

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**CİVCİVLERDE PASİF SAKINMANIN ÖĞRENİLMESİNİ
TAKİBEN DORSOLATERAL HİPPOKAMPUSTA SİNAPS
YOĞUNLUĞU VE YÜKSEKLİĞİNİN DİSEKTÖR SAYIM
METODUYLA HESAPLANMASI
(Elektron Mikroskopik Düzeyde Stereolojik Bir Çalışma)**

DOKTORA TEZİ

T 88238

Dr. Bünyami ÜNAL

Samsun
Eylül – 1999

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**CİVCİVLERDE PASİF SAKINMANIN ÖĞRENİLMESİNİ
TAKİBEN DORSOLATERAL HİPPOKAMPUSTA SİNAPS
YOĞUNLUĞU VE YÜKSEKLİĞİNİN DİSEKTÖR SAYIM
METODUYLA HESAPLANMASI
(Elektron Mikroskopik Düzeyde Stereolojik Bir Çalışma)**

DOKTORA TEZİ

T 88238

Dr. Bünyami ÜNAL

Danışman: Doç. Dr. Süleyman KAPLAN

**Samsun
Eylül - 1999**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji-Embriyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Nusret ÇİFTÇİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Hakkı Dalçık

Üye: Doç. Dr. Hakkı DALÇIK, Kocaeli Üniversitesi

S. Kaplan

Üye: Doç. Dr. Süleyman KAPLAN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Sait Bilgiç
Prof. Dr. Sait BİLGİÇ
Enstitü Müdürü

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

TEŞEKKÜR

Üniversite bünyesinde bulunduğum süre içinde göstermiş oldukları yakın alaka, bilimsel teşvik, hoşgörü ve her türlü yardımlarından dolayı, hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Süleyman Kaplan, Anabilim Dalı Başkanımız hocam Prof. Dr.Nusret Çiftçi ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü hocam Prof. Dr. Sait Bilgiç'e ve her zaman dostluklarının yanımda hissettiğim Yrd. Doç. Dr. Bünyamin Şahin, Dr.Hüseyin Aslan, Arş. Gör. Sinan Canan, Arş. Gör. Levent Tümkaya ve Dr Murat Topbaş'a, tezin büyük bir bölümünün yapımı için elektron mikroskobu ünitesini bizlere açmanın yanında, göstermiş oldukları yakından dolayı Newcastle Üniversitesi Nörobiyoloji Bölümü öğretim üyesi ve elektronmikroskop ünitesi başkanı Dr. P. M. Bradley'e, maddi desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a, bölümümüz personelden Recep İtku ve Atiye Demil'e, beni bu günlere getiren saygı değer annem ve babama, iyi ve kötü günde yanımda olan sevgili eşim Dr. Deniz ve çocuklarım Yağmur, Mehmet ve Hazar'a minnetlerimi sunarım

ÖZET

**CİVCİVLERDE PASİF SAKINMANIN ÖĞRENİLMESİNİ TAKİBEN
DORSOLATERAL HIPPOKAMPUSTA SİNAPS YOĞUNLUĞU VE
YÜKSEKLİĞİNİN DİSEKTÖR SAYIM METODUYLA HESAPLANMASI****(Elektron Mikroskopik Düzeyde Stereolojik Bir Çalışma)****Dr. Bünyami ÜNAL, DOKTORA TEZİ**

Tüm canlılar yaşamlarının ilk anından itibaren ortaya çıktıkları çevre ile yoğun bir etkileşim içerisindedirler. Gelişmişlik düzeyi ile ilişkili olarak sinir sistemleri tarafından düzenlenen bu etkileşimlerin bir kısmına tepki, bir kısmına da uyum gösteren canlılar edindikleri bilgileri yaşamlarının bir sonraki aşamasında kullanabildikleri ölçüde başarılı olurlar.

Nasıl oluştuğu ve nerede yerleştiği araştırılmakla birlikte uzun süreli hafızalama ile ilgili çalışmaların çoğu, beyin korteksi ile sayısız bağlantılara sahip olması yanında limbik sistemin diğer yapılarıyla olan ilişkisi nedeniyle hippocampus bölgesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu güne kadar çeşitli model hayvanların hippocampusları gerek ortaya koydukları davranışsal farklılıklar, gerek biyokimyasal ve elektrofizyolojik parametreler göz önüne alınarak araştırılmış olmasına karşın, pasif sakınmanın öğrenilmesinin dorsolateral hippocampus bölgesinin sinaps sayısal yoğunluğu ve tiplerine etkisi bilinmemektedir.

Öğrenmeye bağlı olarak sayı ve tipleri değiştiği bilinen sinapsların dorsolateral hippocampus bölgesinde nasıl bir değişim gösterdiği araştırıldı. Bunun için model hayvan olarak yumurtadan yeni çıkan civcivler kullanıldı. Civcivlere pasif sakınmanın öğrenilmesi eğitimi uygulanmasının ardından 24 ve 48 saat sonra dorsolateral hippocampus bölgesinde öğrenmenin sinaps düzeyindeki morfolojik etkileri disektör sayım metodu kullanılarak incelendi.

Çalışmada eğitim, zaman, cinsiyet ve beyin hemisferleri arasındaki farklılıklar değerlendirilerek şu sonuçlara ulaşıldı. Tüm gruplarda pasif sakınmanın öğrenilmesi eğitiminin sinaps sayısal yoğunluğu üzerinde artırıcı etkisinin olduğu saptandı. Eğitimle birlikte sinapsların toplam (spin sinaps + shaft sinaps = toplam sinaps) sayısal yoğunluk değerine en büyük katkının shaft tipli sinapslardan kaynaklandığı görüldü. Zamana bağlı anlamlı değişim yalnızca eğitilmiş gruplarda gözlenirken, öğrenmeye bağlı olarak beyin hemisferleri arasında dinamik bir asimetrisinin varlığı da gözlemlendi.

Bulgularımız, dorsolateral hippokampusun pasif sakınmanın öğrenilmesi ile ilgili bir bölge olduğunu göstermektedir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Eylül – 1999



ABSTRACT**ESTIMATION OF NUMERICAL DENSITY AND HIGHT OF SYNAPSES
IN CHICKS FOLLOWING PASSIVE AVOIDANCE TRAINING BY
DISECTOR COUNTING METHOD****(An Electron Microscopical And Stereological Study)****Bünyami ÜNAL, PhD Thesis**

All living organisms are in an intense relationship between their surrounding environments. Organisms learn to react or adapt to the changes in the environment with their nervous systems and they may be successful in their struggle as they use these acquired data in preceding environmental events.

Studies concerning on long term storage of memories are mainly focused on hippocampal region because of its large number of connections with other cortical areas and remaining limbic structures but the location and mechanism of formation of memories are still subject of debate. Although there are a lot of studies on hippocampus by using different animal learning models and regarding behavioral, biochemical and electrophysiological parameters, there was no study concerning the numerical density and morphology of synapses in dorsolateral portion of chick hippocampus after passive avoidance training by using disector counting method.

In the present study, changes in number of synapses, which had known to change during neural activities were examined in the dorsolateral hippocampal area of the chick. One-day old chicks used as model animals. Changes in numerical density of synapses in the dorsolateral portion of hippocampus 24 and 48 hours after passive avoidance training were estimated by using disector counting method.

After comparing the acquired data regarding time, sex, training and differences between the brain hemispheres following results have been obtained: Passive avoidance training caused a marked increase in synapse density in all groups. The major contribution to the increase in total synapse (spin synapses + shaft synapses) density was from shaft synapses. Time dependent significant changes were observed only in trained groups and a dynamic asymmetry between brain hemispheres was detected due to passive avoidance learning.

Our overall results suggest that the dorsolateral hippocampus may be related to passive avoidance learning in chicks.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Eylül – 1999



İÇİNDEKİLER.....	SAYFA
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Kuş Ön Beyni, Bağlantıları ve Memeli Beyin Yapılarıyla Benzerlikleri	7
2.1.1. Memeli İzokorteksinin Homoloğu Olarak Kabul Edilen Eminentia Sagittalis ve Dorsal Ventriküler Kabartı.....	8
2.1.2. Memeli Hippokampusunun Homoloğu Olarak Kabul Edilen Dorsomedial Kompleks (Hippokampus ve Parahippokampal Alan)	10
2.1.3. Memeli Korpus Striatumunun Homoloğu Olarak Kabul Edilen Palaeostriatal Kompleks	11
2.1.4. Memeli Amygdal Nukleusunun Homoloğu Olarak Kabul Edilen Arkistriatal Kompleks	12
2.2. Öğrenme ve Hafızalama Mekanizmaları.....	12
2.2.1. Öğrenme Modelleri	13
2.2.2. Öğrenmeyi Takiben Beynin Bazı Bölgelerinde Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler.....	15
2.3. Hippokampal Formasyon ve Bu Bölgede Öğrenme İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	27
2.3.1. Dorsolateral Hippokampus Bölgesine Yapılan PHAL Uygulaması Sonrasında Ortaya Çıkan Efferent Bağlantılar.....	28
2.3.2. Dorsomedial Hippokampus Bölgesine Yapılan PHAL Uygulaması Sonrasında Ortaya Çıkan Efferent Bağlantılar.....	29
2.3.3. Ventral Hippokampus Bölgesine PHAL Uygulaması Sonrasında Ortaya Çıkan Efferent Bağlantılar	29
2.3.4. Kuş Hippokampusunun Parselasyonu	30
2.3.5. Kuş Hippokampusunun Histolojisi.....	33
2.3.6. Hippokampusta Yapılan İskemi ve Lezyon Çalışmaları Sonrasında Ortaya Çıkan Morfolojik Değişiklikler	35
2.3.7. Yiyecek Depo Eden Kuş Türleri İle Yiyecek Depo Etmeyen Kuş Türlerinin Hippokampusları Arasındaki Farklılıklar.....	37

2.3.8. Hippokampus Morfolojisi Bakımından Göç Eden ve Etmeyen Kuş Türleri Arasındaki Farklılıklar	38
2.3.9. Hippokampusların Morfolojisi Bakımından Kuluçka Paraziti Olan ve Olmayan Kuşlar Arasındaki Farklılıklar.....	39
2.4. Memeli Hippokampusu ve Limbik Sistem.....	40
2.4.1. Memeli Hippokampal Formasyonu.....	41
2.4.2. Memeli Hippokampusunun Histolojisi.....	42
2.4.3. Memeli Hippokampusunun Afferentleri	44
2.4.4. Memeli Hippokampusunun Efferentleri.....	44
2.4.5. Papez Döngüsü	46
2.4.6. Limbik Sistem ve Hippokampal Formasyonun Fonksiyonel Önemi	46
2.4.7. Fonksiyon Bozuklukları ve Korsakoff Sendromu.....	48
2.5. Morfometrik Çalışmalarda Yeni ve Tarafsız Sayım Metotlarının Kullanılma Gerekliği.....	50
2.5.1. Partikül Sayımı İçin Kullanılan Eski Metotlar	54
2.5.2. Yeni ve Tarafsız Stereolojik Sayım Metotları.....	68
3. MATERYAL VE METOT.....	81
3.1. Cıvıvlerin Gruplandırılması ve Deney Düzenegi	81
3.1.1. Fiksasyon İşlemleri.....	83
3.1.2. Çalışılan Bölgenin Tanımlanması ve Disseksiyonu	84
3.1.3. Doku Takip İşlemleri.....	86
3.1.4. Dokuların Bloklanması.....	87
3.1.5. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	87
3.1.6. Gridlerin Hazırlanması	88
3.1.7. Çalışmanın Örneklenme Stratejisinin Belirlenmesi	89
3.1.8. Kesitlerin Alınması.....	90
3.1.9. Kesitlerin Boyanması	91
3.1.10. Elektronmikrografların Çekilmesi.....	93
3.1.11. Sinapsların Morfolojisi, Ortalama Yüksekliklerinin Hesaplanması ve Sayımı İçin Belirlenen Kriterler	94
3.1.12. Fiziksel Disektörün Uygulanması	94

4. BULGULAR	98
5. TARTIŞMA	117
6. KAYNAKLAR.....	127
7. ÖZGEÇMİŞ.....	136



1. GİRİŞ

En ilkelinden en gelişmişine, tüm canlılar yaşamlarının ilk anından itibaren ortaya çıktıkları çevre ile yoğun bir etkileşim içerisindeyler. Kendi gelişmişlik düzeyleri dahilinde etkileşimlerinin bir kısmına uyum, bir kısmına da karşı tepki verirler. Gelişmiş canlılarda, sözü edilen ilişkiler merkezi sinir sistemi tarafından düzenlenmekte ve hayat mücadelesinde onlara avantaj sağlamaktadır. Etkileşim süreci içerisinde aynı tür olaylarla tekrar karşılaştıklarında, edinilen bilgi veya tecrübenin avantaj haline dönüşebilmesi için bir şekilde kayıt edilmeleri ve ihtiyaç duyulduğunda kullanılmaları gereklidir. Edinilen bilgi veya tecrübe ışığında canlıların değişen olaylara göre davranışlarını düzenleme yetenekleri fen ve sosyal bilimlerin en merak uyandıran konusu olması yanında, en çok tartışılan konuların da başında gelmektedir

İnsanlık tarihi boyunca öğrenme ve edinilen bilgilerin nasıl depo edildiği merak konusu olmuş ve bu konularla ilgili bir çok hipotez ileri sürülmüştür. Bu gün bile nöronal mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış öğrenme ve öğrenilen bilgileri kayıt etme konularında çözümüne yönelik çok sayıda veri elde edilmesine karşın konu hala tüm ayrıntısıyla anlaşılammıştır

Bilindiği gibi en ilkelinden en gelişmişine kadar tüm omurgalılar, embriyolojik gelişimleri esnasında longitudinal yerleşimli sinir kordonunun ucunda üç belirgin şişkinliğe sahip olup, bunlar ön, orta ve arka beyin olarak adlandırılmaktadırlar. Omurgalılar gelişmişlik durumuyla ilgili olarak beynin belirli bölgeleri belirli vücut fonksiyonlarını idare etmektedirler. Vücudun motor, solunum, sindirim ve üreme gibi fonksiyonlarını yürüten beyin bölgelerinin yerleri bilinmesine karşın his, zeka, muhakeme, öğrenme ve hafızlama gibi karmaşık fonksiyonların hangi beyin bölgelerinde yürütüldüğü kesin değildir (Noyan, 1993).

Bir kısım bilim adamları, beyin korteksinin motor ve duyuşal sahaları haricinde kalan bölgelerde yalnızca belirli fonksiyonlara ayrılmış merkezlerin olmadığı, bu alanların beynin özgül olmayan sahaları şeklinde düşünülmesi gerektiğini savunmaktadırlar. Bu yaklaşım tarzına göre öğrenme ve hafızalama gibi karmaşık fonksiyonların beyinde belirli merkezlerinin olmadığı söylenmekle beraber, bu fonksiyonların hangi beyin yapılarının ortak ürünü olabileceği araştırıldığında çeşitli duyu organlarından gelen bilgilerin son durağının temporal bölgedeki hippokampus olduğu yönündeki veriler, çalışmaları bu bölge üzerine yoğunlaştırmıştır (Sorra ve ark.,

1998, McBain ve Maccaferri, 1997, Halasy ve ark., 1996, Jodar ve Kaneto, 1995, Schuman ve Madison, 1994, Fazeli, 1992).

Öğrenme ve hafızalama işlemlerinin eş zamanlı olarak beyin korteksi, talamus, limbik sistem ve retiküler formasyon bölgelerini ilgilendirdiği bilinmesine karşın, nöronal mekanizmaları tam olarak aydınlatılamayan bu tür fonksiyonlar, çeşitli canlılar üzerinde ilgili faaliyetlerle birlikte ortaya çıkan morfolojik, biyokimyasal, elektrofizyolojik ve davranışsal değişiklikler izlenerek anlaşılmaya çalışılmaktadır. Öğrenme ve hafızalama fonksiyonunun karmaşıklığına ilave olarak öğrenilen bilgilerin bir kayıt işleminin ardından hatırlanma şekli ve süreleri de bir takım farklılıklar içermektedir. Bazı bilgiler saniyelerle ifade edilebilecek zaman dilimlerinde akılda tutulurken, bazıları yıllarca korunabilmektedir. Hafıza oluşum mekanizması ve evrelendirilmesi ile ilgili bir çok görüş ileri sürülmesine rağmen, yaygın kanı;

- 1.Nöronal alt yapısında duyuşal sinyallerin oluşumunun ardından, bunların kısa bir süre daha duyuşal alanlarda tutulması şeklinde tarif edilen duyuşal hafıza,
- 2.Nöronal alt yapısında sodyum pompasının etkin olduğu öğrenilenlerin bir kaç saniyeden bir kaç dakikaya kadar akılda tutulabilmesi şeklinde tarif edilen kısa süreli veya primer hafıza ve
- 3.Nöronal alt yapısında protein sentezinin bulunduğu, öğrenilen bilginin yıllarca akılda tutulabilmesi şeklinde tarif edilen uzun süreli, kalıcı veya sekonder hafızadır (Ng ve Gibbs, 1991).

Burada belirtilmesi gereken önemli bir özellik, oluşan kısa süreli hafızanın yeni bilgilerin gelmesiyle beraber silindiği veya gerekli olduğu durumlarda uzun süreli forma dönüştürüldüğu gerçeğidir (Gökhan ve Çavuşoğlu, 1989).

Başta belirtildiği gibi edinilen bilgi ve tecrübelerin bir anlam ifade edebilmesi veya bir avantaj sağlayabilmesi için kolayca silinmeyecek bir kayıt biçiminde saklanmaları gerekmektedir. Beynin hangi bölgesinde gerçekleştiği dışında, ne tür bir nöronal mekanizma ile ortaya çıktığı gibi konular bir yana, bu tür bir depolama biçiminin bilgi ve tecrübe birikimlerinin başka nesillere aktarılmasındaki payı büyüktür.

Çalışmalar; beyin korteksinin büyük bir bölümü ve limbik sistemin temel yapılarıyla sayısız bağlantılara sahip olmasına ilaveten, hemen her tip duyuşal algının sonlandığı hippocampal formasyonun uzun süreli hafızayı oluşturduğuna işaret etmektedir. Uzun süreli hafıza biçiminin ortaya çıkmasında etkin olduğu düşünölen

glutamat reseptörlerinin artan yoğunluğu (Wieraszko ve Ball, 1993) yanında, memeli hippokampusunun homoloğu olarak kabul edilen kuşların dorsomedial kortekslerinin (Casini ve ark., 1986, Bingham ve ark., 1985) uzaysal (spatial) hafızaya gereksinim duyan türlerinde (göç eden, kuluçka paraziti olan ve yiyecek depo eden kuş türleri vb.) bu tür bir ihtiyaca sahip olmayanlara oranla fazla gelişmiş olması (Basil ve ark., 1996, Healy ve ark., 1996, Healy ve Suhonen, 1995, Healy ve Krebs, 1993, Krebs ve ark., 1989, Micheli, 1987), şimdiye kadar ileri sürülenleri doğrulamaktadır. Son olarak epilepsi tedavisi için bir kaç vakada hippokampal formasyonun çıkarılmasıyla beraber hastaların eski öğrendikleri bilgileri hatırladıkları halde, hemen hemen hiçbir yeni bilgiyi öğrenememeleri gerçeği de bu bölgenin fonksiyonunun anlaşılmasının ne kadar önemli bir zorunluluk olduğunu göstermektedir (Chronister ve Hardy, 1997).

