

RESEARCH ARTICLE

Sıçan Nukleus Olivaris İ inferiorundaki Toplam Nöron Sayısının Fiziksel Disektör Yaklaşımlarıyla Belirlenmesi

Pınar Naile Gürgör¹(ID), Bülent Ayas²(ID)

¹Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. Ordu, Türkiye

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. Samsun, Türkiye

Published online: 31 Ağustos 2021

© Ordu University Institute of Health Sciences, Turkey, 2021

Özet

Amaç: Nukleus olivaris inferior, medulla oblongata ön yüzeyinde oliva denilen kabartıları oluşturan, beyin sapındaki en büyük ve karakteristik şekli olan bir çift nukleustur Sıçan Nukleus olivaris inferiorundaki (NOİ) toplam nöron sayısının, sayı hesaplamasında altın standart olarak kabul edilen fiziksel disektör olarak tanımlanan stereolojik yöntem ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Eşit sayıda dişi ve erkek olmak üzere toplam 10 adet Wistar sıçan beyin saplarına, rutin parafin doku takibi uygulandı. Nöronlar, NOİ hacminin bilinen bir fraksiyonunda (kesit ve alan fraksiyonları) sistematik olarak örneklenmiş fiziksel ayırıcılarla sayıldı. Her bir NOİ'deki toplam nöron sayısı, sayılan nöronların kullanılan fraksiyonların tersi ile çarpılmasıyla hesaplandı. Verilerin analizinde Student's t-testi kullanıldı. Grup varyanslarının homojenliği Levene's test ile kontrol edildi. Hesaplamalarda ve yorumlamalarda istatistiksel anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı.

Bulgular Dişi ve erkek sıçanların sağ NOİ'lerindeki toplam nöron sayısı sırasıyla 37014 ve 38707, sol NOİ'lerindeki toplam nöron sayısı 37014 ve 39614 olarak hesaplandı. Ne cinsiyetler arasında ne de sağ ve sol kısımlar arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

Sonuç: Bu sonuçlar, sol ve sağ nukleuslar arasında herhangi bir fark olmadığı konusunda daha önce yapılan çalışma sonuçlarını doğrulamaktadır. Ancak literatürde bildirilen 17000 ile 30000 arasında değişen rakamlarla çelişmektedir. Yazının sonunda bu parametre ile ilgili tutarsızlıklara yol açabilecek olası nedenler tartışıldı.

Anahtar Kelimeler: Nukleus olivaris inferior, hücre sayımı, stereoloji, fiziksel disektör,

Determination of the Number of Neurons in the Rat Inferior Olivary Nucleus with Physical Disector Approaches

Abstract

Objective: Nucleus olivarius inferior is a pair of nuclei in the anterior surface of the medulla oblongata that form ridges called olivia, the largest and characteristic shape in the brainstem. It was aimed to determine the total number of neurons in the rat nucleus olivaris inferior (NOI) using the stereological method, which is defined as the physical disector, which is accepted as the gold standard in number calculation.

Methods: Routine paraffin processing was applied to the brain stems of 10 Wistar rats in equal numbers of males and females. Neurons were counted with systematically sampled physical separators in a known fraction of the NOI volume (section and area fractions). The total number of neurons in each NOI was estimated by multiplying the counted neurons by the inverse of the fractions used. Student's t-test was used to analyze the data. The homogeneity of group variances was checked with Levene's test. Statistical significance level was taken as 5% in calculations and interpretations.

Results: The total number of neurons in the right NOIs of female and male rats was 37014 and 38707, respectively, and the total number of neurons in the left NOIs was 37014 and 39614, respectively. No significant difference was observed between the sexes, nor between the right and left parts.

Conclusion: These results confirm the results of previous studies that there is no difference between the left and right nuclei. However, it contradicts the figures reported in the literature ranging between 17000 and 30000. At the end of the article, possible reasons for inconsistencies regarding this parameter was discussed.

Key Words: Nucleus olivarius inferior, cell count, stereology, physical disector

Suggested Citation: Gürgör PN, Ayas B, Sıçan Koklear Nukleusunun Postnatal Gelişimi: Fiziksel Fraksiyonlama Yöntemi ile Nöron Sayımı. ODU Med J, 2021;8(2):12-17.

Sorumlu yazar:

Pınar Naile Gürgör

Telefon numarası: +90 (452) 226 52 14

E-mail: pinarn@hotmai.com

Giriş

Nukleus olivaris inferior, medulla oblongata ön yüzeyinde olivaria denilen kabartıları oluşturan, beyin sapındaki en büyük ve karakteristik şekli olan bir çift nukleustur (1).

