

Ergin Atlarda III, IV ve VI. Çift Kranial Sinirlerin Transversal Kesit Alanları ve Myelinli Akson Sayıları

Durmuş BOLAT ¹  Sadullah BAHAR ² Aytül KÜRÜM ³ Murat Erdem GÜLTİKEN ⁴

¹ Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, TR-71451 Kırıkkale - TÜRKİYE

² Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, TR-42100 Konya - TÜRKİYE

³ Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TR-71451 Kırıkkale - TÜRKİYE

⁴ Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, TR-55270 Samsun - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-7919

Özet

Ekstrinsik göz kaslarının motor uyarımını sağlayan n. oculomotorius, n. trochlearis ve n. abducens'in transversal kesit alanları ve içerdiği myelinli akson sayılarının belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada 3 dişi, 3 erkek yetişkin at kullanıldı. Doku örnekleri sinirlerin cavum subarachnoideale'de seyreden bölümlerinden alındı. Parafin blokları hazırlanan dokular 4 µm kalınlığında transversal olarak rotary mikrotom ile kesildi, Masson trikrom ile boyandı. Sinirlerin kesit alanları Cavalieri metodu ile içerdikleri myelinli akson sayıları ise parçalama yöntemi ile araştırıldı. Sağ ve sol göze ait sinirlerin kesit alanları ve içerdikleri myelinli akson sayıları arasında istatistiksel bir fark gözlenmediğinden sinirlerin akson sayıları taraf ayrıtılmaksızın tek bir veri olarak (median) değerlendirildi. Sinir kesitlerinin alanları n. oculomotorius, n. trochlearis ve n. abducens için sırası ile 2.647 mm², 0.511 mm² ve 1.092 mm² olarak, myelinli akson sayıları ise sırası ile 13.523, 2.034 ve 4.151 adet olarak tespit edildi. Atlarda III, IV ve VI. çift kranial sinirlerin transversal kesit alanlarının ve myelinli akson sayılarının belirlendiği çalışma sonuçlarının bu alandaki bilgi birikimine katkı sağlayacağı ve gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacağı sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: At, Cavalieri metodu, Kranial sinirler, Myelinli akson sayısı, Parçalama

The Area of Cross Sections and the Number of Myelinated Axons of Cranial Nerves III, IV and VI of Adult Horse

Summary

It was aimed to determine the number of myelinated axons and the area of cross sections of oculomotor, trochlear and abducens nerves providing motor innervation of extrinsic muscles of the eye. The study included 3 male and 3 female adult horses. Tissue samples were taken from the part of nerve being in subarachnoid space. Paraffin blocks of tissues were prepared and cut with a rotary microtome transversely at a thickness of 4 µm and sections were stained with Masson's trichrome. The area of cross sections was determined with Cavalieri's method and the number of myelinated axons was calculated by fractionator technique. There were no statistically significance of cross sectional areas and the number of myelinated axons of the right and the left sides, thus the data belonging to both sides were accepted as a single data (median). The areas of cross sections of oculomotor, trochlear and abducens nerves were calculated to be 2.647 mm², 0.511 mm² and 1.092 mm² and the number of myelinated axons 13.523, 2.034 and 4.151 respectively. The results of the study performed to determine the area of cross sections and the number of myelinated axons of III., IV. and VI. cranial nerves of the horse will contribute to the knowledge of this area and shed light on the studies to be conducted in the future.

Keywords: Horse, Cavalieri's method, Cranial nerves, Number of myelinated axons, Fractionator

GİRİŞ

Göz kaslarının motor uyarımı somatik efferent sınıfında yer alan nervus oculomotorius, nervus abducens ve nervus trochlearis tarafından sağlanır. Bu sinirler genel fonksiyon, filogenetik ve köken açısından birbirlerine benzer yapıdadırlar. Nervus oculomotorius diğerlerinden farklı olarak

visseral efferent (parasempatik) liflere sahiptir ¹. N. oculomotorius somatik efferent lifleri ile gözün pozisyonunda, parasempatik lifler aracılığı ile de gözün akomodasyonunda rol almaktadır ². Söz konusu sinirlerde hem myelinli hem de myelinsiz sinir lifleri bulunmaktadır ³.



