekleştirilmiş bu NOİ çalışmaları, kullanılan hayvan türü, araştırma seviyesi ve değerlendirilen parametreler

bakımından da farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle buradaki karşılaştırmalarda bu çalışmaların sadece konumuz ile ilgili olan toplam nöron sayısı bulguları ve kıyaslamada bulunabileceğimiz cinsiyet farklılıkları ve sağ-sol karşılaştırmalarına ait verileri kullanılacaktır.

Sıçan NOI'sinde gerçekleştirdiğimiz nöron sayımı sonuçları bu parametrenin ne erkek ve dişi sıçanlar arasında, ne de kendi içlerinde sağ ve sol tarafları arasında anlamlı bir farklılık düzeyinde olmadığını göstermektedir. Sağ (erkek sağ N = 37014, dişi sağ N = 38707) ve sol (erkek sol N = 37014, dişi sol N = 39614) taraf verileri birleştirilerek (birleştirilmiş erkek N = 37014, birleştirilmiş dişi sol N = 39161) ele alındığında da sonucun değişmediği gözlenmiştir.

Toplam nöron sayısının erkek ve dişiler ile onların sağ ve sol tarafları arasında farklılık göstermediği ile ilgili bulgumuz şekil bakımından, tespit edebildiğimiz tüm kantitatif NOI çalışmalarının bulguları ile uyuşmaktadır. Gerek insanlarda (Pine ve ark., 1997; Sjöbeck ve ark., 1999; Nishie ve ark., 2002 ve 2004; Tsuchiya ve ark., 2005), gerekse sıçan (Bourrat ve Sotelo, 1984; Delhaye-Bouchaud ve ark., 1985; Napper ve West, 1995; Cunningham ve ark., 1999; Maier ve West, 2003) ve farelerdeki (Blatt ve Eisenman, 1985; Frederic ve ark., 1992; Herrup ve ark., 1996; Zanjani ve ark., 1994, 1997 ve 2004) çalışmaların hiçbirinde NOI'deki nöron sayısı bakımından cinsiyet ve bunların sağ ve sol taraflarındaki farklılığına ait bir bulguya rastlanılmadı. Hatta bu nedenle bu çalışmaların bazısının sadece tek bir cinsiyette gerçekleştirildiği, bazısında ise grupların eşit sayıda dişi ve erkek denekler ile oluşturulduğu tespit edildi. Benzer durumun sağ ve sol taraflar içinde geçerli olduğu gözlemlendi. Örneğin sıçanlarda yapılan çalışmalardan ikisinde (Delhaye-Bouchaud ve ark., 1985; Korkmaz ve Çiftçi, 1999) yetişkin yaş grubuyla birlikte altı ayrı yaş (0, 5, 10, 15 ve 20 günlük) grubunun hem sağ hem de sol NOI'lerinde sayım yapılmış ve hiçbir grupta sağ ve sol taraflar arasında farklılık bildirilmemiştir. Bourrat ve Sotelo (1984) ise benzer yaş gruplarında her hayvanda rasgele olarak seçtikleri sağ veya sol NOI'de sayım yapmışlardır. Napper ve West (1995) ise NOI'yi sağ-sol ayırımı yapmadan bir bütün olarak ele alıp çalışırken, Cunningham ve arkadaşları (1999) sayımda sadece sol sıçan NOI'sini kullanmışlardır. İnsan ve fare NOI'sinde gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da benzer uygulamaların olduğunu gözlemledik.

Toplam nöron sayısına ait bulgularımız şekli yönüyle tüm bu çalışmaların bulgularıyla paralellik göstermekle birlikte, çalıştığımız tür olan sıçanlarda gerçekleştirilen çalışmalardaki NOİ için bildirilen değerler bakımından büyük farklılıklar göstermektedir.

Sıçan NOİ'sine ait toplam nöron sayısı verisi bildiren çalışmalardan literatürde tarayabildiklerimizin bulguları Tablo 23'de özetlenmiş ve çalışma bulgularımız ile karşılaştırılmıştır. Tablodan açıkça görüleceği gibi; sunulan çalışmadaki toplam nöron sayısına ait bulgumuz diğer çalışmalar ile uyum halinde olmadığı gibi, diğer çalışmaların bulguları da birbirleriyle çelişkilidir. Tablo dikkatlice incelendiğinde; çalışmamızdaki bulgu ile diğerleri arasında olan farklılığının, hesapladığımız nöron sayısındaki fazlalıkta olduğu görülecektir. Bir başka ifade ile; karşılaştırma sonuçlarımızı şu şekilde genelleyebiliriz: Hesapladığımız N değeri, Tablo 23'de verilen ilişkili çalışmalarda bildirilenlerden çok daha fazladır. Bu tabloda yer alan çalışmaların (burda gösterilmeyen diğer verileri ile birlikte) kendi içlerinde birbirleri ile çelişen yönleri 'Giriş' bölümünde ele alındığı için, takip eden kısımda sadece bunların çalışmamızdaki N değeri ile ilgili karşılaştırmaları yapılacaktır.

Tablo 23. Yetişkin sıçan NOİ'sine ait toplam nöron sayısı (N) verilerimiz ile diğer çalışmalarda bildirilenlerin karşılaştırması

Kaynak	Yaş Grubu	Denek Sayısı ve Cinsiyet		N
<b>Sunulan Çalışma</b>	<b>30 günlük</b>	<b>10</b>	<b>(5E + 5D)</b>	<b>38314*</b>
Bourrat ve Sotelo, 1984	33 günlük	3	D	25500†
Delhaye-Bouchaud ve ark., 1985	Erişkin	3	E	28385*
Napper ve West, 1995	Erişkin	6	(3E + 3D)	30955‡
Korkmaz ve Çiftçi, 1999	30 günlük	5	E	26278*
Cunningham ve ark., 1999	30 günlük	5	Belirtilmemiş	17731
Maier ve West, 2003	10 günlük	6	(3E + 3D)	8880

\*Sağ ve sol taraflar ayrı ayrı sayılmış; buradaki değer tarafların ortalamasıdır

†Sağ ve sol taraflar rasgele seçilmiş

Bu konuda tespit edebildiğimiz ilk çalışma Bourrat ve Sotelo (1984) tarafından gerçekleştirilmiştir. Doğumdan itibaren postnatal 33. güne kadar olan dönemde 6 grup halinde NOİ'deki nöronların nasıl bir sayısal gelişim ve değişim gösterdiğinin araştırıldığı bu çalışmada kıyaslama yapabileceğimiz veri, 33 günlük sıçanlar ile oluşturulan yetişkin grubuna aittir. Ancak bu çalışmada nöron sayısına ait veriler sayısal olarak yayınlanmamıştır. Bulguların sadece grafik halinde bildirildiği bu çalışmada yetişkin sıçan NOİ'sindeki toplam nöron sayısının yaklaşık 25500 ( $\pm 1000$ ) civarında olduğunu okumak mümkündür. Bu değer, bizim hesapladığımız toplam nöron sayısına göre  $\sim$  % 35 oranında daha düşük bir seviyededir.

Delhaye-Bouchaud ve arkadaşlarının (1985) çalışması da yine NOİ'nin postnatal gelişimi ile ilgili olup kıyaslama yapabileceğimiz yaş grubu yetişkin (çalışmada bu grup sıçanların kaç günlük olduğu bildirilmemiştir) grubudur. Burada da yine verilerimizin örtüşmediğini görüyoruz. Bildirilen N değeri (28385) ile bizim verimiz arasında % 25'ten daha fazla bir fark vardır.

Tarama sonuçlarımıza göre; yukarıdaki bu iki çalışma dışında, sıçan NOİ'si için toplam nöron sayısı bildiren diğer çalışmaların varsayımlara dayanmayan stereolojik metotlarla gerçekleştirilmiş olduğunu tespit ettik. Ancak çalışmamız ile bunlardaki nöron sayısı bulgularının paralellik göstermemesi konusunda herhangi bir değişme olmamıştır. Beyin gelişimi sırasında alkole maruz bırakılan sıçanlarda nöron kaybının bildirildiği bir çalışmada (Napper ve West, 1995), her iki taraftaki NOİ bir bütün olarak ele alınarak hesaplama yapılmış ve kontrol grubu erişkin sıçanlar için toplam nöron sayısı  $\sim$  60000 olarak belirlenmiştir. Bu durumda tek taraflı NOİ'ye düşen sayı  $\sim$  30000 olmaktadır ki, bu sayı Tablo 23'de gösterilen NOİ çalışmaları içerisinde çalışma bulgumuz olan  $\sim$  38000'e en yakın olanıdır. Ancak her iki değer arasında yine de  $\sim$  % 20 oranında bir fark vardır.

Stereolojik metotlar kullanılarak gerçekleştirilmiş bir başka NOİ çalışması (Korkmaz ve Çiftçi, 1999), anabilim dalımızda gerçekleştirilmiştir. Ancak bulgularımız bu çalışmanın sonuçlarıyla da çelişki halindedir. NOİ'deki nöron sayısının ontolojik gelişiminin araştırıldığı bu çalışmada 30 günlük sıçan grubu için ortalama N değeri 26278 olarak hesaplanmıştır. Sunulan çalışmadakine göre  $\sim$  12000 nöron kadar daha düşük bir değer.



Sıçan NOI'sine ait tespit ettiğimiz en dikkat çekici değer, Cunningham ve arkadaşlarının (1999) çalışmasında gözlemlendi. Postnatal gelişim sürecinde NOI'deki nöron sayısı değişiminin araştırıldığı ve yine varsayımlara dayanmayan stereolojik metotlar ile gerçekleştirilen bu çalışmada, yukarıda değinilen benzer ontolojik çalışmalarda olduğu gibi postnatal 0. günden itibaren 30. güne kadar farklı hayvan grupları kullanılmıştır. Yetişkin sıçan grubu (30 günlük) için bildirilen N değeri 17731'dir. Bu, belirlediğimiz N değerinin yarısından da daha düşük bir değerdir (~ % 54 oranında daha az). Üstelik bu çalışmada N'in belirlenmesinde kullanılan stereolojik metot, sunulan çalışmada kullandığımız ve uygulamada da tarafsız olduğu bildirilen (Dorph-Petersen ve ark., 2001) fiziksel disektör yaklaşımıdır.

Özetlenecek olunursa; sıçan NOI'si için nöron sayısı bildiren çalışmaların bulguları kendi içlerinde çelişki halinde oldukları gibi, bunların hepsinden daha yüksek bir nöron sayısı değeri hesapladığımız sunulan çalışmadaki bulgularımız ile de uyuşmamaktadır. Bu uyuşmazlık, ilgili çalışmalarda kullanılan sayım metodunun taraflı veya tarafsız olmasıyla da ilişkili bulunmamıştır.

Şimdi de, sıçanlardakiler ile birlikte NOI'de gerçekleştirilen diğer tüm kantitatif çalışmalarda kullanılan nöron sayımı metodolojilerini irdeleyerek burada ve 'Giriş' bölümünde belirttiğimiz çelişkilerin olası nedenleri arasında tespit edebildiklerimiz üzerinde duralım.

