

RESEARCH ARTICLE

# Sıçan Koklear Nuklesunun Postnatal Gelişimi: Fiziksel Fraksiyonlama Yöntemi ile Nöron Sayımı

Bülent Ayas<sup>1</sup>(ID), Pınar Naile Gürgör<sup>2</sup>(ID)

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. Samsun, Türkiye

<sup>2</sup>Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. Ordu, Türkiye

Published online: 31 Ağustos 2021

© Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Turkey, 2021

## Özet

**Amaç:** Koklear nukleus (KN), beyin sapının dorsolateralinde pons ile medulla oblongata sınırında yerleşim gösteren kohleadan gelen tüm işitme yollarını alan ve işitsel bilgilerin işlendiği ilk merkezi sinir sistem kompleksidir. Farklı yaş grubundaki sıçanların koklear nukleuslarındaki toplam nöron sayılarının fiziksel fraksiyonlama yöntemi ile hesaplanması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Sayımlar, koklear nukleusun ventral kısmında (VKN) gerçekleştirildi. Çalışmada postnatal (P) 5, 7, 9, 12, 15, 30 günlük gruplar kullanıldı. Rutin parafin doku takibi işleminden sonra, VKN'den koronal düzlemde 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Her 30. kesit çifti örneklendi ve cresyl violet acetate ile boyandı. Sistemik örnekleme, eşleştirilmiş kesit alanlarının kaydedilmesi ve eş zamanlı olarak görüntülenmesi işlemleri laboratuvarımızda geliştirilen etkin bir yaklaşım uygulanarak gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Postnatal 12. güne kadar VKN nöronlarının sayısında düzenli bir artış tespit edildi. P3. günde görülen toplam nöron sayısında belirgin bir nöron kaybının ardından önemli bir nörogenez başlamış ve P30. günde toplam nöron sayısının erişkin düzeyine çıktığı görülmüştür. Tüm grup verilerinin normal dağılım gösterdikleri ve varyanslarının homojen olduğu gözlenmiştir ( $p>0.05$ ). Veriler normal dağılım gösterdiğinden, hayvan grupları arasında bir farklılık olup olmadığı one-way ANOVA ile değerlendirildi ve farklılık olduğu görüldü.

**Sonuç:** Sıçanlarda işitmenin başlangıcında (P10-12. günler) meydana gelen toplam nöron sayısındaki önemli değişiklik, daha önce bildirilen verileri doğrularken bildirilen değerlerin değişikliği ve büyüklüğü ile çelişmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Stereoloji, fiziksel fraksiyonlama, nöron sayımı, koklear nukleus

## Postnatal Development of Rat Cochlear Nucleus: Neuron Counting with the Physical Fractionator Method

### Abstract

**Objective:** The cochlear nucleus (CN) is the first central nervous system complex that receives all auditory pathways from the cochlea, located at the border of the pons and medulla oblongata in the dorsolateral of the brain stem, and is the first central nervous system complex where auditory information is processed. It was aimed to estimate the total number of neurons in the cochlear nuclei of rats in different age groups with the physical fractionator method.

**Methods:** Counts were performed in the ventral part of the cochlear nucleus (VCN). Postnatal (P) 5, 7, 9, 12, 15 and 30 day groups were used in the study. After routine paraffin tissue follow-up, 4 µm thick sections were taken from the VCN in the coronal plane. Each 30th pair of sections was sampled and stained with cresyl violet acetate. Systematic sampling, recording and simultaneous imaging of paired cross-sectional areas were performed using an effective approach developed in our laboratory.

**Results:** An orderly increase in the number of VCN neurons was detected until the postnatal twelfth day. After a significant loss of neurons in the total number of neurons seen on the third day, a significant neurogenesis started, and it was observed that the total number of neurons increased to the adult level on the thirtieth day. It was observed that all group data showed normal distribution and their variances were homogeneous ( $p>0.05$ ). Since the data showed a normal distribution, one-way ANOVA was used to evaluate whether there was a difference between animal groups and there was a difference.

**Conclusion:** The significant change in the total number of neurons at the onset of hearing (days P10-12) in rats confirmed the previously reported data but contradicted the change and magnitude of the reported values.

