T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEGHORN IRKI KANATLILARDA MEDULLA SPINALIS'İN STEREOLOJİK METODLAR İLE İNCELENMESİ

Durmuş BOLAT

DOKTORA TEZİ

ANATOMİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ

KONYA-2011

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LEGHORN IRKI KANATLILARDA MEDULLA SPINALIS'İN STEREOLOJİK METODLAR İLE İNCELENMESİ

Durmuş BOLAT

DOKTORA TEZİ

ANATOMİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09102043 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2011

i. ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Durmuş BOLAT tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Anatomi (Vet) Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Emrullah EKEN Selçuk Üniversitesi	İmza
Danışman:	Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	Prof. Dr. İlhami ÇELİK Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	Prof. Dr. Dinçer YILDIZ Kırıkkale Üniversitesi	İmza
Üye:	Doç. Dr. Sadullah BAHAR Selçuk Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Orhan ÇETİN

Enstitü Müdürü

ii. ÖNSÖZ

Stereoloji, günümüzde tamamen kabul görmüş, biyolojik objelerin üç boyutlu yapılarını incelemede kullanılan yöntemler topluluğudur. Arka planında yer alan matematiksel ve istatistiksel temeller ile biyolojik yapıların morfolojisi hakkında ön kabulsüz ve tarafsız bilgilerin elde edilmesi için geliştirilmiştir. Bu çalışmada Leghorn ırkı dişi ve erkek kanatlıların medulla spinalis'i ve medulla spinalis'i oluşturan anatomik yapılar, stereolojik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Mevcut çalışma ile Leghorn ırkı kanatlılarda medulla spinalis'in morfometrik özellikleri belirlenmiş ve sonuçlar tablo ve grafikler ile sunulmuştur.

Sunulan bu tez projesi Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (SUBAP, 09102043) tarafından desteklenmiştir.

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde bilimsel yardım ve desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Komitesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ, Prof. Dr. İlhami ÇELİK, Doç. Dr. Sadullah BAHAR'a, Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Memduh GEZİCİ, Prof. Dr. Emrullah EKEN, Prof. Dr. Kamil BEŞOLUK, Prof. Dr. Hakan YALÇIN'a, bilimsel katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Enver YAZAR'a, desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Dinçer YILDIZ'a, laboratuvar çalışmalarının tamamlanması için yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Sinan YÜRÜKER'e, materyal temini için yardımlarından dolayı Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü çalışanlarına, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen eşim Sibel BOLAT'a ve maddi olarak destek sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

iii. İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ 1

1.1. Leghorn ırkı 1

1.2. Columna vertebralis ve medulla spinalis 2

1.2.1. Columna vertebralis 2

1.2.2. Medulla spinalis'in makroskobik yapısı 3

1.2.3. Medulla spinalis'in mikroskobik yapısı 4

1.3. Stereoloji 6

1.3.1. Stereolojinin dayandığı temel prensipler ve kullandığı araçlar ve yöntemler 7

Sistematik rastgele örnekleme (SRÖ) 7

Etkinlik 8

Hata katsayısı (Coefficient of error, CE) 8

Sondalar 8

Cavalieri prensibi 9

Disektör yöntemi 9

2. GEREÇ ve YÖNTEM 12

2.1. Gereç 12

2.2. Yöntem 12

2.2.1. Kadavraların hazırlanması 12

2.2.2. Örnekleme stratejisi ve histolojik işlemler 13

Makroskobik örnekleme 13

Histolojik takip ve mikroskobik örnekleme 14

2.2.3. Hacim hesaplamalarında hata katsayısının (CE) tespiti 14

2.2.4. Bilgisayar destekli hacim hesaplamaları 16

2.2.5. Optik parçalama ile ependim hücre sayısının hesaplanması 18

2.2.6. İstatistiksel analizler 21

3. BULGULAR 22

3.1. Makroskobik bulgular 22

3.2. Morfometrik bulgular 23

3.3. Ependim hücre sayısı 33

3.4. Histolojik bulgular 34

4. TARTIŞMA 37

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 42

6. ÖZET 44

7. SUMMARY 45

8. KAYNAKLAR 46

9. EKLER 50

EK. A: Etik kurul onayı

10. ÖZGEÇMİŞ 51

1. GİRİŞ

1.1. Leghorn ırkı

Tavuk, Aves sınıfına dahil bir kanatlıdır. Aves sınıfı iki alt sınıftan oluşur. Bunlardan birisi Ratitae, diğeri ise tavuk türünün dahil olduğu Carinatae'dir. Carinatae'da Gallus domesticus (tavuk), Anas domestica (ördek), Anser domesticus (kaz), Numida meleagris (beç tavuğu), Columba domestica (güvercin), Meleagris gallopavo (hindi) gibi kanatlı türleri bulunur (Ensminger 1980).

Tavuk, tarihte öncelikle dinsel inanışlardan ya da eğlence için evcilleştirilmiş ve daha sonra gıda kaynağı olarak üretimine devam edilmiştir (Crawford 1990). Evcil tavuk (*Gallus domesticus*) Asya'dan köken alır, atası Asya kıtasına yayılmış olan kırmızı orman tavuğu (*Gallus gallus*) dur. Yaklaşık 10 000 yıl önce Vietnam'da evcilleştirildiği bilinmektedir (Sherman 2002).

Günümüzde tavuk, eti ya da yumurtası için üretilmektedir. Dünya üzerinde eti için üretilen tavuk ırkları etçi (broiler) olarak isimlendirilirken; yumurtası için üretilen ırklar ise genellike yumurtacı ırklar adı altında toplanırlar. Tavuk eti ve yumurtası dünya üzerinde modern teknikler kullanılarak üretilmektedir. Bu ülkelerden bazıları Güney Afrika, Asya ve Latin Amerika ülkeleridir (Sherman 2002).

Leghorn, yumurtacı tavuk ırkları arasında en önemlilerinden biridir (Austic ve Nesheim 1990). İtalya'dan dünya üzerine yayılmıştır. Kuzey Amerika'ya 1853 yılında getirilen ilk Leghorn ırkı kanatlıların ismi İtalya'nın Livorno kentinden gelmektedir. Kuzey Amerikada ıslah edilerek yumurta verimi yükseltilmiş ve diğer ülkelere damızlık olarak gönderilmiştir (Sasimowski 1987, Austic ve Nesheim 1990).

Leghorn ırkının karakteristik özelliklerine bakıldığında farklı renklere sahip oldukları görülmektedir. Dünya üzerinde kırmızı, kahverengi ve sarı renkte olanları bulunsa da, en yaygın olanı beyaz Leghorn'dur. Bu ırkın bütün tiplerinde vücut yapısı ve şekli aynıdır. Karın iyi gelişmiştir, bu ırkın tavukları çoğunlukla balta ibiklidir, ancak gül ibikli olanları da bulunmaktadır. Horozlardaki ibiğin ise dik olduğu görülür. Leghorn ırkında kuyruk yukarıya doğru uzanır. Bu ırkın tavukları 1,5 – 2,0 kg, horozları ise ortalama 2,0-2,5 kg ağırlığındadırlar (Austic ve Nesheim 1990). Yıllık yumurta verimi 150-200 arasında değişir. Sasimowski (1987),

Polonya'da 1930'lu yıllarda üretimine başlanan Leghorn ırkı tavuklardan yılda 260 adet yumurta elde edildiğini belirtmiştir. Yumurtaları beyaz renkli olup, yumurta ağırlıkları 50-60 gr arasında değişir. Bu tavuk ırkının yemden yararlanma oranı yüksektir. Hızlı bir şekilde erginliğe ulaşırlar, yumurtadan çıktıktan 5 ay sonra yumurta üretiminde kullanılabilirler (Austic ve Nesheim 1990).

Kanatlı hayvanların bilinen bir çok hastalığı bulunmaktadır. Özellikle merkezi sinir sistemini etkileyen Marek ve Kanatlı ensefalomiyeliti (avian encephalomyelitis) önemli hastalıkları arasındadır (Ensminger 1980). Avian encephalomyelitis'te beyin, beyincik ve medulla spinalis'te ödem ve özellikle medulla spinalis'in pars cervicalis'indeki nöronlarda dejenerasyon ve nekroz şekillenmektedir (Yılmaz ve Özer 1999). Kanatlı tüberkülozunda medulla spinalis'in pars cervicalis'i ve pars thoracalis'i, columna vertebralis'te meydana gelen lezyonlardan etkilenmektedir (Lairmore 1985). Newcastle ve Clostridium tetani, kanatlı hayvanlarda medulla spinalis'i etkileyen diğer hastalıklardır (Thomas ve ark 2007).

1.2. Columna vertebralis ve medulla spinalis

Hayatın devamı için canlının iç ortamının değişmez tutulması şarttır. Gerek homeostasis, gerekse diğer vücut fonksiyonlarının, canlının ihtiyaçlarına uygun bir biçimde gerçekleşmesi için bir takım düzenleyici kontrol sistemlerine ihtiyaç vardır. Canlı vücudundaki en önemli kontrol sistemi sinir sistemidir (Noyan 1993). Sinir sistemi gerek canlı vücudunda gerekse çevresinde meydana gelen olaylar arasındaki ilişkiyi sağlayan sistemdir. Diğer bir tanımlama ile, duyusal uyarımları alarak, organizmanın iç ve dış ortam değişikliklerine uyum sağlayacak tepkimeleri düzenleyen sistemdir (Tecirlioğlu 1992).

1.2.1. Columna vertebralis

Kanatlılarda toplam 40 vertebrae'dan oluşan columna vertebralis, pars cervicalis (14), pars thoracalis (7), pars lumbalis (5), pars sacralis (2) ve pars caudalis (9-10) olmak üzere beş bölümden oluşur (Feduccia 1975, Nickel 1977, Bellairs ve Osmond 2005).

Pars cervicalis ters “S” şeklinde bir yapı gösterir. Cervical bölümün ilk omuru olan atlas dar ve halka şeklindedir. Atlas’ın arcus ventralis’i hem condylus occipitalis ve hem de axis ile eklemleşmeye mahsus özel eklem yüzlerine sahiptir. Arcus dorsalis’i geniş bir foramen vertebrale oluşturur. Diğer cervical vertebralar hem arcus vertebra’ya hem de corpus vertebra’ya sahip olmalarından dolayı birbirlerine benzer özellik gösterirler. Eklemleşen iki omurun corpus’u arasında fibrokartilaginöz yapıda discus intervertebralis bulunur. Cervical omurların corpusları arasındaki sellar tipte synovial bir eklemdir ve meniscus intervertebralis tarafından bölünmüştür (Nickel 2004).

Kanatlılarda sırt kısadır ve büyük bölümü hareketsizdir (Yamamoto ve ark 2000, Dursun 2002). Pars thoracalis, güvercin ve tavukta 7, kaz ve ördekte 9 adet omurdan oluşmuştur. Güvercin ve tavukta 2.’den 5.’ye kadar olan sırt omurları birbirleriyle kaynaşmışlardır. Bu omurların processus spinosus’ları birleşerek arcus üzerinde kemiksel bir şerit oluşturmuştur. Birinci ve altıncı sırt omuru ise serbesttir. Yedinci thoracal omur, bel omurları ile birleşerek synsacrum’a katılmıştır (Dursun 2002). Synsacrum son sırt omuru, bel ve sakral omurlarının tamamı ile ilk dört (Feduccia 1975) veya beş (Bellairs ve Osmond 2005) caudal vertebra’nın birleşmesiyle oluşur. Diğer caudal vertebralar ise pygostyle’i oluşturur (Feduccia 1975, Bellairs ve Osmond 2005).

1.2.2. Medulla spinalis’in makroskobik yapısı

Kanatlılarda medulla spinalis foramen magnum hizasında medulla oblongata’ dan kesin bir sınır göstermeksizin ayrılır ve canalis vertebralis içerisinde pygostyle’in başlangıcına kadar devam eder (Taşbaş 1978). Tavukta medulla spinalis 15 cervical, 7 thoracal, 11-12 lumbo-sacral ve 7-8 caudal olmak üzere 41 segmentten oluşmuştur (Baumel 1975, Yamamoto 2000, Haziroglu 2001). Her segmentten periferindeki bölgeyi innerve etmek üzere bir çift spinal sinir ayrılır. Birinci çift (C_1) spinal sinir atlas ve os occipitale arasından çıkar ve radix dorsalis’ten yoksundur (Baumel 1975) Birinci ve ikinci cervical spinal sinir arasındaki mesafe 5 mm. kadardır (Baumel 1975). Medulla spinalis, canalis vertebralis içerisinde intumescentia cervicalis ve intumescentia lumbosacralis olmak üzere iki bölgede genişleme yapar. Plexus brachialis’i oluşturan sinir köklerinin ayrıldığı intumescentia cervicalis son üç cervical ve ilk iki thoracal segmentler tarafından oluşturulmuştur

(Baum 1966, Yıldız ve Bahadır 1998). Kanatlılarda plexus lumbosacralis'i oluşturan spinal sinirlerin ayrıldığı medulla spinalis bölümü olan intumescentia lumbosacralis ise lumbal ve sacral segmentler tarafından oluşturulmuştur (Baumel 1975). Kanatlılarda son thoracal ve ilk üç lumbal segmentlerin dorsal'inde sulcus medianus'un ventral'e ve lateral'e doğru genişlemesiyle oluşan ve içerisinde corpus gelatinosum'un yerleştiği sinus rhomboidalis bulunur (Necker 2004, Necker 2006).

Medulla spinalis dıştan içe doğru dura mater spinalis, arachnoidea spinalis ve pia mater spinalis tarafında sarılmıştır. Kanatlıda cervical ve thoracal bölümlerde dura mater spinalis periosteum'dan ayrıdır. İkisi arasında içerisinde yağ doku tarafından çevrelenen bağ doku ve venöz plexusların bulunduğu epidural boşluk bulunur. Thoracal bölümün caudal kısmında dura mater ve periosteum birleşir, venöz plexus'ların bulunduğu yerler istisna olmak üzere, tek bir yaprak halinde canalis vertebralis'in sonuna kadar devam eder. Dura mater spinalis ile pia mater spinalis arasında, her iki yapıya trabeküler bağlarla bağlanmış şeffaf bir zar olan arachnoidea spinalis yer alır. Dura mater spinalis ile arasında mikroskobik bir boşluk olan cavum subdurale bulunur. Pia mater spinalis ile arasında, içerisinde beyin omurilik sıvısının yer aldığı cavum subarachnoidale yer alır. Pia mater spinalis medulla spinalis'i sıkı bir şekilde sarar ve ligamentum denticulatum vasıtasıyla dura mater'e tespit eder (Baumel 1975). Medulla spinalis'in ventral'inde fissura mediana ventralis denilen bir yarık bulunur. Dorsal yüzün medianında ise sulcus medianus dorsalis yer alır (Bellairs ve Osmond 2005).

1.2.3. Medulla spinalis'in mikroskobik yapısı

Kanatlılarda medulla spinalis'in transversal kesitinde memelilere benzer şekilde merkezde substantia grisea ve bu yapıyı çevreleyen substantia alba'dan oluşan iki farklı alan gözlenir. Substantia grisea farklı fonksiyon ve yapıya sahip hücreleri içeren ve romen rakamı ile ifade edilen X adet lamina ve bu laminaların yer aldığı cornu dorsale, cornu ventrale ve cornu laterale olmak üzere üç bölgeden oluşmuştur. Cornu dorsale'de visceral ve somatik afferent internöronlar, cornu ventrale'de somatik efferent, cornu laterale'de ise visceral efferent nöron gövdeleri yer alır. Substantia alba, substantia grisea'nın dış bölümünde yer alan sinir aksonları tarafından oluşturulmuştur. Substantia alba, funiculus dorsalis, funiculus lateralis ve funiculus ventralis olmak üzere üç bölüme ayrılır. Medulla spinalis'in iki yarımı

commissura grisea ve commissura alba vasıtasıyla birbirine bağlanır. Bu yapı memelilerden farklı olarak kanatlılarda net olarak gözlenmez (Huber 1936, Baumel 1975, Yamamoto ve ark 2000, Necker 2005). Canalis centralis median hat üzerinde commissura alba'nın dorsal'inde yer alır (Baumel 1993, Whittow 2000). Canalis centralis'in etrafında sempatik ve parasempatik preganglionik sinir hücre gövdeleri bulunur (Whittow 2000). Canalis centralis'i çevreleyen ependim hücreleri kanal içerisine uzanan mikrovillus'lara sahiptir. Ependim hücreleri kanalda yer alan liquor cerebrospinalis'in hareketini sağlarken, aynı zamanda emiliminde ve az da olsa salgılanmasında rol alır (Bruni ve Reddy 1987). Bu hücreler, medulla spinalis'te meydana gelen travmalarda ve hidrosephalus olgularında reaksiyon göstermektedir. Kronik omurilik yaralanmalarında liquor cerebrospinalis'in ependim hücreleri tarafından emilimi azaldığından ependim hücrelerinin şekli değişerek sayıları azalmaktadır (Radojicic ve ark 2007).

Kanatlıların medulla spinalis'i genel anlamda memelilerdekine benzemekle birlikte, makroskobik olarak cauda equina ve filum terminale'nin olmayışı, aynı zamanda intumescentia lumbosacralis'te sinus rhomboidalis ya da sinus lumbosacralis'in bulunması ile memelilerden ayrılır (Whittow 2000). Sinus rhomboidalis, değişime uğramış, yağdan yoksun ve yüksek oranda glikojen içeren glial hücrelerden oluşan, corpus gelatinosum tarafından doldurulur. Corpus gelatinosum, lobus accessorius ile beraber segmentlerin orta bölgesine yerleşir ve en fazla üç segment boyunca devam eder (Necker 2006). Kanatlı medulla spinalis'inin karakteristik özelliği, nöron ve glia hücreleri tarafından oluşturulan nuclei marginales'in (Hofmann nuclei, paragriseal neurons) varlığıdır (Huber 1936, Necker 2005). Bu yapı medulla spinalis boyunca funiculus lateralis ve ventralis'in periferinde değişik şekil ve büyüklükte bulunur. Nuclei marginalis cervical, thoracal ve sacral bölgede minor nucleus marginalis olarak isimlendirilirken; lumbosacral bölgede lobus accessorius veya major nucleus marginalis olarak tanımlanır (Yamamoto ve ark 2000, Necker 2004). Huber (1936) güvercinde nuclei marginalis'in tüm medulla spinalis boyunca bulunduğunu belirtmiştir. Lobus accessorius, ilgili bölgede ligamentum denticulatum'un dorsal'inde cavum subarachnoidale içine doğru bombe yapmış bir şekilde yer alır (Necker 2005, 2006).

Kanatlı hayvanlar memelilerden farklı olarak bipedal yürüyüşe ve uçma özelliğine sahiptirler. Mikroskobik olarak, hücre gruplarının organizasyonu ve

medulla spinalis ile cerebellum arasında yer alan tractus'ların farklı özellikler göstermesinden dolayı memeli medulla spinalis'inden ayrılırlar (Whittow 2000).