İletişim (Correspondence)



+90 318 3573328



bolatdurmus@yahoo.com

Göz kaslarının innervasyonunu sağlayan sinirlerde akson sayıları rat¹, kedi⁴, köpek⁵ ve koyunda³ yapılan histomorfometrik araştırmalarla ortaya konmuştur. Ancak yapılan kaynak taramalarında atlarda bu sinirlerin morfometrik özellikleriyle ilgili bir bilgiye ulaşılamamıştır.

Stereolojik metotlar içerisinde yer alan parçalama yöntemi ilk defa Mayhew⁶ tarafından sinir dokusunun morfometrisinin değerlendirilmesinde ve sinir liflerinin sayılmasında kullanılmıştır. Bu yöntem gelişen bilgisayar yazılımlarının desteği ile günümüzde çok daha kolay kullanılabilir hale gelmiştir. Bilgisayar destekli parçalama yöntemi sinir liflerinin sayısı, akson ve myelin kalınlıkları ve sinir liflerinin sinir kesiti içerisindeki dağılımının tespitinde etkili ve pratik bir yöntem olarak kullanılmaktadır⁷.

Bu araştırma ile ergin atlarda göz kaslarının sinirsel uyarımına katılan n. oculomotorius, n. trochlearis ve n. abducens'in transversal kesit alanları ve myelinli akson sayılarının stereolojik yöntemlerle belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Araştırma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Binicilik Tesisinden çeşitli ortopedik rahatsızlıkları gerekmesiyle ötenazisine karar verilen ve bu işlemi gerçekleştirmek ve kadavra hazırlanmak üzere Anatomi Anabilim Dalına tahsis edilen 6 attan (1 adet Pony 15 yaşlı 230 kg dişi, 2 adet arap 13 ve 5 yaşlı 300-340 kg dişi, 1 adet Belçika 15 yaşlı 480 kg erkek, 2 adet İngiliz 10 ve 12 yaşlı 420-450 kg erkek) temin edilen materyaller üzerinde gerçekleştirildi. Çalışma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (SÜVFEK, 2011/100).

Metot

- Dokuların Tespiti ve Hazırlanması

Hayvanlar %10'luk kloral hidrat (80 mg/kg, IV)⁸ ile genel anesteziye alındıktan sonra a. carotis communis'e yerleştirilen kanül vasıtası ile kanı boşaltılarak ötenazi gerçekleştirildi. Aynı kanül vasıtası ile fizyolojik tuzlu su verilerek damarların temizlenmesi sağlandı. Bu işlemi takiben her bir hayvan için hazırlanan %10'luk yaklaşık 40 L formalin solüsyonu usulüne uygun bir şekilde a. carotis communis'teki kanül aracılığı ile hayvanlara verilerek oda ısısında tespiti sağlandı. Tespit işlemi izleyen yedinci günde hayvanların başları atlanto-occipital ekleminden ayrıldı ve 15 gün süresince %10 formalin solüsyonu içeren tanklarda bekletildi. Bu süre sonunda beyinler dura mater korunarak cranium'dan uzaklaştırıldı. Bu işlemi takiben ventral yaklaşımla dura mater açıldı ve III, IV ve VI. çift kranial sinirler dura mater'e girdikleri bölgeden ensize edilerek sinirlerin cavum subarachnoideale'de seyreden bölümlerinin beyin üzerinde kalması sağlandı. Daha sonra sağ ve sol sinir çiftleri beyni terk ettikleri yerden kesilerek alındı. Söz ko-

nusu sinir çiftlerinin dura mater'e girmeden önceki 10 mm'lik bölümleri alınarak histolojik takipleri yapıldı. Bu işlemi takiben parafin blokları hazırlanan dokulardan, sinirin uzun eksenine dik olacak şekilde rotary mikrotom (Leica RM2125 RT) kullanılarak 4 µm kalınlığında kesitler alındı ve kesitler Crossman'ın modifiye üçlü boyası (triple) ve May Grunwald Giemsa ile boyandı.