**Key Words:** Stereology, physical fractionator, neuron count, cochlear nucleus

**Suggested Citation:** Ayas B, Gürgör PN. Sıçan Koklear Nuklesunun Postnatal Gelişimi: Fiziksel Fraksiyonlama Yöntemi ile Nöron Sayımı. ODU Med J, 2021;8(2):7-11.

Sorumlu yazar:

Bülent Ayas

Telefon numarası: +90 (362) 312 19 19

E-mail: ayasb1@yahoo.com

### Giriş

Koklear nukleus (KN), kohleadan gelen tüm işitme yollarını alan ve işitsel bilgilerin işlendiği ilk merkezi sinir sistem kompleksidir. Beyin sapının dorsolateralinde pons ile medulla oblongata sınırında yerleşim gösterir (1,2).

KN, ventral ve dorsal olmak üzere iki ana alt nukleusa sahiptir. Ventral koklear nukleus (VKN) ise anteroventral ve posteroventral iki alt nukleus tarafından şekillendirilir (3).

KN'de tonotopik bir organizasyon mevcuttur. Bu düzenlenmede düşük frekansa sahip lifler ventral parçada, yüksek frekansa sahip lifler ise dorsal parçada sonlanır. KN nöronlarında da bu tonotopik organizasyon gözlenir. Kendine özgü yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip bu nöronlar, nukleusun belli alanlarında spesifik hücre popülasyonlarını şekillendirirler (4).

Bu özel yapı ve organizasyonundan dolayı çok sayıda elektrofizyolojik, morfolojik ve patolojik analizler bu nukleusta gerçekleştirilmiştir. Nöron sayısının belirlenmesine yönelik çalışmalar, yapının fonksiyonunun değerlendirilmesinde oldukça değerli bilgiler vermektedir. Ancak bu tür çalışmalarda bildirilen sonuçlar arasında oldukça belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Bu durum tarafsız stereolojik metotlarla gerçekleştirilen analizler için de geçerlidir (5-9).

Çalışmada farklı yaş grubundaki sıçanların koklear nukleuslarındaki toplam nöron sayılarının fiziksel fraksiyonlama yöntemi ile hesaplanması amaçlanmıştır.

### Yöntem

Hayvanlara uygulanan histolojik işlemleri takiben, nöron sayımı KN'nin VKN alt nukleusundaki toplam nöron sayısı, fiziksel fraksiyonlama (12) tekniğine göre hesaplandı ve sonuçları disektör-Cavalieri yaklaşımı (13) ile doğrulandı.

Bu çalışmada sayı belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen fiziksel fraksiyonlama tekniğini bu verilerin yeniden değerlendirilmesinde kullanıldı.

Çalışma, KN'nin ana alt nukleusundan biri olan VKN'de gerçekleştirilmiştir. Postnatal gelişim sürecinde toplam nöron sayısındaki değişimleri hesaplandı.

Çalışmanın ayırıcı bir özelliğini, anabilim dalımızda geliştirilen örnekleme (10) ve fiziksel disektör çiftlerinin görüntü yakalama kartı ile görüntülenmesi (11) yaklaşımının pratik uygulamasını içermesidir.

### Hayvanlar

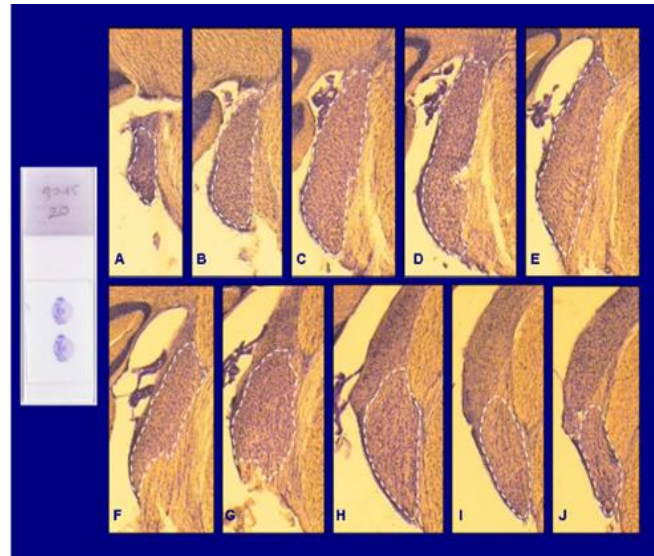
Çalışmada kullanılan hayvanlar Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deneysel hayvanlarına yapılan tüm uygulamalar etik ilkelere uygun olarak gerçekleştirildi. Sıçanların bakımları  $20 \pm 2$  °C'de ısı, 12 saat aydınlık-karanlık ortamda istedikleri kadar yem ve su alabilecekleri şekilde sağlandı.