Çok sayıdaki yapı ile olan bağlantılarının yanı sıra; beyincikle olan bağlantılarının sıra dışılığı, NOI'yi sinir sisteminin gelişim ve fonksiyonunu konu alan birçok araştırma modeli için tercih edilen ideal bir yapı durumuna getirmiştir. Somatomotor bilgilerin işlendiği karmaşık bir ara durak olan NOI; talamus, korteks, beyin sapı ve omurilikten afferent bağlantılar alırken (2), nöronlarının ana projeksiyonu kontralateral beyincik korteksindeki Purkinje hücrelerindedir (3). Beyincikte tırmanıcı lif olarak adlandırılan uyarıcı afferent lif sisteminin tek kaynağını, NOI kökenli bu projeksiyonlar oluşturur (4-6). Bu liflerin bir başka önemli özelliği ise beyincik içerisinde oldukça iyi tanımlanmış, düzenli bir organizasyon göstermeleridir. NOI'nin belirli bir bölgesinden çıkan lifler, kontralateral taraftaki beyincik korteksinin belirli bir bölgesinde sonlanırlar (5,7,8). Dikkat çekici diğer bir özellik de, gelişimin tamamlanması durumunda son halini alan bu olivoserebellar bağlantıdaki sayısal yapılanmadır. Her bir Purkinje hücresi bir tırmanıcı lif ile innerve edilir (2,9,10). Ancak Purkinje hücrelerinin sayısı NOI'deki nöronlardan çok daha fazla olduğundan yaklaşık 5-10 kadar Purkinje hücresine bir olivoserebellar lif düşmektedir (2,11). Tırmanıcı lifler beyincik korteksine ulaşmadan önce medulladaki derin nukleuslara uzanan yan dallar da verirler. Kortekse ulaştıklarında liflerden her biri kendisi ile ilişkili Purkinje hücrelerinin her birisinin gövde ve dendritleriyle yaklaşık 300 kadar sinaps yapmaktadır (12). Bu anatomik organizasyon ve bağlantı şekli, merkezi sinir sisteminin gelişim ve fonksiyonunu düzenleyen çok sayıdaki mekanizmanın araştırılması için oldukça elverişli özelliklerdir.

NOI'deki 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 değerler tutarsızlık göstermektedir. Bu durum tarafsız stereolojik metotların kullanıldığı çalışmalar için de geçerlidir. Bu çelişkinin olası nedenlerinin araştırıldığı bu çalışmada, stereolojik sayım metotları içerisinde altın standart olarak kabul edilen fiziksel disektör metodu ile bu parametrenin yeniden hesaplanması amaçlandı.

Yöntem

Çalışmada kullanılan hayvanlar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Hayvanlara yapılan tüm uygulamalar etik ilkelere uygun olarak gerçekleştirildi. Bakımları 20 ± 2 °C'de, 12 saat aydınlık-karanlık ortamda, istedikleri kadar yem ve su alabilecekleri şekilde sağlandı. Postnatal 30 günlük beşer adet dişi ve erkek olmak üzere 10 adet Wistar cinsi albino sıçan kullanıldı. Ketamin anestezisi altında fosfatla tamponlanmış %4'lük glüteraldehit (13) ile intrakardiyak perfüze edilen sıçanların beyin sapları dekapite edildikten sonra alındı. Rutin histolojik doku takibi uygulanan her bir beyin sapı, parafin kullanılarak bloklandı.

Beyin sapını içeren parafin bloklar, pilot çalışma verileri ışığında, sistematik rastgele örnekleme ile koronal düzlemde her 1/40 olacak şekilde, 4 µm kalınlığında kesit çiftleri halinde kesilerek alındı. Bu şekilde her bir hayvandan yaklaşık 9-10 adet preparat elde edildi. Kesitlere Klüver-Barrera metoduna (14) göre luxol fast blue ile miyelin, cresyl violet acetate ile de Nissl boyamaları yapıldı.

Uygulama, kamera (Panasonic F10 CCD) ve ışıklı ok sağlayıcısı içeren bir mikroskop (Olympus BH-2) ve görüntü yakalama kartı (Pinnacle, Studio Movie Box Plus 710) olan bir bilgisayar (Pentium Core2 Duo) aracılığı ile gerçekleştirildi.

Nöron sayımı, literatürde bildirilen kurallar (15,16) doğrultusunda ve fiziksel disektör çiftlerinin görüntüleme yaklaşımı (17,18) ile gerçekleştirildi.