1.3. Stereoloji

Stereoloji, üç boyutlu objelerin iki boyutlu kesit görüntüleri ya da izdüşümlerinden elde edilen verilere dayanarak, onların gerçek üç boyutlu özellikleri ile ilgili (uzunluk, alan, hacim, partikül sayısı, vb.) yorumlar yapılmasını sağlayan tarafsız metotları içeren bir bilim dalıdır (Baddeley 1991). Cruz-Orive (1993), stereoloji'yi bir objenin geometrik ve istatistiksel yapısı hakkında nicel bilgileri elde etmek için objenin kesitlerini ya da izdüşümlerini kullanan bir yöntem olarak tanımlamıştır.

Stereoloji terimi, Yunan kökenli stereos (üç boyutlu cisim, üç boyutluluk) teriminden türemiştir ve ilk defa 1960 yılından önce kullanılmıştır. 1961 yılında, biyologlar, jeologlar ve tıp disiplininde yer alan bilim adamları Almanya'daki Black Forest'ta maddelerin üç boyutlu tanımı ile ilgili problemleri tartışmak için toplanmışlardır. Alman profesör Hans Elias, iki boyutlu kesitlerden objenin üç boyutlu yapısını anlayabilmek için stereoloji teriminin kullanılmasını önermiş ve bilim dünyasına bu isimle girmiştir (Mouton 2002).

Son yıllarda tıp ve biyoloji alanındaki bilimsel yaklaşımlarda önemli değişimler olmuştur. Bunlardan en önemlisi öznel yaklaşımlardan daha çok tarafsız ya da nesnel yaklaşımın yaygın bir şekilde kabul görmesidir. Biyolojik yapılardan uygun metotlar kullanılarak elde edilmiş nicel veriler, biyolojik türler arasındaki varyasyonun tespiti, tıpta ise kesin teşhise gidilmesinde oldukça değerlidir. Aynı zamanda veriler sayılar ile ifade edildiği için verilerin karşılaştırılması son derece kolaydır. Nicel ölçümler öznel yaklaşımdan daha kolay depolanabilir, taşınabilir ve analiz edilebilirler (James 2004).

Günümüzde genel tıp, astronomi, jeoloji, matematik ve diğer mühendislik bilimlerinde stereoloji sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak en çok fayda sağladığı alanlar anatomi, histoloji, fizyoloji, patoloji ve botanik gibi biyolojik yapılarla uğraşan bilim dallarıdır (Russ ve Dehoff 2000).

Stereolojik yöntemlerle elde edilen bilgiler biyolojik sistemler hakkında ortaya atılan hipotezlerin test edilmesinde kullanılır. Biomedikal araştırmalarda özellikle biyolojik yapıların maruz kaldığı dejenerasyon, zehirlenme, atrofi, hipertrofi ve proliferasyon gibi patolojik durumların tespitinde stereolojik metotlara başvurulur. Bu metotlar aynı zamanda araştırıcıya grup içi ve gruplar arası varyasyon hakkında bilgi sağlar (Mouton 2002).

1.3.1. Stereolojinin dayandığı temel prensipler ve kullandığı araçlar ve yöntemler

Sistematik rastgele örnekleme (SRÖ)

Mikroskobik analizlerde, üzerinde çalışılacak biyolojik dokunun örneklenmesi sistematik taraflılıktan uzak olmalıdır. Örnekleme yapılacak nesnenin her bir parçası, ölçümle elde edilecek sonuca eşit oranda etki etmelidir ve eşit oranda örneklenme şansına sahip olmalıdır (Cruz-Orive 1999). Bu nedenle örneklemenin her bir aşamasında bu kurala sadık kalınması oldukça önemlidir. Sistematik taraflılıktan uzaklaşma, doğru örnekleme yönteminin seçilmesi ve kalibre edilmiş doğru ölçüm araçlarının kullanılmasıyla mümkün olmaktadır (Howard ve Reed 2005). Sistematik rastgele örnekleme, rastgele yapılan örneklemeye göre istatistiki anlamda gerçeğe çok daha yakın sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Gundersen ve ark 1999) .

Biyolojik bir dokuda önceden belirlenen örnekleme aralığı, örneklemenin sistematik kısmını, ilk aralık içinde rastgele bir noktadan başlanması ise, örneklemenin rastgelelik özelliğini sağlar. SRÖ metodu, üzerinde çalışılacak dokunun örneklenmesinde (doku örneklemesi), histolojik kesit alma sırasında (kesit örneklemesi) (Garcia-Finana 2003) ve bu kesitlerin mikroskop altında incelenmesi sırasında (alan örneklemesi) olmak üzere stereolojik araştırmanın her basamağında ayrı ayrı uygulanır (Turgut ve ark 2007). İstatistiksel bakış açısıyla, bu tip bir örnekleme, ne kadar çok örnek üzerinde uygulanırsa doğru sonuçları elde etme şansı da o kadar artar (Russ ve Dehoff 2000). Bu uygulama aynı zamanda bireyler arasındaki varyasyonun azaltılmasında da fayda sağlamaktadır (Gundersen ve Jensen 1987)

Etkinlik

Stereolojinin diğer önemli özelliği ise etkinliktir. Stereolojide etkinlik, yapılacak biyolojik bir araştırmada kaynakların (materyal, sarf malzemesi, zaman) optimum düzeyde kullanılarak, gerçek değere en yakın tahminde bulunmayı ifade eder (Gundersen ve Jensen 1987, Mouton 2002). Tarafsızlık, gerçek değerden sistematik bir sapmaya sebep olmamayı, etkinlik ise daha kısa zamanda daha az hatalı iş yapmayı ifade etmektedir. Mouton (2002), etkinliği zaman ve kesinlik açısından toplam gözlemlenen etkinlik GE = kesinlik / zaman= 1 / CV^2x zaman (GE= Gözlemlenen etkinlik, CV= Coefficient of Variance, ya da bireyler arası varyasyon) ve örnekleme etkinliği ÖE = kesinlik / zaman = 1 / CE^2 x zaman (ÖE= Örnekleme etkinliği, CE= Coefficient of Error ya da hata katsayısı) olarak ifade etmektedir. Bu açıklamalar ışığında etkinliğin zamanla ve hata katsayısı ile ters orantılı olduğu görülür (Mouton 2002).

Hata katsayısı (coefficient of error, CE)

Hata katsayısının belirlenmesi, stereolojik çalışmaların en önemli basamaklarından birisidir. Stereolojik çalışmalar ile yapılan sayısal ölçümlerin kalitesi ve kesinliği hata katsayısı (CE) hesaplanarak gözlemlenebilir. Stereolojik çalışmalarda hata katsayısı gerçek biyolojik bir değere karşılık gelmemekle birlikte, örnekleme stratejisinin kalitesini gösteren bir değerdir (Slomianka ve West 2005). CE, örnekleme stratejisi ve örnek büyüklüğü olarak tanımlanan ve araştırıcı tarafından kontrol edilebilir iki faktöre bağımlıdır. Bu iki faktör yapılacak bir ön çalışma ile belirlenir (Pakkenberg ve Gundersen 1997). CE, standart hatanın popülasyon ortalamasına bölünmesi ile hesaplanabilir (Pakkenberg ve Gundersen 1997, Mouton 2002). Gundersen ve ark (1999) %10 ve altındaki bir CE değerinin stereolojik bir araştırmanın sonuçlarının güvenilir olması için yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

Sondalar

Sondalar, teorik olarak tarafsız stereolojik metotlarda, doku bölümlerinin kesit yüzeyindeki görünüşlerinden biyolojik nesnelerin uzunluğunu, yüzey alanını, sayısını ve hacmini tahmin etmek için kullanılan geometrik şekillerdir. Çalışmalarda doğru sonda-parametre birleşimini seçmek oldukça önemlidir (Gundersen ve ark

1988, Mouton 2002, Howard ve Reed 2005). Sondalar; nokta sondası, çizgi sondası, yüzey sondası ve disektör sondası olarak sınıflandırılır. Nokta sondası sıfır boyutlu olup hacim hesaplamalarında, çizgi sondası tek boyutlu olup alan hesaplamalarında, yüzey sondası iki boyutlu olup uzunluk hesaplamalarında, disektör sondası üç boyutlu olup biyolojik yapılardaki yer alan her hangi bir partikül türünün toplam sayısının hesaplanmasında kullanılmaktadır. Stereolojik metodlar biyolojik yapıların üç boyutlu özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanıldığından sonda ve parametre toplamı üç olmalıdır (Gundersen ve ark 1988).

Cavalieri prensibi

Düzensiz şekilli nesnelerin hacimlerini hesaplamak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan en çok bilineni Arşimet prensibidir (Archimedes' principle). Bu yöntemde incelenen nesne içi su dolu dereceli bir silindire daldırılır ve nesnenin taşırdığı ya da yükselttiği su miktarı nesnenin hacmine eşittir. Bu şekilde etrafından izole edilmiş bir nesnenin hacmi rahatlıkla ve doğrudan ölçülebilir (Michel ve Cruz-Orive 1988, Canan ve ark 2002). Ancak etrafından izole edilemeyen ve küçük biyolojik yapıların hacim ölçümlerinin Arşimet prensibi ile yapılması kapillar etkiden dolayı tavsiye edilmemektedir (McCuan ve Treinen 2008). Bu nedenle son yıllarda biyolojik yapılarda hacim hesaplamalarında Cavalieri yöntemi uygulanmaktadır (Balcioglu ve ark 2009, Sonmez ve ark 2010). Cavalieri yöntemi, 17. yüzyılda yaşayan İtalyan matematik ve uzay bilimci Bonaventura Cavalieri tarafından geliştirilmiştir. Cavalieri bir objenin hacminin, objenin eşit aralıklarla kesilmesi ve her bir kesitin yüzey alanının kesit kalınlığı ile çarpımıyla elde edilebileceğini ortaya koymuştur (Gundersen ve ark 1999).

Cavalieri yöntemi, günümüzde biyolojik dokulardan alınan makroskobik ve mikroskobik kesit görüntüleri ve görüntüleme yöntemleriyle (CT, MRI, US) elde edilen kesit görüntüleri üzerine uygulanarak hacim hesaplamalarında sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuştur (Sahin ve ark 2003, Bilgic ve ark 2005).

Disektör yöntemi

Belli bir hacimde bulunan partiküllerin sayısını tarafsız bir yöntemle hesaplayabilmek için üç boyutlu bir örnekleme yöntemi olan disektör yöntemi Sterio

(1984) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem fiziksel ve optik disektör olmak üzere iki farklı şekilde biyolojik yapılar üzerine uygulanmaktadır (Gundersen 1986).

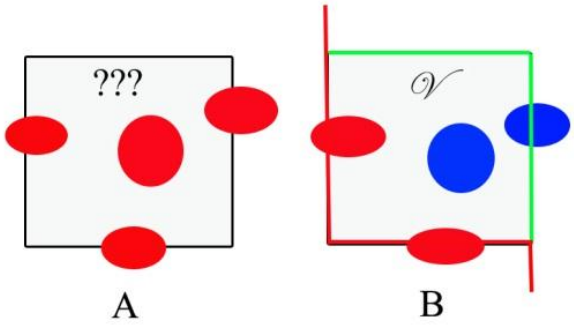
Fiziksel disektör ardışık, birbirine paralel, aynı kalınlıkta ve aralarındaki mesafe bilinen iki kesit üzerinde tanecik sayımında kullanılmaktadır (Sterio 1984). Disektör partikülü genellikle (Q^-) simgesi ile gösterilir. Dolayısı ile disektör bir kesitte (örnek kesit) görülüp ardışığı olan kesitte (gözlem kesiti) bulunmayan partikül izdüşümlerini yani partiküllerin kesit alma doğrultusundaki uçlarını sayar. Bu şekilde tarafsız olarak disektör hacminde bulunan partiküllerin sayısını verir (Mayhew ve Simpson 1994). Bu yöntemin en büyük avantajı kalın kesit alma zorunluluğunun olmaması, olumsuz yönü tanecik sayılırken gözlem kesiti ve örnek kesitinin aynı bölgelerinin üst üste gelme zorunluluğudur (Gundersen 1986, Mayhew 1991).

Optik disektör, ilk defa ışık mikroskobu ile yapılan çalışmalarda Gundersen (1986) ve Braendgaard (1990) tarafından kullanılmıştır. Bu yöntemin temel amacı sayısal açıklığı yüksek olan merceklerle kalın bir doku kesiti içerisinde yukarıdan aşağıya ilerleyerek alınan sanal kesitlerde partikül sayımı yapmaktır. Optik disektör uygulaması için; dokudan sistematik rastgele örneklenmiş, ortalama kalınlığı en az 25 μm olan kesitler ve kesit kalınlığını ölçmek için mikrokator gereklidir (Gundersen 1986, Pakkenberg 1993, Mayhew ve Gundersen 1996). Elde edilen kalın kesitler üzerinde tarafsız sayım çerçevesinin uygulanmasıyla ilgilenilen yapının sayım işlemi gerçekleştirilir (Gundersen 1977).

Optik disektör yöntemi ayrı ayrı iki fiziksel disektörün karşılaştırılmasını gerektirmez. Bundan dolayı iki ayrı fiziksel kesitin incelenmesi sırasında ortaya çıkan zorluklar optik disektör yöntemi ile ortadan kalkmaktadır (West 1993).

Optik parçalama yukarıda bahsi geçen disektör yöntemlerinde yer alan disektör hacmine bağımlı olmayan bir yöntemdir. Bu yöntemde sadece örnekleme basamakları kayıt edilir ve toplam disektör partikülü ile örnekleme basamaklarındaki değerlerin tersinin çarpımı ilgili yapıdaki toplam hücre sayısını verir (Mayhew 1991, West ve ark 1991). Optik parçalamada, yapılan çalışmanın hata katsayısına uygun olarak sayılması gereken hücre sayısı Poisson dağılımından (Poisson Distribution) türetilmiş CE = $1/\sqrt{n}$ formülü ile hesaplanabilir (West ve ark 1991). Burada n

sayılması gereken hücre sayısını ifade eder. Sayılan hücre sayısı arttıkça hata katsayısı değeri düşecektir (Glaser ve Wilson 1998, Schmitz ve Hof 2005).



Resim 1.1. Sayım çerçevesi (A), Tarafsız sayım çerçevesi (B), A ile gösterilen sayım çerçevesinde hangi hücrelerin sayılacağı kesin belli değildir. Sayım çerçevesinin içine ve kenarlarına isabet eden tüm hücreler taraflı bir şekilde sayılabilir. Bu ise sonuçların yanlış hesaplanmasına sebep olur. B ile gösterilen tarafsız sayım çerçevesinde ise kırmızı çizgilere isabet eden hücreler sayılmaz, çerçevenin içine ve yeşil çizgilere isabet eden hücreler sayılır. Bu şekilde bir hücre ya da partikül ancak bir kere sayılma şansına sahiptir (Gundersen 1977).

Stereoloji, günümüzde tamamen kabul görmüş bir yöntemler topluluğudur. Arka planında yer alan matematiksel ve istatistiksel temeller ile biyolojik yapıların morfolojisi hakkında daha doğru bilgilerin elde edilmesi için geliştirilmiştir. Ülkemizde Veteriner Anatomi biliminde çok iyi bilinmemesi nedeni ile bu yöntemin özgün konu özelliğine sahip Leghorn ırkı kanatlılarda medulla spinalis'in morfometrik açıdan incelenmesinde kullanılmasının Anatomi bilimine olumlu katkı yapacağı göz önüne alınmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi ile kanatlı medulla spinalis'inin cinsiyetler arası olası morfometrik özelliklerine katkı yapacağı düşünülmüştür.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Araştırmada, Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 40 haftalık 6 adet (1500±0,063 g) dişi ve 6 adet (1 766±0,082 g), erkek Leghorn ırkı kanatlı kullanıldı. Araştırma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar no: 2009/7-2011/002 Bkz. EK.A).

2.2. Yöntem

2.2.1 Kadavraların hazırlanması

Hayvanlar kas içi 0.5 ml/kg ksilazin (Rompun flk., Bayer Healtcare LLC. Animal Health Division 12707, Shawnee Mission Parkway, Shawnee, Kansas 66201, A.B.D) uygulamasını takip eden 5. dakikada kas içi 0.25 ml/kg ketamin HCl (Ketasol flk., richter pharma ag, Wels. Austria) uygulanarak genel anastezi sağlandı. İdame dozu olarak 0.15 ml/kg ketamin HCl kullanıldı (Cowen 2004). Genel anestezisi sağlanarak sırtüstü (supine) pozisyonda tespit edilen hayvanlarda sternum'un hemen gerisinden deri üzerinde ve m. obliquus internus abdominis'in origosuna parelel olarak yapılan ensizyonlarla abdomen'e girildi. Cavum abdominis'ten geçilerek karaciğerin ventral'inden kalbe ulaşıldı. Apex cordis düzeyinde ventriculus sinister'e yerleştirilen propilen kanül ile önce 1ml/kg (5000 IU/ml) heparin (Nevparin flk., Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş. Yenibosna, İstanbul) verildi. Bu işlemden 1 dakika sonra atrium dextrum'a ensizyon yapılarak hayvanların ötenazisi sağlandı. Kalp durduktan sonra ventriculus sinister'den kanül yardımıyla enjekte edilen 80-100 ml %0,9'luk fizyolojik tuzlu su ile kanın tamamen boşalması sağlandı. Tespit öncesi hayvanlar diseksiyon için uygun pozisyona getirildi. Tespitte her hayvan için 100 ml %10'luk formol solüsyonuna, 1,56 gr $NaH_2PO_4*2H_2O$ ve 3,58 gr $Na_2PO_412H_2O$ eklenerek hazırlanan tamponlu formol solusyonu (pH:7,4) kullanıldı. Perfüzyon, ventriculus sinister'e yerleştirilen kanülle yapıldı. Perfüzyon işleminin yeterliliğine vücudun tamamen sertleşmesi ve karaciğer gibi organların soluklaşması takip edilerek karar verildi (Köktürk ve ark 1999). Bu işlem sonucunda hayvanlar cinsiyete göre numaralandırıldı. Kadavralar %10'luk formol içeren tanklarda 15 gün süre ile bekletildikten sonra diseksiyon işlemine geçildi. Diseksiyon işlemi sırasında pens, bisturi, kostatom kullanılarak columna

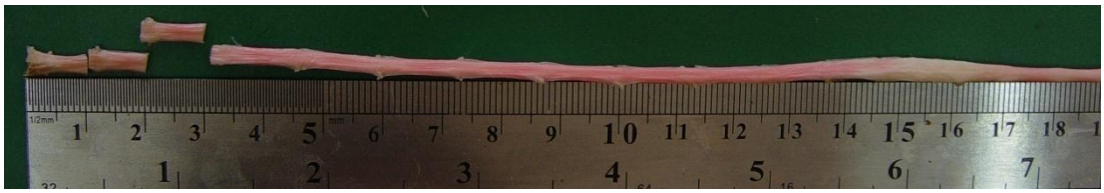
vertebralis etrafındaki kaslar ve diğer yapılar uzaklaştırıldı ve omurlar tamamen görünür hale getirildi. Columna vertebralis cranium ile birlikte hayvanın gövdesinden alınarak uzaklaştırıldı. Bu işlemi takiben 20 dakika boyunca distile su içerisinde yıkandı ve dekalsifikasyon işlemine başlandı. Triklor asetik asit (%6) içerisinde oda sıcaklığında (22ºC) 5 gün süre ile dekalsifikasyon işleminin gerçekleşmesi beklendi. Bu süre sonunda materyallar 20 dakika süreyle distile su ile yıkandı ve medulla spinalis'in çıkarılması aşamasına geçildi (Begum ve ark 2010).