Postnatal (P) 5, 7, 9, 12, 15 ve 30 günlük olmak üzere 6 grup için (n=5) toplam 30 adet Wistar cinsi erkek albino rat kullanıldı.

Ratların hepsi ketamin ile anestezi altına alındı ve fosfatla tamponlanmış %4'lük gluteraldehit ve paraformaldehit ile (14,15) intrakardiyak perfüze edildiler. Perfüzyonun bitiminden hemen sonra hayvanlar dekapite edildi ve beyin sapları alındı.

### Histolojik prosedür

Beyin sapları, standart histolojik doku takip işlemleri sonunda paraplast gömülerek bloklandı. KN içeren beyin sapları rasgele bir başlangıçla, koronal düzlemde 4 µm kesit kalınlığında, her 30. kesit çifti olacak şekilde (P5 ve P7 için her 20.) kesildi ve kesitler cresyl violet acetate ile boyandı. Bu şekilde her bir hayvandan ortalama 9-10 adet preparat elde edildi (Şekil 1).



Şekil 1. Kesit çiftleri aynı preparata alınmıştır (sağda). Şekilde P30 günlük sıçanın KN'sinden örneklenen her 30. kesit çifti verilmiştir. Tüm kesitler en rostral (A) en kaudal (J) doğru VKN'nin sınırları (beyaz noktalı çizgili alan) belirtilerek sıralanmıştır (cresyle violet acetate, obj. 4x, son büyütme 165x).

**Stereolojik prosedür**

VKN içeren her bir kesitte, nöron sayımı kesit alanlarının bilinen bir fraksiyonunda gerçekleştirildi. Bu işlemler Ayas ve ark (11) geliştirmiş olduğu uygulamaya göre yapılmıştır. KN'nin kesit görüntüsü görüntü yakalama kartı aracılığıyla monitöre rasgele düşürüldü (referans kesit). Monitöre yerleştirilen asetat ile CN profili örneklendi. Örneklenen alanlardan birisi ekranın ortasına getirildi ve 40x objective büyütmesine geçildi. Bu görüntü resim olarak kaydedildi. Tekrar küçük büyütme geçildi ve bir referans noktası bulundu. Bu aşamada ok sabit bırakıldı ve diğer kesitteki (gözlem kesiti) aynı noktaya tabla hareketi ile ok (ok sabit durmakta) getirildi. Burada da 40x büyütme geçildi. Elde edilen bu görüntü de resim olarak kaydedildi. Resim formatında kaydedilen disektör çiftlerine ait eş değer alanların (referans kesit ve gözlem kesiti) eşzamanlı görüntülenip değerlendirilmesi işlemi PowerPoint® programında gerçekleştirildi.

Toplam nöron sayısı, sayılan nöronların örnekleme fraksiyonlarının tersi ile çarpılmasıyla hesaplandı.

$$N = \Sigma Q^{-} \times 1/f1 \times 1/f2$$

**İstatiksel analiz**

Verilerin normallik dağılımının değerlendirilmesinde Shapiro-Wilk testi, varyans homojenliğinin kontrolünde ise Levene testi kullanıldı. Veriler normal dağılım gösterdiğinden gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesi one-way ANOVA ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılık Tukey's HSD çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi. P değeri 0,05'den küçük olanların anlamlı farklılık gösterdiği kabul edildi.

**Bulgular**

P5, P7, P9, P12, P15, P30 günlük grupların VKN'sindeki toplam nöron sayısı sırasıyla 21504, 24920, 26928, 20940, 29148, 35568 olarak hesaplandı. Her bir grup için hesaplanan toplam nöron sayıları ve standart sapmaları (N±SD), hata katsayıları (CE) ve varyasyon katsayıları (CV) Tablo 1'de verilmiştir.

