



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Atlarda beyin hemisferlerine ait substantia grisea, alba ve ventriculus lateralis hacimlerinin Cavalieri prensibi kullanılarak hesaplanması

Sadullah Bahar, M. Orhun Dayan*

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi ABD, Konya, Türkiye

Geliş: 10.04.2014, Kabul: 17.04.2014

*modayan@selcuk.edu.tr

Özet

Bahar S, Dayan MO. Atlarda beyin hemisferlerine ait substantia grisea, alba ve ventriculus lateralis hacimlerinin Cavalieri prensibi kullanılarak hesaplanması.

Eurasian J Vet Sci, 2014, 30, 2, 102-107
DOI:10.15312/EurasianJvetSci.201425927

Amaç: Yapılan bu araştırma ile atlarda beyin hemisferlerinin bazı morfometrik özelliklerinin belirlenmesi ve son zamanlarda veteriner sahada da kullanılmaya başlanan MRI/CT görüntülerine ve ölçümlerine referans olması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla cinsiyet ve ırk ayrımı gözetmeksizin 5 at beyini kullanıldı. Beyin hemisferlerine ait substantia alba, substantia grisea ve lateral ventrikül hacmi hesaplamalarında Cavalieri prensibi kullanıldı.

Bulgular: Araştırmada sağ ve sol hemisfere ait hesaplamaları yapılan substantia alba, substantia grisea, lateral ventrikül hacmi ve total hacimler arasında istatistiksel fark belirlenmedi.

Öneri: Atlarda sağ ve sol beyin hemisferlerinin volumetrik özelliklerinin benzer olduğu ve elde edilen verilerin bölge morfolojisine ve gelecekte yapılacak araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Cavalieri prensibi, at, beyin

Abstract

Bahar S, Dayan MO. Volumetric estimations of the gray matter, white matter and lateral ventricles on the brain hemispheres in horses using Cavalieri principle.

Aim: The aim of this study was to determine morphometric features of the horse brain hemispheres and to be reference MRI/CT images and measurements which recently started to be used in veterinary field.

Materials and Methods: Brains of five horses of different breeds and sexes were used. Volumetric estimations of the gray matter, white matter and lateral ventricles of the cerebrum were performed using Cavalieri principle.

Results: In this study, there were no significant differences between volumes of gray matter, white matter, lateral ventricles and the total volumes in the left and the right hemispheres of brain.

Conclusions: The volumetric features of the left and the right brain hemispheres in horses were similar. It is thought that obtained data will contribute to the morphology of related region and the further studies.

Keywords: Cavalieri principle, horse, brain





Giriş

Sinir sistemi memelilerde iç ve dış ortamdaki gelen uyarıları alan, bu uyarıları değerlendiren ve gerekli tepkileri vermek üzere organize olmuş kompleks bir sistemdir (Dyce ve ark 2002, König ve ark 2004). Bu sistem morfolojik olarak merkezi (beyin ve medulla spinalis) ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki bölüme ayrılır (Nickel ve ark 1975, Tecirlioğlu 1977, Dursun 2008). Evcil memeli hayvanlarda beyin gross ve kesitsel anatomisi at (Getty 1975a, Nickel ve ark 1975), merkep (Oto ve Haziroğlu 2009), sığır (Getty 1975a, Nickel ve ark 1975), koyun (Getty 1975a), keçi (Getty 1975a), domuz (Getty 1975b), köpek (Miller 1964, Getty 1975b) ve kedide (Getty 1975b) detaylı olarak incelenmiştir. İnsanlarda ve bazı hayvan türlerinde yapılan postmortem ve antemortem çalışmalarda beyine ait substantia grisea, substantia alba ve ventriculus lateralis hacim ve hacim oranlarının yaşa ve bazı hastalıklara bağlı olarak değiştiği ortaya konmuştur (Mayhew ve ark 1990, Mayhew ve ark 1996, Zhang ve Sejnowski 2000, Yücel ve ark 2003, Sanfilippo ve ark 2005, Staff ve ark 2006, Martola ve ark 2010, Ross 2011, Firlag ve ark 2013). Yapılan kaynak taramalarında atlarda yukarıda belirtilen morfometrik verilerle ilgili bilgilerin oldukça sınırlı olduğu gözlemlenmiştir.