Hippokampusun uzun süreli hafıza merkezi olabilecek en uygun aday olduğu iddialarından sonra, bu işlemler esnasında beynin ilgili bölgelerinde ne tür değişikliklerin olduğunu araştırılmasıyla, ilginç sonuçlara ulaşılmıştır. Çalışmalar, sekonder veya uzun süreli hafızanın sinir sisteminin sürekli aktivasyonu sonucunda oluşmadığını göstermiştir. Bunu genel anestezi, hipoksi, iskemi veya herhangi başka bir sebeple beynin total olarak inaktive olduğu durumların ardından şahsın önceden biriktirdiği anılarını beyni tekrar aktif duruma geldiğinde hatırlayabilmesinden anlamaktayız. O halde bu tür bir kodlama sinapslardaki fiziksel ya da kimyasal değişikliklerden kaynaklanmalı ve bu değişiklikler kalıcı olmalıdır. Uzun süreli hafıza ve bunun sinaptik düzeyde meydana getirdiği değişikliklerle ilgili bir çok görüş olmasına rağmen, ortak kanı, oluşumun fiziksel temellere dayandığıdır. Yapılan çalışmalarla beyin korteksindeki nöron ve dendritlerin üzerlerindeki sinir sonlanmalarının yaşla birlikte çoğaldığı, beyin korteksinde aktive kaybına uğrayan bölgelerin kalınlıklarının incelendiği ve aşırı aktive olan sahaların kalınlığının arttığı gösterilmiştir (Gökhan ve Çavuşoğlu, 1989). Son yıllarda elektron mikroskopik düzeyde yapılan değerlendirmelerde uzun ve yoğun aktivasyon sonucunda pre ve postsinaptik terminallerde ortaya çıkan farklılıklar belirgin bir biçimde gösterilmiştir (Mishkin ve Appenzeller, 1987). Bütün bu gözlemlerden sonra beyinde anıların tespitinin bizzat sinapslardaki anatomik değişikliklerle sonuçlandığı söylenmektedir. Yani duyu reseptörlerinden başlayıp beyin korteksine kadar hafıza yollarındaki nöron bağlantılarına ait sinapslarda oluşan değişiklikler, son istasyon olan korteksin duyu idrak

merkezlerindeki sinapslarda değişiklik yaparak duyu algılamasını hafıza haline dönüştürmekte, daha sonra aynı duyunun aynı nöronal yolları aktive etmesi ile hatırlama mümkün olabilmektedir (Mishkin ve Appenzeller, 1987).

Bilindiği gibi beyin, öğrenme ve bu bilgilerin kaydedilmesi sırasında artan nöronal aktiviteye bağlı olarak daha fazla miktarda enerjiye gereksinim duymakta ve bu ihtiyaç daha fazla glikoz kullanılarak karşılanmaktadır. Bu gerçekten hareketle öğrenme çalışmalarında kullanılan deneklere bir öğrenme modeli uygulamasından önce radyoaktif işaretli 2-deoksizüköz-6 fosfat verilerek kullanıma bağlı artan glikoz seviyelerinin bazı beyin bölgelerinde yoğunlaştığı gözlenmiştir (Konsut ve Rose, 1984). Beyinde ortaya çıkan bu farklılıkların öğrenmeye özel olup olmadığını araştırmak için uygun bir öğrenme modelinin uygulanması ile beraber beynin spesifik bölgelerindeki nöronal değişiklikleri göstermek gerekmektedir. Bu tür çalışmalarda ya deneklerin belli bir görevi öğrenmesi esnasında bazı beyin bölgelerinde meydana gelen morfolojik, biyokimyasal ve elektrofizyolojik düzeydeki değişiklikler belirlenir veya nöronal aktiviteyi uyardığı bilinen bir takım biyokimyasal transmitterlerin bloklanması işlemi sonrasında hayvanlarda ortaya çıkan davranışların izlenmesi gereklidir (Morris ve ark., 1988). Tüm bu işlemlerin başarılması için ise iyi bir deney düzeneği ile beraber uygun bir hayvan modelinin gerekliliği kaçınılmazdır. Öğrenme ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda bir çok farklı metot ve model hayvan kullanılmasına rağmen “pasif sakınmanın öğrenilmesi” modeli için civcivler günümüzde yaygın olarak tercih edilmektedir. İlk olarak 1969 yılında Cherkin tarafından fark edilip, 1977’de Gibbs ve 1987 yılında Rose tarafından geliştirilerek kullanılan bu modelin esasını kuluçkadan yeni çıkmış veya yeni doğmuş hayvanların hayatlarının ilk günlerinde etraflarında bulunan objeleri rasgele biçimde gagalama veya yeme güdülerinin ilerleyen zaman içerisinde edindikleri tecrübelerle kendilerine yararlı olan ve olmayan objeleri birbirlerinden ayırt edebilme davranışları oluşturmaktadır. Bu tür çalışmalarda bir çok farklı hayvan türünün kullanıldığı bilinmektedir. Son yıllarda “pasif sakınmanın öğrenilmesi” (PSÖ) modelini uygulayan araştırmacılar, kuş türlerinden özellikle civcivlerin, tarif edilen modelin gerçekleştirilmesine elverişli olmaları, yumurtadan çıktıklarında gelişmiş bir merkezi sinir sistemine sahip olmaları, hayatlarını devam ettirebilmek için kısa sürede bir çok objeden kendilerine zararlı olan ve olmayanlarını ayırt etmek zorunda olmaları ve kemikleşmemiş bir kafa tasına sahip olmaları sebebiyle

cerrahi işlem ve diğer manipülasyonların uygulanmasının rahatlığı açısından tercih etmektedirler (Steele ve Stewart, 1995, Hunter ve Stewart, 1993)

Organizmanın veya organizma içerisindeki bir yapının fonksiyonunun daha iyi anlaşılması için yapı içerisinde cereyan eden moleküler, biyokimyasal, fizyolojik ve genetik düzeydeki olayların bilinmesinin yanında toplam sayı, sayısal yoğunluk, hacim, uzunluk ve çap gibi morfolojik kriterlerin de doğru biçimde değerlendirilmeleri gerekmektedir.

Burada konumuzla ilgili olan morfolojik kriterlerden sayı parametresinin hangi ölçüm ve değerlendirme kriterleri göz önüne alınarak doğru bir biçimde değerlendirilebileceği konusuna kısaca değinelim. Biyolojik objeler veya bunların içerisinde bulunan yapılar gerçekte 3 boyutlu, yani uzunluk, genişlik ve yüksekliğe sahip olan materyallerdir. Çıplak gözle görülebilecek boyutlardaki objeler algılama sınırlarımız dahilinde olduklarından bunlarla ilgili herhangi bir boyutsal yanılgı söz konusu değildir. İncelenmek istenen objeler görme sınırlarımızın altında olan biyolojik materyaller ve onların alt elemanları (hücre, çekirdek vb.) ise, bunların optik cihazlarla büyütülerek algılanabilir duruma getirilmeleri gerekmektedir. Optik cihazların devreye girdiği bu tür durumlarda ise bir takım ön hazırlıkların yapılma zorunluluğu vardır. Yani önce biyolojik yapı alınmalı, ardından amaca uygun histolojik işlemlerden geçirilmeli, mikrotom, ya da ultramikrotom gibi araçlar yardımıyla ışığa geçirgen kesitler haline dönüştürülmelidir. Elde edilen bu kesitler bir mikroskop altında ya direkt ya fotoğraflanarak veya monitör ekranından incelenebilir. Kullanılan görüntüleme yöntemi ne olursa olsun, artık üç boyutlu yapılardan alınmış olan iki boyutlu kesit görüntüleri söz konusu olacak, bunlar iki boyut, yani uzunluk ve genişlik (x ve y eksenleri) hakkında araştırmacıya fikir verirken, üçüncü boyutları hakkında doğrudan bilgi sağlayamayacaktır. Elde edilen bu görüntülerden, artık görüntü düzlemine dik olan “derinlik” boyutu hakkında bir yorum yapma şansı zorlaşacaktır. Eğer kesit alma ve sonuçta elde edilen iki boyutlu görüntü kavramı daha yakından irdelenirse, algılanamayan derinlik kavramı ihmalinin nasıl vahim hatalara neden olabileceğini kolayca görebiliriz. İncelediğimiz yapı içerisinde bulunan objelerin sayısı bulunmak istendiğinde, yapının kesitler haline dönüştürülerek incelenmesi gerekmektedir. Elde edilen kesit düzlemlerinde gerçekte yapı içinde üç boyutlu olarak bulunan objelerin ancak iki boyutlu izdüşümleri görülebilecektir. Burada, ya araştırmacı partikülün (saymak

istenilen nesne) büyüklüğüne, kesitlerin kalınlığına, objelerin kesilme yönü ve doku içindeki yerleşimine bağlı olarak değişebilecek iki boyutlu izdüşümleri partikülmüş gibi veya bir başka yaklaşımla, üçüncü boyut hakkında fikir sahibi olarak gerçekten partikülleri sayacaktır. Histolojik çalışmaların başlangıcından, yeni stereolojik metotların ortaya çıkışına kadar olan süre boyunca kullanılan yöntemlerle, bu kayıp olan derinlik bilgisinin doğrudan değerlendirilemiyor olmasının sakıncaları fark edilmiş olmasına karşın, yapıcı bir çözüm üretilemediği için ya yokmuş gibi varsayılarak veya bir takım eksik düzeltme faktörleriyle, kayıp verinin yeri doldurulmaya çalışılmıştır (Abercrombie, 1946). Yukarıda bahsedilen problemlerin çözümüne yönelik daha önceden de bir takım pratik çözüm önerileri sunulmasına rağmen, modern anlamda ilk defa 1984 yılında Sterio tarafından geliştirilerek yeniden tarif edilen “disektör sayım metodu” ile yapıların iki boyutlu kesit görüntülerinden onların üçüncü boyutunu anlama ve değerlendirme imkanı elde edilmiştir (Sterio, 1984).

Özetle; yukarıda anlatıldığı gibi morfolojik ve biyokimyasal çalışmalar ile civcivlerde öğrenmenin olaylandığı bölgeler tespit edilmekte ve buraların intermediate ve medial hiperstriatum ventrale (IMHV) (Csillag ve ark., 1994, Doubell ve Stewart, 1993, Stewart ve ark., 1992, Serrano ve ark., 1992) lobus parolfactorius (LPO) (Szekely ve ark., 1994, Lowdnes ve Stewart, 1994, Horn ve ark., 1985) ve hippocampus (Hp) (Basil ve ark., 1996, Clayton, 1995a, 1995b, Healy ve ark., 1996) olduğu savunulmaktadır. Öğrenmeyi takiben Hp’da oluşan elektrofizyolojik değişiklikler (Wieraszko ve Ball, 1991) bilinmesine karşılık, burada sinaps sayısı, sayısal yoğunluğu ve morfolojisi ile ilgili nasıl bir değişimin gerçekleştiği bilinmemektedir. Morfometrik çalışmalarda güvenilir sonuçlar veren stereolojik metotların uygulanması ile, civciv hippocampusunda öğrenme sonrası sinaps morfolojisi ve yoğunluğunda nasıl bir etkinin ortaya çıktığının araştırılması, bu çalışmanın esasını oluşturmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KUŞ ÖN BEYİNİ, BAĞLANTILARI VE MEMELİ BEYİN YAPILARIYLA BENZERLİKLERİ

Uzun yıllar boyunca kuş ön beyni (forebrain) yalnızca rudimenter bir kortikal bölge olan eminentia sagittalis (Wulst) ile iyi gelişmiş bir korpus striatumdan oluştuğu kabul edilmiştir (Dubbeldam, 1991). Son yıllarda bu konularla ilgilenen bilim adamları yaptıkları karşılaştırmalı morfolojik çalışmalarında; kuş beynini dört ana bölgeye ayırarak incelemektedirler.

Tablo I Kuş ve memeli beyinde birbirlerinin homoloğu olarak kabul edilen yapıların sınıflandırılması. Bu sınıflandırma ilk olarak 1936 yılında Kappers, Huber ve Crosby tarafından yapılmış, daha sonra Karten ve Hodos tarafından 1967 de modifiye edilerek yeniden düzenlenmiştir. (Kuenzel ve Masson, 1988)

MEMELİLER	KUŞLAR
İZOKORTEKS	EMINENTIA SAGITTALIS (WULST) a. Hiperstriatum aksesorium (HA) b. Hiperstriatum aksesoriumun nukleus interkalatusu (IHA) c. Hiperstriatum interkalatum supremum (HIS) d. Hiperstriatum dorsale (HD) DORSAL VENTRİKÜLER KABARIKLIK (DVK) a. Hiperstriatum ventrale (HV) b. Neostriatum (N) c. Ektostriatum (E) d. Nukleus bazalis (Bas) e. Arkistriatum (Rostral parça) (A)
HİPPOKAMPUS AMİGDALA NUKLEUSU	HİPPOKAMPUS (Dorsomedial Kompleks) ARKİSTRİATUM (Medial ve kaudal parça)
KORPUS STRİATUM a. Kauda putamen b. Globus pallidus eksternus ve Globus pallidus internus c. Nukleus akkumbens	PALAEOSTRİATAL KOMPLEKS a. Palaeostriatum augmentatum (PA) ve Lobus parolfaktoriüs (LPO) b. Palaeostriatum primitivum (PP) ve Nukleus intrapedinkularis (INP) c. Nukleus akkumbens

Bu bölgeler sırasıyla;

- Memeli izokorteksinin homoloğu olduğu düşünülen, eminentia sagittalis (Wulst) ve dorsal ventriküler katlantı (DVK),

- Memeli hippocampusunun homoloğu olduğu düşünülen dorsomedial korteks (Hippokampus),
- Memeli amigdala nukleusunun homoloğu olduğu düşünülen arkistriatal kompleks ve
- Memeli korpus striatumunun homoloğu olduğu düşünülen palaeostriatal kompleks olarak adlandırılan bölgeler şeklinde ifade edilmektedir (Tablo I).

2.1.1. Memeli İzokorteksinin Homoloğu Olarak Kabul Edilen Eminentia Sagittalis ve Dorsal Ventriküler Kabartı

1953 yılında Kallen ve arkadaşları embriyolojik oluşumlarını göz önüne alarak yaptıkları çalışmalarında, eminentia sagittalisten dorsal ventriküler kabarıklığa kadar uzanan bölgenin subpallial bir yapıdan ziyade pallial (kortikal karakterde) bir yapı olduğunu ileri sürmüşlerdir (Dubbeldam, 1991). Eminentia sagittalis belirgin kortikal bir görüntüye sahip olup, dorsalden ventrale doğru uzanan dört farklı hücre tabakasından oluşmuştur. Bu tabakalar sırasıyla;

- Orta büyüklükte hücrelerle karakterize, yüzeysel bir tabaka olan hiperstriatum aksesorium,
- Granüler hücre yoğunluklu olan hiperstriatum aksesoriumun nukleus interkalatusu,
- Dağınık ve orta büyüklükte hücrelere sahip olan hiperstriatum interkalatum supremum ve
- Büyük hücre grupları içeren bir tabakayla karakterize olan hiperstriatum dorsale olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

Yapı içerisinde yer alan hiperstriatum aksesoriumun nukleus interkalatus bölgesi; beynin kaudal parçasından gelen görsel bilgileri, eminentia sagittalisin rostral parçasından gelen somatosensorial bilgileri ve talamik afferentleri getiren iki ayrı duyu lifini taşımaktadır (Wild, 1987b). Somatosensorial girişler, ilk olarak 1972 yılında Delius ve Bonnetto'nun güvercinler üzerinde yaptıkları çalışmalarında fark edilmiştir (Dubbeldam, 1991). Son bahsedilen bulgular 1987 yılında Wild tarafından daha spesifik bilgilerin ilave edilmesiyle doğrulanmıştır. Wild yaptığı çalışmasında, nukleus dorsalis intermedius ventralis anterior talami (DIVA) ve intermediate ve kaudal neostriatumun

(Ni, Nc)'un geçiş sahaları yoluyla talamik nukleus dorsolateralis posterior'a gelen projeksiyonları tarif etmiştir (Wild, 1987b).

Yapılan çalışmalarda eminentia sagittalis içerisinde yer alan hiperstriatum interkalatum supremumun beynin kaudal bölümlerinden gelen görsel bilgileri aldığı ifade edilmektedir. Eminentia sagittalisin bu son bahsedilen kısmına görsel Wulst adı verilmektedir. Görsel Wulst, retinal afferentlerin önemli bir hedefi olan dorsal talamik kompleksten bilateral projeksiyonlar da almaktadır (Wild, 1987b). Kısaca bu yapı, çıkan sistemlerin sonlandığı ve esas olarak, i telensefalonda karşılıklı bağlantıya sahip olması sebebiyle görsel bilgileri alan bir bölge olarak tarif edilmektedir (Dubbeldam, 1991)

Dorsal ventriküler kabartı terimini ilk olarak 1915'te Johnston kullanmıştır. (Dubbeldam, 1991). DVK'ın pallial bir yapı olduğu, ilk isimlendirmeden yıllar sonra ortaya konmuştur.

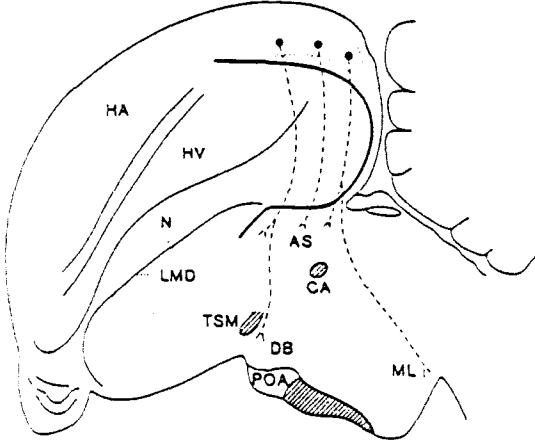
Ektostriatum (E) bir görsel son istasyondur. Kaudal neostriatumdaki L sahası, nukleus ovoidailisten gelen girişleri almakta ve bir işitme merkezi olarak bilinmektedir. Neostriatum ve hiperstriatum ventrale bölgelerinin yoğun bir biçimde intratelensefalik bağlantılara sahip olduğu belirtilmektedir. Bu bağlamda, tüm afferent sistemlerin fasiklus lateralis prosensefali (FPL) boyunca telensefalona girdiği söylenmektedir (Gamlin ve Cohen, 1986).