- Sinir Kesitlerinin Alanı

Sinir kesitlerinin alanları Stereo Investigator (ver. 10, MicroBrightField Inc., VT, USA) yazılımının cavalieri estimator komutu kullanılarak tespit edildi. İki nokta arası 100 µm olan noktalardan oluşan noktalı alan ölçüm cetveli rastgele olarak 20x objektif altında sinir kesitleri üzerine atıldı (Şekil 1). Sinirlerin transversal kesit yüzey alanları $A = a/p \times \Sigma p$ formülü ile hesaplandı. Bu formülde A ilgili sinirin transversal kesit alanını, a/p (10.000 µm²) tarafsız sayım çerçevesinde yer alan bir noktanın alanını, Σp ise kesit yüzeyine düşen toplam nokta sayısını ifade etmektedir⁹.

- Parçalama İçin Sistemik Rastgele Örnekleme

Her bir kranial sinirde yer alan akson sayılarını belirlemek için parçalama sondası ve tarafsız sayım çerçevesi kullanıldı¹⁰. Yapılan ön çalışma ile akson sayımında kullanılacak ızgara büyüklüğü ve tarafsız sayım çerçevesinin alanı güvenilir hata katsayısı (CE) değerine uygun olarak belirlendi. Örneklenen alanlardan tarafsız olarak akson sayıları hesaplandı. Hata katsayısı değeri $CE = 1/\sqrt{Q} \times (1-sf)$ formülü ile hesaplandı ve CE değerinin %5'in altında olmasına dikkat edildi. Bu formülde Q sayılan tanecığı, sf ise örnekleme oranını ifade etmektedir⁷. ızgara alanı uygun CE değerine ulaşmak için her bir sinir analizinde ayrı olarak belirlendi. Tarafsız sayım çerçevesinin alanı ise tüm sinirler için 20 µm x 20 µm = 400 µm² olarak belirlendi. Kranial sinirlerde örneklenen alanlarda 300-500 arasında akson 100 x apo immersiyon objektif (NA 1.4) altında sayıldı^{8,11} (Şekil 2).

İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda sağ ve sol göze ait sinir kesit alanlarının karşılaştırılmasında Two Sample T test, myelinli akson sayılarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U test kullanıldı (SPSS inc. ver. 17). Alan sonuçları mean±SE, myelinli akson sayıları ise median şeklinde tablolarda sunuldu.

Terminolojik ifadelerin yazımında Nomina Anatomica Veterinaria kullanıldı¹².

BULGULAR

Morfometri

Araştırma sonucunda n. oculomotorius, n. trochlearis ve n. abducens'in kesit yüzey alanları, myelinli akson sayıları (median), hata katsayısı değerleri (CE) ve CV değerleri Tablo 1'de verildi. Sinir kesit yüzey alanları ve myelinli akson sayıları yönünden sağ ve sol tarafa ait sinirler arasında istatistiki

fark gözlenmedi ($P>0.05$). Sinir kesitlerinin alanları n. oculomotorius, n. trochlearis ve n. abducens için sırası ile 2.647 mm^2 , 0.511 mm^2 ve 1.092 mm^2 olarak tespit edildi (Tablo 1). Ergin atlarda n. oculomotorius'un 13.523, n. trochlearis'in 2.034 ve n. abducens'in 4.151 myelinli akson içerdiği belirlendi (Tablo 1, 2).