Tüm grup verilerinin normal dağılım gösterdikleri ve varyanslarının homojen olduğu gözlenmiştir (p>0.05). Veriler normal dağılım gösterdiğinden, hayvan grupları arasında bir farklılık olup olmadığı one-way ANOVA ile değerlendirildi ve farklılık olduğu görüldü (p<0.001).

**Tablo 1.** Postnatal gelişim sürecindeki ratların sağ VKN'lerine ait toplam nöron sayıları

Gruplar	N ± SD	CE	CV
P5	21504 ± 951 <sup>c</sup>	0.12	0.08
P7	24920 ± 2528 <sup>b, c</sup>	0.13	0.09
P9	26928 ± 3195 <sup>b</sup>	0.13	0.09
P12	20940 ± 952 <sup>c</sup>	0.12	0.08
P15	29148 ± 2765 <sup>b</sup>	0.12	0.08
P30	35568 ± 4203 <sup>a</sup>	0.11	0.08

N: hesaplanan toplam nöron sayısı; SD: standart sapma; CE: hata katsayısı CV: varyasyon katsayısı.

Bir harfi paylaşmayan ortalamalar anlamlı olarak farklıdır (p<0,05).

**Tartışma**

Bu sonuçlar P12 güne kadar nöron sayısında bir artışı olduğunu göstermektedir. Bu gündeki önemli bir düşüşten sonra ikinci fakat önemli bir artış 3 gün sonra görülmektedir. P7. güne kadar gözlenen nöron sayısındaki artma burada hız kesmiş ve P9. günde gözlenen artıştaki devam anlamsız seviyede kalmıştır. P9. günden sonra artıştaki azalma yerini P12. günde yaklaşık %25 oranında gerçekleşen bir düşüşe bırakmaktadır. P15. günden itibaren ise nöron sayısı yeniden ancak çok daha keskin bir şekilde artarak ancak P30. günlük grupta yetişkin seviyesine ulaşmaktadır.

Nöron sayısındaki bu değişim, işitmenin başladığı günlere karşılık gelmesi noktasında KN'de gerçekleştirilen diğer gelişimsel sayım çalışmalarında (7,8,16,17) belirlenmiş değişim ile benzer özellikler gösterir. Çünkü bunların hepsinde nöron sayısında bir değişim tespit edilmiş ve bu değişimin P10 – 12. günlerde gerçekleştiği bildirilmiştir. Yani bu verilere bakarak bu günlerin nöron sayısı değişiminde bir dönüm noktası olduğu söylenebilir. Ancak bu çalışmalarda bildirilen nöron sayısı değerleri, değişimin şekli ve yetişkin nöron sayısı seviyelerine ulaşılan dönemlere bakıldığında oldukça çelişkili veriler karşımıza çıkmaktadır. Çalışma sonuçlarımız, bu konuda tespit edebildiğimiz ilk çalışma olan Mlonyeni'nin (16) bulguları ile birçok noktadan örtüşmektedir. Bu araştırmacıya göre; nöron sayısı fare VKN'sinde P9 – 10. güne kadar yetişkin seviyesinin üzerine çıkacak kadar artar ve 1–2 gün sonra P10 – 12. günlerde) % 25 oranında bir azalma ile yetişkin değerlerine ulaşır. Bu çalışmada da P9. güne kadar olan bir artıştan sonra yaklaşık %25'lik bir azalma tespit edildi. Ancak bahsedilen çalışmada, burada tespit ettiğimiz P12. günden sonraki önemli artış gözlenmemiştir. Yine bizim çalışmamızda yetişkin değerlerine P12. günde değil, P30. günde ulaşılmıştır.

Webster (7) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da VKN'deki nöron sayısının giderek artan bir seyir gösterdikten sonra P12. günde yetişkin değerlerine ulaştığı tespit edilmiştir. Ancak evvelki çalışmadan farklı olarak yetişkin değerlerine ulaşılırken hücre kaybı belirlenmemiştir. Hatta bu çalışmada bu değer 24 ve 90 günlük farelerde artış göstermekle birlikte, bunun anlamlı seviyede olmadığı da bildirilmiştir. Bu bulgular birçok noktadan bizimkiler ile çelişki halindedir.