## **2. NOI ÇALIŞMALARINDA NÖRON SAYIMI İÇİN KULLANILAN SAYIM METODOLOJİLERİNE AİT DEĞERLENDİRMELER**

Histolojik kesitlerde hücre sayımı işlemi, biyomedikal araştırmaların çoğu zaman gerekli bazen de ümit edilmedik bir parçasını oluşturur (Howard ve Reed, 1998; Guillery, 2002; Geuna, 2005). 'Giriş' bölümünde de değinildiği gibi, bu durum NOI'de gerçekleştirilen çok sayıdaki deneysel ve klinik çalışmalar için de geçerlidir. Ancak kesitlerdeki görüntülerden yola çıkılarak nöron sayısı parametresinin belirlenmesinde yüz yılı aşkın bir süredir halen çözümlenememiş problemlerin bulunması, bu işlemin görüldüğünden çok daha karmaşık olduğunu göstermektedir. Örneğin; Hedreen ve Vonsattel (1997) tarafından atıfta bulunulan ondokuzuncu yüzyıl sonlarına ait bir

çalışmada<sup>1</sup>, araştırmacıların tavşan spinal ganglionunda sinir lifi ve nöron sayısını araştırırken profil sayımı hatalarını gidermek üzere bir düzeltme faktörü geliştirip kullandıkları bildirilmektedirler. Yirminci yüzyıl başlarında William R Thompson isimli bir başka araştırmacının<sup>2</sup> günümüzde sıkça kullanılan stereolojik metotların esaslarını tanımladığı bildirilmiştir (Gundersen, 1986). Aynı dönemde yayınlanan iki çalışma daha var ki (Floderus, 1944; Abercrombie, 1946) bunlarda önerilen düzeltme faktörleri günümüz hücre sayımı çalışmalarında halen kullanılmaktadır. Sonraki yıllarda (özellikle de 80'li yıllardan sonra) çok sayıda başka sayım teknikleri ve düzeltme faktörleri geliştirilmiştir. Tüm bu metotların artı ve eksileri ile ilgili değerlendirmeler ve bunlardan hangilerinin tercih edilmesi gerektiği günümüzün halen süregelen önemli bir tartışma konusudur (Coggeshall ve Lekan, 1996; Saper, 1996 ve 1997; Guillery ve Herrup, 1997; Hedreen, 1998; Hatton ve von Bartheld, 1999; Geuna, 2000; Farel, 2002; West, 1993, 1994 ve 1999; West ve Slomianka, 2001; Benes ve Lange, 2001; Dorph-Petersen ve ark., 2001; Guillery, 2002; Gardella ve ark., 2003). Modern sayım metotlarına olan ilgiyi, tüm dünyada sürekli olarak düzenlenen kurslar ve bu konuda sürekli güncellenen derleme (Braengaard ve Gundersen, 1986; Gundersen, 1986, Gundersen ve ark., 1988a ve b; Cruz-Orive ve Weibel, 1990; Coggeshall, 1992; Mayhew ve Gundersen, 1996; Dorph-Petersen ve ark., 2001; Geuna, 2005) ve kitaplar (Reith ve Mayhew, 1988; Howard ve Reed, 1998; Russ ve Dehoff, 2000; Mouton, 2002; Howard, 2005; Glaser ve ark., 2007) ile de görmek mümkündür.

Histolojik kesitlerden hücre sayısı parametresinin belirlenip hesaplanmasını etkileyen faktörler, karşılaşılan problemler ve önerilen çözüm yolları ile ilgili açıklamalar, bir kısmını yukarıda belirttiğimiz ilgili literatürde detaylıca işlendiğinden; bu başlık altındaki irdeleme ve karşılaştırmalarda sadece ilgili literatür ışığında tespit edebildiğimiz problemler ortaya konacaktır. Bu hata kaynakları yukarıda verilen kaynaklarda etraflıca ele alındığından burada tekrar tekrar atıfta bulunmak yerine (özellik arzeden bazı durumlar haricinde) ilgili problemlerin adları ile yetinilecektir.

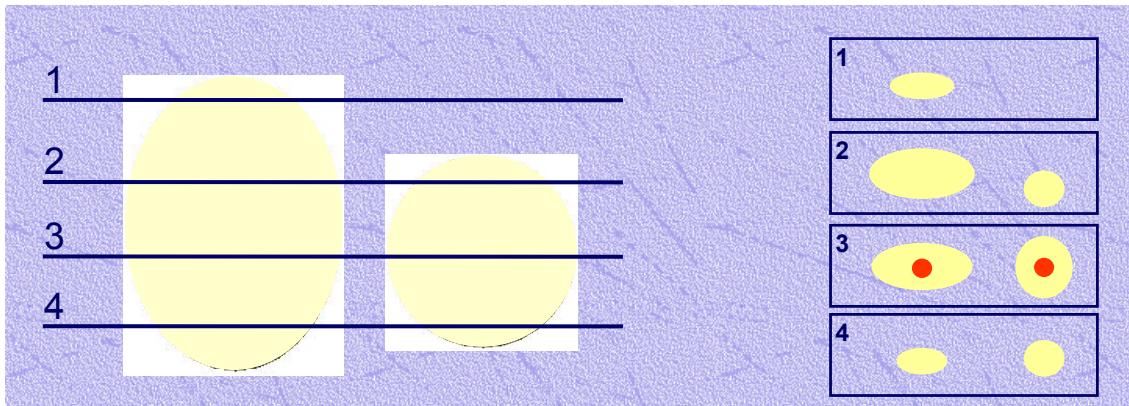
---

<sup>1</sup> Atıfta bulunulan ilgili çalışma Almanya'da bir fizyoloji dergisinde yayınlanmıştır: Gaule J.ve Lewin T., 1896. Über die Zahlen der Nervenfasern und Ganglienzellen in den Spinalganglien des Kaninchens. *Centralbl Physiol* 10; 437 – 471.

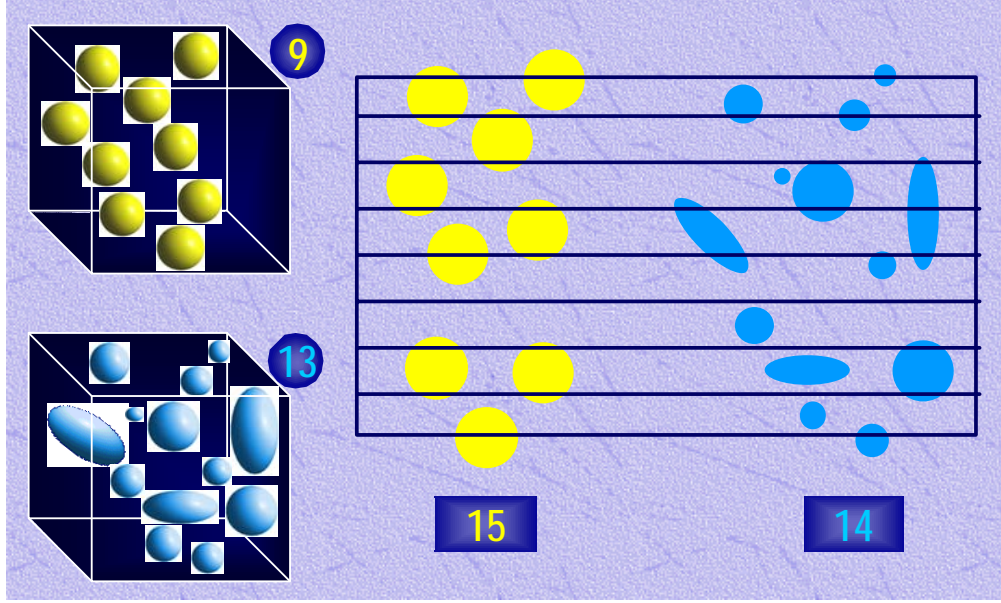
<sup>2</sup> Thompson W.R.,1932. The geometric properties of microscopic configurations. I. General aspects of projectometry. *Biometrika* 24, 21 – 26. Histolojik kesitlerde sayımı yapılacak objelerin şekilleri hakkında herhangi bir varsayımda bulunmadan onların sayısını belirlemek için gerekli esasların tanımlandığı bu çalışma, 80'li yılların ortalarına kadar gözardı edilmiştir.

## 2.1. İnsan NOİ'sindeki Sayım Çalışmaları

İnsan NOİ'sinde gerçekleştirilen nöron sayımı araştırmaları incelendiğimizde; hepsinde varsayımlara dayanan sayım metotlarının kullanıldığını, kullandıkları metodun yanlış uygulandığını, toplam nöron sayısı yerine çok farklı şekilde yorumlanabilecek hücre yoğunluğu parametresini kullandıklarını ve örneklemeyi taraflı şekilde yaptıklarını tespit ettik. Down sendromlu bebeklerde NOİ sayısını hesaplayan Pine ve arkadaşları (1997), bu parametreyi belirlemek için her bireyde sadece NOİ'nin ortasından geçen kesitleri kullanmışlardır. Yani bütünü tamamiyle temsil etmeyen bir yerde çalışmışlardır (örnekleme hatası). Üstelik elde ettikleri kesitlerdeki görüntü alanında nöron profili yoğunluğunu hesaplamışlardır. Belirli bir kesit alanındaki ( $\text{mm}^2$  gibi) profil sayısı değeri, gerçekte ilişkilendirilmesi hemen hemen imkansız olan bir parametredir. Çünkü üç boyutlu olan nöronlar kesitlerde sadece iki boyutlu olarak gözlemlenirler. Objelerin kesitlerde ortaya çıkma olasılığı ise, onların büyüklük ve şekilleri ile doğrudan orantılı olduğundan kesitlerde verdikleri profiller onların gerçekteki sayılarını yansıtmaz. Örneğin daha büyük olan bir hücre, kendisinden daha küçük olan başka bir hücreye göre kesitlerde doğal olarak daha fazla ortaya çıkacaktır. Sonuçta her ikisinin gerçekteki sayıları aynı olduğu halde kesitlerdeki profillerinin sayısı farklı olacaktır. Benzer durum, hücrelerin şekilleri ve kesit alım yönüne göre olan yönelimleri için de geçerlidir (Şekil 25 ve 26). Halbuki bu tarz sayımlarda objelerin sadece kesitlerdeki görüntüsü olan profiller sayıldıkları halde, yorumda bulunurken hücre sözcüğü kullanılmaktadır. Bu durumu düzeltmek için çalışmada kullanılan Abercrombie (1946) ve benzeri düzeltme faktörlerindeki (Floderus, 1944; Konigsmark,



**Şekil 25.** Büyük objeler küçük olanlara göre kesitlerde saha sık görünürler. Şeklin sol tarafında birer tane çekirdek içeren iki adet hücre temsil edilmiştir. Sağ tarafta ise kesitlerde verdikleri profiller gösterilmiştir. Büyük hücre üç kesitte gözlenirken küçük olan iki kesitte gözlenmektedir. Büyüklüğün değişmesi ile gerçek değer değişmeyeceği halde, kesitlerde gözlenme sıklıkları değişecektir. Yani kesitler bize gerçek bilgiyi doğrudan sağlamamaktadırlar (Korkmaz ve Ayas, 2003).



**Şekil 26.** Bir yapının kesitlerde gözlenme sıklığı onun büyüklük, şekil ve yönelimine bağlıdır. Sadece kesitlerdeki profillerin sayımı bize çoğu durumlarda gerçek değeri (sırasıyla; gerçekteki 9 ve 13 obje yerine, 15 ve 14 profil çıkabilmesi gibi) vermeyecektir. Sol tarafta üç boyutlu ortamda hücreler, sağ tarafta kesitlerdeki görüntüleri verilmiştir (Korkmaz ve Ayas, 2003).

1970) varsayımların gerçekte meydana gelip gelmediği hiçbir zaman bilinmeyeceği için, bu da sonucu değiştirmeyecektir. Örneğin düzeltme faktörü olarak önerilen bu formüllerin geçerli olabilmesi için çekirdek veya çekirdekçiklerin küre şeklinde oldukları, izotropik veya gelişigüzel dağılım gösterdikleri, tüm gruplarda dokunun eşit derecede büzülme ve/veya şişme gösterdiği varsayılır. Halbuki tüm bunların gerçekleşip gerçekleşmediğini bilmek veya kontrol etmek neredeyse imkansız gibidir. Bu çalışmanın ilginç bir tarafı da, araştırmacıların varsayımlarda bulunmayı gerektirmeyen stereolojik tekniklerin farkında olmalarına rağmen onları tercih etmemeleridir. Bunun için de iki neden göstermektedirler: (1) araştırmacılara göre kontrol ile denek grupları arasında karşılaştırma yaparken stereolojik metotlar ile kullandıkları profil sayımı yöntemi arasında herhangi bir fark bulunmamaktadır, (2) stereolojik teknikler uygulanışı çok vakit alıcıdır. Halbuki yapılan çalışmalar durumun hiç de böyle olmadığını, aksine varsayımlara dayan metotlar ile tamamen farklı sonuçların elde edilebileceği hem teorik hem de uygulamalı olarak gösterilmiştir (Braengaard ve Gundersen, 1986; Oorschot, 1994). Stereolojik tekniklerin vakit alıcı olması ile ilgili kısım, bundan sonraki alt başlıkta ele alınacaktır.