Kesit çiftleri sistematik rasgele örnekleme ile her 40'ta bir olacak şekilde alındığından ilk fraksiyonumuz $f_1 = 1/40$ 'dır. Kesit çiftlerinden birisi referans kesiti bir diğeri ise gözlem kesitidir. Küçük objektif büyütmesi ile (obj. 4x) referans kesitinde örnekleme yapıp, hangi alanlarda sayım yapılacağı tespit edildi (Şekil 1). Bu şekilde ikinci bir fraksiyon elde edilmiş oldu (f_2).

Sayım işleminin yapılacağı objektif büyütmesinde (obj. 60x) referans kesitinde örneklenen alanlardan birisi referans alanı olarak, gözlem kesitinde ise bu görüntünün eş değeri bulunarak gözlem alanı olarak kaydedildi. Bu işlem diğer alanlar için de tekrarlandı. Fiziksel disektör ile nöron sayımı (ΣQ^- = sayılan nöronların toplamı) PowerPoint® programında gerçekleştirildi (Şekil 2).

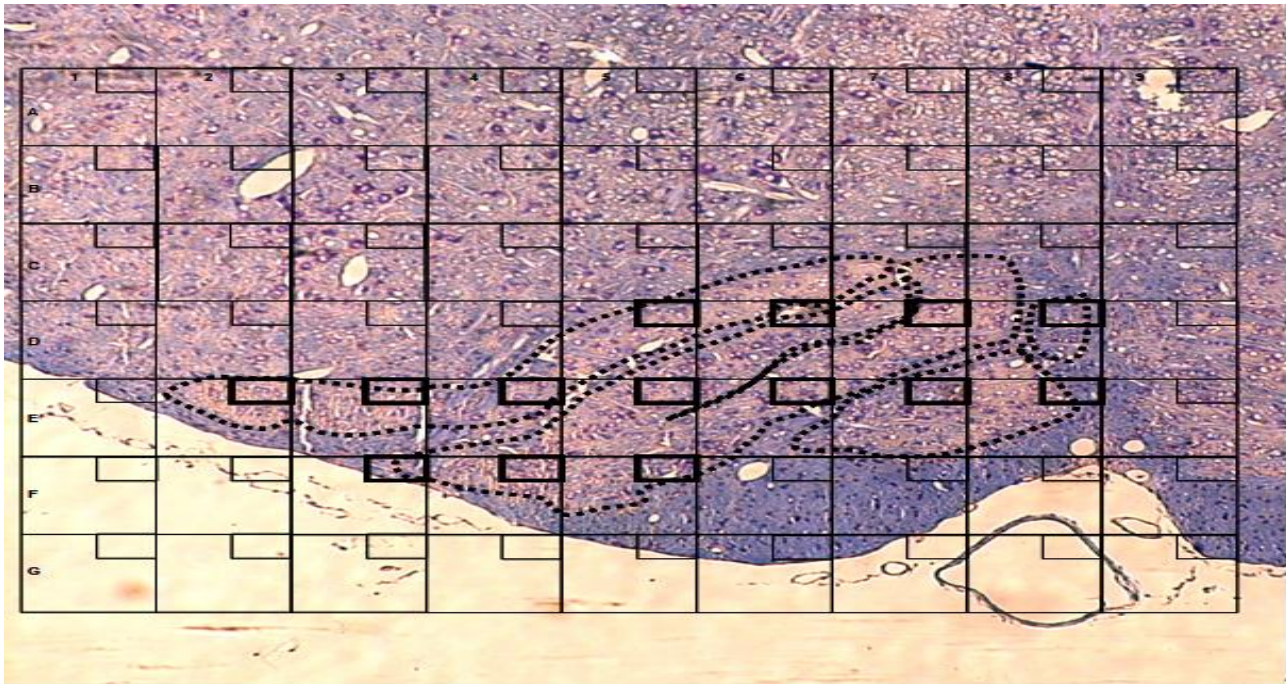
Toplam nöron sayısı (N), sayılan nöronların örnekleme fraksiyonlarının tersi ile çarpılmasıyla hesaplandı.