Os occipitale ve atlas dorsal'den açılarak medulla oblongata ile medulla spinalis'in ilk segmenti görünür hale getirildi. Medulla oblongata ile medulla spinalis sınırı olarak XII. çift beyin siniri ile I. cervical spinal sinirin çıkış yerlerinin orta noktası kabul edildi. Bu noktadan yapılan transversal kesit ile medulla spinalis medulla oblongata'dan ayrıldı. Bu işlemi takiben cervical bölümden başlayarak pygostyl'e kadar olan tüm vertebraların laminektomisi yapıldı. Spinal sinir kökleri foramen intervertebrale düzeyinde kesilerek medulla spinalis, canalis vertebralis'ten uzaklaştırıldı. Tüm medulla spinalis'lerin uzunlukları ölçüldü.

2.2.2. Örnekleme stratejisi ve histolojik işlemler

Makroskobik örnekleme

Yapılan ön çalışma ile hata katsayısı CE ≤ 0,05 değerine ulaşabilmek için medulla spinalis'lerin 1'er cm'lik parçalara ayrılması ve 1/3 oranında örneklenmesi yeterli görüldü (Mayhew 1991, Gundersen ve ark 1999). Makroskobik örnekleme işlemi sistematik rastgele örnekleme kuralına uygun olarak ve ilk alınan örnek rastgele seçilerek gerçekleştirildi (Gundersen ve Jensen 1987) (Resim 2.1.).



Resim 2.1. Medulla spinalis'in örneklenmesi.

Örnekleme sonucunda her bir medulla spinalis'ten dişilerde 10, erkeklerde 11 kesit elde edildi.

Histolojik takip ve mikroskobik örnekleme

Alınan örnekler numaralandırılarak bir gece boyunca akarsuda yıkandı, histolojik takip aşamasına geçildi. Histolojik takip aşamasında sırası ile aşağıdaki işlemler yapıldı.

Örneklenen dokular;

a. % 60'lık alkolde 1 saat,
b. % 70'lik alkolde 1 saat,
c. % 80'lik alkolde 1 saat,
d. % 96'lık alkolde 1 saat,
e. % 96'lık alkolde 1 saat,
f. % 100'lük alkolde 1 saat,
g. % 100'lük alkolde 1 saat,
h. Ksilen I 30 dakika,
i. Ksilen II 30 dakika,
j. Ksilen III 30 dakika,
k. 55 ºC sıcaklıktaki etüv içerisinde ksilen+yumuşak parafinde 15 dakika,
l. Yumuşak parafin 2 saat ve
m. Etüv içerisinde 200 mmHg vakum altında bulunan sert parafinde 4 saat tutuldu.

Bu işlem sonucunda parafin blokları hazırlanan her örnekten rastgele örnekleme prensibine uygun olarak 10 µm kalınlığında birer kesit alındı. Alınan kesitler hematoksilen-eozin ile boyandı (Ekicioğlu ve ark 2005).

2.2.3. Hacim hesaplamalarında hata katsayısının (CE) tespiti

Hata katsayısı değerinin özellikle hacim ölçümlerinde %5'ten küçük ya da eşit olması tercih edilmektedir (Gundersen ve Jensen 1987, Gundersen ve ark 1999, Garcia-Finana ve ark 2003). Hata katsayısı hesaplamasında birden fazla yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan birisi CE = S.E.M/Mean'dir. Burada *S.E.M* standart hatayı, *Mean* ise populasyon ortalamasını ifade etmektedir (Pakkenberg ve Gundersen 1997). Mouton (2002), hata katsayısı hesaplamasında CE = CV/$\sqrt{n}$ formülünün kullanılabileceğini belirtmiştir. Burada CV = Çalışmada kullanılan

bireyler arası varyasyonu göstermektedir. CV değeri standart sapmanın popülasyon ortalamasına bölünmesi ile bulunur ve CV = SD/Mean (SD= Standart Sapma, Mean= Populasyon Ortalaması) şeklinde ifade edilir. CV değerinin düşük olması için çalışmada kullanılan materyalin bir örnek olmasına dikkat edilmelidir. n ise çalışmada kullanılan birey sayısını ifade eder. Bu formülün uygulanması ile elde edilen hata katsayısı değeri %10'dan küçük ya da eşit ve ilgilenilen yapıdan alınmış en az 8 kesit bulunuyorsa, bu değerlerin biyolojik çalışmalar için yeterli olduğu belirtilmektedir (Gundersen ve Jensen 1987). Bu çalışmada Gundersen ve Jensen (1987)'in hata katsayısı formülü kullanıldı.

Araştırmada hacim hesaplamaları için hata katsayısı hesaplaması aşağıdaki formül dizini ile yapıldı.

CE = $\frac{\sqrt{\Sigma var}}{\sum P}$

$\sum Var$ = Noise + Var_{SRS}

Noise = 0.0724 x $\frac{b}{\sqrt{a}}$ x $\sqrt{n\ x\ \sum P}$

Var_{SRS} =($\sum_{i=1}^{n} a$) = (3 x (A-Noise) – 4 x B+C) / 12

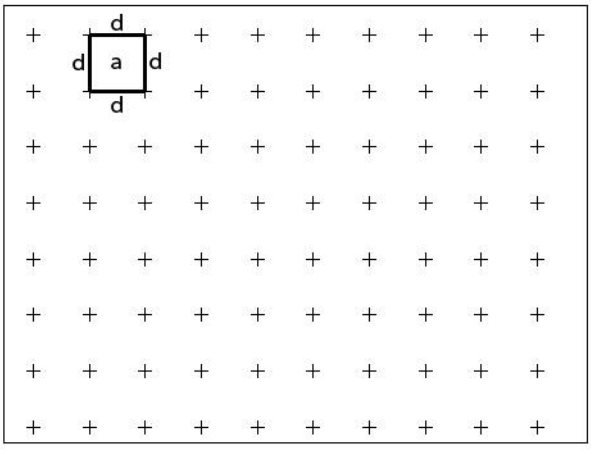
Var_{srs} =($\sum_{i=1}^{n} a$)= Sistematik rastgele örneklemenin tüm alanda istatistiki olarak değişkenliğini gösterir.

Bu formülde, Noise, medulla spinalis'ten alınan kesit yüzey alanlarının karmaşıklığını ifade ederken, $\frac{b}{\sqrt{a}}$, medulla spinalis'in kenar karmaşıklığını ifade etmektedir. Formüldeki b = kenar uzunluğu, $\sqrt{a}$ ise kesit alanının karekökünü temsil eder. Formülde yer alan 0.0724 karmaşıklık değerinin hesaplanmasında kullanılan sabit bir sayı iken, n toplam kesit sayısına, $\sum P$ ise kesitler üzerine düşen toplam nokta sayısına karşılık gelmektedir (Gundersen ve Jensen 1987, West 1993, Ohm ve ark 1997, Gundersen ve ark 1999, Garcia-Finana ve ark 2003)

2.2.4. Bilgisayar destekli hacim hesaplamaları

Hacim hesaplamalarında (substantia alba, substantia grisea, canalis centralis) Stereo-Investigator (sürüm 8.0, MicroBrightField Inc.) kullanıldı. Cavalieri prensibi ile her bir örneğin hacmi V_n= (a/p) x $\sum P$ x t formülü kullanılarak hesaplandı (Mayhew ve Gundersen 1996). Bu formülde, V_n = ilgilenilen örneğe ait yapının hacmi, a/p = noktalı alan ölçüm cetvelinde yer alan bir noktanın alanını, $\sum P$ = ilgilenilen yapı üzerine düşen toplam nokta sayısını, t= ortalama kesit kalınlığını (3000 µm) ifade eder (Gundersen ve ark 1999, Canan ve ark 2002, Yücel ve ark 2003, Howard ve Reed 2005). Tüm yapının hacmi $V_{Top}=V_{1+}V_2\ldots\ldots V_n$ formülü sayesinde hesaplandı (Bjugn ve Gundersen 1993).

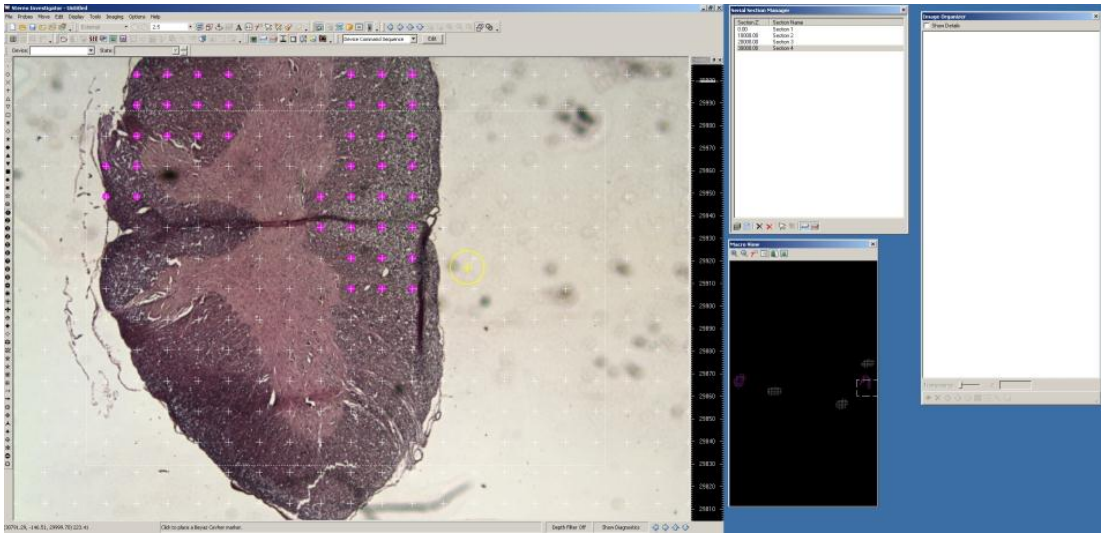
Yapılan ön çalışma sonucunda Cavalieri prensibinde alan ve hacim ölçümlerinde kullanılan noktalı alan ölçüm cetvelinde (Resim 2.2.) bulunan iki nokta arası uzaklık 200 µm, bir noktanın kapladığı alan (a/p) ise 40.000 μm^2 olarak belirlendi. Belirlenen nokta sıklığı substantia alba ve substantia grisea'nın hacim ölçümleri için kullanıldı. Canalis centralis hacmi için bu değer 3 µm olarak belirlendi.



Resim 2.2. Noktalı alan ölçüm cetveli (d=iki nokta arası uzaklık, a=bir noktanın kapladığı alan).

Substantia alba'nın hacim hesaplaması için stereo investigator programında paint komutu seçilerek substantia alba üzerine düşen noktalar sayıldı. Bu sayma işlemi bir hayvana ait tüm kesitlere daha sonra tüm hayvanlara uygulandı. Substantia

grisea'nın hacim ölçümü için substantia alba'da uygulanan yöntem tekrarlandı (Resim 2.3.).



Resim 2.3. Noktalı alan ölçüm cetveli ile substantia alba'nın hacim ölçümü.

Substantia grisea ve substantia alba'nın hacim oranları tespit edildi. Referans hacim içerisinde yer alan bir anatomik yapının referans hacme oranlanması sıklıkla kullanılan ve önemli bir parametredir (Gundersen 1986, Gundersen ve ark 1988, Howard ve Reed 2005). Bütün bir yapı içerisinde bulunan anatomik oluşumun hacimsel oranı aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanabilir;

$$V_v\,(X,Y) = \frac{Y'nin\ içerisinde\ bulunan\ X'in\ hacmi}{Y'nin\ hacmi}$$

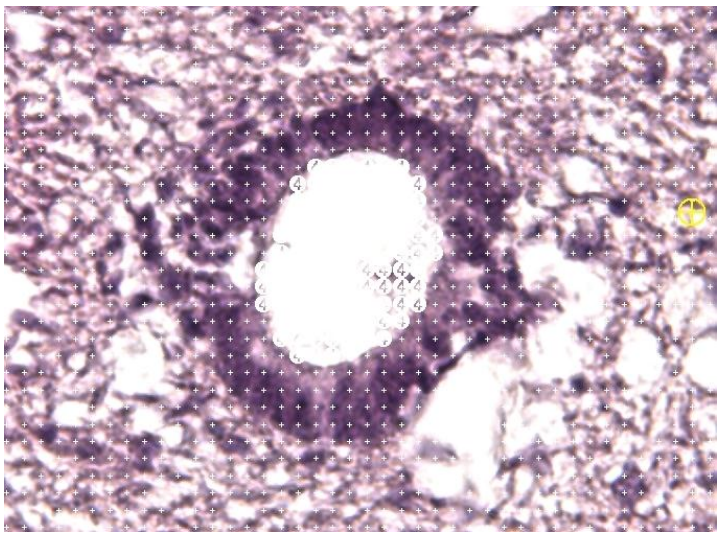
Burada X, substantia grisea'nın hacmini, Y ise medulla spinalis'in hacmini ifade etmektedir. Hacim yerine substantia grisea ve medulla spinalis'e düşen nokta sayıları da kullanılabilir.

$$V_v\,(\text{substantia grisea, medulla spinalis}) = \frac{\sum P\ substantia\ grisea}{\sum P\ medulla\ spinalis}$$

Bu formulde $\sum P\ substantia\ grisea$, substantia grisea'ya isabet eden bütün noktaların toplamını, $\sum P\ medulla\ spinalis$ ise medulla spinalis üzerine düşen toplam nokta sayısını ifade etmektedir (Turgut ve ark 2007).

Canalis centralis'in hacmi, belirlenen nokta sıklığında görüntü üzerine yerleştirilen noktalı alan ölçüm cetveli yardımı ile hesaplandı (Resim 2.4.). Sayılan

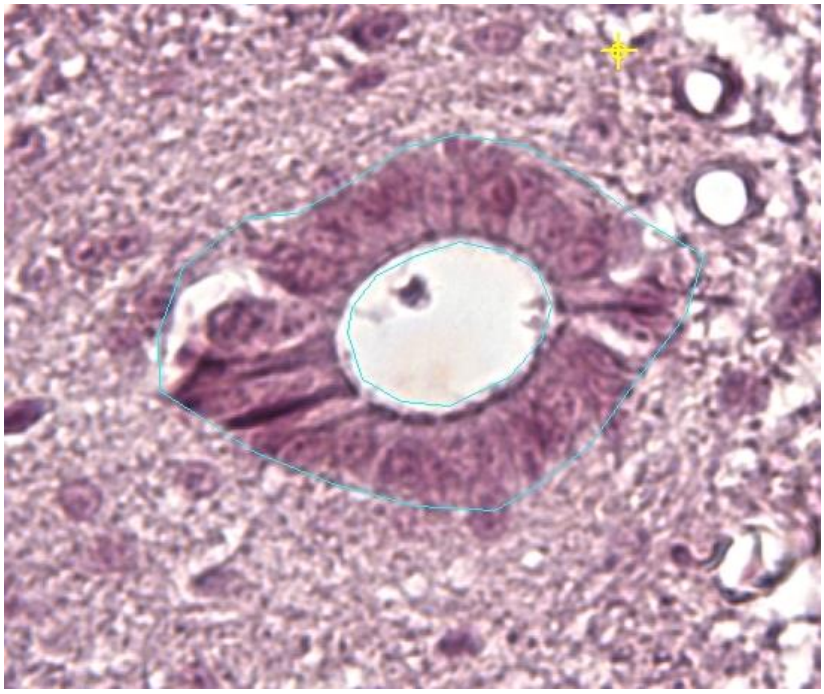
nokta sayısı, ortalama kesit ve bir noktanın sahip olduğu alan değeri ile çarpılarak tüm hayvanlardaki canalis centralis hacmi hesaplandı.



Resim 2.4. Cavalieri prensibi ile canalis centralis'in hacim ölçümü.

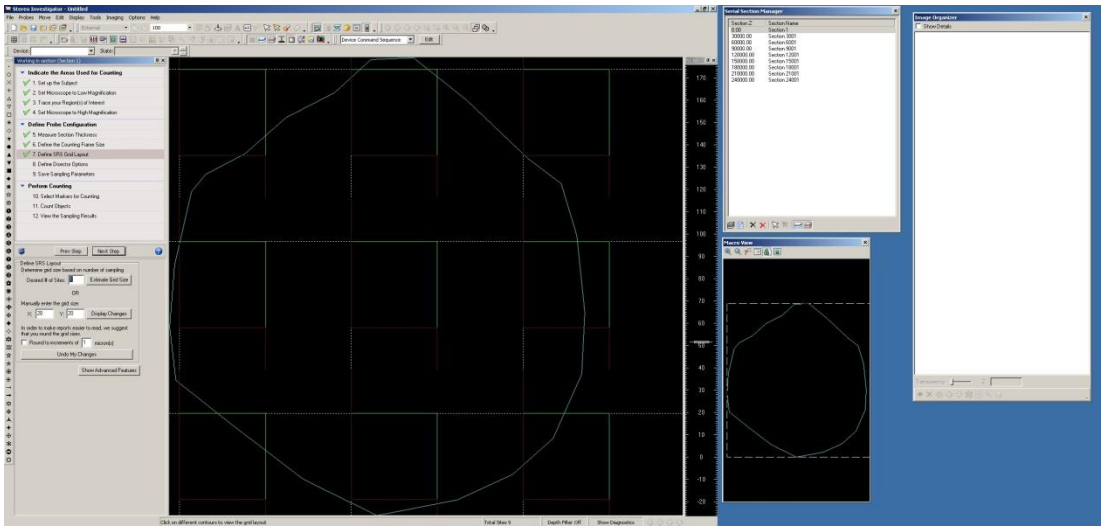
2.2.5. Optik parçalama ile ependim hücre sayısının hesaplanması

Ependim hücrelerinin sayısının hesaplanmasında 40X objektif altında elde edilen canlı görüntü üzerinde ependim hücrelerinin bulunduğu alan Stereo-investigator (Microbrightfield Inc.) programı yardımı ile sınırlandırıldı (Resim 2.5.).