Yaşlanma ile birlikte beyin sapı ve beyincikte nöron ölümünün olup olmadığını araştıran Sjöbeck ve arkadaşlarının (1999) çalışmalarında da benzer hata kaynaklarını

tespit ettik. Bu araştırmacılar çalışmalarını beyincik ve NOI'nin birlikte gözlendiği tek bir kesitte gerçekleştirmişler (rnekleme hatası) ve burada milimetre kareye düşen nöron profili sayısını belirlemişlerdir (profil sayımı). Her iki çalışmanın sonuçlarını karşılaştırdığımızda, profil sayımlarının birbirlerinden ne kadar uzak sonuçlar verebileceği gerçeğini tekrar görmekteyiz (Pine ve arkadaşları NOI'de mm<sup>2</sup>'ye düşen nöron sayısını 139 olarak bildirirken, Sjöbeck ve arkadaşları aynı parametreyi ~ 0,5 olarak bildirmektedirler).

Farklı grupların karşılaştırılmasında NOI'deki nöron sayısının kullanıldığı u klinik çalışmada da örnekleme tamamen yanlış yapıldığı ve sayımda anlam ifade etmeyecek yöntemler kullanıldığı gözlendi. Örneğin, Nishie ve arkadaşları (2002) nöron sayımını NOI'nin güzel grndği kesitlerde gerçekleştirmiştir. Buna göre, güzel çıkmayan kesitlerin çalışmaya katkısı olamaz! Makoto Nishie başka bir araştırıcı grubuyla (Nishie ve ark., 2004), medulla oblongatanın orta kısmından aldığı kesitlerde NOI nöronlarını saydığını bildirmektedir. Nukleusun diğer kısımları hesaplamaya katılmadığı için örnekleme tam yapılmamıştır (rnekleme hatası). Sadece bu hata bile, çalışmanın geri kalan kısımları nasıl yapılırsa yapılsın onu taraflı kılar. Her iki çalışmada da immünohistokimyasal işaretleme yapılmış ve belli kesitlerdeki oküler görüntü alanlarında farklı işaretleme nöron profilleri sayılıp karşılaştırmalarda bulunulmuştur. Yukarıda değinildiği gibi, profil sayımları doğrudan gerçek sayı ile ilişkilendirilemez. Tsuchiya ve arkadaşlarının (2005) alışmasında ise örnekleme nasıl yapıldığına açıklık getirilmemiştir. Nöron sayısı karşılaştırmasında ise kantitatif bir yaklaşım yerine; az, çok, şiddetli gibi dereceleri olan kalitatif bir değerlendirme yöntemini kullanmışlardır. Bu seviyede bir belirlemede bulunabilmek için gruplar arası farkların % 40'ların üzerinde olması gerektiği bilinmektedir. Halbuki gruplar arasında anlamlı olarak tespit edilen farklılıklar çok ender durumlarda bu seviyelere çıkar. Bu durumda da kesit görüntüleri birbirlerine benzediği halde aralarında var olan farklılıklar tespit edilemeyecektir. Tsuchiya ve arkadaşları (2005) alışmalarında sadece profillere baktıklarından, gözlemledikleri farklılıklar çok olsa bile yine de yanılabilirler. Örneğin arttı dedikleri hücrelerin ilgili grupta artmadıklarını, sadece büyüklüklerinin arttığını varsayalım. Bu durumda da kesitlerde daha çok gzleneceklerdir (bkz şekil 25 ve 26).

## 2.2. Fare NOI'sindeki Sayım Çalışmaları

İnsan NOI'si çalışmalarında olduğu gibi, tespit edebildiğimiz sıçan NOI'sine ait kantitatif çalışmaların hemen hepsinde varsayımlara dayanan sayım tekniklerinin kullanıldığını ve örnekleme hatalarının yapıldığını gözlemledik. Dolayısıyla bu çalışmalar arasında var olan ve 'Giriş' bölümünde belirtilen çelişkili bulgulara bu uygulamaların neden olduğunu söylemek mümkündür. Örneğin, ikisi de yetişkin farelerde ve aynı yöntemle NOI'deki nöron sayısını hesapladıkları halde birisinde (Blatt ve Eisenman, 1985) bu değer 37000 çıkarken, diğerinde (Frederic ve ark., 1992) 11700 olarak bulunmuştur (üç katından daha fazla bir farklılık).

Durumu daha da dramatik bir şekilde ortaya koyan bir başka örnek de; iki farklı çalışmadaki bu çelişki yerine, aynı araştırmacı grubunun verilerindeki farklılıklar ile kendini göstermektedir. Fare NOI'sinde oldukça yoğun çalışmalar yapan Zanjani ve arkadaşları 1997 yılında yayınladıkları bir çalışmalarında şöyle bir ifade kullanmaktadırlar (sayfa 504) '*verilerimizi daha önce yayınlanmış bize ve diğer araştırmacılara ait çalışmalar ile doğrudan karşılaştırabilmek için, hücre sayımlarımız için yeni geliştirilen stereolojik teknikler yerine geleneksel düzeltme faktörlerini kullanmayı tercih ettik*'. Bu ifadeden; araştırmacıların her iki yöntemle farklı sonuçlar çıkabileceğini düşündükleri ve kullandıkları metodun eksik yanlarının farkında olduklarını, ancak karşılaştırma amaçlı eski yaklaşımı tercih ettikleri sonucu çıkarılabilir. Bu çalışmanın sonunda da kontrol grubu yetişkin fare NOI'si için buldukları 14250 değerinin diğer çalışmalarında (Shojaeian ve ark., 1985a ve b; Zanjani ve ark., 1992) bulduklarından farklı olmadığını ifade ederler. Zanjani ve arkadaşları (1997) bu çalışmalarında yukarıda verdiğimiz iki kaynaktan (Blatt ve Eisenman, 1985; Frederic ve ark., 1992) sadece Blatt ve Eisenman'a ait olanına atıfta bulunmuşlardır. Buldukları nöron sayısı değeri, bu her iki çalışmanınki ile çelişki halinde olduğu halde çalışmalarında buna değinmemişlerdir. Sadece Blatt ve Eisenman'ın çalışmalarına ait başka bir bulguya atıfta bulunulduğunu gözlemledik. Her ne kadar Zanjani ve arkadaşları (1997) bu çalışmalarındaki bulgularının eski çalışmalarındaki ile uyum halinde olduğunu belirtse de, bu değer diğer araştırmacıların çalışmaları ile uyuşmadığı açıktır. Üstelik aynı araştırmacılar üç yıl önce yayınlanan bir başka çalışmalarında (Zanjani ve ark., 1994) NOI için hesapladıkları 10025 değerinin neden buldukları 14225'den farklı olduğuna değinmemişlerdir. Aynı araştırmacılar daha sonraki

yıllarda (Zanjani ve ark., 2004) aynı değeri 1994 yılındaki çalışmalarına benzer şekilde 10165 olarak hesaplamışlardır. Görüleceği gibi hesapladıkları değer; değil yalnız başka araştırmacıları ile, kendi çalışmaları arasında da farklılık göstermiştir.

Retinoik asitin NOİ gelişimine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Yamamoto, 2005) nöron sayısının belirlenmesinde stereolojik yöntemler kullanılmış, ancak doğru uygulanmamıştır. Araştırmacılar; 18 günlük embriyoların beyinlerinden aldıkları ince kesitlerde disektör metodunu kullandıklarını belirttikleri halde, bu uygulama için zorunluluk olan kesit çiftleri (Sterio, 1984; Gundersen, 1986) kullanmamışlardır<sup>3</sup>. Bu durumda metodu nasıl uygulamışlardır, bilinmemektedir. NOİ sınırları içerisinde saydıkları profilleri o alana bölerek nöron yoğunluğunu hesapladıklarını ifade etmektedirler (profil sayıp nöron olduğunu ileri sürme hatası).

### 2.3. Sıçan NOİ'sindeki Sayım Çalışmaları

Bu türde yapılan eski ve yeni tarihli çalışmalarda hem varsayımlara dayanan eski metotların, hem de modern stereolojik metotların kullanıldığını görmek mümkündür. Bu türde tespit edebildiğimiz ilk çalışmalar Bourrat ve Sotelo (1984) ile Delhaye-Bouchaud ve arkadaşlarına (1985) aittir. Her iki çalışma da fare çalışmalarında olduğu gibi varsayımlara dayanan sayım teknikleri ve düzeltme faktörleri kullanılmış olup, kullanılan örneklemeler de NOİ'nin tümünü temsil etmekten uzaktır. Nitekim her iki çalışmada da yetişkin sıçanlar için bildirilen değerler arasında ~ % 13 oranında bir fark vardır (sırasıyla, ~ 25000'e karşılık ~ 28500). NOİ gelişimini araştıran bu çalışmalarda kullanılan diğer yaş grupları arasındaki fark daha da fazladır; üstelik de yönü değişkenlik göstermektedir (yani çalışmanın birinde bir yaş grubunda olan fazlalık, başka yaş grubu karşılaştırmalarında azalma göstermektedir). Örneğin 5 günlük sıçanlarda aradaki fark ters yönde olmak üzere % 25 olmaktadır (sırasıyla, ~ 28000'e karşılık ~ 21000). Bir başka açıdan bakılacak olursa, birinin yetişkin sıçan NOİ'si için bildirdiği değeri, diğeri 5 günlükler için bildirmiş.

Taramalarımızda varsayımlara dayanan metotlarla gerçekleştirilmiş yeni tarihli sıçan NOİ'si çalışmaları da gözledik. İmmünohistokimyasal işaretlemelerin kullanıldığı bu çalışmaların birinde (Zhang ve ark., 2003) sayım için her hayvanda NOİ'nin belirli bir yerinden alınmış sadece üç kesit kullanılmış (hem yanlış, hem de yetersiz

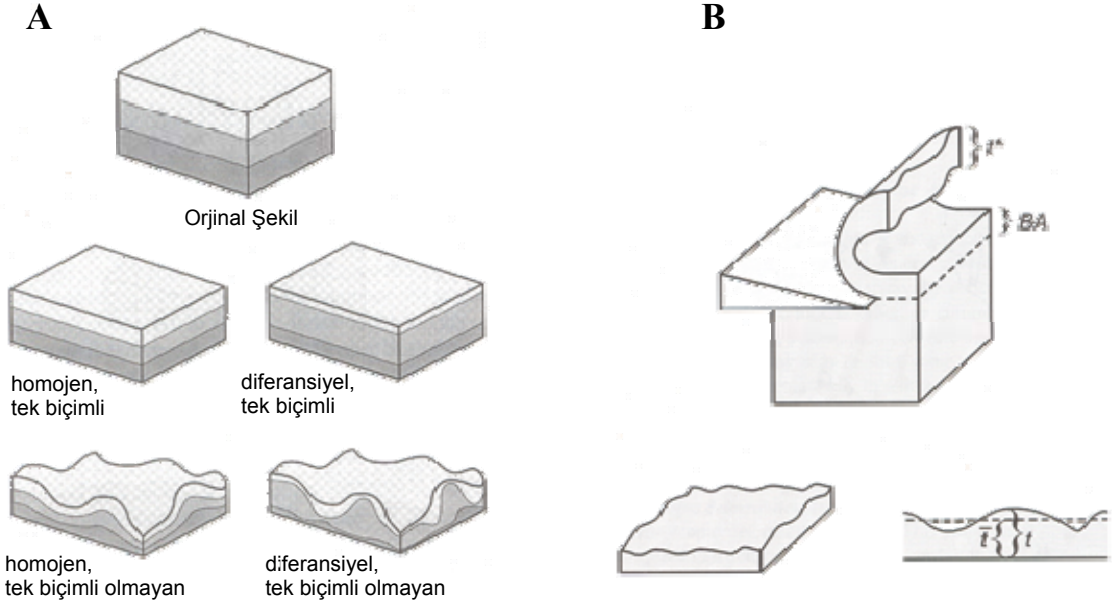
<sup>3</sup> Araştırmacılar kullandıkları metodun adını da yanlış yazmışlardır. İngilizce *disector* olarak yazılan metot adı *dissector* olarak ifade edilmiştir.

örnekleme), karşılaştırmada kesit başına düşen pozitif nöron profillerinin sayısı kullanılmış (profil sayısı nöron olarak kabul edilmiş). Tespit ettiğimiz başka bir çalışmada da (Viscomi ve ark., 2005) benzer uygulamaların olduğunu gözlemledik.