Temelde biyolojik dokuların etkin bir şekilde örnekleme esasına dayanan ve 1980'lerden sonra dokularda hacim, yüzey alanı, uzunluk ve sayısal parametrelerin tarafsız ve yüksek doğrulukta hesaplanmasında sıklıkla stereolojik teknikler tercih edilmektedir (Mouton 2002, Howard ve Reed 2005). Bu tekniklerden Cavalieri prensibi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda at (Bahar ve ark 2013), rat (Bjugn ve Gundersen 1993), fare (Bjugn ve ark 1989, Bjugn ve Gundersen 1993) ve civciv (Turgut ve ark

2007) medulla spinalis'inin segmentlerine ait substantia grisea ve substantia alba hacimleri ortaya konmuştur.

Mevcut araştırmada atlarda Cavalieri prensibi kullanılarak beyin hemisferlerine ait substantia grisea, substantia alba ve ventriculus lateralis hacim ve hacim oranlarının belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Materyal

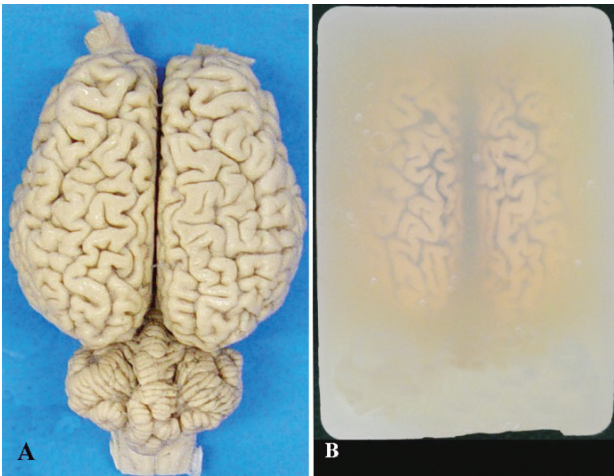
Araştırma 2008-2009 yılları arasında S. Ü. Veteriner Fakültesi Binicilik Tesisinden çeşitli ortopedik rahatsızlıkları gerekçesiyle ötenazisine karar verilen ve bu işlemi gerçekleştirmek ve kadavra hazırlanmak üzere Anatomi Anabilim Dalına tahsis edilen 5 hayvan (1 adet Pony 15 yaşlı 230 kg dişi, 2 adet Arap 13 ve 5 yaşlı 300-340 kg dişi, 2 adet İngiliz 10 ve 12 yaşlı 420-450 kg erkek)'a ait kadavra üzerinde gerçekleştirildi. Araştırma prosedürü Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar no: 2011/015-2011/03).

Diseksiyon

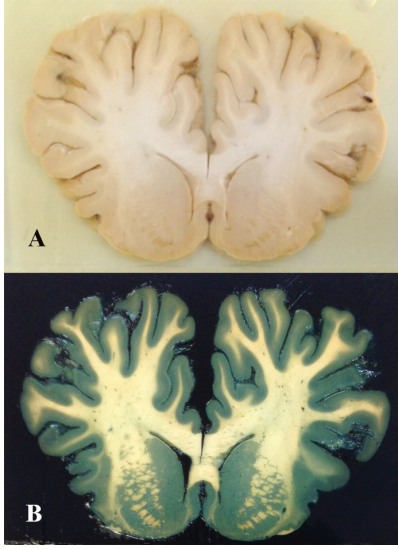
S. Ü. Veteriner Fakültesi Binicilik Tesisinden temin edilen atlar uygun şekilde ötenazisi yapıldıktan sonra atlantoaxialis eklem seviyesinden kesildi. Laboratuvar ortamına getirilen at başlarına öncelikle her iki Arteria carotis communis aracılığıyla %0.9'luk NaCl solüsyonu verilerek damarlardaki kan mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. Daha sonra aynı damarlardan %10'luk formalin solüsyonu enjekte edilerek beyin cavum cranii içerisinde tespit edildi. At başlarının dorsal bölümünde bulunan deri ve yumuşak dokular uzaklaştırıldı. Calvarium uzaklaştırıldıktan sonra beyin dura mater korunarak cavum cranii'den çıkarıldı. Bu işlemi takiben beyin üzerinden beyin zarları uzaklaştırıldı ve ağırlıkları hassas terazi ile hacimleri ise Arşimet prensibi ile ölçüldü (Resim 1). Beyinler colliculus rostralis'in hemen önünden yapılan transversal kesitle hemisferler ile medulla oblongata ve beyincik birbirlerinden ayrıldı. Bu işlemi takiben hemisfer hacimleri tekrardan Arşimet prensibi kullanılarak ölçüldü ve kaydedildi.