Arkistriatum; oksipitomezansefalik yollar vasıtasıyla, ekstralensefalik çıkış sistemlerinin büyük bir kaynağı olarak nitelendirilmektedir. Rostal ve intermediat arkistriatum, telensefalonda içerisinde bir çok hücre gruplarıyla yaptığı bağlantıları sebebiyle bir sensorimotor saha olarak kabul edilmektedir. Arkistriatumun medial ve kaudal bölümleri talamus üzerindeki belirgin projeksiyonlara sahip olması nedeniyle memeli amygdaloid kompleksin kuşlardaki homologu olarak kabul edilmektedir (Dubbeldam, 1991).

Neostriatum ve hiperstriatum ventrale ile ilgili olarak hücre yoğunluğu ve hücresel mimarileri göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda, bölge daha kk alt birimlere ayrılmıştır ve bu yapıların assosiasyon/koordinasyon fonksiyonlarına ilaveten, öğrenme ve hafızalamada etkin rol üstlendiği savunulmaktadır (Rehkamper ve Zilles, 1985).

2.1.2. Memeli Hippokampusunun Homoloğu Olarak Kabul Edilen Dorsomedial Kompleks (Hippokampus ve Parahippokampal Alan)

Hippokampus ve parahippokampalis (APH) adı verilen yapılar, Golgi preparasyonu tekniğiyle incelendiğinde, buralarda granüler ve pleksiform olmak üzere iki



Şekil 1: Sagittal yönde alınan bir kesitteki kuş hippocampusunun efferent bağlantı modellerinin şematik görüntüsü. HA: Hiperstriatum aksesorium, HV: Hiperstriatum ventrale, N: Neostriatum, TSM:Traktus septomezencefalikus, CA: Kommissura rostralis anterior, POA: Nukleus preoptikus anterior, AS: Area septalis. DB:Fasikulus diagonalis Broca, LMD: Lamina medullaris dorsalis, ML: Nukleus mamillaris lateralis. (Dubbelldam, 1991'den değiştirilerek alınmıştır.)

farklı hücre tabakası belirgin biçimde ayırt edilmektedir. Granüler tabakada; piramidal, bipiramidal ve multipolar hücreler görülürken, pleksiform tabakada yoğun olarak horizontal düzlemde yerleşmiş nöronlar bulunmaktadır (Casini ve ark., 1986).

Sağ ve sol hippocampus bölgeleri kendi aralarında yaptıkları yoğun bağlantılara ilaveten area parahippokampalis bölgesiyle de karşılıklı bilgi alışverişini sağlayacak lif sistemlerine de sahiptir (Casini ve ark., 1986).

Şekil 1'de gösterildiği gibi, hippocampus ve area parahippokampalis

olarak adlandırılan iki bölge birlikte hiperstriatum aksesorium ve Broca'nın diagonal bandından afferentlerini alırken, efferentlerini de septal nukleus ve Broca'nın diagonal bandına göndermektedir (Wild, 1987b).

Yapılan çalışmalarında, hipotalamus ve memeli fornixinin prekommissural parçasının eşdeğeri olduğu düşünülen efferent hippocampal sistem üzerinden hippocampusu ulaşan bağlantıları gösterememelerine rağmen, Casini ve arkadaşları 1986'da yaptıkları çalışmada lateral nukleus, mamillaris yakınlarında kaybolan ve hipotalamus üzerinden, bu bölgelere kadar ulaşan, az sayıda liflerin varlığını göstermişlerdir (Dubbelldam, 1991). Ayrıca Bradley ve arkadaşları 1985'de intermedial ve medial hiperstriatum ventrale (IMHV)'nin afferent kaynaklarını özetlerken, hippocampusla olan muhtemel bağlantılarından da söz etmişlerdir (Bradley ve ark., 1985).

Kuş dorsomedial kompleksinin bağlantıları ile memeli Hp+APH sahalarının karşılaştırılması yapıldığında; birçok benzerliğin varlığı hemen göze çarpmaktadır. Memelilerde hippokampustan gelen efferentler fornikse, hipotalamustaki mamiller cisme, septuma ve Broca'nın bandına kadar ulaşmaktadır. Hippokampal ve parahippokampal sistemin afferentlerinin kaynağı ise medial ve lateral enthorinal korteks, medial septal nukleus, lokus koruleus, dorsal ve medial raphe nukleusu ve supramamillar cisimlerdir. 1984 ve 1985 yıllarında Bingham ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, kuş dorsomedial korteksinin, cisimlerin uzaysal koordinatlarını belirlemede vazife görebileceğini bildirmiş olup, daha sonraki çalışmalarda bu bilgiler çeşitli araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır (Bingham ve ark., 1985).

2.1.3. Memeli Korpus Striatumunun Homoloğu Olarak Kabul Edilen Palaeostriatal Kompleks

1970 yılında Nauta ve Karten memeli ve kuşlar üzerinde yaptıkları karşılaştırmalı morfolojik çalışmalarında; internal ve eksternal striatum olarak nitelendirdikleri iki yapı tarif etmişlerdir. İnternal striatum veya bir başka ifade ile paleostriatal kompleks içerisinde;

- Memelilerde kaudat putameninin kuşlardaki homoloğu olduğu düşünülen palaeostriatum augmentatum ve lobus parolfactorius (LPO),
- Memelilerdeki globus pallidus eksternusun kuşlardaki homoloğu olduğu düşünülen paleostriatum primitivum,
- Memelilerde globus pallidus internusunun kuşlardaki homoloğu olduğu düşünülen nukleus intrapedinkularis ve
- Memelilerde nukleus akkumbensin kuşlardaki homoloğu olduğu düşünülen nukleus akkumbens adı verilen yapılar yer almaktadır (Dubbeldam, 1991).

Histokimyasal ve morfolojik bilgilerin birleştirilmesiyle ortaya çıkan sonuçlar, memeli korpus striatumunun bağlantılarının, kuşlarda homoloğu olan alanlarla çarpıcı benzerlikler gösterdiğini belirlemiştir. Memeli korpus striatumunda yer alan kaudat putamen, serebral neokorteksten ve substantia nigradan afferentler almakta, efferentlerini ise globus pallidus ve substantia nigraya göndermektedir (Dubbeldam, 1991).

Yapılan çalışmalarında, palaeostriatal kompleks içinde yer alan LPO'nun, tek başına neokortikalis frontalis ve hiperstriatum ventrale bölgesinden gelen liflere ilaveten, palaeostriatum augmentatum ile birlikte dorsal talamustan yoğun afferent girişler aldığını belirlemişlerdir (Wild, 1987a). Palaeostriatal kompleks içinde yer alan palaeostriatum augmentatum ve palaeostriatum primitivum bölgeleri afferentlerini genellikle efferent aldığı alanlara, LPO adı verilen yapının ise liflerini ansa lentikularis boyunca orta beynin tegmentumuna gönderdiği belirlenmiştir (Wild, 1987a).

2.1.4. Memeli Amygdal Nukleusunun Homoloğu Olarak Kabul Edilen Arkistriatal Kompleks

Arkistriatal kompleks ise;

- Memeli amygdala nukleusuna karşılık gelen arkistriatum posterior ve arkistriatum nukleus taenia ile,
- Memeli sensori motor korteksine karşılık gelen arkistriatum anterior ve arkistriatum intermedium adı verilen yapıları içermektedir.

2.2. ÖĞRENME VE HAFIZALAMA MEKANİZMALARI

İnsanlık tarihi boyunca öğrenme ve öğrenilen bilgilerin nasıl depo edildiği hep merak edilmiştir. Bu olayları açıklamaya yönelik bir çok görüş öne sürülmüştür. Öğrenme konusu ile ilgili yapılan çalışmalarda bir çok veri elde edilmesine rağmen, konunun tüm ayrıntısı henüz ortaya konulabilmiş değildir. Bu güne kadar nöronal mekanizmaları anlaşılamayan bilinç, düşünce, öğrenme ve hafıza gibi konuların temel yapısını açıklamak bütünüyle mümkün olmasa da, ilgili işlemlerin oluşumu sırasında beyinde meydana gelen morfolojik, biyokimyasal ve elektrofizyolojik değişiklikler izlenerek çeşitli hipotezler geliştirilmiştir.

Bilindiği gibi öğrenilen bilgilerin hatırlanma dereceleri de birbirlerinden farklılıklar arz etmektedir. Bazı bilgilerin hatırlanma süresi bir kaç saniye, bazıları ise saatler, aylar ve hatta yıllar sürebilmektedir. Hafıza oluşum zamanları göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda, bu işlemlerinin temelde aynı mekanizmalarla gerçekleştiği, ayrıntıda farklı yollarla beynin değişik bölgelerinde lokalize oldukları gösterilmiştir. Araştırmacılar öğrenme sonrasında nöronal aktivitenin artmasına bağlı olarak, harcanan enerjinin karşılanması için ilgili bölgede daha fazla glikoz kullanılması gerektiği gerçeğinden hareketle, deneklere bir öğrenme eğitiminden önce radyoaktif

olarak işaretlemiş 2- Deoksiglikoz 6 fosfat (2-DG) vererek, kullanılan artmış glikoz seviyesine bağlı, beyin bazı bölgelerinde 2-DG'un yoğunlaştığını gözlemişlerdir (Rose ve Csillag, 1985).

İlk olarak 1977 yılında Sokaloff ve arkadaşları öğrenme ve hafızalama konularıyla ilgili yaptıkları deneysel çalışmalarında; yukarıda adı geçen işaretleme ve izleme tekniğini kullanarak, hayvanlara verilen eğitime paralel olarak beyin bir kısım bölgelerinde meydana gelen değişiklikleri belirlemişlerdir. Beyinde ortaya çıkan bu farklılıkların, öğrenmeye bağlı olup olmadığını araştırmak ve ortaya çıkan bu farklılıkların hangi beyin bölgesinde gerçekleştiğini tespit etmek amacıyla, hayvanlara eğitim öncesi 2-DG verilerek, 13 farklı beyin bölgesini niteliksel (qualitative) ve niceliksel (quantitative) metotlarla analiz etmişlerdir. Niceliksel (qualitative) metotlarla, ilgili beyin bölgelerinde birbirlerinden farklı olmayan sonuçlara ulaşmalarına rağmen, niteliksel (quantitative) metotlarla, 4 beyin bölgesinin diğerlerinden 2-DG yoğunlaşması yönünden anlamlı farklılıklar gösterdiğini saptamışlardır (Rose ve Csillag, 1985). Bu beyin bölgelerinin;

- Hiperstriatum ventrale posterior,
- Palaeostriatal kompleksin ikinci bölgesi,
- Palaeostriatum augmentatum ve
- LPO olduğu belirtilmektedir.

2.2.1. Öğrenme Modelleri

Bu güne kadar öğrenme ve hafızalama çalışmalarında model hayvan olarak bir çok farklı tür ve bunların eğitilmeleri için çeşitli öğrenme modelleri kullanılmıştır.

Uygulanan bir öğrenme modelini takiben ilgili beyin bölgelerinde, nöronal düzeydeki değişiklikleri saptamak ve bu oluşumların beyin içi lokalizasyonlarını belirlemek için uygun denek ve deney düzeneklerine ihtiyaç vardır. Bu tür araştırmalarda iki farklı metot izlenmektedir. Bunlardan birincisi; model hayvanın belirli bir bilgiyi öğrenmesi işlemine paralel olarak farklı beyin bölgelerinde meydana çıktığı düşünülen morfolojik, biyokimyasal ve elektrofizyolojik düzeydeki değişikliklerin tespit edilmesidir. İkincisi ise nöronal aktiviteyi uyardığı bilinen bir takım biyokimyasal araçların bloklanması sonucu, hayvanlarda ortaya çıkan davranışların izlenmesi esasına dayanmaktadır (Morris ve Ark., 1988).

Öğrenme ve hafızalama işlemlerinin nöronal düzeydeki mekanizmalarını anlama amacı ile yapılan deneysel çalışmalarda, omurgasızlardan; sirke sineği (*Drosophila melanogaster*), *C. elegans*, omurgalılardan; kemiriciler, maymun ve köpek gibi hayvanlar model olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Son yıllarda çeşitli kuş türleri, yumurtadan çıktıklarında gelişmiş bir sinir sistemine sahip olmaları, kısa sürede bir çok şeyi hızlı öğrenmeleri, lezyon çalışmaları ve ilaç uygulamalarına elverişli olmaları gibi sebeplerle yaygın olarak tercih edilmektedir (Horn, 1981).

Öğrenme ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda bir eğitim modeli olarak

1. İmprinting (aşinalık, damgalama) öğrenme modeli,
2. Pasif sakınmanın öğrenilmesi (PSÖ) modeli sıklıkla kullanılmaktadır.

Damgalama; yeni doğmuş veya yeni yumurtadan çıkmış hayvanlarda, hayatın ilk günlerinde gerçekleşen lokomotor bir aktivite olarak tarif edilir. Doğal olarak var olan bu davranış biçiminin bir öğrenme modeli olarak kullanılmasındaki temel mantık, hayvanların hayatlarının ilk günlerinde görsel olarak algılayıp, alıştıkları objeler ile, yabancı oldukları objeler arasında tercih yapmaları esasına dayanmaktadır. Yani, görsel biçimde alıştıkları objelere yakınlık duyma davranışları ile, diğerlerinden sakınma davranışları, bir öğrenme modeli olarak kullanılmaktadır (Horn, 1981).

Başta söylendiği gibi, damgalamanın oluşum sürecinin temelinde objelerin görsel olarak öğrenilmesi ve bu şekilde depolanması vardır. Bu noktadan hareketle, iki grup hayvandan ilki yumurtadan çıktıktan veya doğumundan itibaren her hangi bir görsel uyarana maruz bırakılmadan yetiştirilirken, diğerleri belli sürelerle bir görsel uyarana maruz bırakılmak suretiyle eğitilmektedir. Bu tür çalışmalarda görsel olarak bir objeye maruz bırakılan hayvanların bu uygulamaya paralel bazı beyin bölgelerinde gerçekleşmesi beklenen değişiklikler, her hangi bir uyarana maruz bırakılmadan büyütülen grupla karşılaştırılmak suretiyle incelenmektedir (Horn, 1991). Geliştirilen bu modelin temel prensiplerine uyularak, çeşitli laboratuvarlarda farklı uygulamaları değişik hayvanlar üzerinde kullanılmaktadır.

İlk olarak 1969 yılında Cherkin'in fark ettiği, daha sonradan 1977'de Gibbs ve Ng, 1987 yılında ise Rose tarafından geliştirilerek kullanılan pasif sakınmanın öğrenilmesi (PSÖ) modelini; yeni kuluçkadan çıkmış veya yeni doğmuş hayvanların, hayatlarının ilk günlerinde etraflarında bulunan objeleri rasgele biçimde gagalamaya veya yemeye çalışma güdülerinin, ilerleyen zaman dilimi içerisinde edindikleri

tecrübelerle, kendilerine faydalı olan ve olmayan objeleri birbirlerinden ayırt edebilme davranışları oluşturmaktadır.

Bu modelde; doğal olarak gagalama refleksi olan civcivlerin görüntü alanlarına bir tel çubuğun ucuna takılmış boncuk getirilerek, gagalama refleksinin olup olmadığı kontrol edildikten sonra, gagalama refleksi olanlar, bu defa irrite edici maddeye (MeA) batırılan boncukla eğitilmektedirler. İrrite edici maddeye (MeA) batırılan boncuğu gagalayıp tipik sakınma reflekslerini sergileyen denekler daha sonra kendilerine sunulan benzer objeleri gagalamaktan sakınmaktadırlar. Öğrenme çalışmalarında, bu tür bir tecrübi bilgiyi edinen ve bundan mahrum bırakılan hayvanların bazı beyin bölgeleri morfolojik, biyokimyasal, ve elektrofizyolojik yönlerden karşılaştırmalı olarak incelenmektedir (Rose, 1989).

2.2.2. Öğrenmeyi Takiben Beynin Bazı Bölgelerinde Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler

Bilindiği gibi öğrenmeye bağlı olarak beynin bir kısım bölgelerinde hangi mekanizmayla olursa olsun nöronal aktivitenin artması kaçınılmazdır. Artan bu aktiviteyle uyumlu olarak ilgili yerlerde enerji kullanımı artacağından eğitim öncesi hayvanlara radyoaktif işaretli 2-DG verilerek, postmortem beyin yapıları autoradiografik tekniklerle izlenirse, nöronal aktivitenin yoğunlaştığı bölgeler kolaylıkla saptanabilir.

Daha önce sözü edilen öğrenme modellerinden herhangi birinin uygulanmasını takiben, hayvanların IMHV ve LPO olarak adlandırılan beyin bölgelerinde diğer bölgelere göre göze çarpan anlamlı farklılıklar kaydedilmiştir (Doubell ve Stewart, 1993, Stewart ve ark., 1992, Serrano ve ark., 1992, Lowndes ve Stewart, 1994, Horn ve ark., 1985). Konunun akışı içerisinde sırasıyla IMHV, LPO ve ilave olarak araştırma konumuz olan hipokampusta öğrenme ve hafızalama konuları ile ilgili olarak yapılan çalışmalar anlatılacaktır.

Bir Öğrenme Modeli Uygulandıktan Sonra Civciv IMHV Bölgesinde Ortaya Çıkan Morfolojik Değişiklikler ve Bu Değişikliklerin Yorumlanması

Öğrenme ve hafızalama çalışmalarında, yumurtadan yeni çıkmış civcivlere, öğrenme modellerinden birisinin uygulanmasından sonra, öğrenme, motor, duyuşsal ve davranışsal merkezlerle ilişkisi olan ve bunları birbirlerine bağlayan IMHV bölgelerinde

(Bradley ve ark., 1985) ortaya çıkan morfolojik, biyokimyasal ve elektrofizyolojik düzeydeki değişiklikler izlenerek bunların öğrenme işlemi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Horn ve arkadaşları 1985 yılında yaptıkları bir öğrenme modeli olan damgalama uygulaması sonrasında, civciv IMHV bölgelerindeki değişiklikleri araştırmışlardır. Bu deneyde kullanılan üç grup hayvandan; birinci gruptakiler; yumurtadan çıktıktan sonra tamamen karanlık bir ortamda, hiç bir ışık uyarana maruz bırakılmadan bekletilmiştir. İkinci gruptakiler; yumurtadan çıktıktan sonra 21. saate kadar karanlık ortamda bekletilmiş, bu saatten itibaren 20 dakika süreyle yanıp sönen kırmızı bir ışık ortamına alınmışlardır. Daha sonra hayvanlar ilk önce bekletildikleri karanlık yere alınarak otuzuncu saate kadar yaşatılmışlardır. Üçüncü grupta bulunan hayvanlar, bir öncekilerden farklı olarak, ışık ortamında 140 dakika bekletildikten sonra otuzuncu saate kadar yaşamalarına izin verilmiştir. Otuzuncu saatte hayvanların hayatlarına son verilip, ilgili bölgede dendritik diken (spine) ve dendritik şaft sinapsların sayısal yoğunlukları ile bunların postsinaptik yoğunlaşma uzunluklarında ortaya çıkan değişiklikler elektron mikroskopik düzeyde yeni stereolojik metotlarla değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonunda 20 dakika süreyle eğitilen civcivlerde, postsinaptik yoğunlaşma uzunluğu, kontrol grubundakilerle karşılaştırıldığı zaman, ne sağ, ne de sol IMHV bölgesinde bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir. Buna karşın 140 dakika süreyle eğitilen civcivlerin sol IMHV bölgesinde kontrolleriyle kıyaslandığında, % 17.2'lik bir artış gözlenmiştir. Aynı araştırmacılar yukarıda bahsedilen deney protokolü dahilinde civcivleri 1, 2 ve 3 saat ışık uyarana maruz bıraktıktan sonra 46. saate kadar karanlık bir ortama alarak bekletmişlerdir. Diğer grup ise, yaşamlarının ilk dakikasından itibaren hiçbir ışık uyarana maruz bırakılmadan 46. saate kadar karanlık bir ortamda yaşatılmışlardır. 46. saatten itibaren hayvanlar öldürülerek ışık uyarana maruz bırakılanlar ile diğer gruptakilerin hem sağ, hem de sol IMHV bölgesindeki diken (spin) sinapsların postsinaptik yoğunluklarının uzunlukları ölçülmüştür. Bu ölçümler neticesinde 1, 2 ve toplam 3 saat ayrı ayrı ışık uyarana maruz bırakılan hayvanlarda uyarının süresine bağlı olarak ilgili parametrenin sol IMHV bölgesinde arttığı belirlenmiştir (Horn ve ark., 1985).