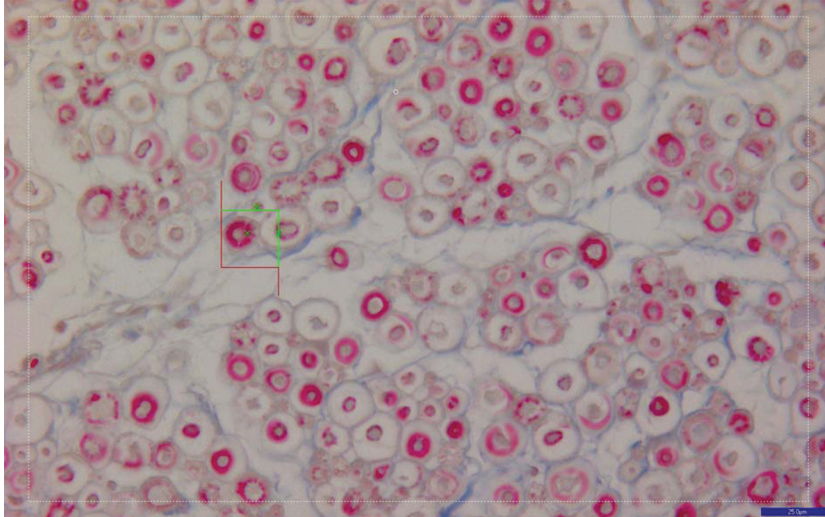
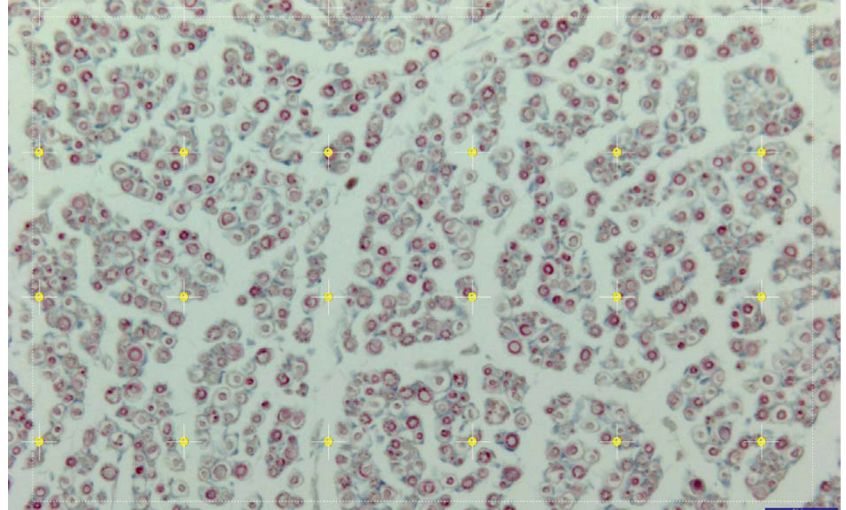
Histoloji

Enine kesitlerde her üç sinirin morfolojisinin oval olduğu

gözlendi (Şekil 3). N. oculomotorius'ta çok kalın olmayan epineurium'dan ayrılan bağ doku kollarının sinirin merkezine kadar devam ederek buradaki arter ve venin adventisyasına karıştığı gözlemlendi. Her üç sinirde de, her bir akson ve çevresindeki myelin nörokeratin rahatlıkla ayırt edilebildi. Yapılan incelemelerde üç sinir arasında sadece n. oculomotorius'un merkezinde damar bulunduğu gözlemlendi. N. trochlearis'te epineurium'un oldukça ince olduğu damarların ise bu sinirin daha çok çevresine yerleştiği göz-

Şekil 1. Noktalı alan ölçüm cetveli yardımı ile sinir kesit alanının hesaplanması, iki nokta arası $100 \mu\text{m}$, Triple, bar = $50 \mu\text{m}$

Fig 1. Calculation of cross sectional area of nerve with the help of point counting grid, distance between two points is $100 \mu\text{m}$, Triple, bar = $50 \mu\text{m}$