Beyinlerin bloklanması

Kesit alınması esnasında beyin dokusunun dağılmaması için her bir beyin 250 mL distile su ve 17.5 g agar'dan (Blood Agar, Biomerieux-France) hazırlanan karışım 97°C'de 10 dk kaynatıldı. Berrak bir görünüm alan agar solüsyonu 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisinde



Resim 1. Diseksiyon sonrası at beyni dorsalden görünüm (A) ve agar ile bloklanmış dorsalden (B) görünüm.



Resim 2. Bloklama sonrası beyinden alınan boyama öncesi (A) ve boyanmış (B) makroskobik transversal kesit.

beyin bulunan özel kaplara dökülerek bloklama işlemi yapıldı (Zarow ve ark 2004). Bloklar bir gün süreyle oda ısısında bekletildikten sonra kesme işlemine geçildi. Elektrikli salam dilimleme makinası ile ortalama 4.74 mm olmak üzere transversal dilimlere ayırdı (Resim 2A).

Makroskobik boyama

Transversal dilimlere ayrılan beyinlerde substantia grisea'nın boyanmasında kullanılan Berlin Blue boyama metodu (Oto 2007) aşağıda belirtildiği gibi modifiye edilerek kullanıldı. Tüm kesitler önce 12.5 g kristal fenol + 1.25 g bakırsülfat + 300 µL HCl + 250 mL distile su ile hazırlanmış solüsyonu içerisinde 60°C sıcaklıkta 5 dakika bekletildi. Kesitler 10 sn buzlu suya daldırıldıktan sonra hazırlanmış %1'lik potasyum ferrosiyanid solüsyonunda 4 dk bekletildi. Daha sonra yaklaşık 1 dakika akan soğuk suyun altında yıkanan kesitler son olarak %2'lik demirklorür solüsyonunda 20 sn bekletildi. Boyanan kesitler Hp Scanjet G4010 marka tarayıcıyla 600 dpi çözünürlükte tarandı (Resim 2B).

Hacim hesaplamaları

Hemisferlere ait substantia grisea (cortex cerebri + basal ganglionlar), substantia alba ve ventriculus lateralis hacimlerinin belirlenmesinde Cavalieri prensibi kullanıldı. Hacim hesaplamalarında ImageJ programından faydalanıldı. Bu amaçla kesit görüntüleri üzerine farklı nokta sıklıklarına sahip noktali alan ölçüm cetveli atıldı (Resim 3). İlgilenilen her bir alan için alanlara düşen noktalar ayrı ayrı sayıldı. Beyinlerde ilgilenilen

yapıların hacimleri ise ayrı ayrı $V = (a/p) \times \sum P \times t$ formülü kullanılarak hesaplandı (Gundersen ve Jensen 1996). Bu formülde V = ilgilenilen yapının hacmi, a/p = noktali alan ölçüm cetvelinde yer alan bir noktanın alanını (substantia grisea ve alba için 49 mm², ventriculus lateralis için 4 mm²), $\sum P$ = ilgilenilen yapı üzerine düşen toplam nokta sayısını, t = ortalama kesit kalınlığını (4.74 mm) ifade eder (Gundersen ve ark 1999, Canan ve ark 2002, Yücel ve ark 2003, Howard ve Reed 2005). Tüm yapının hacmi $V_{Top} = V_1 + V_2 + \dots + V_n$ formülü ile hesaplandı (Bjugin ve Gundersen 1993).