Elde edilen bu veriler beraber değerlendirildiğinde bir eğitim uygulamasına bağlı olarak yani bir öğrenme süreci dahilinde hayvanların IMHV bölgesinde kontrol gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı farklılıkların ortaya çıktığı saptanmıştır. Ayrıca

uyaranın süresine bağlı olarak meydana gelen farklılıkların şiddetinin artması gerçeği, araştırmacılara bu bölgenin öğrenme ve hafızalama ile ilgili olabileceği yorumunu yaptırmıştır (Horn ve ark., 1985).

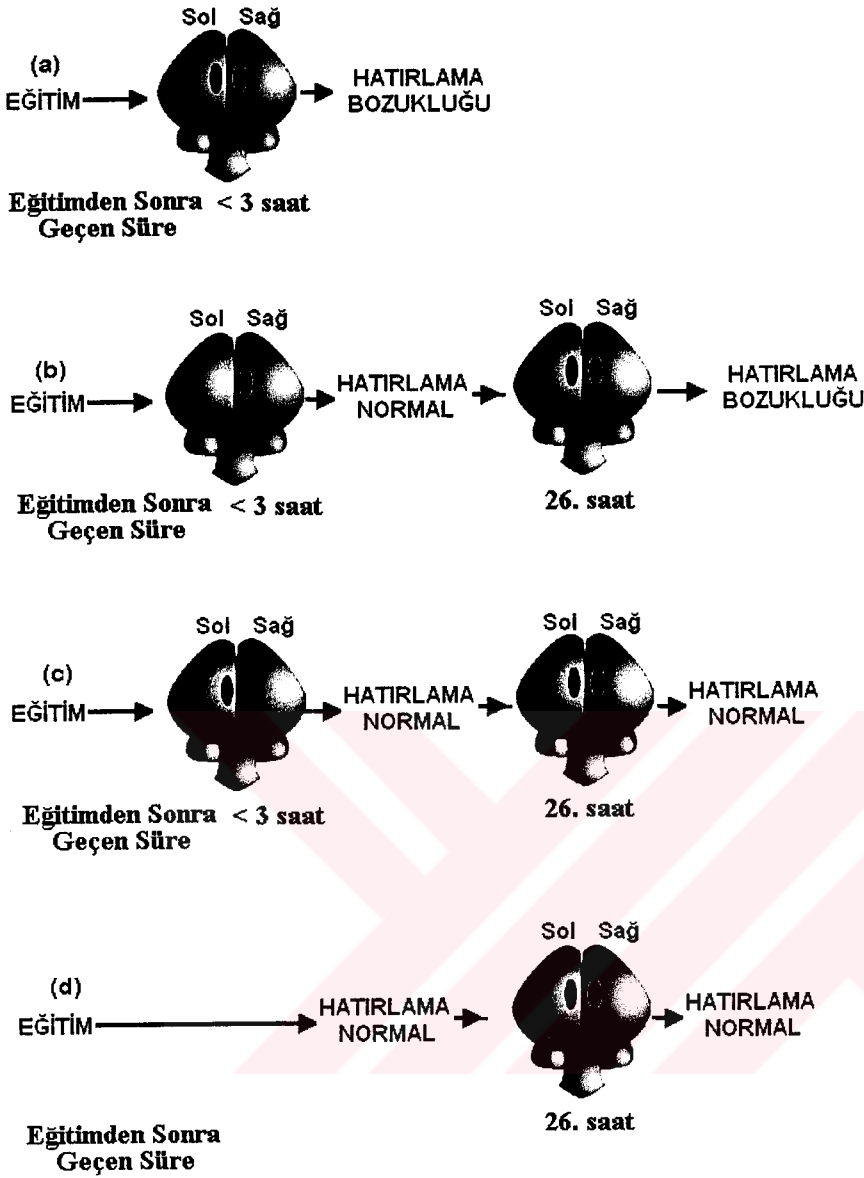
1993 yılında Doubell ve Stewart yaptıkları çalışmada, bir günlük civcivlere PSÖ eğitim modelini uyguladıktan sonra, IMHV bölgesinde ortaya çıkan morfolojik farklılıkları analiz etmişlerdir. Bu çalışmada ilgili bölgedeki sinapsların sayısal yoğunlukları esas alınarak, ölçüm ve değerlendirmeler yeni stereolojik metotlarla yapılmıştır. PSÖ'yü takip eden 1. ve 24. saatlerde hayvanların IMHV bölgelerindeki aksospinos sinapsların sayısal yoğunluğundaki değişikliklere bakıldığında; 1.saat içinde hayvanların sağ IMHV bölgesinde kontrol gruplarıyla kıyas edildiğinde sinaps yoğunluğunda % 77'lik bir artış gözlenirken 24. saatte ne sağ ne de sol IMHV bölgesinde sinaps yoğunluğunda anlamlı bir farklılığın olmadığını belirlemişlerdir.

Buna paralel olarak Stewart ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada, PSÖ modelini uyguladıktan 10 dakika sonra sol IMHV bölgesinde sinapsların sayısal yoğunluğunda % 70, 60 dakika sonra sağ IMHV bölgesinde kontrolleriyle kıyas edildiğinde % 77'lik bir artış olduğunu ve uygulamanın erken saatlerinde ortaya çıkan bu farklılıkların 24. saatte kaybolduğunu saptamışlardır (Stewart ve Lowdnes, 1992).

Elde edilen bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde; bu bölgenin öğrenme ve hafızalama işleminde önemli role sahip ve öğrenmeden kısa bir süre sonra ortaya çıkıp daha sonra kaybolan yapısal farklılıkların, kısa süreli hafızayla ilgili olduğu sonucu çıkmaktadır.

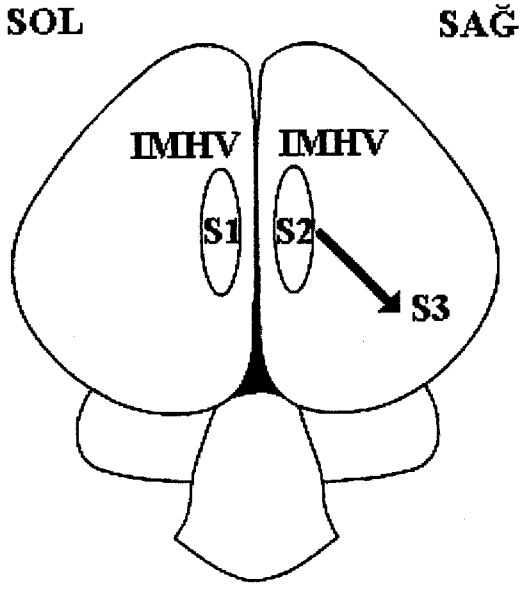
Bir Öğrenme Modeli Öncesi ve Sonrasında Civciv IMHV Bölgelerine Uygulanan Lezyonların Ortaya Çıkarttığı Davranış Farklılıkları ve Bunların Yorumlanması

IMHV bölgesinde daha önce sözü edilen öğrenmeyle ilgili ortaya çıkan hemisferik asimetriyi göstermek için yapılan lezyon çalışmalarında da oldukça ilginç sonuçlara ulaşılmıştır. Öğrenme öncesi ve öğrenme sonrasında ya her iki hemisferindeki IMHV bölgelerine veya bu bölgelerden herhangi birisine elektrokoagulatif biçimde uygulanan lezyonlardan sonra hayvanların davranışları izlenerek, Şekil 2'de gösterilen sonuçlar elde edilmiştir (McCabe, 1991).



Şekil 2: Bir öğrenme modeli sonrasında farklı zaman aralıklarında civciv IMHV bölgesindeki lezyon uygulamalarının davranışsal etkilerinin şematik görüntüsü. (McCabe, 1991'den değiştirilerek alınmıştır).

Yapılan çalışmada; eğitimden 3 saat sonra civcivlere uygulanan bilateral IMHV tahribinin amnezi oluşturduğu, aynı koşullarda sol veya sağ IMHV bölgesindeki lezyonların herhangi bir bozukluğa sebep olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 2 b ve c de görüldüğü gibi; yalnız başına sol veya sağ IMHV bölgesine uygulanan lezyonlar hatırlama fonksiyonunda bir bozukluğa sebep olmamaktadır. Eğitimin ardından sağ IMHV bölgesi tahrip edilen hayvanların, daha sonra sol IMHV bölgesine bir lezyon uyguladığında (26 saat sonra) amnezi gelişmesine rağmen, diğerlerinde yani sol IMHV bölgesi tahrip edilenlerin, sağ IMHV bölgesine bir lezyon uygulaması sonrasında,



Şekil 3: Edinilen bilgilerin hayvan ön beyinde zamanın ilerlemesiyle beraber çeşitli hafıza biçimlerine dönüştürülmek üzere sırasıyla nakledildiği bölgelerin şematik çizimi (McCabe, 1991'den alınmıştır.)

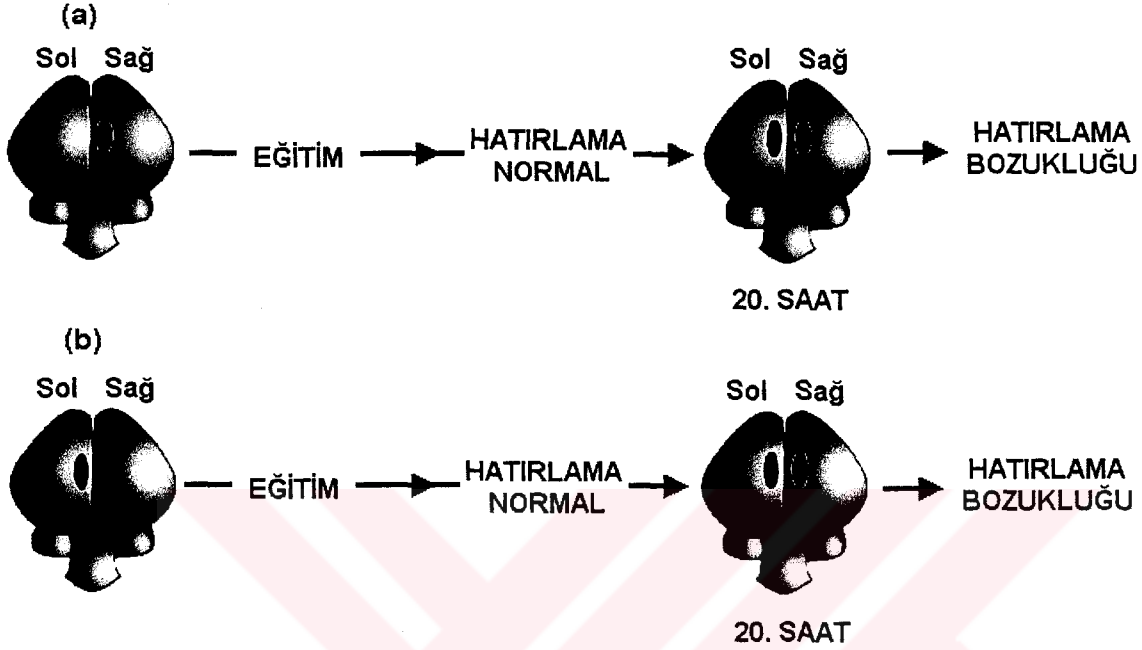
herhangi bir hatırlama bozukluğu oluşmamaktadır. Bu sonuçlar, bize öncelikle IMHV bölgesinde öğrenmeyle alakalı bir fonksiyonel asimetrinin varlığını, bir başka ifadeyle sol IMHV bölgesinin pasif sakınmanın öğrenilmesinde (PSÖ) başat rol üstlendiğini göstermektedir.

Bu bilgilerden yola çıkarak; IMHV bölgesinin bir bilgi depolama yeri olduğu, morfolojik değişikliklerin sol IMHV bölgesine özgü olduğu ve sağ IMHV bölgesinin de bir depo gibi işlev görmesine rağmen, sol IMHV bölgesinden farklı şekilde hareket ettiği savunulmaktadır (Horn ve ark., 1985).

Şekil 3'te şematize edildiği gibi gibi, araştırmacılar bilgilerin öncelikle sol IMHV bölgesinde depolandığını, buradan bir süre sonra sağ IMHV bölgesine aktarıldığını, daha sonraki zaman dilimleri içerisinde ise bilgilerin IMHV dışında başka bir merkeze aktarıldığını savunulmaktadır. Şekil 2b'ye tekrar bakacak olursak, önce hayvanlar eğitilmiş ve eğitimden 3 saat sonra sağ IMHV bölgesine bir lezyon uygulanmıştır. Bu durumda hayvanlar öğrendiklerini sol IMHV bölgelerinde depolayacak, sağ tarafta hasar olduğu için bilgilerin buraya nakli gerçekleşmeyecektir. Uygulamada sağ IMHV bölgesi sağlam bırakılmış olsaydı, sol IMHV bölgesinde lezyon oluşturulacağı zamana kadar, yani eğitimden sonraki 3 saat içerisinde, bilgiler sağ IMHV bölgesine aktarılacaktı. Soldan sağa nakledilen bilgiler ise ilerleyen zaman içerisinde son olarak başka bir depolama merkezine gönderilecekti. Yine şekil 2c'de görüldüğü gibi bilgiler, önce sol IMHV bölgesinde depolanmış, bu bölgeye 3. Saatte uygulanan lezyondan önce bilgiler sağ IMHV bölgesine aktarılmıştır. Yani sonradan yapılan lezyonların, hatırlama fonksiyonuna her hangi bir olumsuz etkisi olmamaktadır. Araştırmacılar bu verilerden hareketle sağ IMHV bölgesine aktarılan bilgilerin, 26. saate kadar başka bir merkeze

nakledilmiş olması sebebiyle, bu saatten sonra sağ IMHV'ye lezyon uygulamalarının her hangi bir etki oluşturmayacağı sonucuna ulaşmışlardır (Davey ve ark., 1987).

Aynı çalışma grubu bu defa hayvanların IMHV bölgelerine eğitim öncesi lezyon uygulayarak, sonuçlarını incelediklerinde, şekil 4'de gösterilen sonuçlara ulaşmışlardır.



Şekil 4: Bir öğrenme modeli öncesinde civciv IMHV bölgelerinde (sağ- sol) uygulanan lezyonların ardından ortaya çıkan davranışları gösteren şematik çizimi. (McCabe, 1991'dan değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 4a'da görüldüğü gibi, yeni yumurtadan çıkan civcivlere, herhangi bir işlem yapılmadan önce, sağ IMHV bölgeleri elektrokoagulatif yolla lezyonlanarak devre dışı bırakılmıştır. Sağ tarafları fonksiyon dışı bırakılan hayvanlar eğitildiğinde, bu işlemin öğrenme ve hafızalama performansı ile ilgili bir bozukluğa sebep olmadığı belirlenmiştir. 20 saat sonra aynı gruptaki hayvanların sol IMHV bölgeleri devre dışı bırakıldığında (önceden sağ IMHV'leri lezyonlananlar), hatırlama fonksiyonlarının tamamen bozulduğu görülmüştür. Şekil 4b'de ifade edilmeye çalışılan denemede ise bir önceki uygulamanın tersi gerçekleştirilerek benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

Araştırmacılar, eğitim öncesi lezyon uygulama çalışmalarında, şekil 4a'da sonuçları ifade edilen verilerin daha önceki çalışmalarla uyumlu, şekil 4b'de ifade edilen verilerin ise daha önceki çalışma sonuçlarıyla ters düştüğünü fark etmişlerdir. Yani eğitim öncesi sağ IMHV bölgesi devre dışı bırakılan hayvanlarda, bilgiler sol IMHV bölgesinde işlem görecektir, fakat sağ taraf hasarlı olduğundan bu alana aktarılamayacaktır. Bu durumda sol taraf öğrenme ve hafızalama işlemlerinde kritik bir

rol üstlenmiş olacak, başka bir alana aktarılamayan bilgiler, buranın da devre dışı bırakılmasının ardından silinecektir. Şekil 4b'de ifade edilen diğer uygulamada eğitim öncesi sol IMHV bölgesi devre dışı bırakılan hayvanların, ilgili işlemleri sağ taraflarıyla gerçekleştirdikleri görülmektedir. Daha önce anlatıldığı gibi, edinilen bilgiler sol IMHV' den sağ IMHV' ye, buradan da belli zaman süresi içerisinde başka alanlara aktarılmaktadır. Oysa bu son durumda, beklenenin aksine sağ IMHV bölgesinde depolanan bilgiler başka alanlara aktarılamamıştır. Yani sağ tarafın devre dışı bırakılmasıyla beraber hayvanlarda belirgin bir hafıza bozukluğu ortaya çıkmıştır. Ortaya çıkan bu durumu açıklama gayesiyle yapılan çalışmalarda görülmüştür ki; sol IMHV'nın eğitim öncesinde devre dışı bırakıldığı durumlarda, sağ IMHV sol IMHV'nın sağlam kaldığı durumlardaki gibi fonksiyon görmekte fakat depoladığı bilgileri başka bir yere aktaramamaktadır. Buradan sağ IMHV'nın asıl fonksiyonunun sadece aldığı bilgileri geçici bir şekilde depoladıktan sonra başka merkezlere aktarmak olduğu sonucu çıkarılmıştır (Horn ve ark., 1985, Curtis ve Stewart, 1989).