Tierney ve Moore'un (8) gerbil olarak isimlendirilen bir başka kemirici türünde gerçekleştirdikleri araştırmada, VCN nöronlarının ilk hafta içerisinde sabit kaldıktan sonra P10–12. günlerde %22 oranında bir azalma sonucunda yetişkin değerlerine ulaştıkları tespit edilmiştir. Bu çalışma ile örtüşen tek bulgumuz aynı günlerde tespit ettiğimiz benzer orandaki hücre azalmasıdır.

Anabilim dalımızda sıçanlarda gerçekleştirdiğimiz ve işitme öncesi ve sonrası olmak üzere iki yaş grubunu kapsayan (P5 ve P30 günlük) bir çalışmada (18), sıçan VKN'sindeki nöron sayısının 2,4 katı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın verilerimiz ile kıyaslayabileceğimiz kısmı nöron sayısı değerleri (sıçanlarda gerçekleştirildiği için) ve artış oranıdır. Ayas ve ark. (18) göre sağ VCN'deki nöron sayısı 13643'ten (P5 günlük) 34570'e çıkmıştır. Buradaki artış oranı sunulan çalışmada tespit ettiğimiz miktara (1.6 kat) göre oldukça fazla olmakla birlikte, P30 günlük sıçanlar için bildirilen değerler tam bir uyum içerisindedir (34570'e karşılık 35568).

Anabilim dalımızda yine sıçanlarda gerçekleştirilen bir başka KN gelişim çalışmasında (17) çalışmamız ile aynı yaş grupları kullanılmıştır. Bu çalışmada nöron sayısında P5. günden itibaren düzenli bir artış gözlenmiş ve bu sayının P12. günlerde 1.8 katına çıkarak yetişkin değerlerine ulaştığı bildirilmiştir. Tıpkı Webster'in (7) farelerde gerçekleştirdiği çalışmanın verilerine benzeyen bu sonuçlar şekil açısından bulgularımız ile örtüşmemektedir. Nöron sayısı değerleri bakımından incelendiğinde ise, bizim verilere göre 1.5 – 2 katı kadar daha düşük olan nöron sayısı değerlerinin hesaplandığını görüyoruz.

Özetle, sıçan VKN'sindeki nöron sayısı postnatal ilk hafta içerisinde artış gösterdikten sonra bir duraklama dönemine girer ve işitmenin başladığı bildirilen dönemde (P12. günde) P5 günlük seviyeye düşer. Ancak P15. günden itibaren tekrar artarak P30. günde yetişkin değerlerine ulaşır.

KN'de (ve diğer yapılarda) gerçekleştirilen hücre sayımı çalışmalarında gözlenen farklılıklar taraflı metot kullanımı, tarafsız metotun yanlış uygulanması,

preparasyonun uygun yapılmaması, hücre tanımlanmasındaki farklılıklar ve doku deformasyonlarından kaynaklanmaktadır. Stereolojik sayım çalışmalarının sonuçlarını etkileyen önemli bir faktör, stereolojik metottan bağımsız bir etken olan kesitlerde hücrelerin tanımlanması ile ilgilidir.

Stereolojik sayım çalışmaları arasındaki çelişkiler, ilgili metodun tüm gereklerinin eksiksiz olarak yerine getirilmesi ve kesitlerde kesin düzeyde tanımlama sağlayan boyama veya işaretleme tekniklerinin kullanımı ile ortadan kaldırılabılır veya en aza indirgenebilir.

### Sonuç

Stereolojik sayım çalışmalarında altın standart olarak değerlendirilen fiziksel fraksiyonlama tekniğinin tercih edilmesi çalışmalar arası olası çelişkileri en aza indirecektir.

### Teşekkür

Bu proje "Postnatal gelişim sürecinde sıçan koklear nukleusundaki nöron sayısının fiziksel fraksiyonlama metodu ile belirlenmesi" isimli doktora tez çalışmasından üretilmiştir. Saygıdeğer Rahmetli Danışman Hocam Prof. Dr. Adnan KORKMAZ anısına...