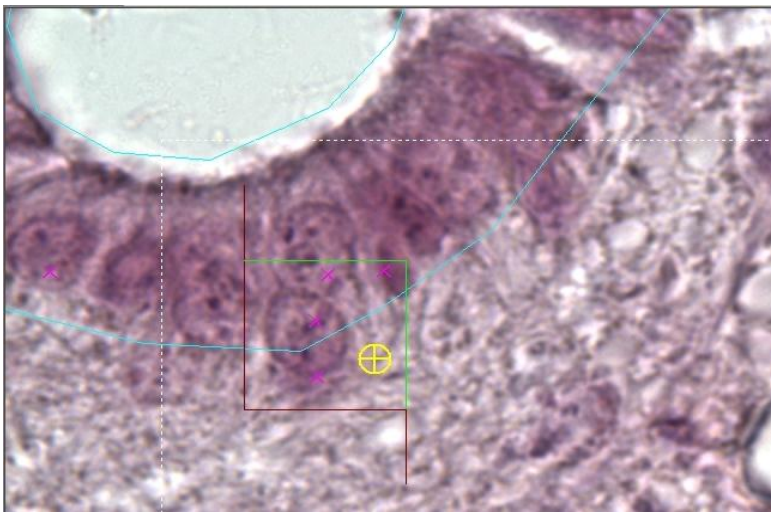
Resim 2.5. Ependim hücrelerinin bulunduğu bölgenin sınırlandırılması.

Daha sonra 100X immersiyon objektif ile alan örneklemesi yapıldı (Resim 2.6.).



Resim 2.6. Ependim hücre sayımı için alan örneklemesinin belirlenmesi.

Bu işlemden sonra ilgilenilen alanın tarafsız sayım çerçeveleri ile örneklenmesi sağlandı. Alan örneklemesinde grid (ızgara) büyüklüğü 20 x 20 µm = 400 µm^2 olarak, tarafsız sayım çerçevesinin büyüklüğü ise 10 x 10 µm = 100 µm^2 olarak belirlendi. Buradaki örnekleme basamağı $\frac{1}{aö} = \frac{100}{400} = \frac{1}{4}$ olarak belirlendi. Ortalama kesit kalınlığı hesaplandı ve değeri 7 µm olarak bulundu. Güvenlik kuşağı için %10 luk bir değer atandı ve disektör yüksekliği 5 µm olarak belirlendi. Buradaki kalınlık örnekleme oranı (kaö) ise $\frac{1}{kaö} = \frac{1}{\frac{5}{7}} = \frac{7}{5}$ = 1.4 olarak bulundu (Mayhew 1991, West ve ark 1991). Tarafsız sayım çerçevesi kullanılarak örneklenen alanlarda sayım işlemine geçildi (Resim 2.7.).



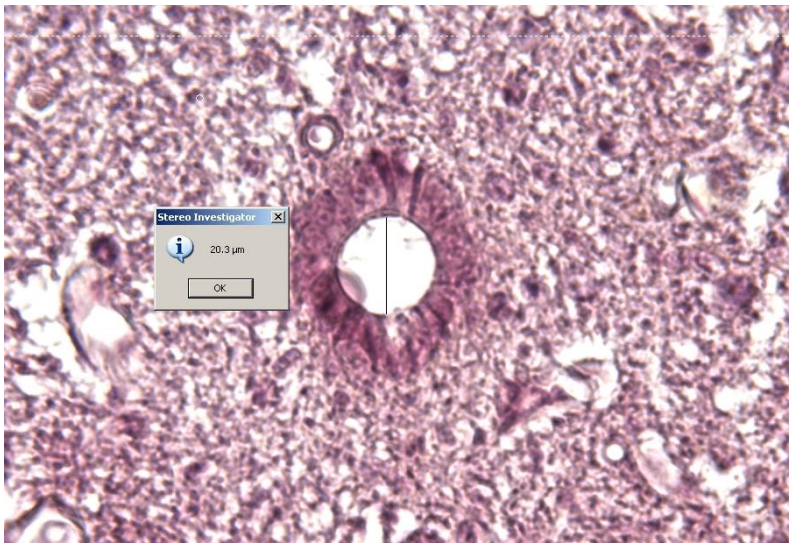
Resim 2.7. Tarafsız sayım çerçevesi ile ependim hücrelerinin sayımı.

Tüm hayvanlara ait medulla spinalis'lerde aynı işlemler yapıldıktan sonra toplam ependim hücresi sayısının belirlenmesi aşamasına geçildi. Çalışmanın ilk bölümünde makroskobik örnekleme oranı $\frac{1}{3}$ olarak belirlenmişti (medulla spinalis'in 1/3 oranında örneklenmesinden dolayı). Örneklenen her bir medulla spinalis bölümünün uzunluğu 1 cm = 10 000 µm olduğundan ve bu bölümden 10 µm kalınlığında 1 kesit alındığından kesit örnekleme oranı $\frac{10}{10000} = \frac{1}{1000}$ olarak tespit edildi. İlgili değerler optik parçalama formülüne yazıldığında;

N = $\frac{1}{\frac{1}{3}}$ X $\frac{1}{\frac{1}{1000}}$ X $\frac{1}{\frac{1}{4}}$ X $\frac{1}{\frac{5}{7}}$ X $\sum Q -$ formülün son hali bu şekilde ifade edilebilir

N (ependim hücresi) = 3 x 1000 x 4 x 1.4 x $\sum Q -$ eşitliğinden medulla spinalis'te bulunan toplam ependim hücresi sayım işlemi yapıldı. Bu formülde $\sum Q -$ optik parçalama yöntemi ile tarafsız sayım çerçevesi kullanılarak her bir kesitte sayılan toplam disektör hücresini ifade etmektedir (Mayhew 1991, West ve ark 1991, Howard ve Reed 2005). Ependim hücre hesaplamasında hata katsayısı CE= $1/\sqrt{n}$ formülü kullanılarak hesaplandı (West ve ark 1991).

Canalis centralis'in çapları Stereo-Investigator kullanılarak ölçüldü. Çap ölçümleri canalis centralis'in transversal ve vertical en geniş bölümleri dikkate alınarak yapıldı (Resim 2.8.).



Resim 2.8. Canalis centralis'in vertical ve transversal çap ölçümleri.

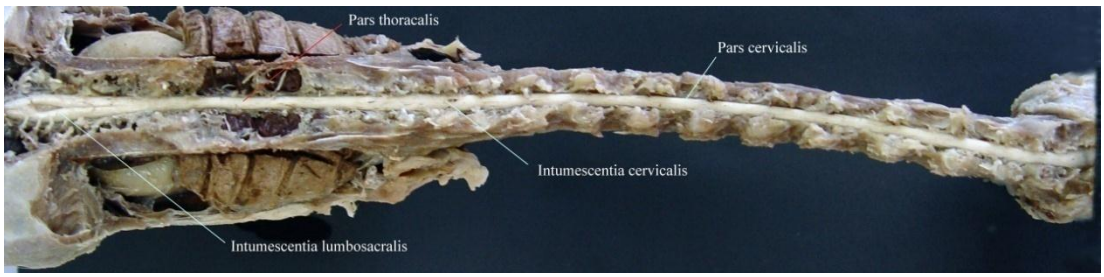
2.2.6. İstatistiksel analizler

Çalışmada cinsiyetlerden elde edilen hacim, hata katsayısı ve uzunluk verileri Two sample t testi, medulla spinalis'in bölümlerine göre elde edilen veriler ANOVA ve Duncan testi, ependim hücre sayıları Mann Whitney U testi, aynı cinsiyete ait canalis centralis'in transversal ve vertikal çapları Paired t testi ve cinsiyetler arasındaki verileri ise Two sample t testi kullanılarak istatistiki açıdan değerlendirildi (SPSS 17.0). $p<0.05$ değeri önem sınırı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Makroskobik bulgular

Erkek ve dişi Leghorn'larda columna vertebralis'in 14 cervical, 7 thoracal, 14 lumbosacral, 5 caudal olmak üzere 40 vertebra'dan oluştuğu tespit edildi. Medulla spinalis'in thoracal bölge dışında canalis vertebralis'i tam olarak doldurmadığı gözlendi (Resim 3.1).



Resim 3.1. Medulla spinalis'in bölümleri.

Pars cervicalis ve pars thoracalis'in ilk 5 segmentinde cavum epidurale'nin geniş olduğu son iki thoracal segmentten itibaren dura mater spinalis'in dış yaprağı (periosteum) ile iç yaprağı birleştiğinden bu boşluğun ortadan kalktığı ve caudal'e doğru cavum subarachnoidale'nin genişleyerek devam ettiği görüldü.

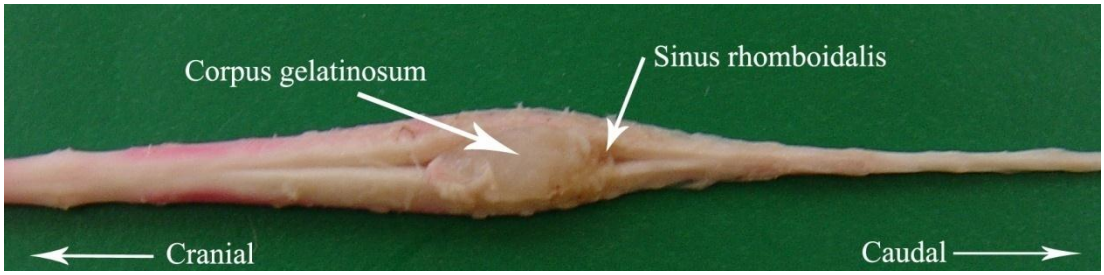
Diseksiyon sonucunda erkek hayvanların 33,3±0,52 cm ve dişi hayvanların ise 31,0±0,89 cm uzunluğunda medulla spinalis'e sahip oldukları belirlendi ($p<0,001$) (Resim 3.2.).



Resim 3.2. A; dişi, B; erkek.

Medulla spinalis'in 15 cervical, 7 thoracal, 14 lumbosacral ve 5 caudal segmentten oluştuğu gözlendi. Bu segmentlerden C13, C14, C15, T1 ve T2'nin intumesentia cervicalis'in, LS1-LS10'un ise intumesentia lumbosacralis'i oluşturduğu tespit edildi. İlk cervical spinal sinirin radix dorsalis'ten yoksun ve ilk cervical spinal sinir ile ikinci cervical spinal sinir arasındaki mesafenin 3-5 mm

arasında olduğu tespit edildi. Medulla spinalis'in pygostyle'e kadar devam ettiği; ancak cauda equina ve filum terminale'nin şekillenmediği gözlendi. Son thoracal segment ile intumescentia lumbosacralis'in ilk üç segmentin dorsal'inde yer alan sinus rhomboidalis'in, corpus gelatinosum tarafından doldurulduğu tespit edildi (Resim 3.3).

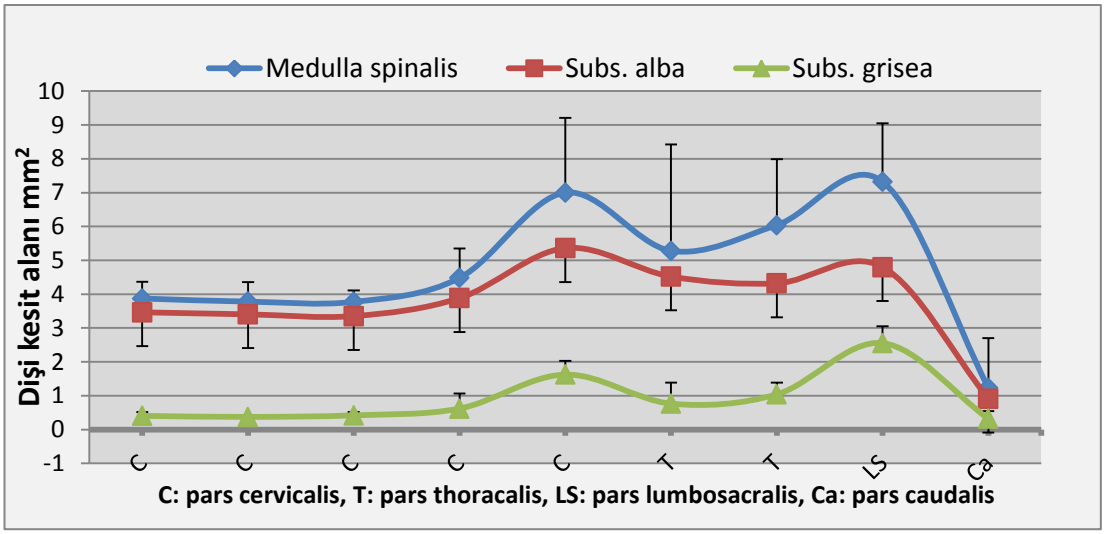


Resim 3.3. Sinus rhomboidalis ve corpus gelatinosum.

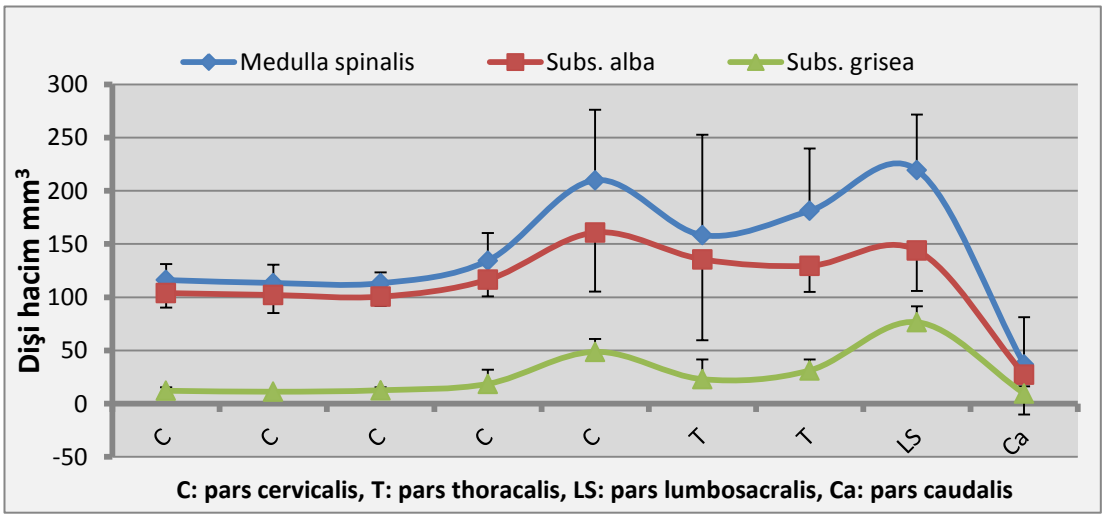
3.2. Morfometrik bulgular

Dişi ve erkek hayvanların medulla spinalisleri sistematik rastgele örneklenme prensibine uygun olarak 3'er cm aralıklarla örneklendi, dişi hayvanlardan 10 kesit erkek hayvanlardan 11 kesit elde edildi. Dişi hayvanlarda caudal bölgeye ait son kesitten veri alınamadı.

Dişi hayvanlarda 5'i cervical, 2'si thoracal, 1'i lumbosacral ve 1'i caudal olmak üzere toplamda 9 örnek hesaplamalarda kullanıldı. Bu örneklerden elde edilen kesitler üzerinde yapılan alan ve hacim hesaplamalarına ait veriler sırası ile Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de verildi.



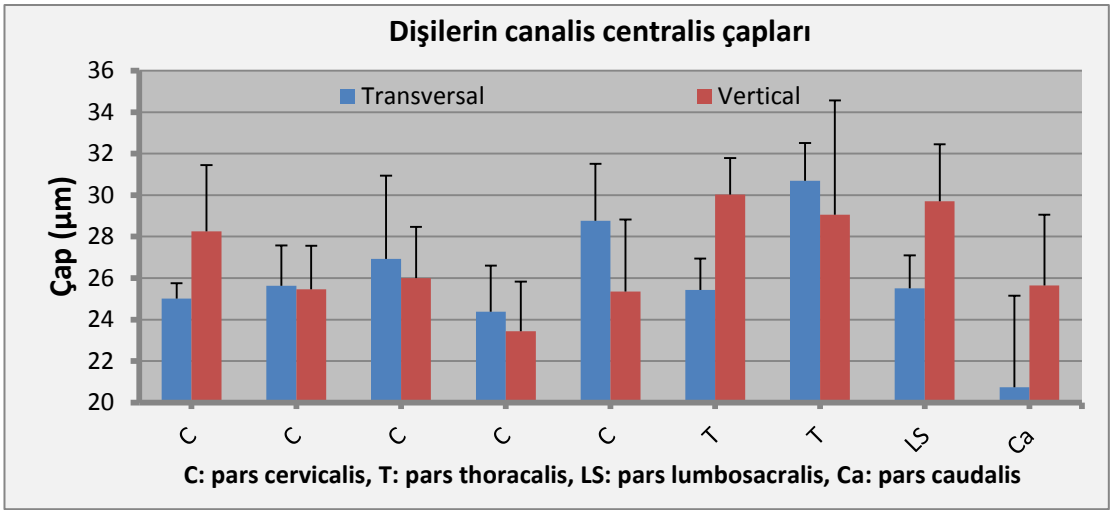
Şekil 3.1. Dişi hayvanlarda medulla spinalis'ten elde edilen kesitlerin yüzey alanları (Mean±SD).



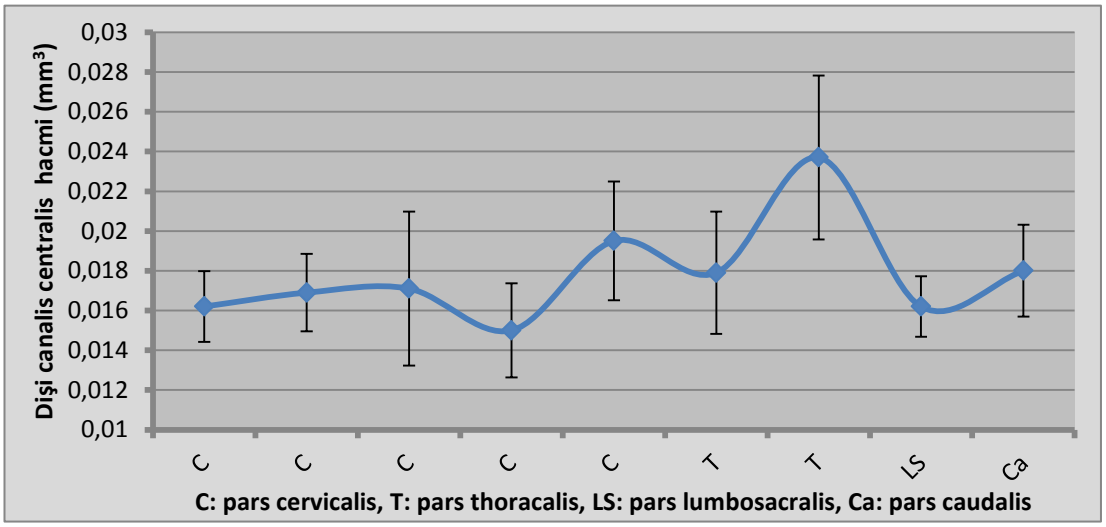
Şekil 3.2. Dişi hayvanlarda medulla spinalis'in bölümlerinin hacimleri (Mean±SD).

Bu veriler ışığında intumescentia cervicalis ve intumescentia lumbalis düzeyinde medulla spinalis, substantia alba ve grisea'nın alanının ve hacminin arttığı, caudal bölümde ise ilgili hacim ve alan değerlerinin düşük düzeyde olduğu gözlendi.