Hacim hesaplamalarında hata katsayısının (CE) tespiti

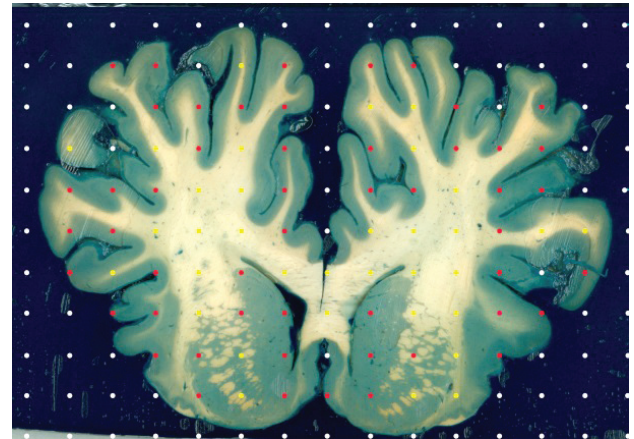
Hata katsayısı değerinin özellikle hacim ölçümlerinde %10'dan küçük ya da eşit olması tercih edilmektedir (Gundersen ve Jensen 1987, Gundersen ve ark 1999, Garcia-Finana ve ark 2003). Stereolojik araştırmalarda hata katsayısı hesaplamasında birden fazla yöntem kullanılmaktadır (Gundersen ve Jensen 1987, West 1993, Ohm ve ark 1997, Gundersen ve ark 1999, Garcia-Finana ve ark 2003). Çalışmanın hata katsayıları daha önceden bildirilen metoda göre hesaplandı (Gundersen ve ark 1999).

İstatistiksel analizler

Çalışmada beyin bölümlerinden elde edilen morfolometrik veriler bağımsız t testi kullanılarak değerlendirildi (SPSS 17.0). $p < 0.05$ değeri önem sınırı kabul edildi.

Bulgular

Araştırmada kullanılan 5 hayvana ait ortalama beyin ağırlığı 533 ± 24.8 g, Arşimet prensibi kullanılarak elde



Resim 3. Boyanmış kesitler üzerine ImageJ programı kullanılarak atılan noktali alan ölçüm cetveli (Her bir nokta 49 mm²).



Tablo 1. Hemisferlerde Cavalieri prensibi kullanılarak elde edilen volumetrik veriler (mean±SEM).

Parametre	Sol	Sağ	Toplam
Substantia grisea mL	91.3±4.18	93.4±5.65	184.7
Substantia alba mL	84.8±5.59	83.8±6.51	168.6
Ventriculus lateralis mL	5.01±1.13	4.86±1.11	9.87
Toplam hacim mL	181.1±9.75	182.1±12.2	363.2

*Aynı satırda istatistiki fark belirlenmedi (P>0.05).

edilen ortalama beyin ve hemisferlerin hacmi değerleri sırasıyla 510±25.9 mL ve 384±20.8 mL olarak belirlendi. Arşimet prensibi kullanılarak yapılan ölçümlerde hemisferlerin tüm beyin hacmine oranı %75.3 olarak bulundu. Aynı beyinlerin Cavalieri prensibi kullanılarak sağ, sol ve toplam hemisfere ait volumetrik verileri Tablo 1'de sunuldu. Sağ ve sol hemisferlere ait morfometrik veriler arasında istatistiki fark belirlenmedi (P>0.05).

Araştırmada substantia grisea, substantia alba ve lateral ventrikülün toplam hemisfer hacimlerine oranı sırasıyla %50.9, %46.4 ve %2.7 olarak tespit edildi. Hemisferlere ait substantia grisea, substantia alba ve ventrikül hacim hesaplamalarında hata katsayısı (CE) sırasıyla % 3.1, %4.1 ve %4.6 olarak gerçekleşti.

Tartışma

Beyin hemisferleri dışta cortex cerebri ile içte subcortical çekirdeklerin oluşturduğu substantia grisea, yine içte cortex cerebri ile subcortical çekirdeklerin farklı merkezlerle bağlantısını sağlayan miyelinli sinir liflerinin oluşturduğu corona radiata olarak isimlendirilen substantia alba ve içerisinde beyin omurilik sıvısının bulunduğu ventriculus lateralis'ten oluşur (Getty 1975ab, Tecirlioğlu 1983, Durşun 2008).