Bir Öğrenme Modeli Uygulandıktan Sonra Cıvciv LPO Bölgesinde Ortaya Çıkan Morfolojik Değişiklikler ve Bu Değişikliklerin Yorumlanması

Memelilerde kauda putamen adı verilen yapının homoloğu olduğu embriyolojik, morfolojik ve biyokimyasal çalışmalarla kanıtlanmış olan palaeostriatum augmentatum ve LPO, hemisferlerin beyaz cevheri içerisine gömülmüş, görelî olarak büyük, gri bir cevher kitlesi olarak tarif edilmektedir (Szekely ve ark., 1994, Lowdnes ve Stewart, 1994) Bilindiği gibi ekstrapiramidal motor sistemini oluşturan bazal gangliyonlar, günlük yaşam içerisinde bilinci zorlamadan yapılan bir takım kalıp hareketlerin kontrolünde görev almaktadır. Yemek yemek, yüzmek kanat çırpma, gibi önceden öğrenilip sonradan otomatik olarak yapılan hareketleri düzenler. Memelilerde kauda putamen olarak adlandırılan ve kuşlarda homoloğu olarak bilinen LPO bölgesi ise sözü edilen fonksiyon bütünlüğü içerisinde daha önceden öğrenilerek yapılan bir amaca yönelmiş kapsamlı faaliyetlerin planlanması ve düzenlenmesinde işlev görmektedir (Lowdnes ve Stewart, 1994).

Stewart ve ark., 1992 yılında yaptıkları çalışmada, pasif sakinmanın öğrenilmesi (PSÖ) eğitimini takiben, bir günlük cıvcivlerin LPO bölgelerinde sinapsların sayısal yoğunluğunu stereolojik metotlarla hesaplandıklarında; eğitimden 24 saat sonra hayvanların sol LPO bölgesinde %30 ve eğitimden 48 saat sonra, kontrolleriyle

kıyaslandığında, sağ ve sol LPO bölgelerinde adı geçen parametrede anlamlı artışlar olduğu gösterilmiştir. Sinapsların içerisindeki veziküllerin sayısal yoğunluğu temel alınarak yapılan araştırmada ise kontrolleriyle kıyas edildiğinde eğitimden 24 saat sonra, sol LPO bölgelerinde % 60'lık bir artış tespit edilmiştir (Stewart ve ark., 1992).

Hunter ve Stewart 1993 yılında pasif sakınmanın öğrenilmesinden sonra civciv LPO bölgesinde sinapsların sayısal yoğunluğundaki artma ” başlığı altındaki çalışmalarında, PSÖ ile eğitilen bir günlük civcivlerin LPO bölgesinde sinapsların sayısal yoğunluğunda bir artmanın varlığını göstermişlerdir Gruplarda bulunan hayvanların 1., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde hayatlarına son verilerek (eğitimden sonra) sağ ve sol LPO bölgeleri incelenmek üzere çıkartılmıştır. Daha sonra sağ ve sol LPO bölgelerindeki sinapsların sayısal yoğunlukları ayrı ayrı stereolojik metotlardan fiziksel disektör ile hesaplanmıştır. Çalışmanın başlangıcından 12. saate kadar geçen süre içerisinde, kontrolleriyle kıyas edildiğinde, eğitilen hayvanların sinaps sayısal yoğunluk değerinde, istatistiksel olarak fazla bir anlamı olmasa bile tedrici bir artış gözlenmiştir. Eğitimden sonra 24. saatten itibaren eğitilen civcivler kontrolleriyle kıyaslandığında, sol LPO'larında sinapsların sayısal yoğunluğunda (Nv syn) %31'lik bir artışın varlığı tespit edilmesine rağmen; aynı zaman diliminde sağ LPO bölgesinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. 48. saatte ise eğitilen civcivlerin sinaps sayısal yoğunluğunda sol LPO bölgesinde %10 ve sağ LPO bölgesinde % 17'lik bir artma ortaya çıkmıştır. Görüldüğü gibi 24. saatte sol tarafta %31'lik artış 48. saatte %10 değerine gerilerken, 24. saatte sağda anlamlı bir artış yokken 48. Saatte bu değer %17'ye çıkmıştır. Elde edilen bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde; Eğitilen civcivler, kontrolleriyle kıyaslandığında, 24. saatte sol LPO bölgesinde, 48. saatte sağ LPO bölgesinde sinapsların sayısal yoğunluğunda artma ortaya çıkmaktadır. Soldan sağa doğru zamana bağlı olarak ortaya çıkan bu değişikliklerin fonksiyonel bir anlamı olup olmadığı tam olarak bilinmese de, IMHV bölgesinde PSÖ'den sonra görülen sinapsların sayısal yoğunluğundaki asimetriyi andırmaktadır (Lowdnes ve Stewart, 1994). Bu bölgenin elde edilen verilerden uzun süreli hafıza ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Bir Öğrenme Modeli Uygulanmasına Bağlı Olarak Civciv IMHV ve LPO

Bölgelerinde Ortaya Çıkan Morfolojik Değişikliklerin Birlikte Değerlendirilmesi

Serrano ve arkadaşları (1992), hayvanlara PSÖ eğitimi uygulamadan önce, hafıza işlemleri ile ilgili olduğu düşünülen bölgelere (LPO ve IMHV), bir takım

amnezik ajan enjekte ederek, buna bağı olarak değişen hayvan davranışlarını, kontrol gruplarıyla karşılaştırmışlardır.

Tablo II :Pasif sakinmanın öğrenilmesinden (PSÖ) kısa bir süre önce IMHV ve LPO bölgelerine ayrı ayrı uygulanan amnezik ajanların, uygulamadan 24 saat sonra ortaya çıkan karşılaştırmalı etkileri. (Serreno ve ark.,1992)

Glutamat dozları (µm)	Hatırlama yüzdesi		Ouabain dozları (µm)	Hatırlama yüzdesi		Emetine dozları (µm)	Hatırlama yüzdesi	
	LPO	IMHV		LPO	IMHV		LPO	IMHV
SF	% 89	% 84	SF	% 87	% 84	SF	% 83	% 84
35	% 78		0.02	% 65		0.75	% 72	
40	% 80		0.027.	% 50*	% 39*	1.5	% 82	
50	% 77	% 41*	0.035	% 51*		2.25	% 80	
60	% 78		0.04	% 38*		3.0	% 79	
70	% 83		0.05	% 40*		4.0		% 47*
						4.5	% 73	
						6.0	% 61	

Amnezik ajan olarak glutamat, ouabain, ve emetin'in belli dozları uygulanan hayvanlar ile serum fizyolojik (SF) uygulanan kontrol grupları karşılaştırılmıştır. Bu çalışma ile PSÖ eğitiminden 5 dakika önce uygulanan ajanların, 24 saat sonra hayvanların öğretilenleri hatırlayıp hatırlamadıkları temel kabul edilerek gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2'de belirtildiği gibi, kullanılan ajanlar ayrı ayrı, belli doz aralıklarında IMHV ve LPO bölgelerine enjekte edildiğinde, glutamat ve emetin'in hiç bir dozu LPO bölgesinde herhangi bir etki oluşturmazken, aynı yere uygulanan ouabain'in 0.027 mikrolitrelik dozunun bile belirgin bir hatırlama bozukluğuna sebep olduğu görülmektedir. Belirtilen dozlarda bu üç ajandan her birinin IMHV bölgesine uygulaması sonucunda anlamlı hatırlama bozukluklarının ortaya çıktığı ifade edilmektedir.

Bu amnezik ajanların etkiledikleri bölge ve etkileşim zamanı göz önüne alınarak yapılan analizlerde; IMHV bölgesinde hatırlama fonksiyonu ile ilgili olarak, ouabain ve glutamatın etkisi, SF verilen kontrolleriyle kıyaslandığında; eğitimden önce verilen glutamatın eğitimden sonra 5. dakikada, ouabain ise 10. dakikada amnezi oluşturmaya başladığı görülmektedir. Aynı bölge içerisine, aynı şartlarda enjekte edilen iki farklı ajanın, etkin olmaya başlamaları arasındaki zamansal farklılık, ilaçların değişik hafıza evrelerini etkiledikleri yorumuna sebep olmaktadır. Bu verilerden hareketle IMHV

bölgesinin hem kısa süreli (STM), hem de orta süreli (ITM) hafızayla ilişkili bir merkez olabileceği iddia edilmektedir.

Deneyde uygulanan amnezik ajanlardan yalnızca ouabainin LPO bölgesinde etkin olduğunu gören araştırmacılar, ilaç uygulamasını takiben, bu bölgede hafıza bozukluğunun zamanlamasını araştırmışlardır.

Eğitimden önce LPO bölgesine uygulanan ouabainin eğitimden sonra 15. dakikadan itibaren etkili olduğunu fark eden araştırmacılar, bunun ya ayrı bir hafıza evresini veya IMHV bölgesinde başlangıcı oluşturulan orta süreli hafızanın, gerektiğinde uzun süreli hafıza formasyonuna dönüştürülmek üzere aktarıldığı, LPO bölgesini etkilediği yorumunu yapmışlardır.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda deney protokollerinin, deneklerin, öğrenme modellerinin ve sonuçlar üzerinde doğrudan etkili olan tarafsız ölçüm metotlarının kullanılmasıyla beraber hafıza oluşumu ve evreleriyle ilgili bilgiler daha belirgin hale getirilmiştir. Elde edilen bu bilgiler ışığında, hafıza oluşum evreleri;

- a. Kısa Süreli Hafıza Evresi,
- b. Orta Süreli Hafıza Evresi ve
- c. Uzun Süreli Hafıza Evresi olarak belirlenmiştir.

Hafıza oluşumu ve evrelerinin anlaşılmasına yönelik olarak. Ng ve Gibbs (1991), daha önce sözünü ettiğimiz, pasif sakınmanın öğrenilmesi (PSÖ) modelinin oldukça değişik bir modifikasyonunu, 1 günlük civcivlere uyguladıklarında, hayvanların hatırlama sürecinde, ikiden daha fazla belirteci kullandıkları ile ilgili kanıtlar bulmuşlardır. Öğrenme sonrasında kullanılan amnezik bir ajanın etkisi ve etkileme zamanı bu ajan tarafından etkilenen nöronal işlemlerin evrelerini belirlediğinden, bu çalışmada, bir öğrenme modelinin uygulanmasından sonra bilgileri alarak hafızalarına depoladığı düşünülen hayvanlara, hafıza oluşum evrelerinin mekanizması ve şeklini belirlemek için, çeşitli farmakolojik inhibitörler verilmiş ve ortaya çıkan davranışsal etkiler gözlenmiştir. Buna göre:

Uzun süreli hafıza evresinin oluşum mekanizması ve oluşum süreleri: Hafıza oluşumu ve bunun evrelendirilmesi ile ilgili olarak geliştirilen bir çok hipotezden en makul olanı, kalıcı veya uzun süreli hafızanın kodlanmasının temelinde protein sentezinin olduğu görüşüdür. Bu hipotezin doğru olup olmadığını tespit etmek gayesiyle yapılan çalışmalarda, bir kısım antibiyotiklerin etkin maddesi olarak bilinen protein

sentez inhibitörlerinin kullanımına bağlı olarak gelişen hafıza bozuklukları gösterilmiştir.

Tablo III: Uzun süreli hafıza üzerinde amnezi oluşturan ajanların etkileri, etkileme biçimleri ve etkileşim zamanları (Ng ve Gibbs, 1991).

UYGULANAN AJANLAR	Zaman aralıkları (dak.)	Zamanlar (dak.)	Etki mekanizmaları
ANTİBİYOTİKLER			
1-Cycloheximide	0-20. dak.	60. dak.	Direkt protein sentez inhibitörü
2-Anisomycin	0-20 dak.	60. dak.	Direkt protein sentez inhibitörü
AMİNO ASİTLER			
1-Bir çok esansiyel olmayan aminoasit	0-5. dak.	60. dak.	İndirekt protein sentez inhibitörü.
ANTİKORLAR			
1 Polyclonal asitler	0-10. dak.	60. dak.	THY-1 moleküllerinin bloklanmasıyla
2-Monoclonal asitler	0-10. dak.	60. dak.	THY-1 moleküllerinin bloklanmasıyla
3-Saflaştırılmış IgG	0-10. dak.	60. dak.	THY-1 moleküllerinin bloklanmasıyla

Tablo 3’de ifade edildiği gibi antibiyotiklerin etkileme şekli ne olursa olsun bu tür ajanların kullanımına bağlı olarak, hayvan davranışlarında zamansal uyumlu olarak vuku bulan değişikliklerin varlığı, hafıza oluşumunda çoklu evrelerin varlığına işaret etmektedir. Örneğin anisomycin veya cycloheximide gibi protein sentez inhibitörlerinin öğrenmeden sonra 0 ile 20. dakikalar arasında hayvanlara intrakranial olarak verilmesi neticesinde, eğitimden 60 dakika sonra belirgin bir amnezi oluşturmakta, aynı ilaçlar yukarıda bahsedilen süreler dışındaki zamanlarda uygulanırsa anlamlı bir etkileri gözlenmektedir. Elde edilen sonuçlar, ilgili bölgelerin protein sentez inhibitörlerine belli zamanlarda duyarlı olduğunu göstermektedir.

Orta süreli hafıza evresinin oluşum mekanizması ve oluşum süreleri: Orta süreli hafıza uzun süreli hafıza oluşumundan önceki bir ara evre olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu evrenin oluşum aşamasında sodyum pompasının etkin olduğu ve sodyum pompa inhibitörlerinin kullanımına bağlı olarak, kayıt işlemlerinin bozulduğu belirlenmiştir.

Tablo 4’te gösterildiği gibi sodyum pompa inhibitörleri olarak bilinen ouabain ve ethacrynic asitin hayvanlara bir öğrenme işlemi takip eden 0 ile 5. dakikalar arasında intrakranial olarak uygulanması sonucunda, 20. dakikadan sonraki zamanlarda belirgin bir hatırlama bozukluğuna sebep olması, adı geçen bu evrenin kullanılan bu

ajanlara belli zamanlarda duyarlı olduğunu göstermektedir. Orta süreli hafıza evresi için yapılan yorumlarda, öğrenmeden sonraki 0 ila 10. dakikada oluştuğu, 20 dakikadan 60. dakikaya kadar geri çağrılabilceği söylenmektedir. Bununla beraber ouabainin amnezik etkisinin bir antikonvülsan olan diphenilyhydantoinin subkutenoz enjeksiyonu sonucu hayvanlarda Na^+ / K^+ ATPase aktivitesinin stimüle edilmesiyle önleniyor olması da teoriyi desteklemektedir.

Tablo IV Orta süreli hafıza üzerinde amnezi oluşturan ajanların etkileri, etkileme biçimleri ve etkileşim zamanları (Ng ve Gibbs, 1991).

UYGULANAN AJANLAR	Zaman aralıkları (dak.)	Zamanlar (dak.)	Etki mekanizmaları
Ouabain	0-5. Dak.	20. Dak.	Sodyum pompasının inhibe edilmesi yoluyla
Ethacrynic asit	0-5. Dak.	20. Dak.	Sodyum pompasının inhibe edilmesi yoluyla
2,4 Dinitrophenol	5-25. Dak.	5. Dak.	ATP sentezinin inhibe edilmesi yoluyla

Kısa süreli hafıza evresinin oluşum mekanizması ve oluşum süreleri:

Öğrenmeyi takip eden 10. dakikaya kadar hatırlamanın normal seviyesinin mevcudiyeti ve bu zaman aralığında depo merkezinin sodyum pompa inhibitörlerine duyarlı olmaması, hafızanın şimdiye kadar bahsedilenlerden daha erken oluşan bir evresini ima etmektedir.

Tablo V: Kısa süreli hafıza üzerinde amnezi oluşturan ajanların etkileri, etkileme biçimleri ve etkileşim zamanları (Ng ve Gibbs, 1991).

UYGULANAN AJANLAR	Zaman aralıkları (dak.)	Zamanlar (dak.)	Etki mekanizmaları
1- 1-2 mM KCL	0-2.5 dak.	5. dak.	K^+ konsantrasyonunu etkileyerek nöronların depolarize edilmesi yolu ile
2- 154 mM KCL	0-2.5. dak.	5. dak.	K^+ konsantrasyonunu etkileyerek nöronların depolarize edilmesi yolu ile
3- Monosodyum glutamat	0-2.5. dak.	5. dak.	K^+ konsantrasyonunu etkileyerek nöronların depolarize edilmesi yolu ile
Lanthanium klorid	0-2.5. dak.	5. dak.	Kalsiyum kanallarını bloklanması yolu ile nöronların depolarize edilmesi ile

Yapılan çalışmalarda öğrenmeyi takiben 0 ile 2.5. dakika içerisinde intrakranial olarak verilen nöronal depolarizan ajanların, öğrenmeyi takip eden 5. dakikadan itibaren hafıza bozukluğuna sebep olduğu gösterilmiştir (Tablo 5).

2.3. HİPPOKAMPAL FORMASYON VE BU BÖLGEDE ÖĞRENME İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Kuş hippocampal formasyonu hem topografik isimlendirme, hem de gelişimsel köken yönünden memeli hippocampal sisteminin bir homologu olarak kabul edilmiştir (Dubbeldam, 1991). Daha önceki bölümlerde sözü edilen benzerlikler dışında fonksiyonel açıdan özellikle mekansal (uzaysal) hafızanın oluşumunda kuş türleri ve memeliler arasında şaşırtıcı ortak özellikler söz konusudur. Son yıllarda kuş hippocampal sistemiyle ilgili yapılan çalışmalarda, bölgenin morfolojik yapısının ayrıntılarının belirlenmesi, yapıyı oluşturan bileşenlerin tespiti ve bu yapıların memelilerin ilgili bölgeleriyle benzerliklerini ortaya koymak amacıyla, hücresel mimari (Montagnese ve ark., 1996) ve immünohistokimyasal (Krebs ve ark., 1991) kriterler göz önüne alınarak bir çok çalışma yapılmıştır.

1996'da Szekely ve Krebs kuş hippocampal kompleksinin alt birimlerini, ilgili yapının efferent bağlantılarını izleyerek tespit etmişlerdir. Bu çalışmada model hayvan Zebra ispinozunda (*Taenopygia guttata*) hippocampal sistemin efferent bağlantıları, her iki cinsiyetten 13-16 gr ağırlığında 16 adet hayvana iontoforetik enjeksiyon yoluyla phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHAL) verilmesi suretiyle anterograd nöron izleme metoduyla belirlenmiştir. Zebra ispinozlarıyla (*Taenopygia guttata*) ilgili herhangi bir stereotaksik atlasın bulunmaması sebebiyle uygulamalar tecrübi (empirik) olarak hippocampal formasyonun en geniş şekliyle bulunduğu rostrokaudal bölgenin merkezi referans alınarak gerçekleştirilmiştir. Kuş hippocampal formasyonu çeşitli araştırmacılar tarafından değişik tarzlarda alt birimlere ayrılmasına rağmen son yıllarda histokimyasal ve hücresel mimari kriterleri göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda hippocampus; dorsomedial, dorsolateral ve ventral hippocampus bölgeleri biçiminde alt bölgelere ayrılmaktadır (Szekely ve Krebs, 1996) (Şekil 5).