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

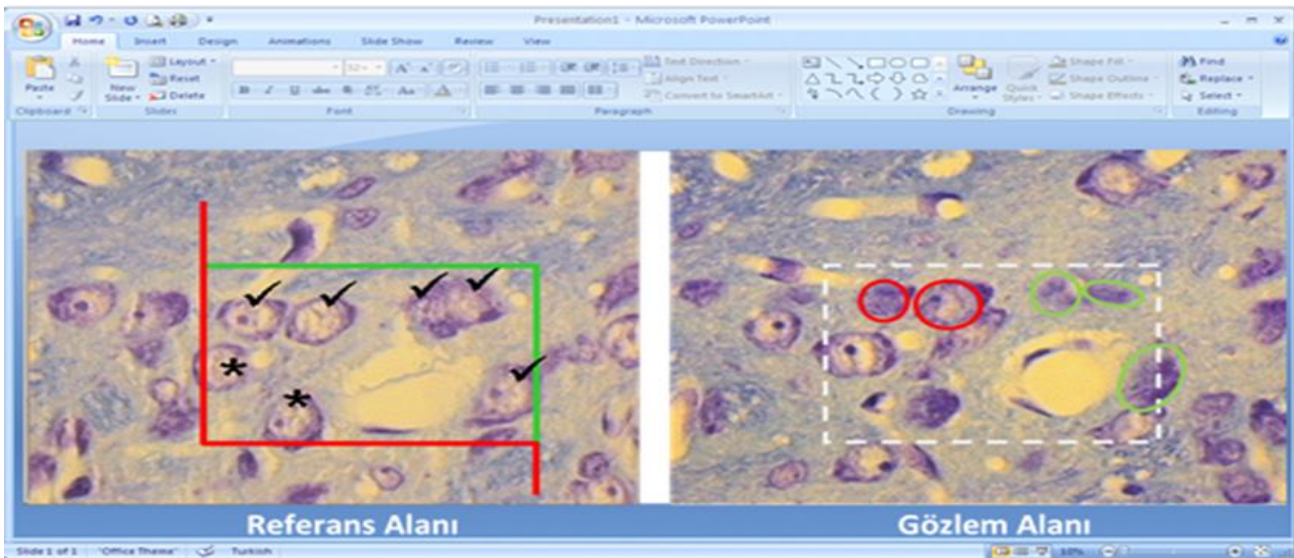
Verilerin analizinde Student's t-testi kullanıldı. Grup varyanslarının homojenliği Levene's test ile

kontrol edildi. Hesaplamalarda ve yorumlamalarda istatistiksel anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı. Tüm

hesaplamalar SPSS v26 (IBM Inc., Chicago, IL, USA) istatistik yazılım programında yapıldı.



Şekil 1. Sıçan NOI'sinde fiziksel disektör ile toplam nöron sayısının belirlenmesinde izlenen alan örnekleme şekli. Koyu renkli kutucuklar NOI'nin örneklendiği alanlardır (Cresyle violet acetate ve luxol fast blue boyama, obj. 4x, son büyütme 165x).



Şekil 2. Örneklenen eşdeğer alanlarda nöron sayımı. Fiziksel disektör ile nöron sayımı (ΣQ^- =sayılan nöronların toplamı) işlemi PowerPoint® programında gerçekleştirildi. Eşdeğer alanlar sırayla yan yana görüntülenirken üzerlerine yine bu programda hazırlanmış bir sayım çerçevesi düşürüldü. Referans kesitinde örneklenen nöron çekirdeklerinin diğer kesitte (gözlem kesitinde) olup olmadığına bakıldı. Örneklenen nöron çekirdekleri '(✓)' işareti ile gösterilmiştir. Çerçevenin içerisinde yer almakla birlikte yasaklanmış kenarlara (kırmızı ile gösterilmiştir) temas ettikleri için örneklenen 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.

Bulgular

Sıçan NOİ'sinde gerçekleştirilen bu çalışmada 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 ($p>0,05$).

Cinsiyetlere göre her bir grup için, hesaplanan toplam nöron sayıları (N), hata katsayıları (CE) ve varyasyon katsayıları (CV) Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. N'nin dişi ve erkeklerde sağ ve sol bölgelere göre tanıtıcı istatistik değerleri ve karşılaştırma sonuçları

	Sağ (n=5)			Sol (n=5)			p
	N ± SD	CE	CV	N ± SD	CE	CV	
Dişi	38707.00±4530.92	0.089	0.12	39614.40±3807.01	0.089	0.08	0.741
Erkek	37013.80±3132.34	0.091	0.08	37003.00±5743.97	0.091	0.16	0.997
p	0.511			0.421			

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

Tartışma

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 edilen 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 disektör 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.