Yapılan çalışmada atlarda ortalama beyin ağırlığı 533 g, relatif ağırlık ise 0.15 olarak belirlendi. Araştırmada belirlenen bu veri Nickel ve ark (1975)'in at için bildirdiği (0.12-0.17) sonuçlarla paralellik gösterirken, Mayhew ve ark (1990) ile benzerlik göstermemektedir. Oto ve Hazirolu (2009) merkep için bu değeri 0.26 olarak bildirmiştir.

Mayhew ve ark (1996) yaptıkları çalışmada atlarda (385±15.6 kg) beyin hacmini 603 mL olarak bildirmiş, sunulan çalışmada bu değer ortalama 510 mL olarak bulunmuştur. Bu durumun çalışmalarda kullanılan hayvanlara ait ırk, cinsiyet ve yaş gibi farklılıklardan kaynaklanabileceği sonucuna varıldı.

Mayhew ve ark (1990) tespit edilmiş at beyininde Cavalieri prensibini kullanarak toplam hemisfer hacmini 326.3 mL olarak tespit etmişlerdir. Aynı metodun kullanıldığı bu çalışmada toplam, sağ ve sol hemisferlere ait veriler başarılı bir şekilde tespit edildi (Tablo 1). Mevcut araştırmada Arşimet prensibi ile yapılan toplam hemisfer hacim ölçümünün ve Cavalieri prensibi ile elde edilen değerden %5.5 fazla olduğu gözlemlendi. Araştırmamız Arşimet prensibinin beyin gibi organların hacim ölçümlerinde başarısının sınırlı olduğunu göstermektedir.

Mayhew ve ark (1996) yaptıkları çalışmada at, sığır, domuz, keçi, köpek, kedi ve tavşanda toplam hemisfer içerisindeki substantia grisea oranının yaklaşık olarak %50 olduğunu bildirmişler, substantia alba ve ventriculus lateralisler için ayrıntılı bir sonuç bildirmemişlerdir. Yapılan çalışmada substantia grisea oranı Mayhew ve ark (1996) ile benzerlik gösterirken, substantia alba ve ventriculus lateralis için bu değerler sırasıyla %46.4 ve %2.7 olarak tespit edildi.

Yapılan literatür taramalarında atlarda ventriculus lateralis'lerin volumetrik özelliklerine ilişkin bir bilgiye ulaşılamadı. Bu çalışma ile atlarda ventriculus lateralis hacminin sağ ve solda benzer olduğu tespit edildi (Tablo 1).



Cavalieri prensibiyle yapılan volumetrik hesaplamalarda CE değerinin %10 ve altında olması ilgili çalışmanın güvenilirliğinin önemli bir göstergesidir (Gundersen ve Jensen 1987, Gundersen ve ark 1999, Garcia-Finana ve ark 2003). Araştırmamızda elde edilen CE değerleri bu güven sınırının içindedir.

Öneriler

Araştırmada kullanılan boyama metodunu substantia grisea ve substantia alba ayırımında oldukça başarılı olduğu ve yapılan morfometrik hesaplamalarda at beyнинin sağ ve sol hemisferleri arasında fark olmadığı ifade edilebilir. Ayrıca çalışmada sunulan veriler, at beyni üzerinde yapılacak benzer morfometrik çalışmalar için referans olarak kullanılabilir.

Kaynaklar

Bahar S, Bolat D, Selcuk ML 2013. The segmental morphometric properties of the horse cervical spinal cord: A study of cadaver. *The ScientificWorld Journal*, Article ID 734923.

Bjugn R, Boe R, Haugland HK 1989. A stereological study of the ependyma of the mouse spinal cord with a comparative note on the choroid plexus ependyma. *J Anat*, 166, 171-178.

Bjugn R, Gundersen HJ 1993. Estimate of the total number of neurons and glial and endothelial cells in the rat spinal cord by means of the optical disector. *J Comp Neurol*, 328, 406-414.

Canan S, Sahin B, Odaci E, Unal B, Aslan H, Bilgic S, Kaplan S 2002. Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: cavalieri prensibi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 22, 7-14.

Dursun N 2008. *Veteriner Anatomi III*, 3 baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, Türkiye, pp:23-60.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG 2002. *Textbook of Veterinary Anatomy*. 3rd edition, Philadelphia, Saunders, USA.

Firlag M, Kamaszewski M, Gaca K, Balasinska B 2013. Age related changes in the central nervous system in selected domestic mammals and primates. *Postepy Hig Med Dosw*, 67, 269-275.