Şekil 2. Tarafsız sayım çerçevesi kullanılarak sinir kesiti üzerinde yer alan myelinli akson sayısının parçalama sondası ile hesaplanması. Triple, bar = $25 \mu\text{m}$

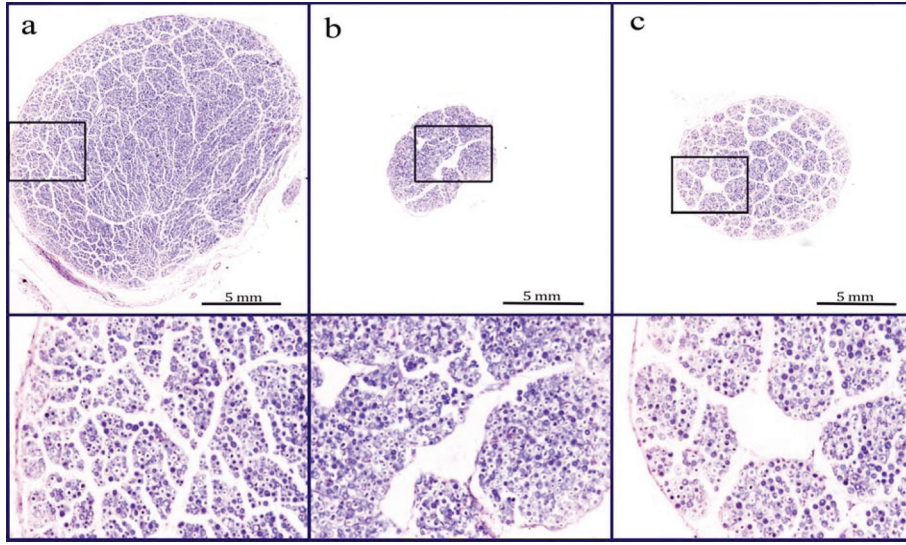
Fig 2. Calculation of the number of myelinated axons with fractionator probe using unbiased counting frame on cross section of nerve. Triple, bar = $25 \mu\text{m}$

Tablo 1. Sağ ve sol III, IV. ve VI. çift kranial sinirlerde sinir kesit yüzey alanları (mean±SE) ve myelinli akson sayıları (median)

Table 1. Cross sectional areas (mean±SE) and the number of myelinated axons (median) of cranial nerves III, IV. and VI. of right and left sides

Parametre	Yön	n	N. oculomotorius	N. trochlearis	N. abducens	CV	CE
Sinir kesit alanı (mm^2)	Sağ	6	2.633 ± 0.27	0.467 ± 0.04	1.127 ± 0.13	0.25	
	Sol	6	2.662 ± 0.12	0.555 ± 0.05	1.058 ± 0.12	0.21	
	Ortalama*		2.647 ± 0.21	0.551 ± 0.05	1.093 ± 0.12	0.23	
Akson sayısı (median)	Sağ	6	13.593	1.994	4.091	0.15	0.04
	Sol	6	13.453	2.073	4.211	0.15	0.04
	Ortalama*		13.523	2.034	4.151	0.15	0.04

*Sağ ve sol göze ait morfometrik değerlerin ortalamasıdır.



Şekil 3. Göz kaslarını innerve eden kranial sinirlerin virtual slice kullanılarak elde edilen genel görünümü, a- n. oculomotorius, b- n. trochlearis, c- n. abducens, May Grunwald Giemsa

Fig 3. General view of cranial nerves innervating eye muscles obtained using virtual slice, a- oculomotor nerve, b- trochlear nerve, c- abducens nerve, May Grunwald Giemsa