Dişi hayvanlarda medulla spinalis'in farklı bölümlerinin canalis centralis'inin transversal ve vertical çapları ile hacim değerleri Şekil 3.3 ve 3.4'te verilmiştir.



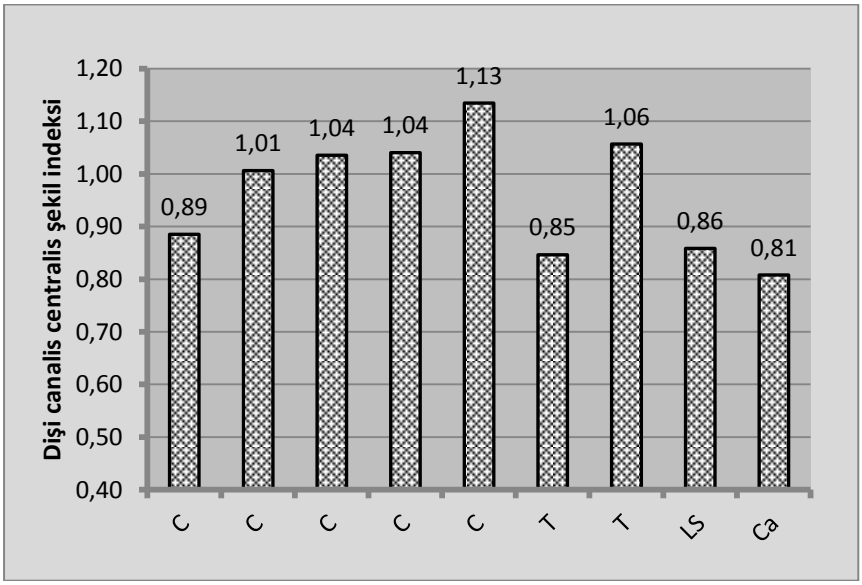
Şekil 3.3. Dişi hayvanlarda canalis centralis'in çapları (Mean±SE).



Şekil 3.4. Dişi hayvanlarda canalis centralis'in farklı bölgelerdeki hacimleri (Mean±SD).

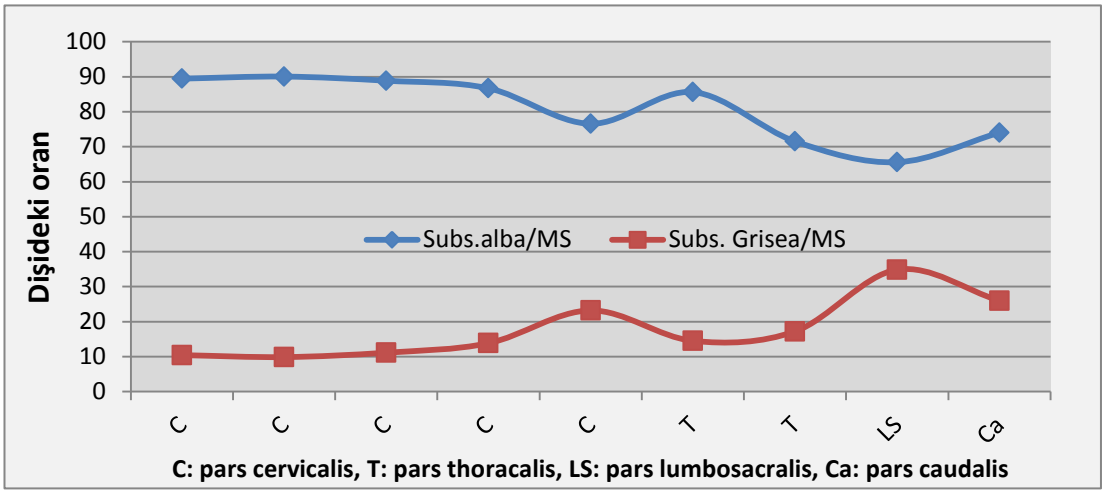
Canalis centralis'in thoracal ikinci kesit düzeyinde transversal, thoracal birinci kesit düzeyinde ise vertical çapın en yüksek değerlere sahip olduğu gözlendi. En düşük transversal ve vertical çaplar sırası ile caudal ve cervical dördüncü kesitlerde tespit edildi. Canalis centralis'in kesit bazında şekil indeksi ($şekil\ indeks = \frac{transversal\ çap}{vertical\ çap}$) Şekil 3.5'te verilmiştir. Bu hayvanlarda canalis centralis'in vertical ve transversal çapları arasında istatistiki fark gözlenmedi

(p>0,05, paired t test). Dolayısı ile şekil indeksinin “1” (canalis centralis yuvarlak) olduğu belirlendi.

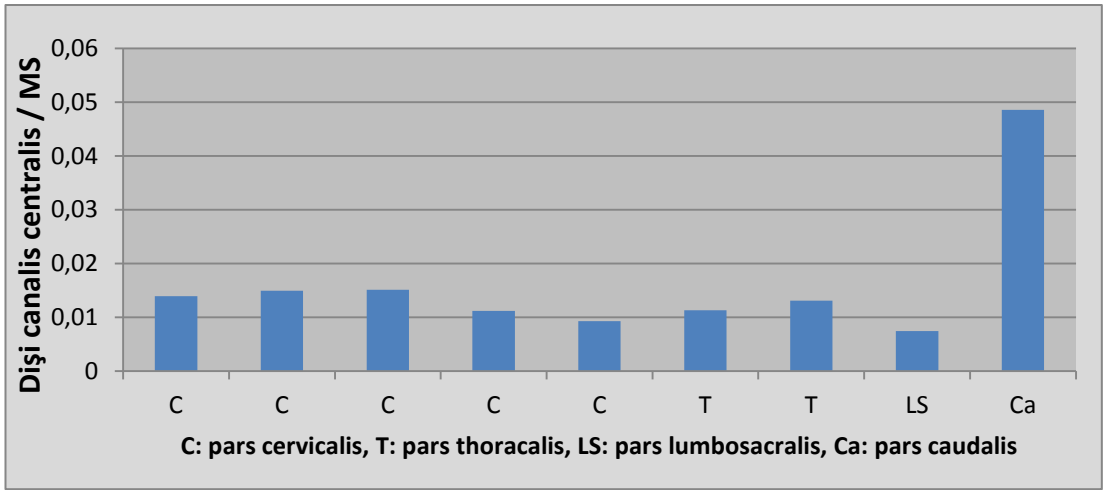


Şekil 3.5. Dişi hayvanlarda canalis centralis’in şekil indeksi.

Dişi hayvanlarda substantia alba ve substantia grisea ile canalis centralis’in, medulla spinalis’e olan hacim oranları Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’de verildi. Intumescentia cervicalis ve intumescentia lumbosacralis düzeyinde substantia grisea oranı artarken, substantia alba oranının azaldığı, canalis centralis’in ise caudal bölgede en yüksek orana ulaştığı gözlendi.

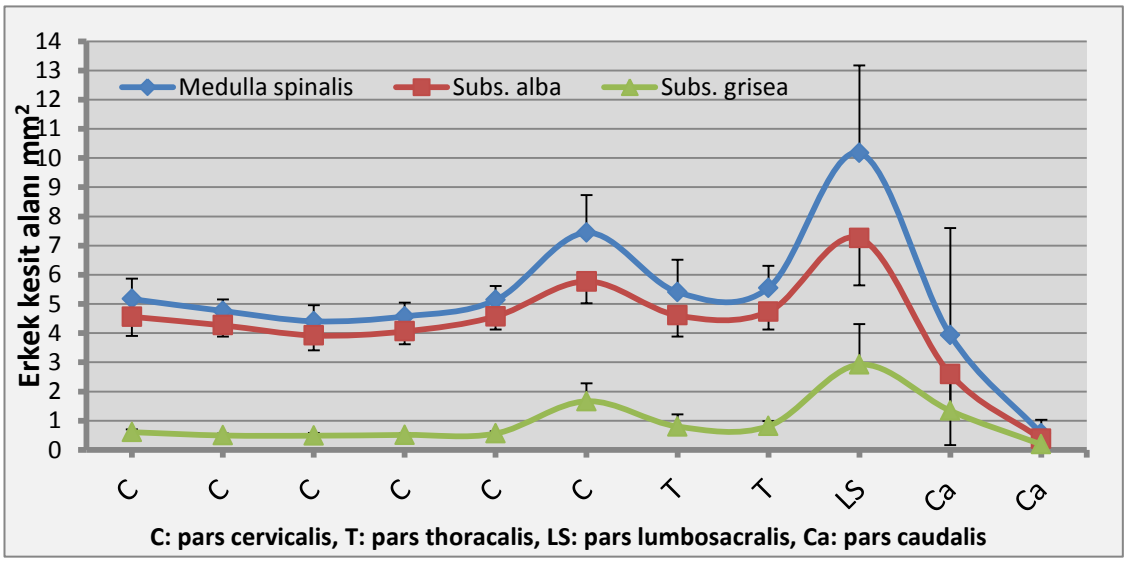


Şekil 3.6. Substantia alba ve substantia grisea hacminin medulla spinalis hacmine oranları.

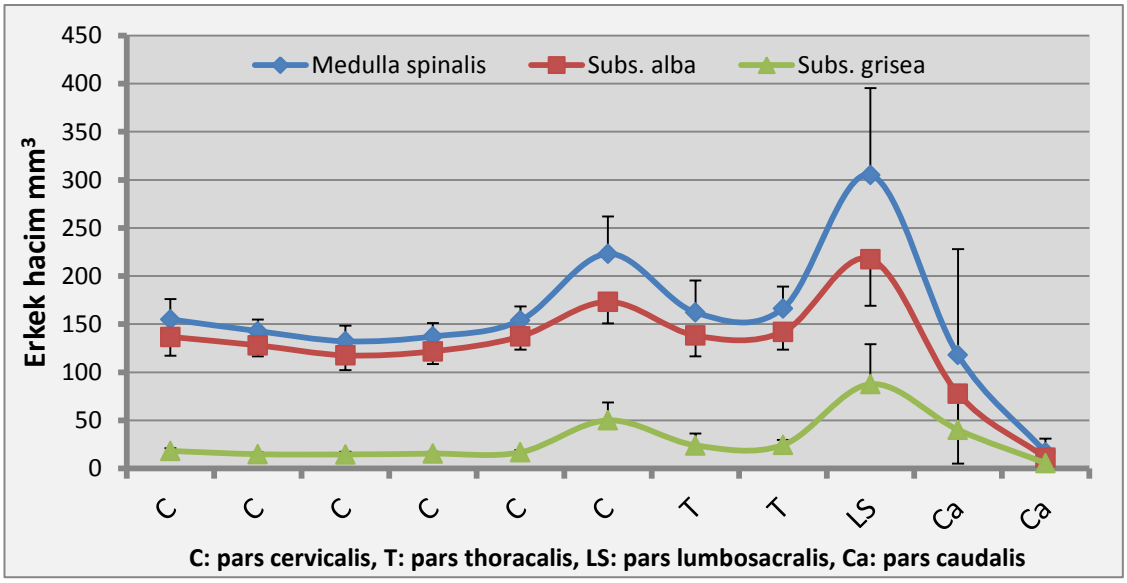


Şekil 3.7. Canalis centralis hacminin medulla spinalis hacmine oranı.

Erkek hayvanlarda 6'sı cervical, 2'si thoracal, 1'i lumbosacral ve 2'si caudal olmak üzere 11 örnek hesaplamalarda kullanıldı. Bu örneklerden elde edilen kesitler üzerinde yapılan alan ve hacim hesaplamalarına ait veriler sırası ile Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da verildi.



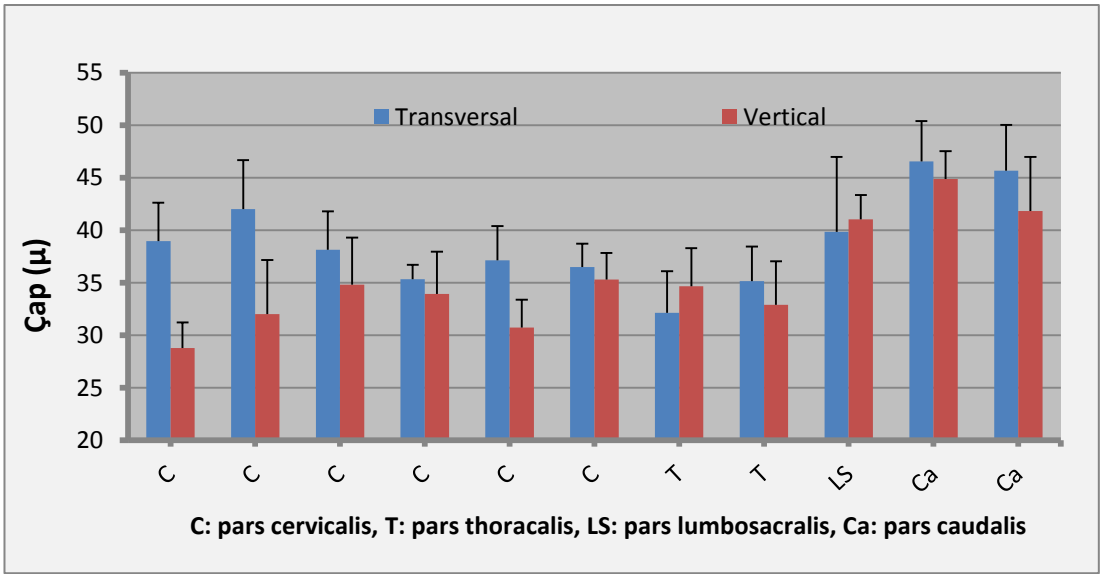
Şekil 3.8. Erkek hayvanlarda medulla spinalis kesitlerinin yüzey alanları (Mean±SD).



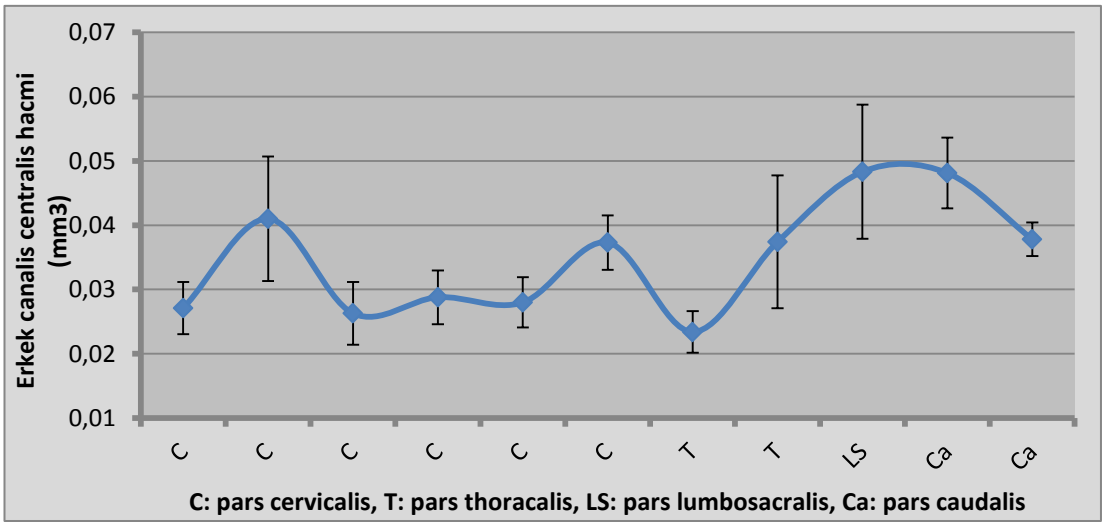
Şekil 3.9. Erkek hayvanlarda farklı medulla spinalis bölümlerinin hacimleri (Mean±SD).

Verilerin analizi sonucu intumescentia cervicalis ve intumescentia lumbosacralis düzeyinde medulla spinalis, substantia alba ve grisea'nın alanlarının ve hacimlerinin arttığı, caudal bölümde ise azaldığı tespit edildi (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).

Erkek hayvanlarda canalis centralis'in çap ve hacimleri sırasıyla Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de verildi. Canalis centralis'in caudal birinci kesit düzeyinde transversal ve vertical çaplarının en yüksek olduğu, thoracal birinci kesit düzeyinde transversal, cervical birinci kesit düzeyinde ise vertical çapın en düşük değere sahip olduğu gözlendi. Transversal ve vertical çap arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,05$, Paired t test).

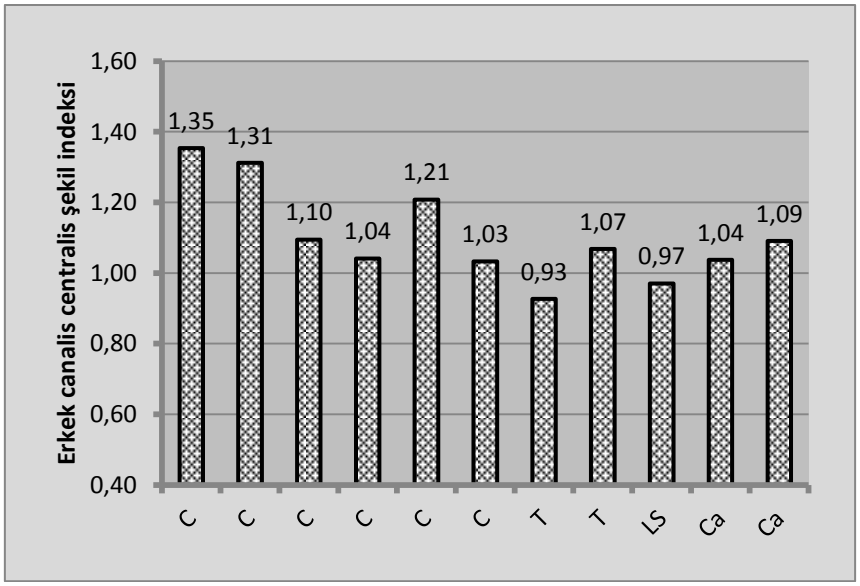


Şekil 3.10. Erkek hayvanlarda canalis centralis'in farklı çap değerleri (Mean±SE).



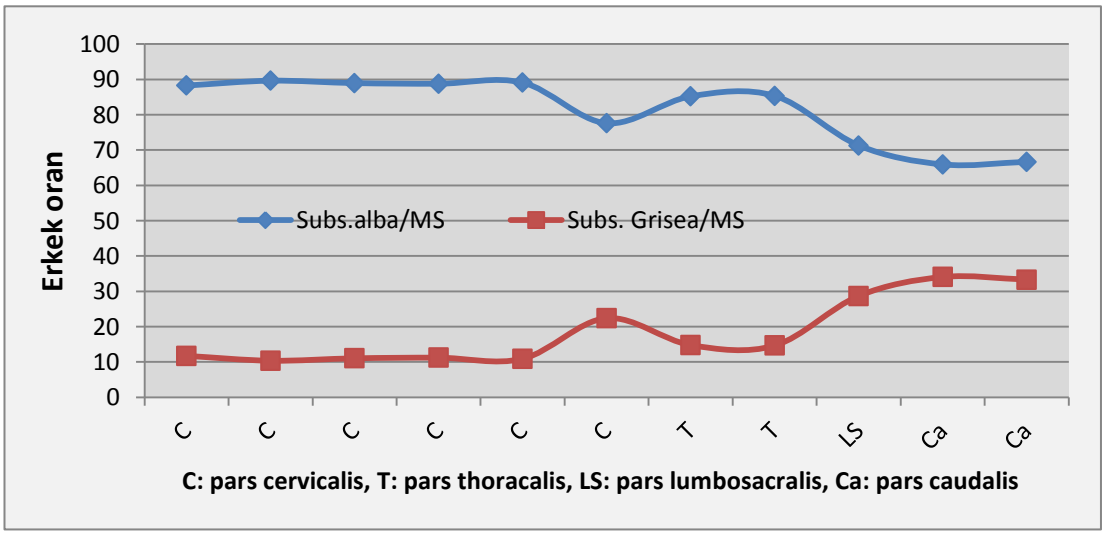
Şekil 3.11. Erkek hayvanlarda canalis centralis'in farklı bölümlerinin hacimleri (Mean±SD).