Sıçan NOİ'sinde stereolojik yöntemlerle gerçekleştirilmiş dört adet çalışma tespit edebildik (Tablo 23). Bu çalışmalarda, karşılaştırma için kullanılabilir eşdeğer yaş grupları için bildirilen değerlerin birbirleriyle uyuşmadığına ilk alt başlık altında değinilmişti. Bunun olası nedenleri arasında uygulama hatalarının yanısıra, stereolojik metotların uygulanması sırasında histolojik işlemin tabiatından dolayı ortaya çıkan ve henüz yeni (son 5 – 6 yıl içerisinde) tanımlanmış hata kaynaklarının da olabileceğini düşünmekteyiz. Napper ve West (1995) ile Maier ve West (2003) toplam nöron sayısı hesaplamalarında optik disektör tekniğini kullanmışlardır. Bu yaklaşıma göre toplam nöron sayısı; optik disektörler ile hesaplanan nöron yoğunluğunun, Cavalieri yöntemiyle (Gundersen ve ark., 1988a) belirlenen NOİ hacmiyle çarpılması yoluyla hesaplanır. Her iki çalışmada da tespit edebildiğimiz en önemli eksiklik; optik disektörün tanımlandığı orjinal makalede (Gundersen, 1986) de belirtildiği gibi, kesitteki büzüşmenin hesaplanması zorunluluğunun yerine getirilmediğidir. Burada toplam nöron sayısı, nöron yoğunluğu ve NOİ hacminin bir fonksiyonu olduğu için sonuç doğrudan yoğunluk hesabına katılan kesit kalınlığından etkilenecektir. Halbuki ilgili yayınlarda kesit kalınlığının ve büzüşme derecesinin nasıl hesaplandığı veya tartışıldığı bir kısım göremedik. Tespit edebildiğimiz ikinci bir konu, NOİ sınırları ile ilgilidir. NOİ, kesitlerde yer yer dağınık alanlardan meydana geldiği için bu araştırmacılar bunları birleştirerek ele aldıklarını ifade etmişlerdir. Bu da başka çalışmalar ile olan karşılaştırmaları güçleştiren etkenlerden birini oluşturacaktır.

Optik disektör ile yapılan çalışmalarda neden tutarsızlıklar olabildiğini ve olası hata kaynaklarını araştıran ayrıca çözüm önerilerinde bulunulan çalışmalarda (Hatton ve von Bartheld, 1999; Dorph-Petersen ve ark., 2001; Guillery, 2002; Gardella ve ark., 2003; Geuna, 2005) dokuların histolojik takibinden tek yönlü etkilenmediklerini, bu etkinin çoğu durumda oldukça karmaşık şekillerde meydana gelebileceğini (Şekil 27a) ve kesit kalınlığının ilk alınan nominal kalınlıktan çok farklı olabileceğini ortaya koymuştur. Bu etkinin parafin kesitlerin yanı sıra, büzüşmediği iddia edildiğinden stereolojik çalışmalarda bir dönem sıkça kullanılan glikolmetakrilat gibi plastik madde kesitleri için de geçerli olduğu gösterilmiştir. Hatta kesitlerin alım işlemi sonrasında





**Şekil 27.** A, Doku blokları veya kalın kesitlerin z-eksenindeki (kesit düzlemine dik olan yön) farklı deformasyonun çeşitleri. B, Kesit alım işlemindeki kesit deformasyonu. Üst taraf: bir kesitin bloktan kesilişi gösterilmiştir. Kesit alımı için belirlenen aralık (BA) başlangıçtaki kesit kalınlığından ( $t^*$ ) farklı olabilir.  $t^*$  tipik olarak yüzdürüldüğü suyun sıcaklığına ve tampon konsantrasyonuna bağlıdır. Alt taraf: kesite ait nihai bölgesel kalınlık ( $t$ ) kesitin farklı yerlerinde değişkenlik gösterebilir. Kesite ait nihai ortalama kalınlık da ( $\bar{t}$ ) hem BA'dan hem de  $t^*$ 'den farklı olabilir (Dorph-Petersen ve ark., 2001).

(bloktan kesme işleminden sonra suda yüzdürme, etüvde bekletme ve boya için çeşitli solusyonlardan geçirilme gibi işlemlerinin sonrasında) aynı kesitin farklı yerlerinde bile kalınlıkta farklılık gösterebileceği<sup>4</sup> ortaya konmuştur (Şekil 27b). Bununla birlikte, önerilen ve denenmiş düzeltme faktörleri kullanıldığında tanımlanan hata kaynaklarının bertaraf edilebileceği bildirilmiştir (Dorph-Petersen ve ark., 2001).

Optik disektörün kullanıldığı bir başka çalışma anabilim dalımızda gerçekleştirilmiştir (Korkmaz ve Çiftçi, 1999). Bu çalışmada daha önce belirttiğimiz iki çalışmadan farklı olarak hacim hesabı gerektirmeyen optik fraksiyonlama (West ve ark, 1991) tekniğini kullanmışlardır. Her ne kadar bu yöntemde bilinmesi gereken tek faktörün fraksiyonlar olduğu ve bu nedenle kesit kalınlığının bilinmesinin gerekmediği belirtilmişse de, bu fraksiyonlardan birini kalınlık örnekleme fraksiyonu oluşturur. Bu da yukarıda değindiğimiz kalınlık probleminden etkilenecektir. Bu çalışmadaki bulguların diğer stereolojik NOİ çalışmalarındaki bulgularla (Tablo 23) örtüşmemesinin bir nedeni bu faktörün dikkate alınmamış olması olabilir.

<sup>4</sup> Kesit kalınlığındaki deformasyonun stereolojik bir çalışmaya olan etkisi, sadece kalın kesitlerin kullanıldığı yöntemler (optik disektör, optik fraksiyonlama gibi) için geçerli olduğu bildirilmiştir.

Postnatal gelişim sürecinde NOİ'deki nöron sayısı değişimini araştıran bir başka stereolojik çalışmada (Cunningham ve ark., 1999) nöron sayımı için (sunulan çalışmamızda olduğu gibi) fiziksel disektör metodu kullanılmıştır. Her ne kadar bu metot nöron sayımında birçok faktörden etkilenmeyen altın standart olarak gösterilmişse de, bu kaynakta metodun iki önemli noktada yanlış uygulandığını gözlemledik. Bunlardan birisi kalınlık ölçümüyle ilgilidir. Cunningham ve arkadaşları toplam nöron sayısını hesaplarken fiziksel disektörler ile belirledikleri nöron yoğunluğunu, Cavalieri yöntemiyle ayrıca belirledikleri NOİ hacmiyle çarparak elde etmişlerdir. Hacim hesabı için kesit kalınlığı gerektiğinden, 5 µm kalınlığında aldıkları kesitlerin kalınlığını diferansiyel odaklama yöntemiyle belirleyip ilgili hacim formülünde yerine koyarak hesaplamada bulunmuşlardır. Öncelikle, bu kesit kalınlığı diferansiyel odaklama ile kalınlık ölçümü için yeterli değildir. Ancak 20-25 µm ve daha kalın kesitlerin kalınlık ölçümü için uygun olduğu gösterilen bu metot (Uylings ve ark., 1986; West ve ark., 1991), 5 µm kalınlığındaki kesitlere uygulandığından belirlenen kalınlık ve dolayısıyla gerçekleştirilen uygulama tarafsızlığını kaybeder. Bir başka konu ise aslında bu işleme hiç gerek olmadığıdır. Pakkenberg ve Gundersen 1988 yılında (irdelediğimiz çalışmanın yayın yılından 11 yıl önce) *disektör – Cavalieri* kombinasyonu olarak isimlendirdikleri oldukça etkin yaklaşımlarında, nöron sayısını belirlemede her iki yöntemi birleştirmiş ve bu şekilde kesit kalınlığı hesabını gerektirmeyen bir formül geliştirmişlerdir.

Cunningham ve arkadaşlarının (1999) çalışmalarında tespit ettiğimiz ikinci bir yanlış uygulama örnekleme ile ilgilidir. Doğru bir uygulamada referans hacminin (burada NOİ) tüm kısımlarına eşit derecede örneklenebilme şansı verilmesi gerekirken, bu araştırmacılar kesit alanlarını örneklerken örnekleme adımlarının yarısını doldurmayan NOİ kısımlarını değerlendirmeye almadıklarını bildirmektedirler. Bu durum çalışmayı taraflı kılan (yani gerçek değerden giderek uzaklaşan) önemli bir yanlış uygulamadır.

#### **2.4. Diğer Türlerin NOİ'sindeki Sayım Çalışmaları**

Tüm bu çalışmaların haricinde, kedi ve manda NOİ'sinde gerçekleştirilmiş iki çalışma daha tespit ettik (King ve ark., 1998; Rashed ve ark., 2007). Biri geçen yıl yayınlanmış olmasına rağmen, her ikisinde de hatalı örneklemenin yanı sıra varsayımlara dayanan teknikler kullanılmıştır. Konunun başında tartışılan bu hata kaynakları bu çalışmalar için de geçerlidir.

### 3. SUNULAN ÇALIŞMAYA AİT METODOLOJİK DEĞERLENDİRMELER

Sıçan NOI'sinde toplam nöron sayısının belirlenmesinde kullandığımız fiziksel fraksiyonlama tekniği (Gundersen, 1986) diğer stereolojik metotların içerisinde oldukça üstün özellikleri olan bir sayım metodudur. Her ne kadar yukarıda değindiğimiz gibi, teorik olarak varsayımlara dayanmayan tarafsız nitelikteki stereolojik metotların uygulamada ortaya çıkan eksik yönleri olsa da, bunlar esas olarak optik disektör yaklaşımları ile ilgilidir. Özellikle kesit kalınlığı ve tanımlama problemleri üzerinde yoğunlaşan bu tartışmalar, fiziksel fraksiyonlama tekniği ile ilişkili değildir. Çünkü bu teknik (optik fraksiyonlamadan farklı olarak) doku takibinden kaynaklanan deformasyon problemlerinden etkilenmediği gibi, hesaplamada kesit kalınlığının bilinmesini de gerektirmez. Gereken tek şey disektörün ve sistematik rasgele örnekleme uygulamasına kurallarına uymaktır. Sonuçta, elde edilen fraksiyonlarla sayılan nöron sayısı çarpılarak toplam nöron sayısı hesaplanır. Şimdi çalışmamızda bu gerekleri ne derece takip ettiğimizi değerlendirelim.

Çalışma için kullandığımız kesit kalınlığı (4  $\mu\text{m}$ ), sayımı söz konusu olan yaklaşık  $\sim 10\text{-}12$   $\mu\text{m}$  çapındaki nöron çekirdekleri (en küçük nöronlar çekirdekleri için) için uygundur. Bu şekilde fiziksel disektör metodunun en önemli gereklerinden biri<sup>5</sup> yerine getirilmiş olundu. Bu şekilde, çalışmamızda çapları 8  $\mu\text{m}$ 'ye kadar inen küçük nöron çekirdeklerinin de sayım kapsamına alındığını söyleyebiliriz. Diğer yandan bakılacak olunursa, eğer sıçan NOI'si bundan da küçük nöronlar içeriyorsa sayım dışı kalmış olacaktır. Görüleceği gibi, sadece bu aşamanın bile gözardı edilmesi çalışmalararası çelişkilere yol açabilecektir. Bunun bir örneğini anabilim dalımızda sıçan ventral koklear çekirdeğinde gerçekleştirilmiş iki ayrı çalışmada (Ağar ve ark., 1999; Ayas ve ark., 2008) da görmek mümkündür. Her ikisi de fiziksel fraksiyonlama ile gerçekleştirilmiş bu çalışmalardan ilkinde 6  $\mu\text{m}$ 'lik kesitler kullanılmış ve bu çekirdekteki toplam nöron sayısı 15600 olarak bulunmuştur. Diğerinde ise 4  $\mu\text{m}$ 'lik kesit çiftleri kullanılmış ve aynı parametre  $\sim 35500$  olarak hesaplanmıştır.

Üzerinde özenle durduğumuz bir konu da NOI sınırlarının belirlenmesi oldu. Bu konuda çalışma sonuçlarımızı etkileyecek herhangi bir durum ile karşılaşmadı. Disektörün bir başka olmazsa olmaz gereklerinden olan sistematik rasgele örnekleme,

---

<sup>5</sup> Kesit kalınlığı, sayımı sözkonusu olan objenin kesit alım yönündeki uzunluğunun yarısından az (yada en az yarısı kadar) olmalıdır.