Tablo 2. III, IV ve VI. çift kranial sinirlerde myelinli akson sayıları

Table 2. The number of myelinated axons of cranial nerves III, IV and VI

Parametre	Tür	Özellik	N. oculomotorius (Mean±SD)	N. trochlearis (Mean±SD)	N. abducens (Mean±SD)	Kaynaklar
Akson Sayıları	Rat	Myelinli	13.88±43	282±10	329±10	[1]
	Köpek	Myelinli	8.543±1231	1.509±223	2.473±211	[5]
	Koyun	Myelinli	13.684±294	3.377±52	2.908±132	[3]
	Kedi	Myelinli	-	965	1.901	[4]
	At	Myelinli (median)	1.3523	2.034	4.151	Mevcut araştırma sonucu

Tablo 3. Göz kaslarının innervasyonuna katılan toplam myelinli sinir akson sayısına III., IV. ve VI. çift sinirlerin katkı oranları (%)

Table 3. Contribution rates of cranial nerves III, IV. and VI. to the number of myelinated axons involving innervation of eye muscles (%)

Tür	N. oculomotorius (%)	N. trochlearis (%)	N. abducens (%)	Kaynaklar
Rat	69	14	17	[1]
Köpek	68	12	20	[5]
Koyun	68	17	15	[3]
At	69	10	21	Mevcut araştırma sonucu

lemlendi. Perineurium ile çevrili sinir demetlerinin belirgin olduğu gözlenirken, bu demetlerin içindeki akson çaplarının homojen olmadığı belirlendi. N. abducens'te sinir demetlerinin çaplarının diğer iki sinire göre daha geniş olduğu ve epineurium'un burada daha kalın olduğu tespit edildi. Yapılan histolojik incelemede bu üç sinirin de bağdoku, akson ve fasikül yerleşimi yönünden farklı özellikler taşıdıkları tespit edildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyolojik dokularda tespit sonrası meydana gelen doku hacmindeki büzüşme bilinen bir gerçektir. Parafin blok-

larda dokuya bağlı olarak %40-50 oranında büzüşme görülebilmektedir¹³. Biyolojik yapılardaki tanecik sayısı histolojik işlemler sırasında şekillenen hacim değişikliklerinden etkilenmemektedir¹⁴. Mevcut çalışmada, 2 boyutlu kesitlerde alan örnekleme yapılarak tanecik sayısının hesaplandığı metot olan parçalama metodu kullanıldı.

Sinir yenilenmesi ve hasarı ile ilgili çalışmalarda sinir dokusu genellikle osmium tetroksit ile tespit edilmekte ve resin ya da araldit uygulaması yapılmaktadır^{15,16}. Parafin'e gömme metodu ile resin'e gömme metodunun sonuçları karşılaştırıldığında myelinli akson sayısının tespitinde kullanılan iki metot arasında istatistiki bir farkın bulunmadığı, ancak sinirlerde yer alan akson alanı, myelin alanı,

akson ve myelin çapı gibi morfometrik değerler arasında fark görüldüğü bildirilmektedir ¹⁶. Mevcut çalışmada ilgili sinirlerin sadece içerdikleri myelinli akson sayısı tespit edilmiş, metot kısıtlaması nedeni ile diğer histomorfometrik parametreler araştırılmamıştır.

Yapılan literatür taramaları sonucunda III, IV ve VI. çift kranial sinirlerde myelinli akson sayıları ile araştırmamızda elde edilen sonuçlar *Tablo 2*'de verildi. Araştırmada n. oculomotorius'da tespit edilen myelinli akson sayısı ile koyunda bildirilen sayı arasında yakın bir benzerlik olduğu gözlemlenirken diğer sinirlerde böyle bir benzerlik tespit edilmedi. Rat, köpek, koyun ve kedide adı geçen sinirler üzerinde yapılan araştırmalarda benzer metotlar kullanılarak myelinli ve myelinsiz akson sayıları ayrı ayrı tespit edilmiştir.