Kesit bazında canalis centralis'in şekil indeksi grafik Şekil 3.12'de verildi. Tüm medulla spinalis boyunca erkek hayvanlarda canalis centralis'in şekil indeksinin 1,1 olduğu dolayısı ile dorsoventral doğrultuda basık olduğu tespit edildi. Şekil indeksindeki bu farkın, cinsiyet ayrımı için önemli bir veri olmadığı saptandı (Two sample t test, $p>0,05$).

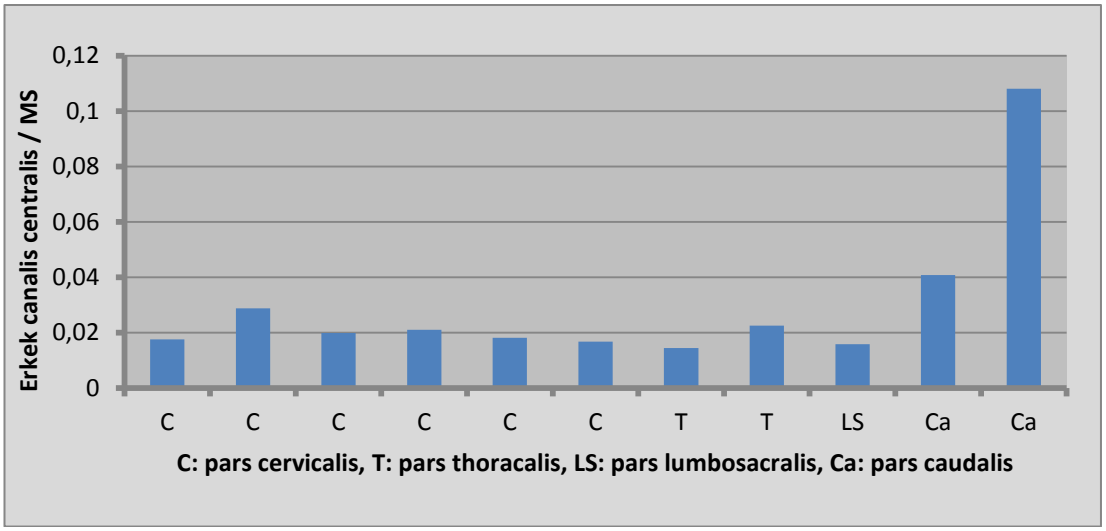


Şekil 3.12. Erkek hayvanlarda canalis centralis'in şekil indeksi.

Substantia alba ve grisea ile canalis centralis'in medulla spinalis'e olan hacim oranları Şekil 3.13 ve Şekil 3.14 de verilmiştir.



Şekil 3.13. Substantia alba ve substantia grisea'nın farklı bölgelerdeki hacimlerinin medulla spinalis hacmine oranları.



Şekil 3.14. Canalis centralis hacminin medulla spinalis hacmine oranı.

Erkek ve dişi hayvanlarda medulla spinalis ve bölümlerinden elde edilen morfometrik veriler karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4'te verildi. Substantia alba'nın her iki cinsiyetteki hacimleri arasındaki karşılaştırmada, erkek Leghorn'ların dişilerden daha fazla substantia alba hacmine sahip olduğu belirlendi (Two sample t test, $p<0,05$,). Erkek kanatlıların dişilerden daha fazla substantia grisea hacmine sahip oldukları görüldü (Two sample t test, $p<0.05$). Dişi ve erkek hayvanlar arasında yapılan canalis centralis'in hacim karşılaştırmasında, erkeklerin dişilerden daha fazla canalis centralis hacmine sahip oldukları saptandı ($p<0,05$, Two sample t test)

Çizelge 3.1. Substantia alba, grisea, canalis centralis ve medulla spinalis'in hacimlerinin karşılaştırması (CE= hata katsayısı, CV= bireyler arası varyasyon, Mean±SD).

	Dişi			Erkek		
	Hacim (mm^3)	CE	CV	Hacim (mm^3)	CE	CV
Substantia alba	$1007±127^b$	0,016	0,126	$1400±94,1^a$	0,014	0,067
Substantia grisea	$241±26,8^b$	0,037	0,111	$311±23,0^a$	0,036	0,075
Canalis centralis	$0,160±0,034^b$	0,018	0,212	$0,406±0,113^a$	0,016	0,278
Medulla spinalis	$1249±151^b$	0,026	0,120	$1712±113^a$	0,025	0,066

a,b: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiki olarak anlamlıdır (Two sample t test, medulla spinalis hacmi = $p<0,001$, substantia alba hacmi = $p<0,002$, susbtantia grisea hacmi = $p<0,001$, canalis centralis hacmi = $p<0,004$).

Çizelge 3.2. Dişi ve erkek hayvanların pars cervicalis, pars thoracalis, pars lumbosacralis ve pars caudalis'lerinin sahip oldukları substantia alba ve substantia grisea oranlarının karşılaştırması (Mean±SD).

	Substantia grisea		Substantia alba	
	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek
Pars cervicalis	0,150±0,015^{b}	0,136±0,015^{c}	0,849±0,015^{a}	0,863±0,015^{a}
Pars thoracalis	0,173 ±0,011^{b}	0,146±0,023^{c}	0,826±0,011^{a}	0,853±0,023^{a}
Pars lumbosacralis	0,351±0,028^{a}	0,290±0,037^{b}	0,648±0,028^{b}	0,709±0,038^{b}
Pars caudalis	0,329±0,092^{a}	0,334±0,039^{a}	0,670±0,092^{b}	0,665±0,039^{c}
Medulla spinalis	0,1936±0,882^{A}	0,1819±0,706^{B}	0,806±0,008^{B}	0,818±0,007^{A}

a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (Duncan test, $p<0,05$). Substantia grisea ve substantia alba'nın medulla spinalis bölümlerine göre cinsiyetler arasında istatistiki fark tespit edilmedi (Two sample t test, $p>0.05$,). A, B: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiki olarak anlamlıdır (Two sample t test, $p<0,05$).

Dişilerde medulla spinalis'in sahip olduğu substantia grisea oranı erkeklerden fazla iken substantia alba oranının düşük olduğu gözlendi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.3. Her iki cinsiyetin canalis centralis oranlarının karşılaştırması (Mean±SD).

	Canalis centralis/ Medulla spinalis	Canalis centralis/ Subs. grisea
Dişi	0,012±0,002^{b}	0,066±0,011^{b}
Erkek	0,023±0,006^{a}	0,131±0,041^{a}

a, b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak anlamlıdır (Two sample t test, $p<0,01$).

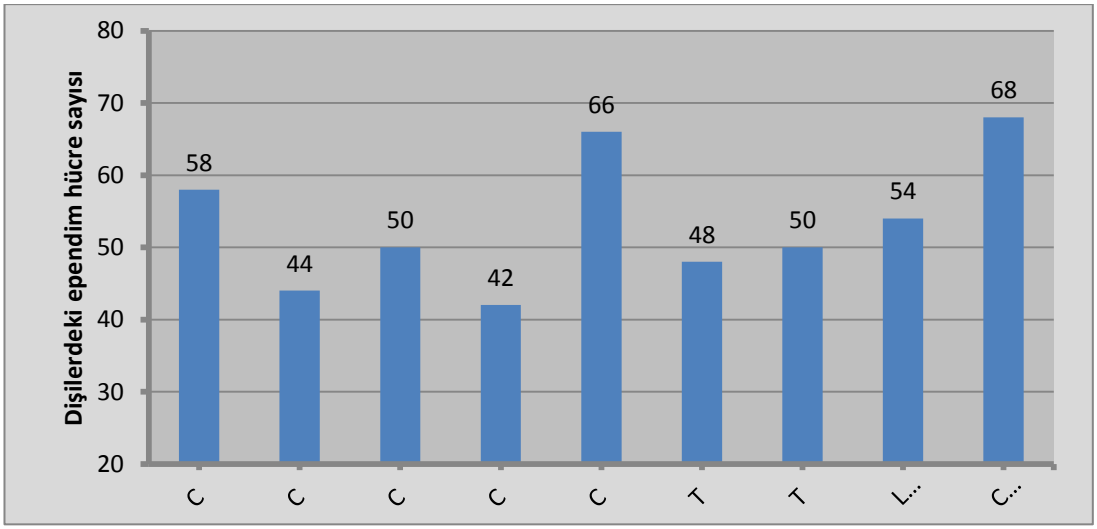
Çizelge 3.4. Her iki cinsiyette canalis centralis çaplarının medulla spinalis'in bölümlerine göre dağılımı (µm, mean±SD).

	Dişi		Erkek	
	Transversal	Vertical	Transversal	Vertical
Pars cervicalis	26,1±6,04^{ab,B,x}	25,7±6,51^{a,B,x}	38,0±7,81^{ab,A,x}	32,6±8,71^{c,A,y}
Pars thoracalis	28,0±4,76^{a,A,x}	29,5±9,57^{a,A,x}	33,6±8,65^{b,A,x}	33,7±9,17^{bc,A,x}
Pars lumbosacralis	25,5±3,90^{ab,A,x}	29,7±6,75^{a,B,x}	39,8±7,49^{ab,A,x}	41,0±5,63^{ab,A,x}
Pars caudalis	20,7±0,83^{b,B,x}	25,6±8,33^{a,B,x}	46,1±9,59^{a,A,x}	43,3±9,66^{a,A,x}
Ortalama çap	25,9±6,43^{a,B,x}	26,9±7,52^{a,B,x}	38,8± 9,99^{a,A,x}	35,5± 9,63^{b,A,x}

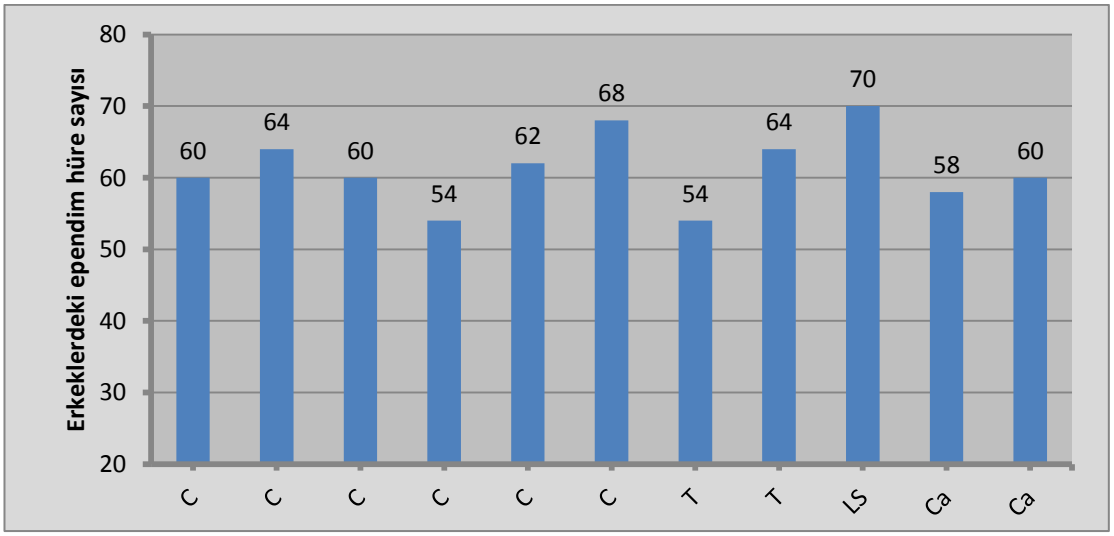
a, b, c: Aynı sütunda yer alan farklı harf taşıyan cinsiyetlere ait çap ölçümleri istatistiki açıdan önemlidir (Duncan test, $p<0,05$). A, B: Aynı satırdaki vertical ve transversal çaplara ait farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (Two sample t test, $p<0,05$). x, y: Aynı satırda yer alan aynı cinsiyete ait farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (Paired t test, $p<0,05$).

3.3. Ependim hücre sayısı

Optik parçalama ile her iki cinsiyette yapılan ependim hücre sayımı sonucunda dişilerde 1 957 200 (CE = 0,091) erkeklerde ise 2 755 200 (CE = 0,078) hücre olduğu tespit edildi. Aradaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu görüldü (Mann Whitney U test, $p<0,05$). Medulla spinalis'in ilgili bölümünden alınan kesit bazında sayılan hücre sayısı sırası ile dişi ve erkekte Şekil 3.15 ve Şekil 3.16'da verildi.



Şekil 3.15. Dişi hayvanlarda medulla spinalis'in farklı bölümlerinde tespit edilen toplam ependim hücre sayıları.



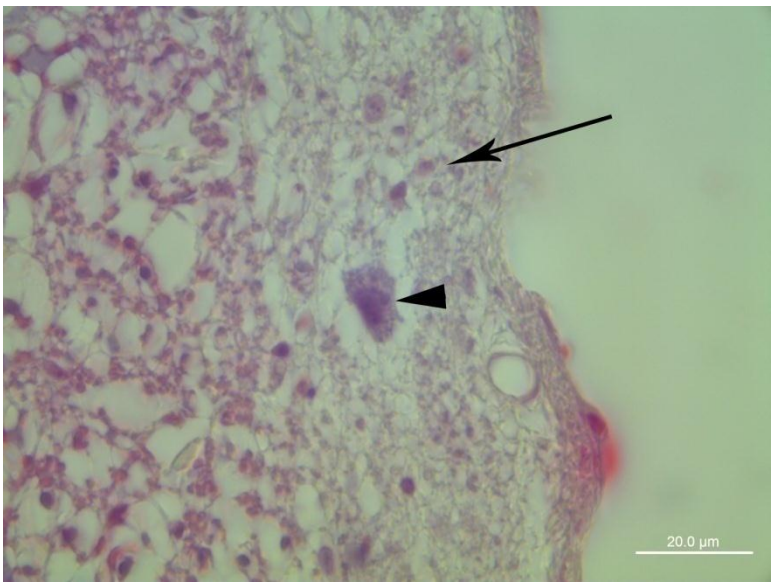
Şekil 3.16. Erkeklerde medulla spinalis'in farklı bölümlerinde tespit edilen toplam ependim hücre sayıları.

Ependim hücre sayılarının medulla spinalis'in farklı bölümlerinden alınan kesitlerdeki dağılımına bakıldığında dişilerde caudal bölgede en fazla, cervical dördüncü kesit düzeyinde ise en az olduğu (Mann-Whitney U test, $p<0,05$), erkek hayvanlarda ise medulla spinalis'in genelinde homojen bir dağılımın olduğu görüldü (Şekil 3.15, Şekil 3.16).

Ependim hücrelerinin medulla spinalis'in tamamındaki dağılımına bakıldığında birim kalınlıktaki (10 µm) sayılabilecek ependim hücre sayısının dişilerde 52, erkeklerde 60 adet olduğu görüldü. İki cinsiyet arasındaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edildi (Mann-Whitney U test, $p<0,02$).

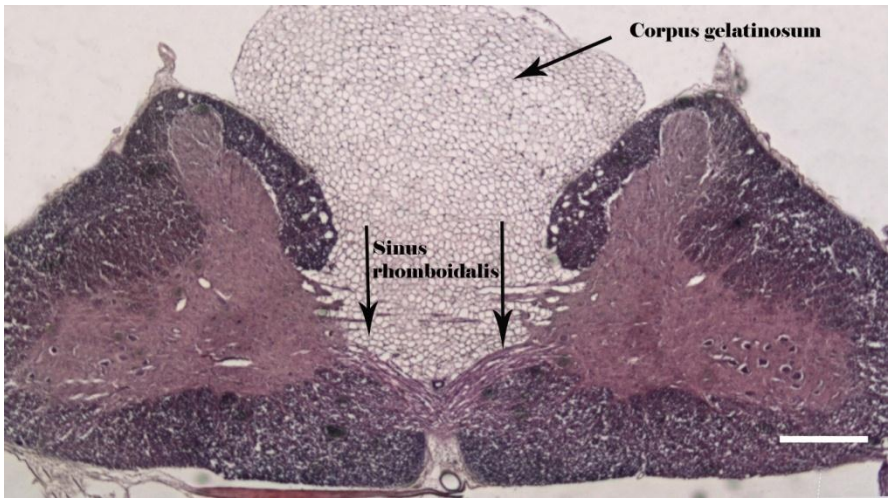
3.4. Histolojik Bulgular

Medulla spinalis'in lateral kenarına lokalize olan nucleus marginalis'e, cervical, thoracal, lumbosacral ve caudal bölümlerde rastlandı. Bu nucleus az sayıda nöron içeren ve daha çok glia hücrelerinden oluşan açık renkli bir bölge olarak gözlendi (Resim 3.4).

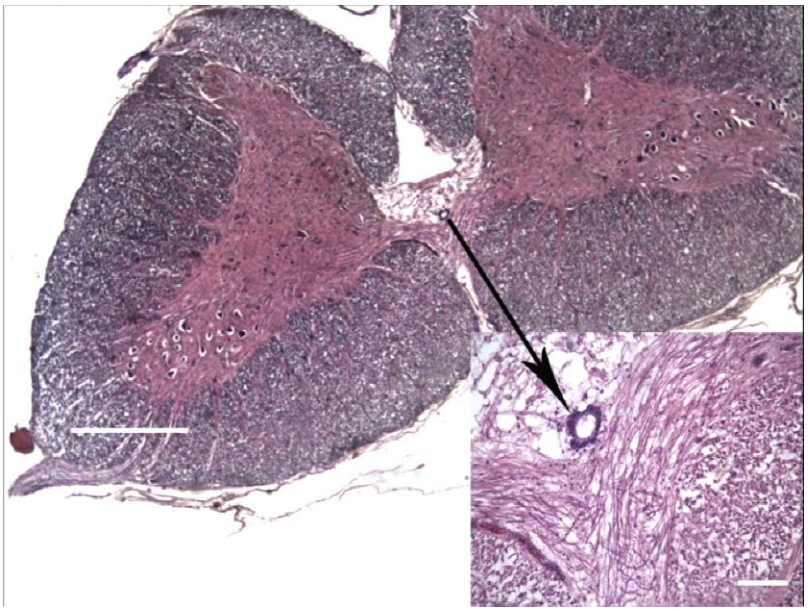


Resim 3.4. Pars cervicalis'in kesiti görülmektedir. Okbaşı; nöron, Ok; Nucleus marginalis, hematoksilen-eosin, büyütme çizgisi = 20 µm.