çalışmamızda (hem kesit hem de kesit alanları seviyesinde) da ödünsüz olarak uygulandı ve örneklenen her kesitte NOİ sınırları rahatlıkla belirlenebildi (Şekil 24a ve b). Tanımlama konusunda vurgulamak istediğimiz bir başka konu, nöronların tanımlanmasıdır. Kullandığımız rutin boyamalarda belirlediğimiz ve birçok stereolojik çalışmada kullanılan kriterler ile nöronları ayırmada bir güçlükle karşılaşılmadı. Ancak küçük tipteki nöronlar ile gliaları ayırt etmede zaman zaman güçlüklerle karşılaşıldı. Böyle durumlarda ayırımı tamamen belirlediğimiz kriterlere göre yaptık. Bu problemin farkında olduğumuzdan, çalışmamızın projesini hazırlarken nöronları rutin boyama yerine immünohistokimyasal teknikler kullanarak işaretlemeyi ve bu şekilde daha gerçekçi bir ayırım yapabilmeyi planladık ve ona göre proje önerisinde bulduk. Ancak projemizin kabul gören desteği istenilen düzeyde olmadığı için çalışmayı bu yönüyle gerçekleştiremedik. Hücre tanımlanmasındaki bu güçlük, sayım çalışmaları için günümüzde halen çözümlenmeyi bekleyen problemlerden biri olarak durmaktadır.

Çalışmamız sonunda elde ettiğimiz CE (0,09) ve CV (0,08 – 0,12) değerleri uyguladığımız örnekleminin de yeterli seviyede olduğunu göstermektedir. Her sıçanda örneklemediğimiz ortalama kesit (~11), kesit alanı (~75) ve sayılan nöron çekirdeği sayıları (~125) da önerilen (Gundersen ve ark., 1999) seviyelerde çıkmıştır. Bu değerler, çalışmamızda toplam nöron sayısı değerlerindeki varyansın esas olarak biyolojik olarak var olan varyanstan kaynaklandığını göstermektedir.

Stereolojik metotların, özellikle de fiziksel disektör yaklaşımlarının tercih edilmemelerinin esas nedenlerinden birini, uygulanmalarında gerekli görülen ekipmanların her laboratuvarında bulunmaması; diğerini de uygulamaların (özellikle de fiziksel disektör uygulamalarının) vakit alıcı bir işlem olması oluşturur. İlgili stereoloji literatüründe önerilen bilgisayar ile kontrol edilebilen mikroskop düzenekleri ve ilgili yazılımlar gerçekten de (yurtdışındaki birçok laboratuvar ve bilim disiplini dahil) oldukça pahalı (100 – 150 bin avro gibi) ekipmanlardır. Çalışmamızda fiziksel fraksiyonlama tekniği için kullandığımız (Şekil 16) ve 'Materyal ve Metot' bölümünde tanımladığımız düzenek hemen her laboratuvarında var olan genel amaçlı (bilgisayar ve mikroskop) ekipmanlardır. Bu düzenek ile gerçekleştirdiğimiz fiziksel fraksiyonlama ile nöron sayımı işleminde, Anabilim Dalımızda geliştirilen iki yaklaşım kullanıldı. Bunlardan biri kesit alanlarının örneklenmesini (Kormaz ve ark., 2000), diğeri de kesit çiftlerindeki eşdeğer alanların bulunup görüntülenmesi (Ayas ve ark., 2008) işlemini

kolaylıkla uygulanabilir pratik birer uygulamaya dönüştürmektedir. Elde ettiğimiz sonuç bu yaklaşımın oldukça etkin olduğunu göstermiştir (eşdeğer alanların örneklenip, eşzamanlı görüntülenip sayılması işlemi yaklaşık 4 – 4,5 saat kadar sürdü). Sonuçta fiziksel disektör yaklaşımlarının uygulanmasında en çok vakit alan ve bu nedenle de tercih edilmeyen aşaması oldukça kolaylaştırılmış olundu. Kamera ilaveli bir mikroskop (birçok laboratuvarıda zaten var olan genel amaçlı bir ekipman) ve görüntü yakalama kartı olan sıradan bir bilgisayar (500 YTL ve yukarı fiyatlarda) gibi genel amaçlı ekipmanlar uygulamanın gerçekleştirilmesi için yeterlidir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Kantitatif sıçan NOI'si çalışmalarındaki irdelemelerimiz ve sunulan çalışmamızdan çıkardığımız sonuçları şu maddelerde özetleyebiliriz:

1. Sıçan NOI'sinde toplam nöron sayısının belirlenmesinde kullandığımız teknik teorikte olduğu kadar uygulamada da varsayımlara dayanmayan sonuçlar verdiğinden ve bunun uygulamasında bildirilen tüm kriterleri özenle yerine getirdiğimizden, hesaplama ile belirlediğimiz toplam nöron sayılarının gerçeğe en yakın değerleri yansıttığını düşünüyoruz.
2. Sıçan NOI'sindeki toplam nöron sayısı erkek ve dişiler arasında anlamlı bir fark göstermemektedir. Bu durum hem grup içi, hem de gruplararası sağ ve sol taraflar arasında da değişmemektedir. Bu tespitimiz, sıçan NOI'sinde gerçekleştirilen diğer çalışmaların bulgularıyla uyum halindedir.
3. Hesapladığımız nöron sayısı değeri literatürde bildirilen değerlerin hepsinden daha fazladır ve hiç biri ile uyuşmamaktadır. Diğer çalışmalardaki değerler de birbirleriyle uyuşmamaktadır. Bu durum için tespit edebildiğimiz başlıca nedenleri şu şekilde sıralayabiliriz;
  - a. örneklemenin doğru yapılmaması
  - b. varsayımlara dayanan sayım tekniklerinin kullanılmış olması
  - c. stereolojik tekniklerin yanlış veya eksik uygulanması
  - d. referans hacim tanımlamalarında belirsizlikler

4. Nöron tanımlamalarında onları özel olarak işaretleyen ve onları glialardan ayıran boyama tekniklerinin kullanılması ve kullanılan metodun gereklerine özenle uyulması farklılıklara neden olan önemli iki faktörü ortadan kaldıracaktır.
5. Uygulamada da varsayımlara dayanmayan ve kesit kalınlığı doku deformasyonu gibi birçok faktörden etkilenmeyen fiziksel disektör yaklaşımlarının tercih edilmesi çalışmalar arası çelişkileri en aza indirecektir.
6. Disektör çiftlerindeki eşdeğer alanların örneklenip eşzamanlı görüntülenmesi uygulamamızın bu tekniğin kullanımını cesaretlendireceği ve bu konuda çalışma yapmak isteyen diğer araştırmacılara yararlı olacağı ümidindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Abercrombie, M. (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.*, **94**: 239–247.
- Ağar, E., Korkmaz, A., Boşnak, M., Demir, Ş., Ayyıldız, M., Marangoz, C. (1999). Do cochlear nuclei contribute to auditory lateralization? A stereological evaluation of neuron numbers. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, **108**: 661–665.
- Apps, R., Lee, S. (1999). Gating of transmission in climbing fibre paths to cerebellar cortical C1 and C3 zones in the rostral paramedian lobule during locomotion in the cat. *J. Physiol. (Lond)*, **516**: 875–883.
- Armengol, J.A., Lopes-Raman, A. (1996). Pattern of degeneration of the rat inferior complex after the early postnatal axotomy of the olivocerebellar projection. *Histol. Histopathol.*, **11**: 379–388.
- Armstrong, D.M. (1974). Functional significance of connections of the inferior olive. *Physiol. Rev.*, **54**: 358–417.
- Ayas, B., Korkmaz, A., Gürgör, P.N. (2008). Postnatal development of the rat cochlear nucleus: Neuron counts using the physical fractionator. *IX. National Histology and Embryology Congress, Poster Abstracts*, 20–23 May 2008, Adana.
- Ayas, B., Korkmaz, A., Gürgör, P.N. (2008). Simultaneous viewing of disector pairs with a frame grabber: A practical and economic application of the physical disector on systematically sampled section fields. *IX. National Histology and Embryology Congress, Poster Abstracts*, 20–23 May 2008, Adana.
- Azizi, A.S., Woodward, D.J. (1987). Inferior olivary nuclear complex of the rat: Morphology and comments on the principles of organization within the olivocerebellar system. *J. Comp. Neurol.*, **263**: 467–484.
- Bancroft, J.D., Stevens, A. (1996). *Theory and practice of histological techniques. Fourth Edition*, Churchill Livingstone.
- Barmack, N.H., Fredette, B.J., Mugnaini, E. (1998). Parasolitary nucleus: A source of GABAergic vestibular information to the inferior olive of rat and rabbit. *J. Comp. Neurol.*, **392**: 352–372.
- Barr, M.L., Kiernan, J.A. (1988). *The Human Nervous System, An Anatomical Viewpoint, Fifth Edition*, J.B. Lippincott Company.

- Batini, C., Buisseret-Delmas, C., Conrath-Verrier, M. (1979). Olivo-cerebellar activity during harmaline-induced tremor, A 2-[14C] deoxyglucose study. *Neurosci. Lett.*, **12(2-3)**: 241–246.
- Benardo, L.S., Foster, R.E. (1986). Oscillatory behaviour in inferior olive neurons: mechanism, modulation, cell aggregates. *Brain Res. Bull.*, **17(6)**: 773–784.
- Benes, M.F., Lange, N. (2001). Two-dimensional versus three-dimensional cell counting: A practical perspective. *Trends in Neuroscience*. **24(1)**: 11–17.
- Berkley, K.J., Worden, I.G. (1978). Projections to the inferior olive of the cat. I. Comparisons of input from the dorsal column nuclei, cervical nucleus, spino-olivary pathways, the cerebral cortex and cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, **180**: 237–252.
- Bernard, J.F. (1987). Topographical organization of olivocerebellar and corticonuclear in the rat. A WGA-HRP study: I. Lobules IX, X and flocculus. *J. Comp. Neurol.*, **263**: 241–258.
- Bishop, G.A. (1984). The origin of the reticulo-olivary projection in the rat: A retrograde horseradish peroxidase study. *Neuroscience*, **11**: 487–496.
- Bjung, R., Gundersen, H.J.G. (1993). Estimate total number of neurons and glial and endothelial cells in the rat spinal cord by means of optical disector. *The Journal of Comparative Neurology*, **328**: 406–414.
- Blatt, G.J., Eisenman, L.M. (1985). A qualitative and quantitative light microscopic study of the inferior olivary complex of normal, reeler, and weaver mutant mice. *The Journal of Comparative Neurology*, **232**: 117–128.
- Bondy, C.A. (1991). Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J. Neurosci.*, **11**: 3442–3455.
- Bourrat, F., Sotelo, C. (1984). Postnatal development of the inferior olivary complex in the rat. III. A morphometric analysis of volumetric growth and neuronal cell number. *Dev. Brain Res.*, **16**: 241–251.
- Bourrat F., Sotelo, C. (1988). Migratory pathways and neuritic differentiation of olivary neurons in the rat embryo. Axonal tracing study using the in vitro slab technique. *Dev. Brain Res.*, **39**: 19–37.
- Bourrat F., Sotelo, C. (1990a). Early development of the rat precerebellar system: Migratory routes, selective aggregation and neuritic differentiation of the inferior olive and lateral reticular nucleus neurons. An overview. *Arch. Ital. Biol.*, **128**: 151–170.