İlgili çalışmada da yukarıda bahsedilen sınıflama esas alınarak yani dorsomedial, dorsolateral ve ventral hippocampus bölgelerinden her birine PHAL maddesi enjekte edildikten sonra bu maddenin etkisine bağlı olarak görünür duruma gelen hippocampal formasyonun kendi içinde (internal) ve diğer ön beyin bölgeleriyle (eksternal) yaptığı efferent bağlantılar ortaya çıkartılmıştır. Belirlenen bu bağlantıların doğru olup olmadığını hiperstriatum aksesorium ve medial hiperstriatum ventrale bölgesine PHAL maddesi enjekte edilerek kontrol edilmiştir

2.3.1. Dorsolateral Hippokampus Bölgesine Yapılan PHAL Uygulaması Sonrasında Ortaya Çıkan Efferent Bağlantılar

İnternal Efferent Bağlantılar: Dorsolateral hippocampus bölgesi daha önceki çalışmalarda çeşitli araştırmacılar tarafından parahippokampal alan olarak nitelenen bölgenin lateral tarafına karşılık gelmektedir. Nöron izleme yöntemiyle yapılan bu ve benzer çalışmalarda hippocampusun dorsolateral bölgesinin hippocampal formasyon dahilinde yaptığı (internal) efferent bağlantılarını ventral hippocampus bölgesine gönderdiği, buna karşılık medial hippocampus bölgesinde bu nöronların izine rastlanmadığı gözlenmiştir (Şekil 5 B).

Eksternal Efferent Bağlantılar: Dorsolateral hippocampus bölgesinin eksternal bağlantılarının iki ana demet halinde ilerlediği görülmüştür. PHAL akson demetlerinden birisinin; hippocampal hiperstriatal sınır yoluyla sol hippocampusun lateraline, diğerinin ise septohippokampal bağlantı karşısındaki ventral bölgeye ulaştığı belirtilmektedir.

Bu iki demetten ilki olan lateral lifler, bir rostral, bir de kaudal_oryantasyonda yerleşim göstermekte ve lateral liflerin rostral aksonları, hiperstriatum aksesoriuma ilaveten lamina frontalis superiorla birlikte hiperstriatum ventralenin dorsal taraf ile hiperstriatum dorsalenin ventral tarafınca oluşturulan laminar bir kompleks boyunca yayılmaktadır Lateral liflerin kaudal aksonları ise; dorsal ve lateral kortikal sahalarla ilerledikten sonra buradan arkistriatum posterior içindeki terminalleri yoluyla fronto arkistriatum traktusuna katılmaktadırlar.

Ana demetlerden ikincisi olan ventral lifler önce lateral septal nükleusa ulaşmakta, oradan rostrale kıvrılmak suretiyle ikiye ayrılarak Broca'nın diagonal bandının nükleusunun innervasyonu yaptıktan sonra tuberkulum olfaktorum ve preoptik alanların daha kaudal kısımlarında bulunan lobus parolfaktorusun rostomedial ve ventral tarafına ulaşmaktadır. Bu kaudal oryantasyonlu parça ikiden daha fazla sayıda lif vermektedir. Bu liflerden bir tanesi ventral paleostriatumu içine alan daha derin paleostriatal bölgelerde ilerledikten sonra nükleus taeniae ve arkistriatumdaki terminalleriyle traktus oksipitomezensefalunun oluşumuna katılmaktadır. Bu bölgenin diğer sinir lifleri; stratum sellulare eksternum ve medial periventriküler hipotalamusa uzanan fasikulus prosensephali ve traktus oksipitomezensefalikus yoluyla medial diansefalonda devam etmektedir. Dorsolateral hippocampusun eksternal efferent

liflerinin büyük bir çoğunluğu (%90) ipsilateral olmasına karşın, arkistriatal kompleksin kontrolateralinin ventral pozisyonunda da uzantılarına rastlandığı savunulmaktadır (Szekely ve Krebs, 1996).

2.3.2. Dorsomedial Hippokampus Bölgesine Yapılan PHAL Uygulaması Sonrasında Ortaya Çıkan Efferent Bağlantılar

Dorsomedial hippocampus olarak kabul edilen bölge daha önceki çalışmaların çoğunda tarif edilmemiş olmasına rağmen, yapılan bir çalışmada, alan 4 ve alan 6 olarak tarif edilen bölgelere karşılık gelmektedir (Ericson ve ark., 1991). Ayrıca çinko emdirme metoduyla gerçekleştirilen bir çalışmada da buna benzer bir alan tarif edilmektedir (Montagnese ve ark., 1993).

Nöron izleme çalışmaları ile dorsomedial hippocampus bölgesinde ortaya çıkan bütün projeksiyonların ipsilateral tarafta olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada hippocampusun dorsolateral ve ventral alt bölümlerine ilaveten septumun dorsal ve lateral ventrikülün hiperstriatum aksesoriumundan oluşan dorsal duvarı boyunca ince bir bant halinde PHAL akson terminalleri izlenmiştir (Szekely ve Krebs, 1996) (Şekil 5 A).

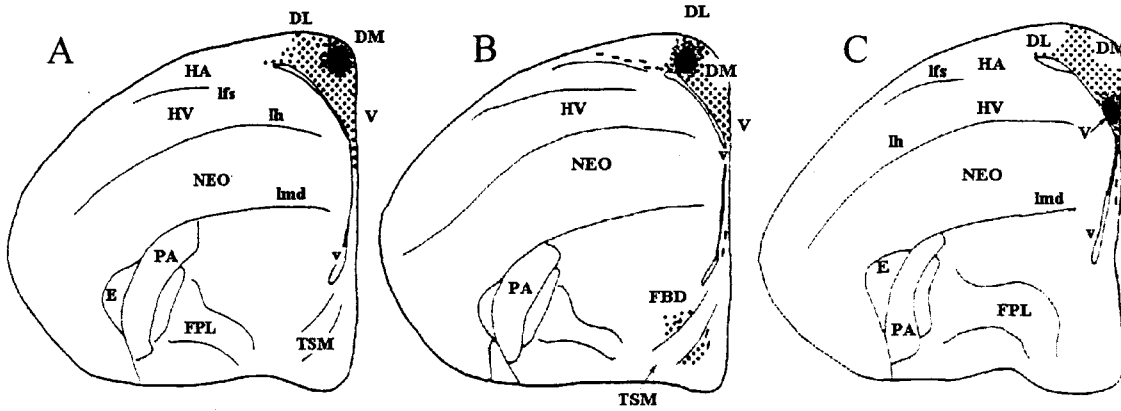
2.3.3. Ventral Hippokampus Bölgesine PHAL Uygulaması Sonrasında Ortaya Çıkan Efferent Bağlantılar

Ventral hippocampus bölgesi daha önceki çalışmalarda hippocampus olarak tarif edilen alan ile (Szekely ve Krebs., 1996), alan 1, 2 ve alan 3 olarak adlandırılan sahalara karşılık gelmektedir (Ericson ve ark., 1991) Nöron izleme çalışmaları sonunda ventral hippocampus bölgesinin projeksiyon liflerinin tümünün dorsolateral sahalara yayıldığı ve bu liflere dorsomedial bölgelerde rastlanmadığı belirtilmektedir (Szekely ve Krebs., 1996).

İşaretlenmiş liflerin septohippokampal bağlantı boyunca geçtiği ve medial septal nukleusa uğradıktan sonra çardaklaşarak kommissura palli vasıtasıyla kontralateral septuma yayıldığı ifade edilmektedir (Szekely ve Krebs, 1996) (Şekil 5 C).

Yukarıda sözü edilen üç farklı hippocampus alanına PHAL uygulanması sonrası gözlenen işaretlenmiş efferent aksonlarının kontrolleri, hippocampal kompleksle yakın yerleşimde bulunan hiperstriatum aksesorium ve hiperstriatum ventrale bölgelerine aynı işlemlerin uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. Hiperstriatum aksesorium ile

hiperstriatum ventralenin efferent projeksiyonları hippocampusun bağlantıları ile örtüştüğü için böyle bir yol tercih edilmiştir.



Şekil 5 Zebra ispinozu hippocampusun dorsomedial (DM), dorsolateral (DL) ve ventral (V) bölgelerine PHAL uygulaması sonrasında ortaya çıkan projeksiyonların şematize görüntüsü. NEO: Neokorteks, v: Ventrikül, PA: Palaeostriatum augmentatum, FA: Traktus fronto arkistriatikus, FPL: Fasikülus diagonalis Broka, PVT: Palaeostriatum ventrale, HV: Hiperstriatum ventrale, HA: Hiperstriatum aksesorium, lmd: Lamina medullaris dorsalis, lfs: Lamina frontalis superior. (Szekely ve Krebs, 1996'dan değiştirilerek alınmıştır)

2.3.4. Kuş Hippokampusunun Parselasyonu

Geleneksel olarak hippocampal yapıların belirlenmesinde standart histolojik boyama (Nissl boyaması), enzim histokimyası (AchE) ve emdirme (Golgi) teknikleri kullanılmaktadır.

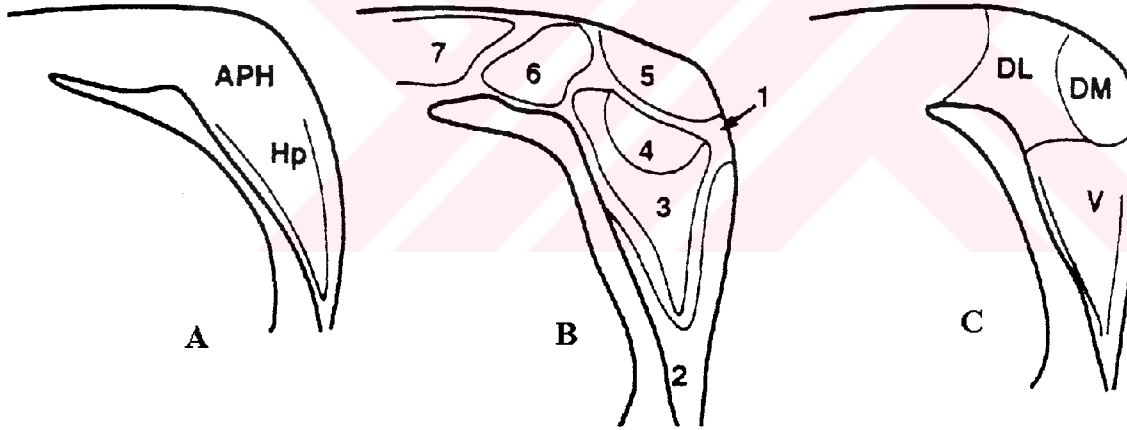
Bu konuda yapıyı oluşturan hücre kümelerinin mimarisel özellikleri göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda ortaya çıkan farklılıklar esas alınarak bir takım parselasyonların yapıldığı dikkati çekmektedir (Rehkamper ve ark., 1991). Son yıllarda immunohistokimyasal yaklaşımların hızlı bir biçimde bu tür araştırmalarda kullanılması alt bölümlerin daha sağlıklı şekilde belirlenmesine olanak vermiştir. Böylece benzer kimyasal yapılardan oluşan hücrelerin morfolojik sınırları netleştirilmiştir (Güntürkün ve Karten, 1991).

Yukarıda anlatılan bilgilere göre, hippocampusun efferentleri göz önüne alındığında, bölgenin üç alt bölümde incelenebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Szekely ve Krebs (1996) (Şekil 6 C) tarafından elde edilen sonuçlar, geniş ölçüde Karten ve Hodos'un (1967) (Şekil 6 A) ve Erichhsen ve ark., (1991) yaptıkları çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu gözükmektedir (Şekil 6 B). Şekil 6 C'de gösterildiği gibi dorsolateral (DL) hippocampus olarak isimlendirilen bölge area parahippokampal bölge (APH) olarak adlandırılan yapının lateraline (Şekil 6 A) veya alan 6 ve alan 3 olarak

adlandırılan yapının lateral parçasına denk düşmektedir (Şekil 6 B). Ayrıca Golgi emdirme tekniğini kullanarak yapılan çalışmada APH olarak sınırları belirlenen sahanın dorsolateral alana denk düştüğü görülmektedir (Montagnese ve ark., 1996).

Dorsomedial (DM) alt bölüm olarak adlandırılan (Szekely ve Krebs, 1996) (Şekil 6 C) bölgenin bağlantıları ve sınırları bu konularla ilgili yapılan diğer çalışmalarda pek bahsedilmese de Ericson ve arkadaşlarının (1991) yaptıkları çalışmada alan 4'ün dorsomedial parçası ve alan 5 olarak tarif edilen bölgeye denk düştüğü görülmektedir (Şekil 6 B). Bunlara ilave olarak Montagnese ve ark. çinko emdirme tekniğiyle 1993 yılında yaptıkları çalışmada adı geçen alt bölümü kressent bir alan olarak tanımlamış ve kullandıkları teknikten sonra dorsomedial bir alt bölümün arta kaldığını belirlemişlerdir (Montagnese ve ark., 1993a).

Ventral (V) alt bölüm olarak adlandırılan (Şekil 6 C) bölge (Szekely ve Krebs, 1996) Karten ve Hodos (1967) tarafından hippocampus olarak nitelenen alan (Şekil 6 B) veya Ericson ve arkadaşlarının (1991) tarif ettiği alan 1, 2 ve 3'ün medial tarafıyla aynı alanı işgal ettiği görülmektedir.



Şekil 6: Kuş hippocampusunun alt bölümlerinin değişik araştırmacılara göre parselasyonu (Szekely ve ark., 1996).

- A. Karten ve Hodos'un 1967 yılında güvercinler üzerinde yaptıkları çalışmaya göre kuş hippocampusunun parselasyonu. Hp: Hippokampus, APH: Area parahippokampalis
- B. Erichsen ve ark., 1991 yılında güvercinler üzerinde yaptıkları çalışmaya göre kuş hippocampusunun parselasyonu.
- C. Szekely ve Krebs., 1996 yılında zebra İspinozlarda yaptıkları çalışmaya göre kuş hippocampusunun parselasyonu.: Dorsolateral: DL, Dorsomedial: DM, Ventral: V (Szekely ve arkadaşları 1996'dan değiştirilerek alınmıştır).

Şimdiye kadar referans ve bulgularını verdiğimiz çalışmalarda tarif edildiği gibi; ötücü kuşların hippocampuslarından çıkan projeksiyonlar, memeli hippocampal kompleksinin efferent bağlantılarına temelde benzerlik göstermektedir. Önemli bir husus; ötücü kuşlar ile memelilerin her ikisinde de septal kompleksle ilişkide olan hippocampal efferentlerin bir medial ve lateral topografik organizasyona sahip olmalarıdır. Daha açık bir ifade ile, her iki türde ventral parçadan ayrılan aksonlar (septohippokampal birleşme yerine doğru) medial septumda sonlanırken, daha dorsal ve lateral bölgelerden gelen fibriller (hippokampal-hiperstriatal bölgelerin birleşme yerine doğru) lateral septumda sonlanmaktadır. Kuş hippocampusunun dorsomedial, dorsolateral ve ventral olarak adlandırılan, alt bölümlerin her birini memeli hippocampusunda daha önceden tarif edilen ilgili bölgeler ile karşılaştırmak mümkündür. Yukarıda belirtilen özellikler dikkate alındığında:

1. Kuşlarda dorsolateral hippocampus bölgesi bazal gangliyonlara, limbik arkistriatum, nukleus septalis lateralisdeki septal kompleks ve fasikulus diagonalis Broka'ya ve paraksiyal mezodiensefalik merkezlere uzanan ana projeksiyonları ile, memeli subikulumuyla özdeşleştirilebilir (Amaral, 1993). Szekely ve Krebs (1996) çalışmalarından elde edilen bulgular, güvercin hippocampal sisteminde yapılan çalışma sonuçlarıyla da uyumludur (Casini ve ark., 1986).
2. Kuşlarda ventral hippocampus olarak nitelenen (Szekely ve Krebs, 1996), bölgenin kontralateral hippocampus üzerinde oluşan komissural projeksiyonları göz önüne alındığında büyük bir olasılıkla memelilerdeki ammon boynuzunun izdüşümüdür (Casini ve ark., 1986). Aynı sonuç Montagnese ve arkadaşları tarafından (1996) Golgi emdirme tekniğinin kullanılması ve bu alanlarda mevcut piramidal hippocampal nöron morfolojilerin tanımlanmasıyla da doğrulanmıştır.
3. Bu tür çalışmalarda en büyük problem, memeli hippocampal sisteminde bilinen bir alt bölümle, kuşlardaki dorsomedial hippocampus olarak nitelenen bölge arasında bir paralellik kurma çabalarıdır. Casini ve ark., (1986) daha yoğun nöron izleyicilerinin kullanılmasına bağlı olarak, değişik tanımlamalarla böyle bir alt bölümün varlığına işaret etmişlerse de, henüz spesifik bir kural ortaya konulmuş değildir. Dorsomedial bölgenin kendi iç bağlantıları esas alındığında,

bu bölgenin gyrus dentatusun eşdeğeri olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu saha Ericson ve arkadaşlarının alan 4 ve alan 5 olarak tarif ettikleri bölgelerle de örtüşmektedir (Ericson ve ark., 1991).

2.3.5. Kuş Hippokampusunun Histolojisi

Nissl ve Klüver-Barrera tekniklerine göre boyanmış telensefalik dorsomedial korteksin dilimlerinin ependimal epitelin üstünde iki ana tabakaya ayrıldığı belirtilmekte, bunlar pleksiform ve granüler tabaka olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca granüler tabakanın alt tarafıyla ependimal epitelin hemen üzerinde ince bir periventriküler alt tabakalaşmanın varlığı da göze çarpmaktadır (Şekil 7). Bu sınıflamaya göre;

Pleksiform Tabaka: Temel olarak miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinden oluşmaktadır. Pleksiform tabakadaki sinir hücrelerinin şekilleri fusiform olup, hippocampusun dorsal kısımlarında kalınlığı azalan, diğer yerlerde oldukça kalınlaşan bir karakter sergilemektedir.

Granüler Tabaka: Bu tabaka, kortikal parankimanın ortasında olup büyük bir alanı işgal etmektedir. Yapı içerisinde dağınık dağılım gösteren ve izole hücre gövdelerine rastlanmaktadır.

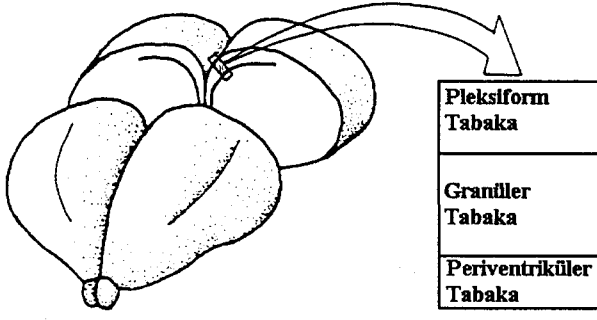
Periventriküler Tabaka: Bu alt tabaka, nöronal hücre gövdesi ve sinir liflerinden fakir, ince bir katmandır (Molla ve ark., 1986).