Intumescentia lumbosacralis'in histolojik kesitinden elde edilen görüntüde corpus gelaninosum'un sinus rhomboidalis'i doldurduğu (Resim 3.5) ve canalis centralis'in bu yapı içerisinde yer aldığı görüldü (Resim 3.6).



Resim 3.5. Intumescentia lumbosacralis'in pars lumbosacralis'ten görünümü. Hematoksilen-eosin, büyütme çizgisi = 500 µm.



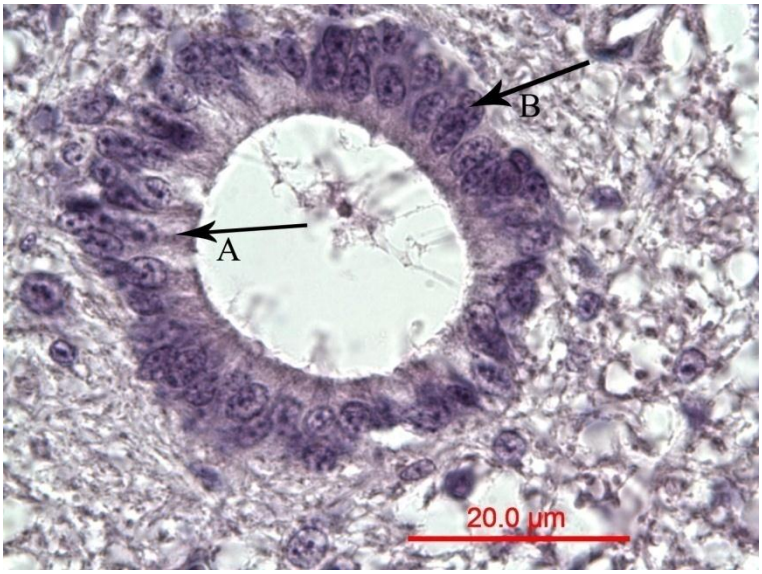
Resim 3.6. Pars lumbosacralis kesiti, hematoksilen-eosin, büyütme çizgisi = 500 µm, hematoksilen-eosin, büyütme çizgisi = 50 µm.

Lobus accessorius'un medula spinalis'in lumbal ve sacral segmentlerine ait spinal sinirlerin radix ventralis'inin dorsal'inde yer aldığı gözlendi. Söz konusu yapının modifiye glia hücrelerinden oluştuğu görüldü (Resim 3.7).



Resim 3.7. Pars lumbosacralis kesiti, hematoksilen-eosin.

Canalis centralis duvarının tüm segmentler boyunca ependim hücreleri ile döşeli olduğu görüldü. Kübik ya da basık prizmatik olan bu hücrelerin bazal membran üzerine oturduğu ve bu yapının çevresinde bol miktarda kan damarlarının olduğu tespit edildi. Ependim hücrelerinin apikal yüzlerinde mikrovilluslar ve kinosilyumların varlığı dikkati çekti (Resim 3.8).



Resim 3.8. Medulla spinalis kesiti. Canalis centralis ve ependim hücreleri görülmektedir. Hematoksilen-eosin; büyütme çizgisi = 20 µm. A: Ependim hücresi, B: Çekirdek.

4. TARTIŞMA

Bu araştırmada, dekalsifikasyon işlemi öncesi herhangi bir segmentasyon işlemi yapılmadan, columna vertebralis'ler cranium ile birlikte dekalsifikasyona tabi tutuldu. Begum ve ark (2010), medulla spinalis'i columna vertebralis ile birlikte segmentlerine ayırmışlar daha sonra ise dekalsifikasyon işlemine geçmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre Leghorn ırkı kanatlılarda dekalsifikasyon öncesi medulla spinalis'i segmentlere ayırmanın gerekli olmadığı ve bir bütün olarak dekalsifiye edilebileceği sonucuna varıldı.

Araştırıcılar (Taşbaş 1978, Whittow 2000) tarafından belirtildiği gibi medulla spinalis'in cauda equina'yı oluşturmadan pygostyle'e kadar devam ettiği ve burada sonlandığı tespit edildi.

Medulla spinalis'lerin uzunluk ölçümleri sonucunda ortalama dişilerde 31 cm, erkeklerde 33 cm olduğu tespit edildi (Resim 10). Taşbaş (1978), medulla spinalis boyunun tavuklarda 37,4 cm, horozlarda ise 40,3 cm olduğunu belirtmiştir. Hazıroğlu ve ark (2001) ise tavuklarda medulla spinalis uzunluğunun 32,4 cm olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar Taşbaş (1978) ile uyumlu olmamakla birlikte, Hazıroğlu ve ark (2001)'larının bulgularına yakındır. Tespit edilen farkın, her iki çalışmada da kullanılan materyalin farklı ırktan seçilmiş olmasından kaynaklanabileceği sonuçlarına varılmıştır.

Sunulan bu çalışmada, dişilerde medulla spinalis'in hacmi 1 249±151 mm^3, erkeklerde ise 1 712±113 mm^3 olarak ölçüldü (Çizelge 3.1). Taşbaş (1978), tavuklarda medulla spinalis'in hacmini 2 500 mm^3, erkeklerde ise 3 100 mm^3 olduğunu belirtmiştir. Taşbaş (1978) kullanılan materyalin ırkını belirtmemiş ve ölçümlerini Arşimet prensibi (suya daldırma yöntemi) ile gerçekleştirmiştir. Özellikle küçük biyolojik yapıların hacim ölçümlerinin Arşimet prensibi ile ölçülmesi kapillar etkinden dolayı tavsiye edilmemektedir (McCuan ve Treinen 2008). Bunun yerine dokudan ve dokunun şeklinden bağımsız tarafsız bir yöntem olan Cavalieri prensibi uygulanmalıdır. Mevcut çalışma ile diğer çalışmalar arasında ortaya çıkan farkın, ırk, tür ve metot farklılığından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Mevcut çalışmada medulla spinalis'in pars cervicalis'inin onbeş segmentten oluştuğu tespit edildi (Resim 3.1, Resim 3.2). Baumel (1975) ve Hazıroğlu ve ark

(2001) cervical bölümün onbeş segmentten oluştuğunu bildirmiştir. Yamamoto ve ark (2000) ise yapmış oldukları laminasyon sonucunda Leghorn ırkı kanatlıların civcivlerinde pars cervicalis'in oniki segmentten oluştuğunu ifade etmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar Baumel (1975) ve Hazıroğlu ve ark (2001)'nın bulguları ile uyumlu iken Yamamoto ve ark (2000)'larının bulguları ile örtüşmemektedir.

Mevcut çalışmada C_1 ve C_2 spinal sinirlerinin arasındaki mesafenin 3-4 mm olduğu tespit edildi. Baumel (1975) birinci ve ikinci cervical spinal sinirler arasındaki mesafenin 5 mm kadar olduğunu, Taşbaş (1978) ise bu mesafenin tavukta 1.3 cm horozda ise 1.5 cm olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışmadaki bulgular Baumel (1975) ile uyumlu iken Taşbaş (1978) ile örtüşmemektedir.

Mevcut çalışmada her iki cinsiyette intumescentia cervicalis'in C_{13}, C_{14}, C_{15}, T_1 ve T_2 tarafından oluşturulduğu belirlendi (Resim 3.1, Resim 3.2). Intumescentia cervicalis son üç cervical ve ilk iki thoracal segment tarafından oluşturulur (Baum 1966, Hazıroğlu ve ark 2001). Nickel (1977) ise son iki cervical ile T_1 veya T_2 bazen de T_3 tarafından oluşturulduğunu bildirmiştir. Yıldız ve Bahadır (1998) plexus brachialis'in yapısına C_{13}, C_{14}, C_{15} ve Th_1, Th_2 segmentlerine ait spinal sinirlerin katıldığını bildirmişlerdir. Çalışmadaki bulgular, Baum (1966), Yıldız ve Bahadır (1998) ile Hazıroğlu ve ark (2001)'nın bulguları ile örtüşmektedir.

Mevcut çalışmada intumescentia lumbosacralis'te corpus gelatinosum'un bulunduğu ve sinus rhomboidalis'in büyük bölümünü doldurduğu tespit edildi (Resim 3.3, Resim 3.5). Intumescentia lumbosacralis üzerinde baklava biçiminde yer alan bir genişleme, sinus rhomboidalis yer alır ve bu oluşum bezelye ya da nohut şeklinde bir yapı, corpus gelatinosum, tarafından doldurulur (Baumel 1975, Taşbaş 1978, Whittow 2000, Yamamoto ve ark 2000, Haziroglu ve ark 2001, Necker 2006). Mevcut çalışmadaki bulgular önceki çalışmaların bulguları ile uyumludur.

Medulla spinalis'den elde edilen kesitlerde en geniş bölümün intumescentia lumbosacralis olduğu tespit edildi (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.8, Şekil 3.9). Taşbaş (1978) medulla spinalis'in transversal kesitinde en geniş bölümün intumescentia lumbosacralis olduğunu bildirmiştir.

Medulla spinalis'in transversal kesitleri üzerinde yapılan hacim hesaplamaları sonucunda substantia alba'nın toplam hacminin dişilerde 1007±127 mm^3 erkeklerde

ise 1400.7± 94.1 mm^3 olduğu tespit edildi. Yine her iki cinsiyette substantia grisea'nın ölçümleri sonucu, dişilerde substantia grisea'nın hacminin 241.4±26.8 mm^3 erkeklerde ise 311.4±23.4 mm^3 olduğu tespit edildi. Canalis centralis'in Cavalieri prensibi uygulanarak yapılan hacim ölçümlerinde bu değer dişilerde 0,160±0.034 mm^3, erkeklerde ise 0,406±0.113 mm^3 olarak tespit edildi (Çizelge 3.1).

Substantia grisea'nın toplam hacminin medulla spinalis'in toplam hacmine oranlanması sonucunda dişilerde bu değerin %19,36±0,882, erkeklerde ise %18,19±0,706 olduğu görüldü (Çizelge 3.2). Dişilerde substantia grisea'nın hacim oranının pars caudalis ve pars lumbosacralis'de en yüksek olduğu, erkeklerde ise en fazla pars caudalis'te olmak üzere dişilerle uyumlu olduğu tespit edildi (Çizelge 3.2). Rahmanifar ve ark (2008) deve kuşunda yaptıkları araştırmada substantia grisea'nın en yoğun olduğu bölgenin pars lumbalis olduğunu tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmada dişi ve erkek hayvanlarda bu oranın en az olduğu bölüm pars cervicalis olarak belirlenirken, pars thoracalis'te bu değer nispeten daha yüksektir. Hazıroğlu ve ark (2001) substantia grisea'nın alanını substantia alba'nın alanına oranladıklarında buna benzer sonuçlara ulaşmışlardır. Rahmanifar ve ark (2008) ergin deve kuşunda pars thoracalis'in en az susbtantia grisea'ya sahip olduğunu pars cervicalis'in ise pars thoracalis'e göre nispeten daha fazla substantia grisea içerdiğini bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada elde edilen bulgular deve kuşundaki bulgulara benzerlik göstermektedir.

Optik parçalama sonucunda dişi hayvanlarda ependim hücre sayısının ortalama 1 957 200, erkeklerde ise 2 755 200 olduğu tespit edildi. Yapılan kaynak taramalarına göre mevcut çalışmadaki ependim hücresi sayımının Leghorn ırkı dişi ve erkek kanatlılarda daha önce yapılmadığı belirlendi. Bundan dolayı doğrudan ilgili kaynak bulunamadığından karşılaştırma yapılamadı. Bjugn ve ark (1989), dişi farelerde fiziksel disektör kullanarak yaptıkları bir çalışmada ependim hücrelerinin sayısını tüm medulla spinalis'te 163 000 olarak tespit etmişlerdir. Ancak ilgili çalışmada medulla spinalis hacmi Arşimet prensibi uygulanarak ölçülmüştür. Fiziksel disektör ile hücre sayımı, histolojik takip sonrası elde edilen kesitler kullanılarak yapılmıştır. Histolojik takip sırasında biyolojik dokularda meydana gelen büzüşme bilinen bir gerçektir (Dorph-Petersen ve ark 2001). Dolayısı ile histolojik takip öncesi yapılan hacim ölçümünün, doku büzüşmesi gibi faktörleri göz ardı ederek, birim hacimdeki hücre sayısının belirlenmesinde referans alınmasının

doğru bir yaklaşım olmayacağı düşünülmektedir. Bu problemden dolayı ilgili çalışmada bir çok düzeltme faktörü kullanılarak çıkan sonuçlar düzeltilmeye çalışılmıştır. Mevcut çalışmada ise ependim hücre sayımı hacimden bağımsız optik parçalama yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntem hacimden etkilenmediği için dokularda meydana gelebilecek herhangi bir büzüşmeden ya da genişlemeden etkilenmemektedir.

Leghorn ırkı kanatlılarda canalis centralis çevresinin, tüm segmentler boyunca ependim hücreleri ile döşeli olduğu görüldü (Resim 3.8). Kübik ya da basık prizmatik olan bu hücrelerin yuvarlak ya da oval çekirdeklere sahip olduğu, kesintisiz bir bazal membran üzerine oturduğu ve bu yapının çevresinde bol miktarda kan damarının olduğu tespit edildi. Ependim hücrelerinin apikal yüzlerinde mikrovilluslar ve kinosilyumların varlığı dikkati çekti. Bruni ve Reddy (1987) dişi farelerde canalis centralis'in etrafını döşeyen ependim hücrelerinin yuvarlak veya hafifçe oval ya da ince uzun çekirdeklere sahip hücreler olduğunu, aynı zamanda mikrovillus ve kinosilyum'unun bulunduğunu bildirmiştir.

Mevcut çalışmada canalis centralis'in pars lumbosacralis'te corpus gelatinosum içerisinde asılı seyrettiği comissura grisea dorsalis'in oldukça dar bir bölge olduğu, comissura grisea ventralis'in, canalis centralis'i ventral'den kucakladığı görüldü (Resim 3.6). Yamamoto ve ark (2000) ve Hazıroğlu ve ark (2001), pars lumbosacralis'te canalis centralis'in corpus gelatinosum içerisine asılı bir şekilde bulunduğunu belirtmişlerdir. Mevcut çalışmadaki bulgular ile diğer çalışmalardaki bulgular uyumludur.

Mevcut çalışmada nucleus marginalis ve lobus accessorius Leghorn ırkı kanatlılarda hem dişide hem de erkeklerde tüm medulla spinalis boyunca lateral veya lateroventral olarak izlendi.(Resim 3.4, Resim 3.7). Pars cervicalis ve pars caudalis'te gözlemlenen nucleus marginalis'lerin hücreden fakir ve soluk boyanan bir bölge olduğu tespit edildi. Bölgenin detaylı incelemesinde çok az nörona rastlanırken, hücre topluluğunun daha çok glia hücrelerinden oluştuğu tespit edildi. Pars lumbosacralis ve pars caudalis'te yer alan lobus accessorius'taki hücresel yapıların spinal ganglion'un hemen ventral'ine yerleştiği ve modifiye glia hücrelerinden oluştuğu görüldü. Huber (1936), medulla spinalis'in mikroskobik incelenmesi sonucunda pars cervicalis, pars thoracalis, pars lumbosacralis ve pars

caudalis'te medulla spinalis'in lateral kenarlarına sağlı sollu yerleşmiş nucleus marginalis'lerin yer aldığını bildirmiştir. Nucleus marginalis cervical, thoracal ve caudal bölgede birbirine benzer ve minor nucleus marginalis olarak isimlendirilir. Pars lumbosacralis'te yer alan nucleus marginalis ise farklılık gösterir ve medulla spinalis'in dış kenarından canalis vertebralis'in içine doğru bombe yapmış şekilde görülür. Bundan dolayı, major nucleus marginalis olarak isimlendirilir. Huber (1936)'e göre nucleus marginalis'te yer alan hücreler, cornu ventrale'de yer alan hücrelere benzemekle birlikte; onların yarı büyüklüğünde ve daha soluk boyanan bir görünüme sahiptir. Necker (1999) pars lumbosacralis'te yer alan major nucleus marginalis ya da lobus accessorius'un güvercinlerde yerde yürüme sırasında bir denge unsuru olarak görev yapabileceğini belirtmiştir. Necker (1999, 2006) lobus accessorius'un canalis vertebralis ile ilişkili olduğunu ve iç kulaktaki yapıya benzer bir şekilde liquor cerebrospinalis'te oluşan hareketi ve değişimleri algılayarak güvercine yürüyüş esnasında dengesini sağlamasına yardımcı olabileceğini bildirmiştir. Mevcut çalışmadaki histolojik bulgular önceki çalışmalarla uyumludur. Lobus accessorius, corpus gelatinosum ve nucleus marginalis'in fonksiyonu günümüzde hala netlik kazanmamıştır. Konu ile ilgili bazı hipotezler olmasına rağmen, günümüzde kesin bir sonuca ulaşılamamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde;

- Çalışma sonucunda elde edilen bulgular dişi ve erkek Leghorn'ların medulla spinalis'lerinin farklı özellikler gösterdiği ve medulla spinalis ile ilgili planlanan araştırmalarda, dişi ve erkek farkının gözetilmesinin gerekliliği,
- Dekalsifikasyon yönteminin Leghorn ırkı kanatlılarda medulla spinalis'i segmentlerine ayırmadan columna vertebralis'e bir bütün olarak uygulanabileceği,
- Stereolojik metodlar ile kanatlı hayvanlarda medulla spinalis'in substantia grisea'sı ve alba'sı ile canalis centralis'in hacimlerinin hesaplanabileceği, optik disektör kullanılarak optik parçalama yöntemi ile ependim hücrelerinin sayılarının güvenilir bir şekilde hesaplanabileceği, medulla spinalis'te yer alan diğer hücre gruplarına da disektör yönteminin uygulanabileceği, çıkan sonuçların dişi ve erkek hayvan ayrımında kullanılabileceği,
- Bu hesaplamalar sonucunda elde edilen bulguların merkezi sinir sistemi ile ilgili hastalıkların teşhis ve tedavisine katkı sağlayabileceği,
- Stereolojk metotlar ile yapılan alan ve hacim hesaplamalarının, kompüterize tomografi (CT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi görüntüleme sistemleri ile elde edilen görüntüler üzerinde uygulanabileceği,
- Üç boyutlu modelleme uygulamaları olarak bilinen metotların uzman kişilere bağımlı yapılabildiği ve yazılım desteğinin mutlak gerekliliği nedeni ile bu tip olumsuzluklara sahip olmayan stereolojik metotların medulla spinalis'te yapılan morfolojik çalışmalarda kullanılabileceği,
- Elde edilen bulgular ışığında kanatlı medulla spinalis'ine özgü olan nucleus marginalis'te yer alan nöron ve glia hücrelerinin kesin ayrımlarının yapılabilmesi için glial fibriler asidik protein (GFAP) gibi immünohistokimyasal yöntemleri de içeren daha detaylı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu,
- Yumuşak ve pelte kıvamında olan corpus gelatinosum'un özellikle kimyasal yapısının tespit edilebilmesi amacıyla, glikojen içeriğinin belirlenmesi için Periyodik Asit Schiff (PAS) reaksiyonu, yağ içeriğinin belirlenmesi için Sudan Black, Oil Red O gibi boyama metotlarının kullanıldığı detaylı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu,