- Bourrat F., Sotelo, C. (1990b). Migratory pathways and selective aggregation of the lateral reticular neurons in rat embryo: A horseradish peroxidase in vitro study, with special reference to migration patterns of the precerebellar nuclei. *J. Comp. Neurol.*, **294**: 1–13.
- Bourrat, F., Sotelo, C. (1991). Relationships between neuronal birthdates and cytoarchitecture in the rat inferior olivary complex. *J. Comp. Neurol.*, **313**: 509–521.
- Bowman, M.H., King, J.S. (1973). The conformation, cytology and synaptology of the opossum inferior olive nucleus. *J. Comp. Neurol.*, **148**: 491–524.
- Bowman, J.P., Sladek, J.R. (1973). Morphology of the inferior olivary complex of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Neurol.*, **152**: 299–316.
- Bozhilova-Pastirova, A. (1990). Structural and ultrastructural study of the inferior olivary complex in the ground squirrel (*Citellus citellus* L.) (in Bulgarian). *Exsperim med i morf*, 29–4, 1–7.
- Bozhilova-Pastirova, A., Ovtcharoff, W. (1979). Synaptic organization of the medial accessory nucleus of the cat. *J. Hirnforsch*, **20**: 19–28.
- Bozhilova-Pastirova, A., Itchev, K., Ovtcharoff, W. (1989a). Distribution of glial fibrillary acidic protein in the inferior olivary complex of the cat, ground squirrel and pigeon. In: Histochemical methods and their application in the science and diagnosis. *Gegenbaurs morphol Jahrb Leipzig*, 135 2 S, 310.
- Bozhilova-Pastirova, A., Itchev, K., Ovtcharoff, W. (1989b). Morphology of glial cells in the inferior olivary complex of the pigeon (*Columba livia*). I. Astrocytes (in Bulgarian). *Experim med i morf*, 28–8: 22–26.
- Bozhilova-Pastirova, A., Itchev, K., Ovtcharoff, W. (1989c). Morphology of glial cells in the inferior olivary complex of the pigeon (*Columba livia*). I. Oligodendrocytes (in Bulgarian). *Experim med i morf*, 28–3, 26–31.
- Bozhilova-Pastirova, A., Itchev, K., Christova, T. (1991). Morphology of the astrocytes in the inferior olivary complex of the ground squirrel (*Citellus citellus* L.). *Verh Anat Ges 85. Anat Anz Suppl*, **170**: 685–686.
- Bozhilova-Pastirova, A., Ovtcharoff, W. (1995). The morphology of inferior olivary complex in phylogeny. *European Journal of Morphology*, **33**: 176–176.
- Bozhilova-Pastirova, A., Ovtcharoff, W. (2000). The inferior olivary complex. *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*, **155**: 85.
- Braendgaard, H., Gundersen, H.J.G. (1986). The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *Journal of Neuroscience Methods*, **18**: 39–78.

- Braendgaard, H., Evans, E., Howard, C.V., Gundersen, H.J.G. (1990). The total number of neurons in the human neocortex unbiasedly estimated using optical disectors. *Journal of Microscopy*, **157**: 285–304.
- Breazile, J.E. (1967). The cytoarchitecture of the brain stem of the domestic pig. *J. Comp. Neurol.*, **129**: 169–188.
- Brodal, P., Brodal, A. (1981). The olivocerebellar projection in the monkey. Experimental studies with the method of retrograde tracing of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, **201**: 375–393.
- Brown, J.T., Chan-Palay, V., Palay, S.L. (1977). A study of afferent input to the inferior olivary complex in the rat by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, **176**: 1–22.
- Bukowska, D., Zguczynski, L., Mierejewska-Krzyzowska, B. (2002). Axonal collateral branching of neurons in the inferior olive projecting to the cerebellar paramedian lobule in the rabbit. *Cells Tissues Organs*, **172**: 37–47.
- Carpenter, M.B. (1985). *Core Text of Neuroanatomy. Third Edition*, Baltimore, Williams & Wilkins.
- Chan-Palay, V. (1977). *Cerebellar dentate nucleus. Organization, cytology and transmitters*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- Chan-Palay, V., Palay, S.L. (1972). The form of velate astrocytes in the cerebellar cortex of monkey and rat: High voltage electron microscopy of rapid Golgi preparations. *Z Anat Entwickl-Gesch*, **138**: 1–19.
- Chedotal, A., Sotelo, C. (1992). Early development of olivocerebellar projections in the fetal rat using CGRP immunocytochemistry. *Eur. J. Neurosci.*, **4**: 1159–1179.
- Chu, T., Hullinger, H., Schilling, K., Oberdick, J. (2000). Spatial and temporal changes in natural and target deprivation-induced cell death in the mouse inferior olive. *J. Neurobiol.*, **43(1)**: 18–30.
- Coggeshall, R.E. (1992). A consideration of neural counting methods. *Trends in Neuroscience*, **15**: 9–13.
- Coggeshall, R.E., Lekan, H.A. (1992). Methods for determining numbers of cells and synapses: A case for more uniform standards of review. *J. Comp. Neurol.*, **364**: 6–15.
- Courville, J., Faraco-Cantin, F., Marson, L. (1983). Projections from the reticular formation of the medulla, the spinal trigeminal and lateral reticular nuclei to the inferior olive. *Neuroscience*, **9**: 129–139.

- Courville, J., Faraco-Cantin, F., (1978). On the origin of the climbing fibers of the cerebellum. An experimental study in the cat with an autoradiographic tracing method. *Neuroscience*, **3**: 797–809.
- Cruz-Orive, L.M., Weibel, E.R. (1990). Recent stereological methods for cell biology: A brief survey. *Am. J. (Lung Cell Mol.) Physiol.*, **258**: L148–L156.
- Cunningham, J.J., Sherrard, R.M., Bedi, K.S., Renshaw, G.M., Bower, A.J. (1999). Changes in the numbers of neurons and astrocytes during the postnatal development of the rat inferior olive. *J. Comp. Neurol.*, **406**: 375–383.
- Delhaye-Bouchaud, N., Geoffroy, B., Mariani, J. (1985). Neuronal death and synapse elimination in the olivocerebellar system. I: Cell counts in the inferior olive of developing rats. *J. Comp. Neurol.*, **232**: 299–308.
- Desclin, J.C. (1974). Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. *Brain Res.*, **77**: 365–384.
- Devor, A., Yarom, Y. (2002). Generation and Propagation of Subthreshold Waves in a Network of Inferior Olivary Neurons. *J. Neurophysiol.*, **87(6)**: 3059–3069
- de Zeeuw, C.I., Holstege, J.C., Calkoen, F., Ruigrok, T.J.H., Voogd, J. (1988). A new combination of WGA-HRP anterograde tracing and GABA immunocytochemistry applied to afferents of the cat inferior olive at the ultrastructural level. *Exp. Brain Res.*, **447**: 369–375.
- de Zeeuw C.I., Holstege, J.C., Ruigrok, T.J.H., Voogd, J. (1989a). The cerebellar, mesodiencephalic and GABAergic innervation of the glomeruli in the cat inferior olive. A comparison at the ultrastructural level. *Exp. Brain Res.*, **17**: 111–116.
- de Zeeuw C.I., Holstege, J.C., Ruigrok, T.J.H., Voogd, J. (1989b). Ultrastructural study of the GABAergic, cerebellar and mesodiencephalic innervation of the cat medial accessory olive; anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.*, **284**: 12–35.
- de Zeeuw, C.I., Holstege, J.C., Ruigrok, T.J.H., Voogd, J. (1990). Mesodiencephalic and cerebellar terminals terminate upon the same dendritic spines in glomeruli of the cat and rat inferior olive: An ultrastructural study using a combination of [3H]-leucin and wheat germ agglutinin coupled horseradish peroxidase anterograde tracing. *Neuroscience*, **34**: 645–655.
- de Zeeuw, C.I., Wentzel, P., Mugnaini, E. (1993). Fine structure of dorsal cap of the inferior olive and its GABAergic and non-GABAergic input from the nucleus prepositus hypoglossi in rat and rabbit. *J. Comp. Neurol.*, **327**: 63–82.

- de Zeeuw, C.I., Van, Alphen, A.M., Hawkins, R.K., Ruigrok, T.J.H. (1997). Climbing fibre collaterals contact neurons in the cerebellar nuclei that provide a GABAergic feedback to the inferior olive. *Neuroscience*, **80**: 981–986.
- de Zeeuw, C.I., Simpson, J.I., Hoogenraad, C.C., Galjart, N., Koekkoek, S.K.E., Ruigrok, T.J.H. (1998). Microcircuitry and function of the inferior olive. *Trends Neurosci.*, **21**: 391–400.
- Dorp–Petersen, K.A., Nyengaard, J.R., Gundersen, H.J.G. (2001). Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *Journal of Microscopy*, **204**: 232–246.
- Eccles, J.C., Llinás, R., Sasaki, K. (1966). The synaptic excitatory synaptic action of climbing fibers on the Purkinje cells of the cerebellum. *J.Physiol.*, **182**: 268–296.
- Farel, P.B. (2002). Trust, But Verify: The Necessity of Empirical Verification in Quantitative Neurobiology. *The Anatomical Record (New Anat.)*, **269**: 157–161.
- Floderus, S. (1944). Untersuchungen über den bau der menschlichen hypophyse mit besonderer berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen verhältnisse. *Acta Pathologica Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, **53(suppl.)**: 1–26.
- Frederic, F., Hainaut, F., Thomasset, M., Guenet, J.L., Delhay-Bouchaud, N., Mariani, J. (1992). Cell counts of Purkinje and inferior olivary neurons in the ‘hyperspiny Purkinje cells’ mutant mouse. *European Journal of Neuroscience*, **4**: 127–135.
- Fredette, B.J., Adams, J.C., Mugnaini, E. (1992). GABAergic neurons in the mammalian inferior olive and ventral medulla detected by glutamate decarboxylase immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.*, **321**: 501–514.
- Foster, R.E, Peterson, B.E. (1986). The inferior olivary complex of the guinea pig: Cytoarchitecture and cellular morphology. *Brain Res. Bull.*, **17**: 785–800.
- Gahr, M. (1997). How should brain nuclei be delineated? Consequences for developmental mechanisms and for correlations of area size, neuron numbers and functions of brain nuclei. *Trends Neurosci.*, **20**: 58–62.
- Gardella, D., Hatton, W.J., Rind, H.B., Rosen, G.D., von Bartheld, C. S. (2003). Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical dissector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. *Journal of Neuroscience Methods*, **124**: 45–59.
- Gellman, R., Houk, J.C., Gibson, A.R. (1983). Somatosensory properties of the inferior olive of the cat. *J. Comp. Neurol.*, **215**: 228–243.

- Geuna, S. (2000). Appreciating the Difference Between Design-Based and Model-Based Sampling Strategies in Quantitative Morphology of the Nervous System. *J. Comp. Neurol.*, **427**: 333–339.
- Geuna, S., (2005). The revolution of counting “Tops”: Two decades of the disector principle in morphological research. *Microscopy Research and Technique*, **66**: 270–274.
- Glaser, J., Greene, G., Hendricks, S. (2007). *Stereology for Biological Research with a Focus on Neuroscience. Second Edition*, MBF Press.
- Goffinet, A.M. (1983) The embryonic development of the inferior olivary complex in normal and reeler (rlORL) mutant mice. *J Comp Neurol.*, **219(1)**: 10–24.
- Gray, H. (1995). *Gray's Anatomy. Thirty-Eight Edition*, ELBS with Churchill Livingstone.
- Gray, H. (2005). *Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice, Thirty-Ninth Edition*, Elsevier Churchill Livingstone.
- Groenewegen, H.J., Voogd, J., Freeman, S.L. (1979). The parasagittal zonation within the olivocerebellar projection. II. Climbing fibre distribution in the intermediate and hemispheric parts of the cat cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, **183**: 551–602.
- Gudovic, R., Milutinovic, B. (1996). Regression changes in inferior olivary nucleus compared to changes of Purkinje cells during development in humans. *Journal of Brain Research-Journal Fur Hirnforschung*, 37(1): 67–72.
- Guillery, R.W. (2002). On counting and counting errors. *Journal of Comparative Neurology*, **447**: 1–7.
- Guillery, R.W., Herrup, K. (1997). Quantification without pontification: Choosing a method for counting objects in sectioned tissues. *J. Comp. Neurol.*, **386**: 2–7.
- Gundersen, H.J.G. (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: The edge effect. *Journal of Microscopy*, **111**: 219–223.
- Gundersen, H.J.G. (1986). Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *Journal of Microscopy*, **143**: 3–45.
- Gundersen, H.J.G. (1992). Stereology: The fast lane between neuroanatomy and brain function—or still only a tightrope? *Acta Neurologica Scandinavica*, **137(suppl.)**: 8–13.
- Gundersen, H.J.G., Østerby, R. (1981). Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or ‘Do more less well !’. *J. Microsc.*, **121**: 65–73.

- Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B.V. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, **147**: 229–263.
- Gundersen, H.J.G., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sørensen, F.B., Vesterby, A., West, M.J. (1988a). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathologica Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, **96**: 379–394.
- Gundersen, H.J.G., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sørensen, F.B., Vesterby, A., West, M.J. (1988b). The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathologica Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, **96**: 857–881.
- Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B.V., Kieu, K., Nielsen, J. (1999). The efficiency of systematic sampling in stereology—reconsidered. *Journal of Microscopy*, **193**: 199–211.
- Gupta, M., Mayhew, T.M., Bedi, K.S., Sharma, A.K., White, F.H. (1983). Inter-animal variation and its influence on the overall precision of morphometric estimates based on nested sampling designs. *J. Microsc.*, **131**: 147–154.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2007). *Tıbbi Fizyoloji*, **11. Türkçe Basım**. Yüce Yayınları A.Ş. & Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.
- Gwyn, D.G., Nicholson, J.P., Flumerfelt, B.A., (1977). The inferior olivary nucleus of the rat: A light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology*, **174**: 489–520.
- Hatton, W.J, von Bartheld, C.S. (1999). Analysis of cell death in the cochlear nucleus of the chick embryo: Calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *The Journal of Comparative Neurology*, **409**: 169–186.
- Hayran, M., Özdemir, O. (1996). *Bilgisayar İstatistik ve Tıp. İkinci Baskı*, Hekimler Yayın Birliği, Ankara.
- Heckroth, J.A., Goldowitz, D., Eisenman (1990). Olivocerebellar fiber maturation in normal and lurcher mutant mice: defective development in lurcher. *J. Comp. Neurol.*, **291**: 415–430.
- Hedreen, J.C. (1998). What Was Wrong With the Abercrombie and Empirical Cell Counting Methods? A Review. *The Anatomical Record*, **250**: 373–380.
- Hedreen, J.C., Vonsattel, J.P. (1997). Centenary of Gaule and Lewin, pioneers in cell counting methodology, *J. Microsc.*, **187**: 201–203.

- Herrup, K., Shojaeian-Zanjani, H., Panzini, L., Sunter, K., Mariani, J. (1996). The numerical matching of source and target populations in the CNS: The inferior olive to Purkinje cell projection. *Developmental Brain Research*, **96**: 28-35.
- Horn, A.K.E., Hoffmann, K.P. (1987). Combined GABA-immunocytochemistry and TMB-HRP histochemistry of pretectal nuclei projecting to the inferior olive in rats, cats and monkeys. *Brain Res.*, **40**: 133–138.
- Howard, C.V., Reed, M.G. (1998). *Unbiased Stereology, Three-dimensional measurement in microscopy. First edition*, BIOS scientific publishers, UK.
- Howard, V. (2005). *Three-dimensional Measurement in Microscopy (Advanced Methods). Second Edition*, Taylor & Francis Publisher.
- Jeneskog, T. (1987). Termination in posterior and anterior cerebellum of a climbing fiber pathway activated from the nucleus of Darkschewitsch in the cat. *Brain Res.*, **412**: 185–189.
- Kappers, A.C.U., Huber, C.G., Crosby, E.C. (1960). *The Comparative Anatomy of the Nervous System of Vertebrates, Including Man*, vol. 1. Hafner Publishing Company, New York, pp. 668–695.
- Kawamura, K., Hashikawa, T. (1970). Olivocerebellar projections in the cat studied by means of anterograd axonal transport of labeled amino acids as tracers. *Neuroscience*, **4**: 1615–1633.
- Kaya, M. (1984). Elektron mikroskopi teknikleri. *Bulletion of the Çukurova Medical Faculty*, **9**: 1–21.
- King, J.S. (1976). The synaptic cluster (glomeruli) in the inferior olivary nucleus. *J.Comp. Neurol.*, **165**: 387–400.
- King, V.M., Armstrong, D.M., Apps, R., Trott, J.R. (1998). Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology*, **390**: 537–551.
- Konigsmark, B.M. (1970). Methods for the counting of neurons. In: Nauta, W.J.H., Ebbesson, S.O.E., editors. Contemporary research methods in neuroanatomy. New York, *Springer*, 315–340.
- Kooy, F.H. (1917). The inferior olive in vertebrates. *Fol. Neurobiol. Leipzig*, **10**: 205–369.
- Korkmaz, A., Çiftçi, N. (1999). Neuron Counts in the Inferior Olivary Nucleus of Developing Rats: A Reevaluation of the Previously Reported Data By Means of Unbiased Stereology. *International Summer School On Developmental Neuroscience, Poster Abstracts*, 5–9 July 1999, İzmir.

- Korkmaz A., Çiftçi N., Boşnak M., Açar E. (2000). A simplified application of systematic field sampling and low-cost video recording set up for viewing disector pairs - exemplified in the rat cochlear nucleus. *Journal of Microscopy*, **200**: 269–276.
- Korkmaz, A., Ayas, B. (2003). *Kurs Dokümanları ve Uygulama Rehberi*. Uygulamalı Stereoloji Kursu, 29 Mayıs - 1 Haziran 2003, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Denizli.
- Kroustrup, J.P., Gundersen, H.J.G. (1983). Sampling problems in an heterogeneous organ: quantitation of relative and total volume of pancreatic islets by light microscopy. *J. Microsc.*, **13**: 43–55.
- Landis, D.M., Rayne, H.R., Weinstein, L.A. (1989). Changes in the structure of synaptic junctions during climbing fiber synaptogenesis. *Synapse*, **4**: 281–293.
- Lang, E.J., Sugihara, I., Llinás, R. (1996). GABAergic modulation of complex spike activity by the cerebellar nucleo-olivary pathway in rat. *J. Neurophysiol.*, **1**: 255–275.
- Lang, E.J., Sugihara, I., Welsh, J.P., Llinás, R. (1999). Patterns of spontaneous Purkinje cell complex spike activity in the awake rat. *J. Neuroscience*, **19**: 728–739.
- Leonard, C.S., Simpson, J.I., Graf, W. (1988). Spatial organization of visual messages of the rabbit's cerebellar flocculus. I. Topology of inferior olive neurons of the dorsal cap of Kooy. *J. Neurophysiol.*, **60**: 2073–2090.
- Llinás, R., Baker, R., Sotelo, C. (1974). Electrotonic coupling between neurons in the cat inferior olive. *J. Neurophysiol.*, **37**: 560–571.
- Llinás, R., Yarom, Y. (1981). Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurons in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol.*, **315**: 549–567.
- Lui, F., Benassi, C., Biral, G., Corazza, R. (1999). Olivofloccular circuit in oculomotor control: Binocular optokinetic stimulation. *Exp. Brain. Res.*, **125**: 211–216.
- Luna, L.G. (1968). *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*, New York, *McGraw-Hill, Inc.*
- Maier, S.E., West, J.R. (2003). Alcohol and nutritional control treatments during neurogenesis in rat brain reduce total neuron number in locus coeruleus, but not in cerebellum or inferior olive. *Alcohol*, **30**: 67–74.
- Martin, J.H. (1989). *Neuroanatomy, Text and Atlas*, Elsevier, Science Publishing Co. Inc., New York.



- Martin, G.F., Dom, R., King, J.S., Robards, M., Watson, C.R.R. (1975). The inferior olivary nucleus of the opossum (*Didelphis masupialis virginiana*), its organization and connections. *J. Comp. Neurol.*, **160**: 507–534.
- Martin, G.F., Beattie, M.S., Hughes, H.C., Linauts, M., Panneton, M. (1977). The organization of reticulo-olivo-cerebellar circuits in the North American opossum. *Brain Res.*, **137(2)**: 253–266.
- Mayhew, T.M., Gundersen, H.J.G. (1996). “If you assume, you can make an ass out of u and me”: a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *Journal of Anatomy.*, **188**: 1–15.
- Moatamed, F. (1968). Cell frequencies in the human inferior olivary nuclear complex. *J. Comp. Neurol.*, **128**: 109–116.
- Mouton, P.R. (2002). *Principles and Practices of Unbiased Stereology*. Baltimore and London.
- Napper, R.M.A., West, J.R. (1995). Permanent neuronal cell loss in the inferior olive of adult rats exposed to alcohol during the brain growth spurt: a stereological investigation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **vol 19, no 5**: 1321–1326.
- Nauta, W.J.H., Feirtag, M. (1986). *Fundamental Neuroanatomy*, New York, W.H. Freeman and Company, 280–288.
- Nelson, B., Barmack, N.H., Mugnaini, E. (1986). GABAergic projection from vestibular nuclei to rat inferior olive. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **12**, 255
- Nelson, B., Mugnaini, E. (1989). Origin of GABAergic inputs to the inferior olive. In: The olivocerebellar system in motor control. Strata P (ed). *Exp. Brain Res. Series 17. Springer-Verlag*, Berlin, pp 86–107.
- Netter, F.H. (2002). *İnsan Anatomisi Atlası*, **2. Baskıdan çeviri**, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Nieuwenhuys, R., ten Donkelaar, H.J., Nicholsan, C. (1998). The central nervous system of vertebrates. Smeets W.J.A.J., Wicht, H. (ed). *Springer-Verlag*, Berlin, 3 vols.
- Nishie, M., Yoshida, Y., Hirata, Y., Matsunaga, M. (2002). Generation of symptomatic palatal tremor is not correlated with inferior olivary hypertrophy. *Brain*, **126**: 1348–1357.
- Nishie, M., Mori, F., Yoshimoto, M., Takahashi, H., Wakabayashi, K. (2004). A quantitative investigation of neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the pontine and inferior olivary nuclei in multiple system atrophy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **30**: 546–554.

- Oorschot, D.E. (1994). Are you using neuronal densities, synaptic densities or neurochemical densities as your definitive data? There is a better way to go. *Prog. Neurobiol.*, **44**: 233–247.
- Oscarsson, O. (1969). Termination and functional organization of the dorsal spino-olivocerebellar path. *J. Physiol.*, **196**: 453–478.
- Oscarsson, O. (1980). Functional organization of olivary projection to the cerebellar anterior lobe. In: Courville, J., de Montigny, C., Lamare, Y. (eds). The inferior olivary nucleus. Anatomy and physiology. Raven Press, New York, pp 279–289.
- Pakkenberg, B., Gundersen, H.J.G. (1988). Total numbers of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by disector and fractionator. *J. Microsc.*, **150**: 1–20.
- Palay, S.L., Chan-Palay, V. (1974). Cerebellar cortex. Cytology and organization. *Springer Verlag*, Berlin Heidelberg, New York.
- Pine, S.S., Landing, B.H., Shankle W. R. (1997). Reduced inferior olivary neuron number in early down syndrome. *Pediatric Pathology & Laboratory Medicine*, **17**: 537–545.
- Powers, R.E., DeSouza E.B., Walker, L.C., Price, D.L., Vale, W.W., Young, W.S. **3rd**. (1987). Corticotrophin-releasing factor as a transmitter in the human olivocerebellar pathway. *Brain Res.*, **415(2)**: 347–352.
- Rashed, R., Emara, S., Shinozaki, A., Imagawa, T., Uehara, M. (2007). Qualitative and quantitative studies of the inferior olivary complex in the water buffalo (*Buballus bubalis*). *Journal of Vet. Med. Science*, **69(2)**: 143–147.
- Reith, A., Mayhew, T.M. (1988). *Stereology and Morphometry in Electron Microscopy: Problems and solutions*. Hemisphere Publishing Corporation.
- Robertson, L.T., Stotler, W.A. (1974). The structure and connections of the developing inferior olivary nucleus of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Neurol.*, **158**: 167–190.
- Rondi-Reig, L., Delhaye-Bouchaud, N., Mariani, J., Caston, L. (1997). Role of the inferior olivary complex in motor skills and motor learning in the adult rat. *Neuroscience*, **77**: 955–963.
- Rosner, B. (1990). *Biostatistics, Third Edition*, PWS-KENT Publishing Company.
- Ruigrok, T.J.H. (1997). Cerebellar nuclei: The olivary connection. *Progress in Brain Res.*, **114**: 167–192.
- Ruigrok, T.J.H. (2003). Collateralization of climbing and mossy fibers projection to the nodulus and flocculus of the rat cerebellum. *J. Comp. Neurol.*, **466**: 278–298.