Garcia-Finana M, Cruz-Orive LM, Mackay CE, Pakkenberg B, Roberts N 2003. Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. *NeuroImage*, 18, 505-516.

Getty R 1975a. *Sissons and Grossmann's The Anatomy of the Domestic Animals*, 5th edition, volume 1, Philadelphia, W.B. Saunders Company, USA, pp: 633-650.

Getty R 1975b. *Sissons and Grossmann's The Anatomy of the Domestic Animals*, 5th edition, volume 2, Philadelphia, W.B. Saunders Company, USA, pp: 1671-1686.

Gundersen H, Jensen EB 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147, 229-263.

Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology reconsidered. *J Microsc*, 193, 199-211.

Howard V, Reed M 2005. *Unbiased stereology: Three-dimensional measurement in microscopy*. Garland Science, Bios Scientific, Oxon, UK, pp: 53-64.

König HE, Liebich HG, Cervený C 2004. *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals*, Chapter 14: Nervous system, 1st edition, Stuttgart, Germany.

Martola J, Bergström J, Fredrikson S ve ark 2010. A longitudinal observational study of brain atrophy rate reflecting four decades of multiple sclerosis: A comparison of serial 1D, 2D, and volumetric measurements from MRI images. *Neuroradiology*, 52, 109-117.

Mayhew TM, Mwamengele GLM, Dantzer V 1990. Comparative morphometry of the mammalian brain: estimates of cerebral volume and cortical surface areas obtained from macroscopic slices. *J Anat*, 172, 191-200.

Mayhew TM, Mwamengele GLM, Dantzer V 1996. Stereological and allometric studies on mammalian cerebral cortex with implications for medical brain imaging. *J Anat*, 189, 177-184.

Miller ME 1964. *Anatomy of The Dog*, 1st edition, Philadelphia, Saunders Company, USA.

Mouton PR 2002. *Principles and practices of unbiased stereology*. John Hopkins University Press, USA, pp: 5-6.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E 1975. *Lehrbuch Der Anatomie Der Haustiere*. Band IV. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.

Ohm T, Busch C, Bohl J 1997. Unbiased estimation of neuronal numbers in the human nucleus coeruleus during aging. *Neurobiol Aging*, 18, 393-399.

Oto Ç 2007. Merkepte (Equus asinus) encephalon'un anatomisi ve transversal kesitlerinin incelenmesi. AÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, doktora tezi, Ankara, Türkiye.

Oto C, Hazirolu RM 2009. Macro-anatomical investigation of encephalon in donkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 56, 159-164.

Ross DE 2011. Review of longitudinal studies of MRI brain volumetry in patients with traumatic brain injury. *Brain Inj*, 25, 1271-1278.

Sanfilipo MP, Benedict RHB, Sharma J, Weinstock-Guttman B, Bakshi R 2005. The relationship between whole bra-





- in volume and disability in multiple sclerosis: A comparison of normalized gray vs. White matter with misclassification correction. *NeuroImage*, 26, 1068-1077.
- Staff RT, Murray AD, Deary IJ, Whalley LJ 2006. Generality and spesificity in cognitive aging: A volumetric brain analysis. *NeuroImage*, 30, 1433-1440.
- Tecirlioğlu S 1983. *Komparatif Veteriner Anatomi: Sinir Sistemi*. 1. Baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Yayınları, Ankara, Türkiye.
- Turgut M, Tunc AT, Aslan H, Yazici A, Kaplan S 2007. Effect of pinealectomy on the morphology of the chick cervical spinal cord: A stereological and histopathological study. *Brain Res*, 1129, 166-173.
- West M 1993. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*, 14, 275-285.
- Yücel F, Ünal N, Erçakır M, Güven G 2003. Rat beynindeki yaşı bağlı hacim değişikliklerinin Cavalieri yöntemi ile saptanması. *Erciyes Tıp Der*, 25, 179-185.
- Zarow C, Kim TS, Singh M, Chui H 2004. A standardized method for brain-cutting suitable for both stereology and MRI-brain co-registration. *J Neurosci Meth*, 139, 209-215.
- Zhang K, Sejnowski TJ 2000. A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *PNAS*, 97, 5621-5626.