Toplam nöron sayısının erkek ve dişiler ile ilgili nukleusun sağ ve sol tarafları arasında farklılık göstermediği ile ilgili bulgumuz, tespit edebildiğimiz tüm kantitatif NOİ çalışmalarının bulguları ile uyumdadır. Gerek insanlarda (19-23), gerekse sıçan (24-28) ve farelerdeki (29,34) çalışmaların hiçbirinde NOİ'deki nöron sayısı bakımından cinsiyetler ve

bunların sağ ve sol NOİ'leri arasında farklılığa 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 (25,35) yetişkin yaş grubuyla birlikte altı ayrı yaş (0, 5, 10, 15 ve 20 günlük) grubunun hem sağ hem de sol NOİ'lerinde sayım yapılmış ve hiçbir grupta sağ ve sol açısından farklılık bildirilmemiştir. Bourrat ve Sotelo (24) ise benzer yaş gruplarında her hayvanda rasgele olarak seçtikleri sağ veya sol NOİ'de sayım yapmışlardır. Napper ve West (26) ise NOİ'yi sağ-sol ayırımı yapmadan bir bütün olarak ele alıp çalışırken, Cunningham ve arkadaşları (27) sayımda sadece sol sıçan NOİ'sini kullanmışlardır. İnsan ve fare NOİ'sinde gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da benzer uygulamaların olduğunu gözlemledik.

Ancak hesapladığımız nöron sayısı değeri literatürde bildirilen değerlerin hepsinden daha fazla ve hiçbirisi ile uyumamaktadır. Diğer çalışmalardaki (24,25) değerler de (17.000-30.000 adet nöron) birbirleriyle uyumamaktadır. Bu durum için tespit edebildiğimiz başlıca nedenler örneklemenin doğru yapılmaması, varsayımlara dayanan sayım tekniklerinin kullanılmış olması, stereolojik tekniklerin yanlış veya eksik uygulanması ve referans hacim tanımlamalarında belirsizlikler olabilir.

Sıçan NOİ'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.

Ayrıca nöron tanımlamalarında onları özel olarak işaretleyen ve glialardan ayıran boyama tekniklerinin kullanılması ve kullanılan metodun gereklerine özenle uyulması farklılıklara neden olan önemli iki faktörü ortadan kaldıracaktır.

Sonuç

Uygulamada da varsayımlara dayanmayan ve kesit kalınlığı doku deformasyonu gibi birçok faktörden etkilenmeyen fiziksel disektör yaklaşımlarının tercih edilmesi çalışmalar arası çelişkileri en aza indirecektir.

Disektör çiftlerindeki eşdeğer alanların örneklenip eşzamanlı görüntülenmesi uygulamamızın bu tekniğin kullanımını cesaretlendireceği ve bu konuda çalışma yapmak isteyen diğer araştırmacılara yararlı olacağı ümidindeyiz.

Teşekkür

Bu proje “Sıçan Nukleus Olivaris İnfieriorundeki Toplam Nöron Sayısının Fiziksel Disektör Yaklaşımlarıyla Belirlenmesi” isimli doktora tez çalışmasından üretilmiştir. Saygıdeğer Rahmetli Danışman Hocam Prof. Dr. Adnan KORKMAZ anısına...

Peer-review: Dışarıdan hakemli.

Yazar katkıları:

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

Yazar çatışması: Yazarlar çatışma olmadığını beyan etmiştir.

Finansal destek: Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No. T544).

Kaynaklar

1. Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi. Üçüncü Baskı. ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim AŞ-Metu Pres-Yayınları, Ankara. 2002.
2. Standring S. Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice. 42nd Edition. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh. 2020.

3. De Zeeuw CI, Holstege JC, Calkoen F, Ruigrok TJH, Voogd J. 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.* 1988;447: 369–375.
4. Nauta WJH, Feirtag M. *Fundamental Neuroanatomy.* New York. WH Freeman and Company. 1986; 280–288.
5. Voogd J, Feirabend HKP, Schoen SHR. Cerebellum and precerebellar nuclei, in “The Human Nervous System” (G. Paxinos ed.). San Diego, Academic Press. 1990;312–388.
6. Voogd J. The human cerebellum. *J Chem Neuroanat.* 2003;26: 243–252.
7. Gwyn DG, Nicholson JP, Flumerfelt BA. The inferior olivary nucleus of the rat: A light and electron microscopic study. *J Comparative Neurology.* 1977;174: 489–520.
8. Azizi AS, Woodward DJ. Inferior olivary nuclear complex of the rat: Morphology and comments on the principles of organization within the olivocerebellar system. *J Comp. Neurol.* 1987;263: 467–484.
9. Carpenter MB. *Core Text of Neuroanatomy.* 3rd Edition. Baltimore. Williams & Wilkins. 1985.
10. Martin JH. *Neuroanatomy, Text and Atlas.* Elsevier, Science Publishing Co Inc, New York. 1989.
11. Ruigrok TJH, Voogd J. Organization of projections from the inferior olive to the cerebellar nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 2000;426(2): 209–228.
12. Hall JE, Guyton AC, *Tıbbi Fizyoloji.* 13. Basım. Güneş Tıp Kitabevleri. 2017.
13. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and practice of histological techniques.* 4th Edition, Churchill Livingstone. 1996.
14. Luna LG. *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.* New York, McGraw–Hill, Inc. 1968.
15. 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.
16. Pakkenberg B, Gundersen HJG. The total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *Journal of Microscopy.* 1998;150: 1–20.