- Ruigrok, T.J.H., De Zeeuw, C.I., van der Burg, H., Voogd, J. (1990). Intracellular labeling of neurons in the medial accessory olive in the cat. I. Physiology and light microscopy. *J. Comp. Neurol.*, **300**: 462–477.
- Ruigrok, T.J.H., De Zeeuw, C.I. (1993). Electron microscopy of in vivo recorded and intracellularly injected inferior olivary neurons and their GABAergic innervation in the cat. *Microsc. Res. Tech.*, **24**: 85–102.
- Ruigrok, T.J.H., Voogd, J. (1995). Cerebellar influence on olivary excitability in the cat. *Eur. J. Neurosci.*, **7**: 679–693.
- Ruigrok, T.J.H., Voogd, J. (2000). Organization of projections from the inferior olive to the cerebellar nuclei in the rat. *J Comp Neurol.*, **426(2)**: 209–228.
- Russ, J.C., Dehoff, R.T. (2000). *Practical Stereology. Second Edition*, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Rutherford, J.G., Gwyn, G. (1980). A light and electron microscopic study of the inferior olivary nucleus of the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *J. Comp. Neurol.*, **189**: 127–155.
- Saigal, R.P., Karamanlidis, A.N., Voogd, J., Michaloudi, H., Mangana, O. (1983). Olivocerebellar connections in sheep studied with retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.*, **217**: 440–448.
- Saint-Cyr, J.A., Courville, J. (1979). Projection from the vestibular nuclei to the inferior olive in the cat. An autoradiographic and horseradish peroxidase study. *Brain Res.*, **165**: 189–200.
- Saint-Cyr, J.A. (1987). Anatomical organization of cortico-mesencephalo-olivary pathways in the cat as demonstrated by axonal transport techniques. *J. Comp. Neurol.*, **257**: 39–59.
- Saint-Cyr, J.A., Courville, J. (1980). Projections from motor cortex, midbrain and vestibular nuclei to the inferior olive in the cat: Anatomical organization and functional correlates. In: Courville, J., de Montigny, C., Lamare, Y. (eds) The inferior olivary nucleus. *Anatomy and Physiology*. Raven Press, New York, pp 97–124.
- Saint-Cyr, J.A., Courville, J. (1982). Descending projections to the inferior olive from the mesencephalon and superior colliculus in the cat. *Exp. Brain Res.*, **45**: 333–345.
- Saper, C.B. (1996). Any way you cut it: A new journal policy for the use of unbiased counting methods. *J. Comp. Neurol.*, **364**: 5–6.
- Saper, C.B. (1997). Counting on our reviewers to set the standards. *J. Comp. Neurol.*, **386**: 1.

- Scheibel, M.E., Scheibel, A.B. (1954). Observations on the intracortical relations of the climbing fibers of the cerebellum; a Golgi study. *J. Comp. Neurol.*, **101**(3): 733–763.
- Scheibel, M.E., Scheibel, A.B. (1955). The inferior olive. A Golgi study. *J. Comp. Neurol.*, **102**: 77–132.
- Scheibel, M.E., Scheibel, A.B., Walber, F., Brodal, A. (1956). Areal distribution of axonal and dendritic patterns in inferior olive. *J. Comp. Neurol.*, **106**: 21–49.
- Schild, R.F. (1970). On the inferior olive of the albino rat. *J. Comp. Neurol.*, **140**: 255–260.
- Shojaeian, H., Delhaye-Bouchaud, N., Mariani, J. (1985a). Decreased number of cells in the inferior olivary nucleus of the developing staggerer mouse. *Dev. Brain Res.*, **21**: 141–146.
- Shojaeian, H., Delhaye-Bouchaud, N., Mariani, J. (1985b). Neuronal death and synapse elimination in the olivocerebellar system. II. Cell counts in the inferior olive of adult X-irradiated rats and weaver and reeler mutant mice. *J. Comp. Neurol.*, **232**: 309–318.
- Sjöbeck, M., Dahlén, S., Englund, E. (1999). Neuronal loss in the brainstem and cerebellum—Part of the normal aging process? A morphometric study of the cerebelli and inferior olivary nucleus. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, **vol. 54A, no.9**, B363–B368.
- Smith, G.T., Brenowitz, E.A., Wingfield, J.C. (1997). Seasonal changes in the size of the avian song control nucleus HVC defined by multiple histological markers. *The Journal of Comparative Neurology*, **381**: 253–261.
- Sotelo, C., Llinás, R., Baker, R. (1974). Structural study of inferior olivary nucleus of the cat: Morphological correlates of electrotonic coupling. *J. Neurophysiol.*, **37**: 541–559.
- Sotelo, C., Bourrat, F., Triller, A. (1984). Postnatal development of the inferior olivary complex in the rat. II. Topographic organization of the immature olivocerebellar projection. *J. Comp. Neurol.*, **222**: 177–199.
- Sotelo, C., Wassef, M. (1991). Cerebellar development: afferent organization and Purkinje cell heterogeneity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **331**: 307–313.
- Sotelo, C., Chedotal, A. (1997). Development of the olivocerebellar projections. *Perspect. Dev. Neurobiol.*, **5**: 57–67.

- Spence, S.J., Saint-Cyr, J.A. (1988). Comparative topography of projections from the mesodiencephalic junction to the inferior olive, vestibular nuclei, and upper cervical cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, **268**: 357–374.
- Standring, S. (2005). *Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice.*, **39. Edition**, Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Sterio, D.C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*, **134**: 127–136.
- Sugihara, I. (2006). Organization and remodeling of the olivocerebellar climbing fiber projection. *Cerebellum*, **5**: 15–22.
- Szentágothai, J., Rajkovits, K. (1959). Ueber den Ursprung der Kletterfasern des Kleinhirns. *Z Anat Entwicklungsgeschichte*, **121**: 130–141.
- Szteyn, S. (1988). Types of neurons in nucleus olivaris inferior of the European bison. *J. Hirnforsch*, **29**: 353–356.
- Taber, E. (1961). The cytoarchitecture of the brain stem of the cat. I. Brain stem nuclei of the cat. *J. Comp. Neurol.*, **116**: 27–69.
- Tan, J., Gerrits N.M., Nanhoe, R., Simpson, J.I., Voogd, J. (1995). Zonal organization of the climbing fiber projection to the flocculus and nodulus of the rabbit: A combined axonal tracing and acetylcholinesterase histochemical study. *J. Comp. Neurol.*, **356**: 23–50.
- Taner, D. (2002). *Fonksiyonel Nöroanatomi, Üçüncü Baskı*, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.- Metu Pres- Yayınları, Ankara.
- Tolbert, D.L., Massopust, L.C., Murphy, M.G., Young, P.A. (1976). The anatomical organization of the cerebello-olivary projection in the cat. *J. Comp. Neurol.*, **170**: 525–544.
- Tsuchiya, K., Oda, T., Yoshida, M., Sasaki, H., Haga, C., Okino, H., Tominaga, I., Matsui, K., Akiyama, H., Hashizume, Y. (2005). Degeneration of the inferior olive in spinocerebellar ataxia 6 may depend on disease duration: Report of two autopsy cases and statistical analysis of autopsy cases reported to date. *Neuropathology*, **25**: 125–135.
- Ulfig, N., Chan, W.Y. (2001). Differential expression of calcium-binding proteins in the red nucleus in the developing and adult human brain. *Anat. Embryol.*, **203**: 95–108.
- Umetani, T. (1989). Topographic organization of the cerebello-olivary projection in the albino rat: an autoradiographic orthograde tracing study. *Kobe J Med Sci.*, **35(2)**: 65–91.

- Uylings, H.B.M., van Eden, C.G., Hofman, M.A. (1986). Morphometry of size/volume variables and comparison of their bivariate relations in the nervous system under different conditions. *J. Neurosci. Meth.*, **18**: 19–37.
- van der Want, J.J.L., Voogd, J. (1987). Ultrastructural identification and localization of climbing fiber terminals in the fastigial nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.*, **258**: 1–18.
- van der Want, J.J.L., Wiklund, L., Guegan, M., Ruigrok, T., Voogd, J. (1989). Anterograde tracing of the rat olivocerebellar system with *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (Pha-L). Demonstration of climbing fiber collateral innervation of the cerebellar nuclei. *J. Comp. Neurol.*, **288**: 1–18.
- Viscomi, M.T., Florenzano, F., Amadio, S., Bernardi, G., Molinari, M. (2005). Partial resistance of ataxin-2-containing olivary and pontine neurons to axotomy-induced degeneration. *Brain Research Bulletin*, **66**: 212–221.
- von Bartheld, C.S. (2002). Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histology and Histopathology*, **17**(2): 639–48.
- Voogd, J. (2003). The human cerebellum. *J. Chem. Neuroanat.*, **26**: 243–252.
- Voogd, J., Feirabend, H.K.P, Schoen, S.H.R. (1990). Cerebellum and precerebellar nuclei, in “*The Human Nervous System*” (G. Paxinos ed.), San Diego, Academic Press, 312–388.
- Voogd, J., Wylie, D.R.W. (2004). Functional and anatomical organization of floccular zones: A preserved feature in vertebrates. *J. Comp. Neurol.*, **470**: 107–112.
- Walberg, F. (1956). Descending connections to the inferior olive: A experimental study in the cat. *J. Comp. Neurol.*, **104**: 77–173.
- Walberg, F. (1982). Olivary afferents from the brain stem reticular formation. *Brain Res.*, **471**: 130–136.
- Wassef, M., Chedotal, A., Cholley, B., Thomasset, M., Heizmann, C.W., Sotelo, C. (1992). Development of the olivocerebellar projection in the rat: I. Transient biochemical compartmentation of the inferior olive. *J. Comp. Neurol.*, **323**: 519–536.
- Watson, C.R.R., Herron, P. (1977). The inferior olivary complex of marsupials. *J. Comp. Neurol.*, **176**: 527–538.
- Wegiel, J., Wisniewski, H.M., Dziewiatkowski, J., Badmajew, E., Tarnawski, M., Reisberg, B., Mlodzik, B., de Leon, M.J., Miller, C.D. (1999). Cerebellar atrophy in Alzheimer’s disease-Clinicopathological correlations. *Brain Res.*, **818**: 41–50.

- Welsh, J.P., Chang, B., Menaker, M.E., Aicher, S.A. (1998). Removal of the inferior olive abolishes myoclonic seizures associated with a loss of olivary serotonin. *Neuroscience*, **82**: 879–897.
- West, M.J. (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology of aging*, **14**: 275–285.
- West, M.J. (1994). Advances in the study of age-related neurons loss. *The Neurosciences*, **6**: 403–411.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J.G. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*, **231**: 482–497.
- West, M.J. (1999). Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends in Neuroscience*, **22**: 51–61.
- West, M.J., Slomianka, L. (2001). 2–D versus 3–D cell counting – a debate. *Trends in Neuroscience*, **Vol. 24, No. 7**.
- Whitworth, R.H., Haines, D.E. (1986). On the question of nomenclature of homologous subdivision of the inferior olivary complex. *Arc. Ital Biol.*, **124**: 271–317.
- Yamamoto, M., Fujinuma, M., Hirano, S., Hayakawa, Y., Clagett-Dame, M., Zhang, J., McCaffery, P. (2005). Retinoic acid influences the development of the inferior olivary nucleus in the rodent. *Development Biology*, **280**: 421–433.
- Young, B., Heath, J.W. (2000). *Weater's Functional Histology, A Text and Colour Atlas*, **Fourth Edition**, Churchill Livingstone, London.
- Zanjani, H.S., Mariani, J., Delhay-Bouchaud, N., Herrup, K. (1992). Neuronal cell loss in heterozygous staggerer mutant mice: A model for genetic contributions to the aging process. *Dev. Brain Res.*, **67**: 153–160.
- Zanjani, H.S., Herrup, K., Guastavino, J.-M., Delhay-Bouchaud, N., Mariani, J. (1994). Developmental studies of the inferior olivary nucleus in staggerer mutant mice. *Developmental Brain Research*, **82**: 18–28.
- Zanjani, H.S., Vogel, M.W., Delhay-Bouchaud, N., Martinou, J.C., Mariani, J. (1997). Increased inferior olivary neuron and cerebellar granule cell numbers in transgenic mice overexpressing the human Bcl-2 gene. *J. Neurobiol.*, **32**: 502–516.
- Zanjani, H.S., Herrup, K., Mariani, J. (2004). Cell number in the inferior olive of nervous and leaner mutant mice. *Journal of Neurogenetics*, **18**: 327–339.

Zhang, W., Lin, T.R., Hu, Y., Fan, Y., Zhao, L., Mulholland, M.W. (2003). Activation of c-fos expression in the rat inferior olivary nucleus by ghrelin. *Neuroscience Letters*, **353**: 157–160.



## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılı Samsun doğumluyum. İlk, orta ve yüksek öğrenimimi Samsun'da yaptım. 2002 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2003 yılında O.M.Ü. Sağlık Bilimleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazandım. Yüksek lisans eğitiminin ilk senesinde O.M.Ü. Tıp Fakültesi Dönem II derslerini alarak başarı ile tamamladım. 2004 yılında aynı enstitünün Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın açmış olduğu Doktora sınavını kazanarak Doktora eğitimime başladım. 2005 yılı Eylül ayından itibaren Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.