- Lobus accessorius (major nucleus marginalis)'un spinal ganglion'lara yakın yerleşimi nedeni ile doku karakterinin tam olarak belirlenebilmesi ve periferik sinir sistemine ait bir yapı olup olmadığının anlaşılabilmesi için, farklı boyaların özellikle bağ doku ipliklerinde kollajeni iyi boyayan üçlü boyamanın yapılması, ayrıca dokunun içerdiği hücrelerin nöron-glia ayrımlarının yapılabilmesi amacıyla da immünohistokimyasal yöntemleri de içeren daha detaylı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu,
- Çalışmada kullanılan örnekleme stratejisinin tüm medulla spinalis ile ilgili hacim, sayı gibi parametrelerin hesaplanmasında yeterli olduğu ancak segment bazında verilecek bilgiler için yetersiz kalabileceği, özellikle medulla spinalis'in segmentlerinde yapılacak stereolojik çalışmalarda her bir segmente uygulanacak örnekleme stratejisinin ayrıca belirlenmesinin gerekli olduğu ve,
- Özellikle kanatlı hayvanlarda eski metotlar ile değerlendirilen segment bazındaki çalışmaların stereolojik metotlar kullanılarak tekrar edilmesinin faydalı olabileceği sonuçlarına varılmıştır.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Leghorn Irkı Kanatlılarda Medulla Spinalis'in Stereolojik Metodlar ile İncelenmesi

Durmuş Bolat

Anatomi (Vet.) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA 2011

Bu çalışma, Leghorn ırkı kanatlılarda medulla spinalis'i oluşturan substantia alba, substantia grisea, canalis centralis'in hacimleri ile ependim hücre sayısının stereolojik metodlar kullanılarak araştırılması amacı ile yapılmıştır. Bu amaçla her iki cinsiyetten (6 dişi, 6 erkek) toplam 12 adet ergin (40 haftalık) Leghorn ırkı kanatlı kullanıldı. Genel anestezi sonucunda kadavra haline getirilen hayvanlara %6'lık Triklor asetik asit ile 5 gün boyunca dekalsifikasyon işlemi uygulandı. Bu işlem sonucunda medulla spinalis'ler diseke edilerek uzunlukları ölçüldü. Elde edilen medulla spinalisler makroskobik ve mikroskobik örnekleme yapılarak dişilerden 10 erkeklerden 11 adet 10 µm kalınlığında kesit alındı ve hematoksilen-eosin ile boyandı. Bu kesitler üzerinde, stereo-investigator yardımı ile alan, hacim, çap ölçümleri ve ependim hücre sayımı gerçekleştirildi. Hacim değerleri sırası ile dişi ve erkek hayvanlarda medulla spinalis için, 1249 mm^3, 1712 mm^3, substantia alba için, 1007 mm^3, 1400 mm^3, substantia grisea için, 241 mm^3, 311 mm^3, canalis centralis için, 0,160 mm^3, 0,406 mm^3 olarak tespit edildi. Ependim hücre sayıları dişiler için 1 957 200, erkek hayvanlar için 2 755 200 olarak bulundu. Birim kesitte dişi hayvanlarda sayılabilecek ependim hücre sayısı 50 iken erkeklerde bu değerin 60 olduğu görüldü. Araştırma sonucunda erkek hayvanların dişilere göre daha uzun ve hacimsel olarak daha büyük medulla spinalis'e sahip oldukları tespit edildi. Dişilerde canalis centralis tüm medulla spinalis boyunca yuvarlak bir görünüme sahipken erkeklerde canalis centralis'in dorsoventral basık olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, dişi ve erkek medulla spinalis'inin farklı özellikler gösterdiği, bundan dolayı Leghorn ırkı kanatlılar üzerinde yapılması planlanan çalışmalarda, dişi ve erkek farkının gözetilmesinin gerekebileceği ve sonuçların medulla spinalis üzerinde ilerde yapılacak anatomik, histolojik ve patolojik çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Medulla spinalis; Leghorn; Cavalieri prensibi; Optik parçalama; Stereoloji.

7. SUMMARY

The Investigation of the Spinal Cord in Leghorn by Using Stereological Methods

The aim of this study was to determine the volume of spinal cord, grey matter, white matter, central canal and the number of ependymal cells as well by using stereological methods in Leghorn. 12 (40 weeks old) Leghorns (6 hens, 6 roosters) were used for the research. Cadavers were dissected after general anesthesia and decalcified with 6% Trichloroacetic acid over 5 days. Spinal cords were dissected and the lengths of the cords were measured, respectively. 10 sections at 10 μm thick taken from chickens and 11 sections from cocks were stained with haematoxylene-eosine after macroscopically and microscopically systematic sampling was performed. The area, volume, thickness and the number of the ependymal cells of the spinal cords were figured by using stereo-investigator on these sections. The volumes of spinal cords were introduced 1249 mm^3 and 1712 mm^3; 1007 mm^3 and 1400 mm^3 for white matter; 241 mm^3 and 311 mm^3 for grey matter and, 0,160 mm^3 and 0,406 mm^3 for central canal about female and male animals, respectively. The number of ependymal cells were counted 1 957 200 in chickens and 2 755 200 in cocks. The countable number of ependymal cells of spinal cords on each cross-section in chickens was revealed 50 and 60 for cocks. As a result this study demonstrated cocks had longer and higher volume of spinal cords than that of chickens. Furthermore, the shape of the central canal in chickens was detected as round through the spinal cord despite it was more flattened dorsoventrally in cocks.

Consequently, it is important to be considered the differences between female and male Lenghorns when studies are planned which will conduct on this breed because of the spinal cords contrast. The results of the study may be beneficial for the anatomical, pathological and histological researches that will be planned on the spinal cord.

Key Words: Spinal cord; Leghorn; Cavalieri principle; Optical fractionator; Stereology.

8. KAYNAKLAR

1.Austic R, Nesheim M. Poultry production. 13th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1990;81-84.

2.Baddeley AJ. Stereology In: Spatial statistics and digital image analysis. National Research Council 1991:181-216.

3.Balcioglu H, Uyanikgil Y, Yuruker S, Tuna H, Karacayli U. Volumetric Assessment of Lateral Pterygoid Muscle in Unilateral Chewing: A Stereologic Study. J Craniofac Surg. 2009;20(5):1364.

4.Baum E. Evcil hayvanların komparatif nörolojisi. A Ü Vet Fak Yayınları 1966:203-289.

5. Baumel JJ. Aves Nervous System. In: Getty R, editor. Sisson and Grossman's The anatomy of the domestic animals.Vol. 2. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1975. p. 2019-2024.

6. Baumel JJ, King A, Breazile J, Evans H, Berge J. Handbook of avian anatomy: Nomina Anatomica Avium. Nuttall Ornithological Club, Cambridge, Mass.; 1993.

7.Begum F, Zhu W, Namaka MP, Frost EE. A novel decalcification method for adult rodent bone for histological analysis of peripheral-central nervous system connections. J Neurosci Methods 2010;187(1):59-66.

8.Bellairs R, Osmond M. The atlas of chick development. Academic Press; 2005.

9.Bilgic S, Sahin B, Sonmez OF, Odaci E, Colakoglu S, Kaplan S, Ergur H. A new approach for the estimation of intervertebral disc volume using the Cavalieri principle and computed tomography images. Clin Neurol Neurosurg 2005;107(4):282-288.

10.Bjugn R, Bøe R, Haugland H. A stereological study of the ependyma of the mouse spinal cord. With a comparative note on the choroid plexus ependyma. J Anat 1989;166:171.

11.Bjugn R, Gundersen HJ. 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 1993;328(3):406-414.

12.Braendgaard H, Evans S, Howard C, Gundersen H. The total number of neurons in the human neocortex unbiasedly estimated using optical disectors. J Microsc 1990;157(Pt 3):285-304.

13.Bruni J, Reddy K. Ependyma of the central canal of the rat spinal cord: a light and transmission electron microscopic study. J Anat 1987;152:55.

14.Canan S, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S. Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanilan bir stereolojik yöntem: cavalieri prensibi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2002;22(1 Suppl 1):7-14.

15.Cowen S. Wild Birds in : Exotics and wildlife: a manual of veterinary nursing care. London, UK: Butterworth-Heinemann; 2004;149-163.

16.Crawford R. Poultry breeding and genetics. Elsevier Science Health Science div; 1990;3-4.

17.Cruz-Orive LM. Systematic sampling in stereology. Bulletin of the international statistical institute 1993:451-468.

18.Cruz-Orive LM. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. J Microsc 1999;193(Pt 3):182-198.

19.Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. J Microsc 2001;204(Pt 3):232-246.

20.Dursun N. Evcil kuşların anatomisi. Ankara: Medisan Yayınevi; 2002;97-98.

21.Ekicioğlu G, Ozkan N, Şalvaazar E. Hematoksilen-Eozin (hematoxylen-eosin) (H&E). Aegean Pathol J 2005;2:58-61.

22.Ensminger M. Poultry science Second Edition ed. Danville, Illinois: The Interstate Printers and Publishers; 1980;250-251.

23.Feduccia A. Aves Osteology. In: Getty R, editor. Sisson and Grossman's The anatomy of the domestic animals.Vol. 2. Philadelphia: W.B. Sounders Company; 1975. p. 1790-1801.

24.Garcia-Finana M, Cruz-Orive LM, Mackay CE, Pakkenberg B, Roberts N. Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. Neuroimage 2003;18(2):505-516.

25.Glaser E, Wilson P. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. J Microsc 1998;192(2):163-171.

26.Gundersen HJ. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. J Microsc 1977;111:219-223.

27.Gundersen HJ. 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. J Microsc 1986;143(Pt 1):3-45.

28. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J Microsc 1987;147(Pt 3):229-263.

29. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 1988;96(10):857-881.

30.Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. J Microsc 1999;193(Pt 3):199-211.

31.Haziroglu RM, Orhan IO, Yildiz D, Gultiken ME. Morphology of the spinal cord in the chicken, duck and pigeon. Turk J Vet Anim Sci 2001;25(6):913-920.

32.Howard CV, Reed M. Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy. Madison Avenue, New York, USA. Taylor & Francis; 2005.

33.Huber J. Nerve roots and nuclear groups in the spinal cord of the pigeon. J Comp Neurol 1936;65(1):43-91.

34.James NT. Morphometry and stereology in biology and medicine using confocal microscopy. The institution of Electrical Engineers 2004:1-4.

35.Köktürk S, Ceylan S, Yardimoglu M, Dalçik H, Gonca S. Farklı tespit solusyonlarıyla perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerinin değişik dokularda ışık mikroskobik düzeyde karşılaştırılması. Genel Tip Derg 1999;4:135-139.

36.Lairmore M, Spraker T, Jones R. Two cases of tuberculosis in raptors in Colorado. J Wildlife Dis 1985;21(1):54.

37.Mayhew TM. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. Exp Physiol 1991;76(5):639-665.

38. Mayhew TM, Simpson RA. Quantitative evidence for the spatial dispersal of trophoblast nuclei in human placental villi during gestation. Placenta 1994;15(8):837-844.

39. Mayhew TM, Gundersen HJ. 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. J Anat 1996;188 (Pt 1):1-15.

40.McCuan J, Treinen R. Capillarity and Archimedes' principle of floatation. Preprint 2008.

41.Michel RP, Cruz-Orive LM. Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. J Microsc 1988;150(Pt 2):117-136.

42.Mouton PR. Principles and practices of unbiased stereology. John Hopkins University Press 2002;5-6.

43.Necker R. Specializations in the lumbosacral spinal cord of birds: morphological and behavioural evidence for a sense of equilibrium. Eur J Morphol 1999;37(2):211-214.

44.Necker R. Histological and immunocytochemical characterization of neurons located in the white matter of the spinal cord of the pigeon. J Chem Neuroanat 2004;27(2):109-117.

45.Necker R. Are paragriseal cells in the avian lumbosacral spinal cord displaced ventral spinocerebellar tract neurons? Neurosci Lett 2005;382(1-2):56-60.

46.Necker R. Specializations in the lumbosacral vertebral canal and spinal cord of birds: evidence of a function as a sense organ which is involved in the control of walking. J Comp Physiol A 2006;192(5):439-448.

47. Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Siller W, Wight P. Anatomy of the domestic birds. Parey New york: Springer-Verlag, Berlin; 1977.

48. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Bewegungsapparat. 4th ed. Parey; 2004.

49.Noyan A. Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji. Meteksan Yayınları, Ankara 1993;209-218.

50.Ohm TG, Busch C, Bohl J. Unbiased estimation of neuronal numbers in the human nucleus coeruleus during aging. Neurobiol Aging 1997;18(4):393-399.

51.Pakkenberg B. Total nerve cell number in neocortex in chronic schizophrenics and controls estimated using optical disectors. Biol Psychiat 1993;34(11):768-772.

52.Pakkenberg B, Gundersen HJ. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. J Comp Neurol 1997;384(2):312-320.

53.Radojicic M, Nistor G, Keirstead H. Ascending central canal dilation and progressive ependymal disruption in a contusion model of rodent chronic spinal cord injury. BMC Neurol 2007;7(1):30.

54.Rahmanifar F, Mansouri S, Ghazi S. Histomorphometric study of the spinal cord segments in the chick and adult male ostrich (Struthio camelus). Iranian J Vet Res (IJVR) 2008.

55.Russ J, Dehoff R. Practical stereology. New York, Plenum Pub Corp; 2000.

56.Sahin B, Emirzeoglu M, Uzun A, Incesu L, Bek Y, Bilgic S, Kaplan S. Unbiased estimation of the liver volume by the Cavalieri principle using magnetic resonance images. Eur J Radiol 2003;47(2):164-170.

57.Sasimowski E. Animal breeding and production. An outline. Warszawa: PWN Polish Scientific Publishers; 1987;331-332.

58.Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience 2005;130(4):813-831.

59.Sherman D. Tending animals in the global village: a guide to international veterinary medicine. Wiley-Blackwell; 2002;46-47.

60.Slomianka L, West MJ. Estimators of the precision of stereological estimates: An example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. Neuroscience 2005;136(3):757-767.

61.Sonmez O, Odaci E, Bas O, Colakoglu S, Sahin B, Bilgic S, Kaplan S. A stereological study of MRI and the Cavalieri principle combined for diagnosis and monitoring of brain tumor volume. J Clin Neurosci 2010.

62.Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. J Microsc 1984;134(Pt 2):127-136.

63.Taşbaş M. Evcil kanatlılardan tavuk-horoz (Gallus domesticus) ve hindi'nin (Meleagris gallopavo) medulla spinalis ve zarları (meninges) üzerinde karşılaştırmalı makro-anatomik ve subgros araştırmalar. Ank Univ Vet Fak Derg 1978:731-746.

64.Tecirlioğlu S. Komparatif veteriner anatomi, sinir sistemi. Ankara Üniversitesi Anatomi Ders Notları 1992:9-10.

65.Thomas N, Hunter D, Atkinson C. Infectious diseases of wild birds. Wiley-Blackwell; 2007;293-294.

66.Turgut M, Turkkanitunc A, Aslan H, Yazici A, Kaplan S. Effect of pinealectomy on the morphology of the chick cervical spinal cord: A stereological and histopathological study. Brain Res 2007;1129:166-173.

67. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in thesubdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. Anat Rec 1991;231(4):482-497.

68. West MJ. New stereological methods for counting neurons. Neurobiol Aging 1993;14(4):275-285.

69.Whittow G. Sturkie's avian physiology. Academic Press, San Diego; 2000.

70.Yamamoto M, Kitagawa H, Imagawa T, Uehara M. The organization of the spinocerebellar tract neurons in the chicken. Brain Res Bull 2000;52(6):537-546.

71.Yıldız H, Bahadır A. Tavuk, yerli ördek ve güvercinlerde plexus brachialis'in oluşumu ve plexus oluşumuna katılan temel rami ventralis'teki sinir fasciculus'larının sayı, çap, yerleşim ve dağılımlarının makroanatomik ve subgros incelenmesi. J Vet Med Uludağ 1998;17:65-78.

72.Yılmaz F, Ozer H. Hindi embriyosunda deneysel avian encephalomyelitis (ae) uzerinde morfolojik incelemeler. Turk J Vet Anim Sci 1999;23:205-213.

73.Yücel F, Ünal N, Erçakır M, Güven G. Determination of age-related volume changes in rat brain by Cavalieri's Method. Erciyes Med J 2003;25(4):179-185.

9. EKLER

EK. A: Etik kurul onayı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ
ETİK KURUL (SÜVFEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	12.01.2011	Toplantı Sayısı	2011/01	Karar Sayısı	2011/002

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ tarafından sunulan ve 2009/7 sayılı SÜVFEK kararı ile "yasal deney hayvanı üreticisi ya da tedarikçisinden temin edilen belgenin kurula sunulması" koşuluyla etik kurul onayı verilmiş olan, doktora öğrencisi Durmuş Bolat'ın "Leghorn Yumurtacı Parent ve Ross (208) Broiler Parentlerde Medulla Spinalis'in Cervical Bölümü Üzerinde Morfometrik Araştırmalar" isimli tez projesinde değişiklik önerisi değerlendirilmiştir.

Projede 8 dişi ve 8 erkek Leghorn, 8 dişi ve 8 erkek Ross (308) broiler parent kullanılacağı bildirilmiş olmasına rağmen, 6 dişi, 6 erkek olmak üzere 12 adet Leghorn kullanıldığı, yasal üreticiden 20 adet teslim alınan Leghornlardan 8 (4 dişi+4 erkek) adedinin ön çalışmada kullanıldığı, broylerlerin araştırmadan çıkarıldığı, tezin adının, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 7.7.2010 tarih ve 4/2 sayılı kararı ile **"Leghorn Irkı Kanatlılarda Medulla Spinalis'in Stereolojik Metotlar ile İncelenmesi"** şeklinde değiştirildiği, yasal üreticiden alınan yazının da eklendiği görülmüştür.

Sonuç olarak;

Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin hayvan kullanım etiği açısından **"Uygun olduğuna"** oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet MADEN Başkan	Prof. Dr. Enver YAZAR Başkan Yardımcısı
Projede yer aldığı için katılmadı SÜVFEK Md.7.5 Prof. Dr. Sadettin TIPIRDAMAZ Üye	Gürkan HIZLI Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi

Prof. Dr. Fatma İNAL Raportör Üye	Doç. Dr. Uğur USLU Üye	Hüseyin AYDIN Sivil Üye

10. ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. 1998 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden mezun oldu. Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'na 2001 yılında Araştırma Görevlisi olarak atandı. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Anatomi alanında 2006 yılı güz döneminde doktora eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.