Sözü edilen bu tabakalarda farklı morfolojik özellikte 6 hücre tipi belirlenmiştir.

Bunlar;

1. Horizontal Nöronlar (HN),
2. Kısa Aksonlu Multipolar Nöronlar (MN-1),
3. Uzun Aksonlu Multipolar Nöronlar (MN-2),
4. Piramidal Nöronlar (PN),
5. Bipiramidal Nöronlar (BN) ve
6. Periventriküler Nöronlar (PvN) olarak adlandırılmaktadır.(Molla ve ark., 1986)

Horizontal Nöronlar (HN): Bu tip nöronların hepsinin dorsomedial korteks boyunca, pleksiform tabakada yerleştikleri görülmüştür. Dendritik ağaç kaba bir bakışla bipolar görülmesine rağmen, ayrıntıda diskoid veya hemisferik şekillidir. Dendritlerin büyük bir çoğunluğunun beyin yüzeyine paralel seyrettikleri, az bir kısmının da granüler tabakaya doğru inme eğiliminde oldukları ve çapları 200-250 mikrometre



Şekil 7 Erişkin civcivlerin beyin hemisferlerinden transvers yönde kesilen dilim ve dorsomedial korteksten alınan parçanın tabakalarının şematize görüntüsü. (Molla ve arkadaşları 1986'dan değiştirilerek çizilmiştir).

bölgelerde yerleşmişlerdir. Dendritik ağaç kabaca yuvarlak şekilli bir yıldız görünümünde olup, çapları 200-250 mikrometre ve 3-7 ana daldan meydana gelmektedir. Bu nöronların aksonları kısa ve dendritik ağaç etrafında çok sayıda kollateral veren bir özelliğe sahiptirler.

Uzun Aksonlu Multipolar Nöronlar (MN-2): Bu nöronlar özellikle yapının dorsal kısımlarında olmak üzere bütün granüler tabaka boyunca yerleşim göstermektedir. Dendritik ağaç tipik biçimde yıldızimsi karakterde, çapları oldukça değişkenlik gösteren (en fazla 350 mikron) 5-10 ana daldan meydana gelmektedir. Aksonlar oldukça uzun ve dorsomedial korteksin granüler tabakası boyunca lateral kısımlara kadar ilerlemekte ilaveten dendritik ağaç etrafında kısa kollaterallerde vermektedir.

Piramidal Nöronlar (PN): Bu nöronlar dorsomedial korteksdeki granüler tabakanın dorsal kısımlarında gözlenmezken, medial kısımlarda yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Radial biçimde dağılım gösteren dendritik ağaç tamamen piramidal görünümündedir. Dendritik ağaç pleksiform tabakaya kadar uzanan bir apikal çıkıntıya ilaveten, yelpaze biçimli dağılım gösteren bazal uzantılara da sahiptir. Yukarıya doğru ilerleyen apikal çıkıntılar bir müddet sonra önce 1-3 ana dala ardından küçük yan dallara ayrılmaktadır. Aksonlar dorsal bölgeye doğru granüler tabaka boyunca ilerlemekte ve kendi dendritik ağacı etrafında bir çok kısa kollateraller vermektedir.

Bipiramidal Nöronlar (BN): Bu nöronlar piramidal nöronlar gibi, onlarla yer değiştirmek suretiyle aynı bölgeleri işgal ederler. Dendritik ağaç birbirine zıt iki yönde

arasında değişen 5-10 ana kökten oluştukları belirlenmiştir. Nöron aksonlarının, başlangıçlarında, pleksiform tabaka boyunca beyin yüzeyine paralel seyir izledikten sonra, granüler bölgeye doğru bir ilerleme gösterdikleri tespit edilmiştir.

Kısa Aksonlu Multipolar Nöronlar (MN-1): Bu nöronlar dorsomedial korteksin granüler tabakası boyunca dorsal ve medial

demetlenmekte ve fusiform biçimli olan hücre gövdesinden çıkmaktadırlar. Apikal demet piramidal nöronların apikal çıkıntıları gibi pleksiform tabakaya kadar ulaşmakta, bazal demet ise apikal çıkıntılara nispeten daha kısa ve kalın 2-4 ana daldan oluşmaktadır. Bu nöronların aksonları dorsal bölgelere doğru granüler tabaka boyunca ilerlemektedir.

Periventriküler Nöronlar (PvN) :Bu nöronlar dorsomedial kortekste hemen ependimal epitelin üzerindeki tabakada lokalize olmuşlardır. Hücre gövdeleri piriform veya fusiform şekillidir. Dendritik ağaç granüler tabakada yelpaze şeklindeki oluşumlarıyla 4-5 ana kök tarafından oluşturulmaktadır. Bu bölgedeki aksonları uzun olup, başlangıçta yükselme eğilimi göstermektedir (Molla ve ark., 1986).

2.3.6. Hippokampusta Yapılan İskemi ve Lezyon Çalışmaları Sonrasında Ortaya Çıkan Morfolojik Değişiklikler

Geçici serebral iskemiye takiben civciv (*Gallus domesticus*) dorsal hippocampusundaki sinapsların sayısal yoğunluğu temel alınarak 1995 yılında Horner ve arkadaşları tarafında yapılan çalışmada oldukça ilginç sonuçlar bulunmuştur.

Bilindiği gibi merkezi sinir sistemindeki nöron gruplarının iskemiye duyarlılıkları oldukça değişkendir. Meydana gelen hasar miktarı; kümülatif etki gösteren olayların tekrarı ile hipoperfüzyonun derece ve süresine bağlıdır (Kato ve ark., 1989). Hippokampusun ona komşu olarak bilinen sahalara nazaran, aynı derecedeki yaralanmaya toleransı daha düşüktür. (Kirino, 1982) Hatta uygulanan böyle bir yaralanmaya hippocampusun alt bölümleri bile farklı cevaplar vermekte, memeli hippocampusunda CA1 olarak adlandırılan sahanın en duyarlı bölge olduğu ifade edilmektedir (Ashton ve ark., 1989) İskemiye takiben hippocampusun CA1 piramidal hücrelerinde gözlenen gecikmiş nöronal hücre ölümünün nekrotik süreçten çok, apoptotik süreçten geçtiğine dair kuvvetli bulgular mevcuttur (Nitatori ve ark., 1995).

Bu güne kadar serebral iskemi modelleri değişik tür memelilerde çalışılmış olup elde edilen verilerin klinik bulgularla da uyumlu olduğu saptanmıştır (Schmidt-Kastner ve Freunt., 1991). Son yıllarda internal karotis arterin geçici olarak tıkanmasıyla oluşturulan hipoperfüzyon neticesinde beynin spesifik bölgelerinde benzer hasarların olduğu gözlenmiştir (Willson ve ark., 1994). Ayrıca kuş beyninin memelilere benzer bir mekanizmayla iskemiye cevap verdiği, oluşturulan iskemi eğer bir eğitim çalışmasından önce gerçekleştirilmişse amnezi görülmekte, tersinde ortaya

çıkılmaktadır (Willson ve ark., 1994). Bu olay anterograd amnezi olarak tanımlanmaktadır (Kato ve ark., 1989).

Yukarıda belirtilen çalışmada; yeni yumurtadan çıkan 0 (sıfır) günlük civcivler alınarak, bunlar iskemik ve iskemik olmayan iki gruba ayrılmıştır. Hayvanların 24 saat boyunca gerekli bakımı dikkatli bir biçimde yapıldıktan sonra, iskemik grup olarak nitelenenlerinin internal karotis arterleri 10 dakika süreyle bir klemp yardımıyla tıkanmıştır. Böylece beyinde oluşturulan hipoperfüzyonla, iskemik bir süreç başlatılmış olup, sonuçta sinaps seviyesinde hasarın boyutları araştırılmıştır. Bu çalışmada kontrol grubunda bulunan hayvanlar, iskemik gruptaki hayvanlarla internal karotis arterin tıkanması hariç, aynı cerrahi uygulamalara maruz bırakılmıştır.

Cerrahi girişimden bir hafta sonra civcivler transkardial yolla perfüze edildikten sonra beyin dokusu histolojik işlemlerden geçirilmek üzere kraniumdan dışarıya çıkartılmıştır. Bu çalışmada gruplar arasında hipoperfüzyonun bir etkisinin olup olmadığını araştırmak için sinaps sayıları esas alınarak inceleme gerçekleştirilmiştir. Sinaps sayısını hesaplanmasında ise stereolojik yaklaşımlardan olan fiziksel disektör metodu kullanılmıştır.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu hayvanlarda herhangi bir hemisferik asimetrisinin olmadığı, iskemik deneklerin sinaps yoğunluğunun (sağ ve sol birlikte değerlendirildiğinde) kontrol grubuna nispeten %27 daha az olduğu saptanmıştır.

Bunların sonuçlarına daha detaylı olarak baktığımızda; asimetric sinapsların hem dendritik shaft hem de dendritik spine değerlerinde iskemik grupta anlamlı bir azalma gözlenirken, simetric sinapsların hiçbir tipinde istatistiksel anlamda bir değişikliğin olmadığı saptanmıştır.

Sandi ve arkadaşları (1992) tarafından yapılan bir çalışmada, pasif sakınma eğitimi öncesi ve sonrasında tek taraflı veya iki taraflı hippokampal bölgede lezyon oluşturularak, buna bağlı civcivlerde ortaya çıkan davranışsal değişiklikler izlenmiştir. Burada asıl merak edilen konu öğrenme ve hafızalama işlemi esnasında hippokampusun rolü olup olmadığı gerçeğidir. Yukarıdaki araştırmacılar yaptıkları deney serileriyle hippokampal sistemde oluşturulan bir lezyonun öğrenme ve hafızalama olaylarını direkt etkilediğini göstermişlerdir.

Eğitim öncesi bilateral olarak hippokampuslarında lezyon oluşturulan hayvanların eğitim sonrasında tiksindirici maddeye karşı sakınma cevabı

göstermemeleri, oluşturulan hippokampal hasara atfedilmektedir. Hippokampus hasarına bağlı olarak ortaya çıkan bu tür bir amnezinin, eğitim öncesi IMHV bölgesinde oluşturulan lezyonun sebep olduğu amneziye benzediği görülmektedir. IMHV bölgesinde var olduğu çeşitli çalışmalarla ispat edilen fonksiyonel lateralizasyonun benzer bir versiyonunun da hippokampusta olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada eğitim öncesi sol hippokampusta tek taraflı (unilateral) olarak oluşturulan lezyonların iki taraflı (bilateral) lezyonlar gibi amnezi oluşturduğu gösterilmiştir. Böylece yeni kazanım ve edinilen bilgilerin hatırlanmasında sağlam bir hippokampusun gerekliliği savunulmaktadır (Sandi ve ark., 1992). Bununla birlikte sol hippokampusun hafıza oluşumunun başlangıç evresinde işlev gördüğünü, eğitimden sonra 1 saat içinde yapılan bilateral lezyonların bile anlamlı bir amnezi oluşturmamasından anlaşılmaktadır (Sandi ve ark., 1992).

2.3.7. Yiyecek Depo Eden Kuş Türleri İle Yiyecek Depo Etmeyen Kuş Türlerinin Hippokampusları Arasındaki Farklılıklar

Healy ve Krebs (1993) yiyecek depo eden bir kuş türü olan magpieler (*Pica pica*) ile yiyecek depo etmeyen jackdawları (*Corvus monedula*) karşılaştırmışlardır.

Hippokampus ve telensefalik bölgelerinin hacimlerinin hesaplanması için, seçilen kesitlerin her biri 10'luk bir fotoğrafik büyütme altında incelenerek bunlardan hippokampusun dış sınırları belirlenmiştir. Elde edilen bu verilerden kuşun türü ve yaşı dikkate alınarak, kesik koni yaklaşımı ile (truncated cone, stereolojik olmayan bir yaklaşımla) ilgili bölgenin hacmi hesaplanmıştır. Buna göre yiyecek depo eden ve etmeyen kuşların yuvada kaldıkları süre içinde hesaplanan görelî hippokampus hacimlerinde istatistiksel bir fark tespit edilmezken, bunların erişkinlerinde anlamlı değişiklikler bulunmuştur. Yiyecek depo etmeyen jackdaw erişkinlerinde telensefalon hacmi ile kıyaslanan görelî hippokampus hacminin yuvada kalan türdeşleriyle aynı olduğu, magpielerde yaşla beraber görelî hippokampus hacminin anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara ilaveten her iki türün kendi aralarında yavru ve erişkinlerinin görelî hippokampus hacimleri incelendiğinde jackdawlarda bir fark gözlenmezken, magpielerin erişkinlerinde bir genişleme eğilimi saptanmıştır.

Aynı çalışmada iki kuş türünün yuvada kalma dönemleri (5-25.günler) ve erişkin (320 günden büyük) grubundan rastgele bir alt örnekleme ile altışarlı toplam 24 hayvan seçilerek incelenmiştir. Hesaplamalar, Nissl ile boyanmış kesitlerin 100x100

mikrometre boyutlarında oluşturulan çerçevedeki bir tek fokus düzlemine düşen partikül izdüşümlerinin sayımı ve bunların (Abercrombie, 1946) bir düzeltme faktörü ile çarpımıyla elde edilmiştir. Elde edilen verilerin sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde; sayısal yoğunluğun türler arasındaki değerlerinde tam bir farklılık gösterilememesine rağmen, magpielerdeki yaşa bağlı azalma eğiliminin jackdawslardan daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Her iki tür ayrı ayrı analiz edildiği zaman, jackdawslarda yaşa bağlı oluşan azalmanın daha anlamlı olduğu göze çarpmaktayken, magpielerde bu tür bir değişim gözlenmemiştir. Toplam hücre sayıları incelendiğinde; yaş ile beraber anlamlı değişikliklerin oluşmasına ilaveten magpielerde diğer türe nispeten daha fazla sayıda hücrenin varlığı tespit edilmiştir. Erişkin ve yavru kuş türleri ayrı ayrı incelendiklerinde; yavru iki tür arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı, erişkin magpielerin aynı yaştaki jackdawslardan daha fazla sayıda hücreye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar sırasıyla yorumlandığında; yiyecek depo eden magpie ve yiyecek depo etmeyen jackdaw erişkinleri arasında görelî hippokampus hacim ve hücre sayılarındaki değişimler 2-25. günlerde kısmen artmasına karşın, 35-365. günler arasında yani, uçmaya başlama eyleminden sonra, bu eylemin sonucu olarak daha belirginleşmekte, magpielerde görülmemesine karşın jackdawslarda yaş ile beraber sayısal yoğunluk değerleri azalmakta ve bu değişim yiyecek depo eden kuşlarda sonradan oluşan nörojeneze bağlanmakta ve erişkin magpielerde hippokampal bölgedeki nöron sayılarının artışı jackdawslardaki artıştan daha çok olduğu gözlenmektedir.

2.3.8. Hippokampus Morfolojisi Bakımından Göç Eden ve Etmeyen Kuş Türleri Arasındaki Farklılıklar

Bu tür çalışmalarda, yani göç eden kuş türlerinin hippokampus hacmi üzerine yaş ve tecrübenin nasıl bir etkisi olduğu incelenmiştir.

Healy ve Krebs (1996) yılında göç eden ve göç etmeyen çalı bülbülleri (warblers)'nin hippokampal hacimlerine yaş ve uçuş deneyiminin etkilerini araştırmışlar. Çalı bülbüllerinin görelî hippokampal hacmi ölçüldüğünde, yaşlı ve tecrübe sahibi hayvanlar genç ve tecrübesizler ile kıyaslandığında birinci grubun nispeten anlamlı bir büyümeye sahip olduğu gözlenmiştir. Elde edilen verilerden yaş ve/veya tecrübenin görelî hippokampus büyümesinde etkili olduğu yorumu yapılmıştır.

Yukarıdaki iki faktörden yalnızca yaşın etkisini kontrol etmek için tecrübe sahibi olmayan genç kuşlarla tecrübe sahibi olmayan yaşlı kuşlar birbirleri ile kıyaslandığında, yaşlı gruptakilerin görelî hippokampus hacimlerinde anlamlı bir genişlemenin varlığı gösterilmiştir. Göç tecrübesine sahip kuşlar ile tecrübe sahibi daha yaşlı hayvanların görelî hippokampus hacimleri ölçüldüğünde aralarında anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar sırasıyla yorumlandığında; göç eden bir kuş türü olan garden warblerslerin görelî hippokampal hacminin uçuş tecrübesinin etkisiyle arttığı, yaşamın ilk yıllarında yaş faktörünün olumlu bir katkısının olduğu ve ilk yıldan sonra yaş değişkeninin etkisinin ortadan kalktığı, görelî hippokampal hacimde meydana gelen değişikliklerin hippokampus hariç telensefalonun mutlak hacmindeki bir azalmanın ortaya çıkmasına ilave olarak hippokampusun mutlak hacminde artmayla birlikte gerçekleştiği, yaş ile birlikte tecrübeye bağlı olarak görelî hippokampal hacimdeki artma hem beynin bu bölgelerinde sayısal yoğunlukta hem de nöron sayısındaki artışla beraber ortaya çıkmakta ve telensefalon hacmindeki azalmada su kaybının etkisinin oldukça önemsiz olduğu (Ektostriatumda olduğu gibi su kaybındaki azalmaya sayısal yoğunluktaki artma eşlik etmekte buna karşılık nöron sayısında değişme olmamaktadır) belirtmektedir.

2.3.9. Hippokampusların Morfolojisi Bakımından Kuluçka Paraziti Olan ve Olmayan Kuşlar Arasındaki Farklılıklar

Reboreda ve arkadaşları (1996), kuluçka paraziti olan ve olmayan cowbirdlerde hippokampus büyüklüğüne cinsiyet ve türün etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada dişisi kuluçka paraziti olan ve yapılan bu işlemde erkeklerinin hiçbir katkısı olmayan shiny cowbirdlerin (*M. bonariensis*), dişisi kuluçka paraziti iken, yapılan bu eylemi erkeğiyle birlikte başaran screaming cowbirdler (*M. rufozillaris*) ve kuluçka paraziti olmayan bay-winger cowbirdlerin (*M. badius*) hippokampus ve telensefalon hacimleri karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir.

Bilindiği gibi kuluçka paraziti terimi, yumurtalarını başka kuşların yuvalarına bırakarak, yumurtadan çıkacakları zamana kadar orada bekletip, yumurtadan çıktıktan sonra yavrularını kendileri besleyen kuş türleri için kullanılmaktadır

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar birlikte yorumlandığında; görelî hippokampus hacminin kuluçka paraziti olan kuş türlerinde parazit olmayan kuş

türlerine oranla daha büyük olduğu, kuluçka paraziti olan kuş türleri ile parazit olmayan kuş türleri arasında ortaya çıkan farklılıklar, cinsiyetler göz önüne alınarak incelendiğinde; dişisi ve erkeği birlikte parazit olanlar ve parazit olmayan türlerde cinsiyete bağlı bir farklılık yokken, sadece dişisi parazit olan türlerde cinsiyete bağlı görelî hippokampus hacimlerinde belirgin bir farklılık ortaya çıktığı, kuluçka paraziti olmayan ve yalnızca dişisi kuluçka paraziti olan türlerin erkeklerinde hippokampus nispeten telensefalonun görelî hacminin daha büyük olduğu ve yukarıdaki bulgulardan artan görelî hippokampus hacminin kuluçka parazitliliğı ve uzaysal hafıza ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir.