- 17.Korkmaz A, Çiftçi N, Boşnak M, Açar E. 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*. 2000;200: 269-276.
- 18.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.
- 19.Pine SS, Landing BH, Shankle WR. Reduced inferior olivary neuron number in early down syndrome. *Pediatric Pathology & Laboratory Medicine*. 1997;17: 537-545.
- 20.Sjöbeck M, Dahlén S, Englund E. 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*. 1999;54A(9): B363-B368.
- 21.Nishie M, Yoshida Y, Hirata Y, Matsunaga M. Generation of symptomatic palatal tremor is not correlated with inferior olivary hypertrophy. *Brain*. 2002;126: 1348-1357.
- 22.Nishie M, Mori F, Yoshimoto M, Takahashi H, Wakabayashi K. A quantitative investigation of neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the pontine and inferior olivary nuclei in multiple system atrophy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2004;30: 546-554.
- 23.Tsuchiya K, Oda T, Yoshida M, Sasaki H, Haga C, Okino H, Tominaga I, Matsui K, Akiyama H, Hashizume Y. 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*. 2005;25: 125-135.
- 24.Bourrat F, Sotelo C. Postnatal development of the inferior olivary complex in the rat. III. A morphometric analysis of volumetric growth and neuronal cell number. *Dev. Brain Res*. 1984;16: 241-251.
- 25.Delhay-Bouchaud N, Geoffroy B, Mariani J. Neuronal death and synapse elimination in the olivocerebellar system. I: Cell counts in the inferior olive of developing rats. *J. Comp. Neurol*. 1985;232: 299-308.
- 26.Napper RMA, West JR. 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*. 1995;19(5): 1321-1326.
- 27.Cunningham JJ, Sherrard RM, Bedi KS, Renshaw GM, Bower AJ. Changes in the numbers of neurons and astrocytes during the postnatal development of the rat inferior olive. *J. Comp. Neurol*. 1999;406: 375-383.
- 28.Maier SE, West JR. 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*. 2003;30: 67-74.
- 29.Blatt GJ, Eisenman LM. A qualitative and quantitative light microscopic study of the inferior olivary complex of normal, reeler, and weaver mutant mice. *The Journal of Comparative Neurology*. 1985;232: 117-128.
- 30.Frederic F, Hainaut F, Thomasset M, Guenet JL, Delhay-Bouchaud N, Mariani J. Cell counts of Purkinje and inferior olivary neurons in the 'hyperspiny Purkinje cells' mutant mouse. *European Journal of Neuroscience*. 1992;4: 127-135.
- 31.Herrup K, Shojaeian-Zanjani H, Panzini L, Sunter K, Mariani J. The numerical matching of source and target populations in the CNS: The inferior olive to Purkinje cell projection. *Developmental Brain Research*. 1996;96: 28-35.
- 32.Zanjani HS, Herrup K, Guastavino JM, Delhay-Bouchaud N, Mariani J. Development studies of the inferior olivary nucleus in staggerer mutant mice. *Developmental Brain Research*. 1994; 82: 18-28.
- 33.Zanjani HS, Vogel MW, Delhay-Bouchaud N, Martinou JC, Mariani J. Increased inferior olivary neuron and cerebellar granule cell numbers in transgenic mice overexpressing the human Bcl-2 gene. *J. Neurobiology*. 1997;32: 502-516.
- 34.Zanjani HS, Herrup K, Mariani J. Cell number in the inferior olive of nervous and leaner mutant mice. *Journal of Neurogenetics*. 2004;18: 327-339.
- 35.Korkmaz A, Çiftçi N. 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*. July 5-9; İzmir-Turkey: 1999.