Rat, köpek, koyun ve atta göz kaslarının innervasyonuna katılan toplam myelinli sinir akson sayılarına adı geçen sinirlerin katkı oranları ayrı ayrı değerlendirildiğinde n. oculomotorius'un katkı oranının bütün hayvanlarda hemen hemen aynı oranda ve en yüksek olduğu belirlendi (*Tablo 3*). Koyun dışındaki hayvanlarda n. abducens ikinci derecede katkıya sahipken n. trochlearis'in en az katkıya sahip sinir olduğu gözlemlendi. Rat, köpek ve atta IV. ve VI. çift sinirlerin katkı oranlarının ise birbirlerine yakın olduğu tespit edildi.

Çalışmada kullanılan yöntemin myelinli akson sayılarının tespitinde oldukça başarılı olduğu ancak myelinsiz akson sayısı ile myelin ve akson morfometrisinin belirlenmesinde yetersiz kaldığı ve konuyla ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

Atlarda III., IV. ve VI. çift kranial sinirlerin transversal kesit alanlarının ve myelinli akson sayılarının belirlendiği çalışma sonuçlarının bu alandaki bilgi birikimine katkı sağlayacağı ve gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutacağı sonucuna varıldı.

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışmanın bir kısmı Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Laboratuvarları'nda (KUBTAL) yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- Fraher JP:** Axon numbers in rat oculomotor, trochlear and abducent nerves. *J Anat*, 166, 151-155, 1989.
- Sanders RD, Gillig PM:** Cranial nerves III, IV, and VI: Oculomotor function. *Psychiatry (Edgemont)*, 6 (11): 34-39, 2009.
- Berardinelli P, Scapolo PA, Barazzoni AM, Russo V, Bortolami R:** Nerve fiber composition of the intracranial portion of the oculomotor, trochlear, and abducens nerves in the sheep. *Anat Rec*, 260 (3): 294-298, 2000.
- Hildebrand C, Oscarsson A, Risling M:** Fiber composition of the feline trochlear and abducens nerves. *Brain Res*, 453 (1-2): 401-407, 1988.
- Vivo J, Morales JL, Diz A, Galisteo AM, Monterde JG, Aguera E, Miro F:** Structural and ultrastructural study of the intracranial portion of the oculomotor, trochlear and abducent nerves in dog. *Anat Histol Embryol*, 35 (3): 184-189, 2006.
- Mayhew TM:** An efficient sampling scheme for estimating fibre number from nerve cross sections: The fractionator. *J Anat*, 157, 127-134, 1988.
- Larsen JO:** Stereology of nerve cross sections. *J Neurosci Meth*, 85 (1): 107-118, 1998.
- Taylor PM:** Effects of surgery on endocrine and metabolic responses to anaesthesia in horses and ponies. *Res Vet Sci*, 64 (2): 133-140, 1998.
- Howard V, Reed MG:** Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. 2nd ed., pp. 35-53, Oxon, UK, Garland Science/Bios Scientific Publishers, 2005.
- Gundersen HJ:** Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: The edge effect. *J Microsc*, 111 (2): 219-223, 1977.
- Larsen JO, Thomsen M, Haugland M, Sinkjær T:** Degeneration and regeneration in rabbit peripheral nerve with long-term nerve cuff electrode implant: A stereological study of myelinated and unmyelinated axons. *Acta Neuropathol (Berl)*, 96 (4): 365-378, 1998.
- Nomina Anatomica Veterinaria:** International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Ithaca, New York: World Association of Veterinary Anatomists, 2005.
- Miller PL, Meyer TW:** Effects of tissue preparation on glomerular volume and capillary structure in the rat. *Lab Invest*, 63 (6): 862-866, 1990.
- Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJG:** Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc*, 204 (3): 232-246, 2001.
- Castro J, Negro P, Avendaño C:** Fiber composition of the rat sciatic nerve and its modification during regeneration through a sieve electrode. *Brain Res*, 1190, 65-77, 2008.
- Raimondo S, Fornaro M, Di Scipio F, Ronchi G, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S:** Methods and Protocols in Peripheral Nerve Regeneration Experimental Research: Part II-Morphological Techniques. *Int Rev Neurobiol*, 87, 81-103, 2009.