---

**Peer-review:** Dışarıdan hakemli.

### Yazar katkıları:

**Konsept:** BA. **Tasarım:** BA **Literatür tarama:** BA **Veri Toplama ve İşleme:** BA, PNG **Analiz veya Yorumlama:** BA, PNG **Yazan:** BA.

**Yazar çatışması:** Yazarlar çatışma olmadığını beyan etmiştir.

**Finansal destek:** Yazarlar bu çalışmada herhangi bir finansal destek almadığını beyan etmişlerdir.

---

### Kaynaklar

1. Snyder RL and Leake PA. Topography of spiral ganglion projections to cochlear nucleus during postnatal development in cats. *J Comparative Neurology*. 1997; 384: 293-311.
2. Biacabe B, Chevallier JM, Avan P, Bonfils P. Functional anatomy of auditory brain stem nuclei: application to the anatomical basis of brain stem auditory evoked potentials. *Auris Nasus Larynx*. 2001;28(1): 85-94.
3. Osen KK. Cytoarchitecture of cochlear nuclei in cat, *J Comparative Neurology*. 1969;136(4): 453-484.

4. Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Canlon B. Modulating calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the cochlear nucleus by moderate noise exposure in mice. A quantitative study on the dorsal and posteroventral cochlear nucleus. *Brain Research*. 1998;800(1): 86-96.
5. Gleich Y, Kadow C, Strutz J. The postnatal growth of cochlear nucleus subdivisions and neuronal somata of the anteroventral cochlear nucleus in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Audiology & Neuro-Otology*. 1998;3(1): 1-20.
6. Moore JK, Guan YL, Shi SR. MAP2 expression in developing dendrites of human brain stem auditory neurons. *J Chem Neuroanatomy*. 1998;16(1): 1-15.
7. Webster DB. Conductive hearing loss affects the growth of cochlear nuclei over an extended period of time. *Hearing Research*. 1988; 32: 185-192.
8. Tierney TS, Moore DR. Naturally occurring neuron death during postnatal development of gerbil ventral cochlear nucleus begins at the onset of hearing. *J Comparative Neurology*. 1997;387: 421-429.
9. Açar E, Korkmaz A, Bosnak M, Demir Ş, Ayyıldız M, Marangoz C. Do cochlear nuclei contribute to auditory lateralization? A stereological evaluation of neuron numbers, *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*. 1999;108: 661-665.
10. Korkmaz A, Çiftçi N, Boşnak M, Açar E. A simplified application of systematic area sampling and low-cost video recording set up for viewing disector pairs-exemplified in the rat cochlear nucleus. *J Microsc*. 2000;200(3): 269-276.
11. Ayas B, Korkmaz A, Gürgör PN. Simultaneous Viewing of Disector Pairs with a Frame Grabber: A Practical and Economic Application of the Physical Disector on Systematically Sampled Section Fields. *Cell & Tissue Biology Research, 9th National Histology and Embryology Congress with International Contribution; May 20-23; Adana-Turkey: 2008*.
12. Gundersen HJG. 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*. 1986;143: 3-45.
13. Pakkenberg B, Gundersen HJG. Total numbers of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by disector and fractionator. *Journal of Microscopy*. 1988;150: 1-20.
14. Kaya M. Elektron mikroskopi teknikleri. *Bulletion of the Çukurova Medical Faculty*. 1984;9: 61-71.
15. Bancroft JD and Stevens A. theory and practice of histological techniques. Fourth Edition. Churchill Livingstone. 1996.
16. Mlonyeni M. The late stages of the development of the primary cochlear nuclei in mice. *Brain Research*. 1967;4: 334-344.
17. Tümkeya L. Sıçanlarda koklear nuklesun postnatal gelişiminin stereolojik metotlarla araştırılması. Doktora tezi. OMU Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2003.
18. Ayas B, Korkmaz A, Çiftçi N. İşitme öncesi ve sonrası dönemlerindeki sıçanlarda koklear nukleusun kantitatif özelliklerinin stereolojik metotlarla belirlenmesi. VI. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Bildiri Özeti Kitapçığı, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi. İstanbul-Türkiye: 2002.