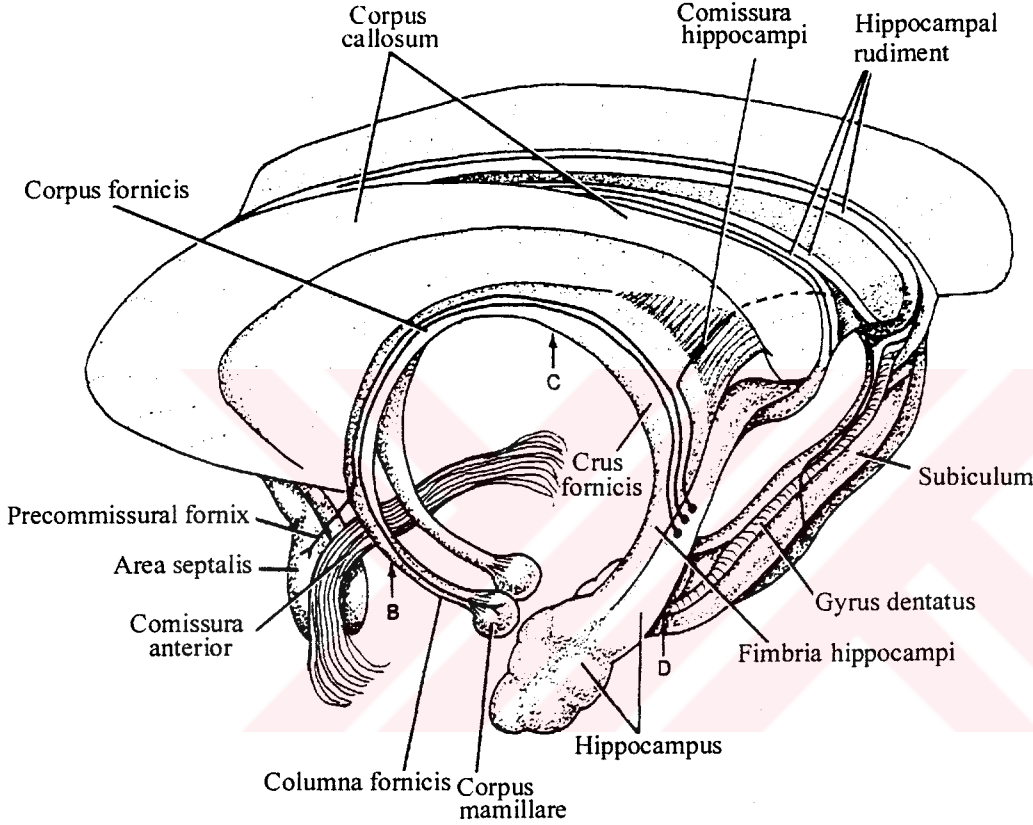
2.4. MEMELİ HİPPOKAMPUSU VE LİMBİK SİSTEM

Limbik sistem, diensefalon ile telensefalon arasında yer alan yapıların oluşturduğu sistemin adıdır. Bu sistemin koku alma ve bunları değerlendirme ile ilişkili bölgelerle fonksiyonel ilişkisi söz konusudur. Emosyonel aktiviteleri serebral korteksin düzenlendiğı ve bunların dışı vurumunun limbik sistem ile hippokampus tarafından sağlanması yanında, bu sistemin öğrenme ve hafızalamada da işlev gördüğü düşünülmektedir. İlkel hayvan türlerinde gıda bulma ve bu gıdaların kendilerine zararlı olup olmadığını ayırt etmede, çiftleşme güdülerinin kontrolü ve yavrularını tanıyıp sahip çıkma aktivitelerinde, tehlikeyi sezip savunma için gerekli önlemlerin alınmasında, ayrıca limbik sistem tarafından düzenlendiğı bilinen koku, öğrenme ve davranışların kontrolü gibi fonksiyonlardan koku duyusunun önemi daha ön plandayken, daha gelişmiş memelilerde bu tür davranışların ortaya çıkmasında öğrenme ve davranışların dışı vurulma fonksiyonu daha baskındır. Bu fonksiyonun yapılmasında limbik sistemin serebral korteksin assosiasyon sahalarından aldıkları uyaranlar büyük önem arz etmektedir.

Limbik sistem içerisinde hem kortikal, hem de subkortikal yapılar yer almaktadır. Hippokampal formasyon, area septalis, gyrus singuli, gyrus parahippokampalis, indisiyum griseum ve korpus amygdaloideum bu sistem içerisinde yer alan yapılardandır. Serebral korteksin limbik sisteme dahil edilen kısımlarına lobus limbikus adı verilmekte ve gyrus singuli, gyrus fassiolaris, gyrus parahippokampalis, hippokampus, area subkallosa ve gyrus dentatus bu kortikal yapıları oluşturmaktadır. Forniks, fassikulus mamillotalamikus, singulum, stria terminalis, stria longitudinalis medialis, stria longitudinalis lateralis, fassikulus mammillotegmentalis, fassikulus

medialis telensephali, stria diagonalis ve stria medullaris talami gibi limbik yapılar arasında bağlantıyı sağlayan veya bu yapılardan başlayarak diğer bazı merkezlere giden yollarda işlev görmesi sebebiyle limbik sistem içerisinde incelenmektedir (Gökhan ve Çavuşoğlu, 1989).

2.4.1. Memeli Hippokampal Formasyonu

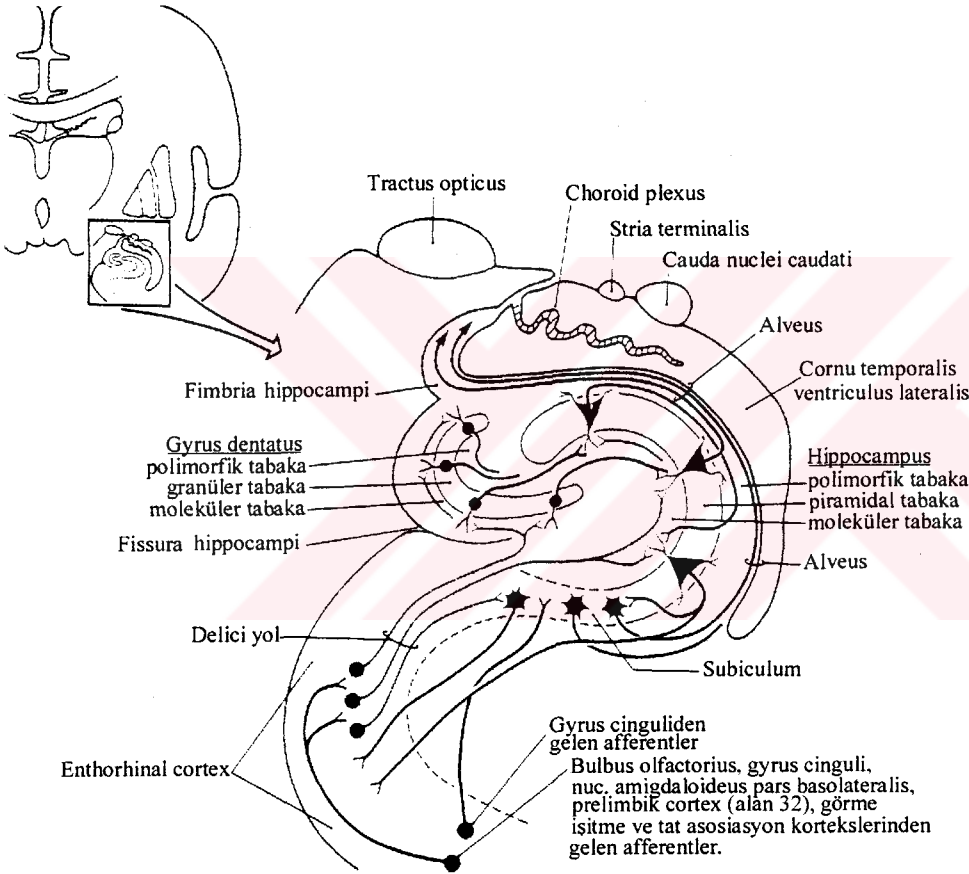


Şekil 8 Memeli hippocampal formasyonu ve komşu yapıların görünümü (Nolte, 1993)

Bu yapı hippocampus, gyrus dentatus, subiculum ve entorhinal korteks adı verilen korteks kısımlarını kapsamaktadır. Hippocampus, ventrikülus lateralisin kornu inferiusunun tabanında yer alan korteks kısmı olup, alt mediale doğru subiculum ve gyrus parahippokampalis ile devam eder. Gyrus parahippokampalisin öne doğru uzanan kısmı unkus adını alır. Hippocampusun öne doğru uzanan ve parmak şeklindeki genişlemesine pes hippocampi; yukarıda ventrikülus lateralis komşu yüzünü örten beyaz cevher kısmına ise alveus hippocampi denir. Alveus hippocampi içerisinde yer alan lifler medialde birleşerek fimbria hippocampi oluşturur. Hippocampus arkadan corpus callosumun splenium kısmının altına kadar uzanır. Gyrus dentatus

hippokampusun medialinde fimbria hippocampi ile subikulum arasında yer alır. Ön tarafta unkusa karışan gyrus dentatus, arka tarafta gyrus fassiolaris ile; gyrus fassiolaris ise korpus kallosumun üzerindeki ince bir gri cevher tabakası olan indisium griseum ile devam eder. Korpus kallosumun uzunluğu boyunca seyreden indisium griseumun içerisinde miyelinli liflerin oluşturduğu stria longitudinalis medialis ve stria longitudinalis lateralis ismi verilen iki ince şerit ansa pestalise kadar uzanır (Taner, 1998) (Şekil 8)

2.4.2. Memeli Hippokampusunun Histolojisi

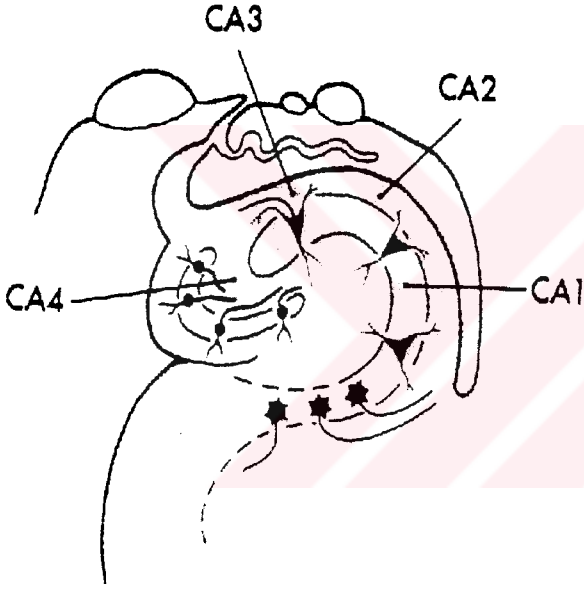


Şekil 9: Memeli hipokampal formasyonu, onunla ilişkili komşu yapılarla beraber gyrus dentatus, subikulum ve hipokampustaki hücre tiplerinin şematik görüntüsü. (Chronister ve Hardy, 1997'den değiştirilerek alınmıştır)

Hippokampal formasyon dahilindeki subikulum, 3 tabakalı hipokampus (arkikorteks) ile parahippokampal gyrusun entorhinal korteksindeki (paleokorteks) 6

tabakalı yapı arasında bir geçiş bölgesidir. Bu geçiş zonu küçük olmasına rağmen prosubikulum, subikulum proper, presubikulum ve parasubikulum adı verilen dört bölgeye ayrılarak incelenmekte ve bu alan hipokampusu gelen informasyonlar için vazgeçilmez bir ara bölge olarak nitelendirilmektedir (Şekil 9).

Hippokampus ve dentat gyrus, neokorteksteki aynı isimli tabakaların benzerleri olan bir yüzeysel moleküler tabaka, bir derin polimorfik tabaka ve arada hipokampusta piramidal hücrelerden oluşan piramidal tabaka ile gyrus dentatusta granüler hücrelerden oluşan granüler tabaka olarak üç kısımdır. Hippokampusun moleküler tabakası ventriküllerin ependimal astarının hemen altında bulunmakta ve bu üç yapıya ait hücrelerin akson afferentlerinin yanı sıra, dendritlerinin uzantılarını da içermektedir



Şekil 10: Bir başka adlandırma kriterine göre memeli hipokampusun alt bölümleri (Chronister, Hardy (1997)'den değiştirilerek alınmıştır).

bulunmaktadır. Hippokampusun en iç kısmında bulunan kısım lateral ventrikülle sınır oluşturmakta ve subikulum ile hipokampusta lokalize olan hücre gövdelerinden gelen miyelinli ve yükselen aksonları ihtiva etmektedir. Bu tabaka alveus olarak adlandırılmakta olup hipokampusun fimbriyası ile devam ederek forniksi oluşturur (Chronister ve Hardy, 1997) (Şekil 9).

(Şekil 9). Gyrus dentatusun granüler hücre tabakası ve hipokampusta piramidal hücre tabakası olarak nitelenen tabaka diğer yerlerde bulunan nöron efferentlerini içermekte olup bu tabakada yer alan granüler ve piramidal hücre dendritlerinin moleküler tabaka içinde radial olarak dağıldıkları görülmektedir. İç tabaka veya polimorfik tabaka olarak adlandırılan yerde piramidal ve granüler hücre aksonları, birkaç intrinsik nöron ve bol miktarda glia hücresi

Hippokampusun hücrel mimari özellikleri göz önüne alınarak incelendiğinde, CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak adlandırılan 4 farklı bölgeden oluştuğu gözlenir (Chronister ve Hardy, 1997). Bu yapılardan;

CA1 bölgesi; subikulum–hippokampus birleşme yerinde,

CA2 ve CA3 bölgeleri; hippocampus içerisinde ve

CA4 bölgesi ise; gyrus dentatus ve hippocampusun kavuştuğu noktada bulunmaktadır (Şekil 10) (Chronister ve Hardy, 1997).

2.4.3. Memeli Hippokampusunun Afferentleri

Hippokampal formasyonun en belirgin afferent kaynağı entorhinal kortekstir. Entorhinal korteks yalnızca olfaktör afferentleri değil, aynı zamanda singulum vasıtasıyla gyrus singuliden, uncinata fasciculus vasıtasıyla orbital korteks ve amygdala'dan ve temporal lobun diğer alanlarından aldığı afferentlere ilaveten bazı septal ve hipotalamik liflerinde forniks boyunca ilerleyerek hippocampal formasyona ulaştığı bilinmektedir. Forniks hippocampustan ayrılan ana efferent liflerin geçiş bölgesi olmasına rağmen, hippocampal formasyon ve entorhinal kortekse kolinerjik septohippokampal projeksiyonları da götürmektedir. Bilindiği gibi hippocampal formasyon duyu (sensory) informasyonlarının esas itibarıyla bütün tiplerinin de ana erişim bölgesidir (Şekil 10). Ayrıca gyrus dentatusun granüler hücreleri hippocampusun CA3 bölgesinin moleküler tabakası içerisine, CA3 nöronları ise hippocampusun CA1 bölgesine bilgi taşımaktadır (Chronister ve Hardy, 1997, Nolte, 1993).

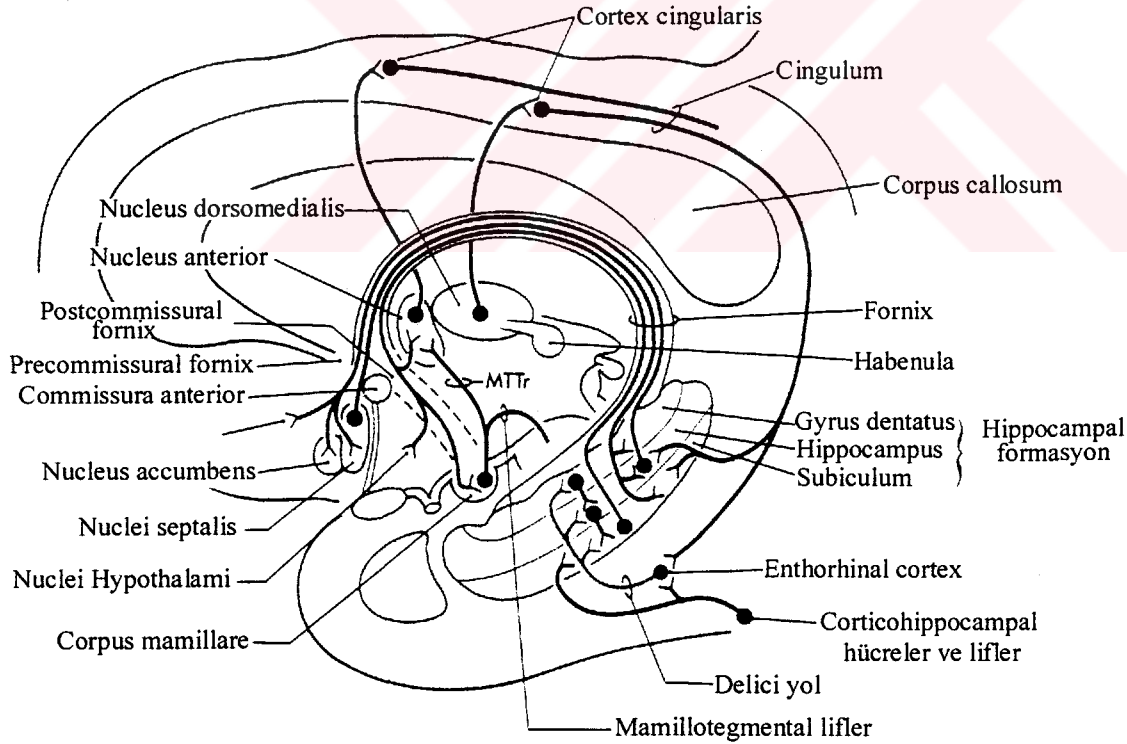
2.4.4. Memeli Hippokampusunun Efferentleri

Hippokampal formasyon direkt olarak entorhinal korteks ve diğer kortikal sahalarla liflerini gönderirken, en büyük efferentleri fornikte gözlenmektedir. Şekil 11'de gösterildiği gibi forniks lifleri hippocampal kommissürde çaprazlaşan bir kaç hariç, korpus kallosumun altına doğru hareket etmektedirler.

İnterventrüküler foramen seviyesinde, bazı liflerin prekomissürel forniksteki gibi, anterior kommissürün önünden ayrıldıkları, sonra bu liflerin büyük bir çoğunluğunu septal ve preoptik sahalarla giderek buralarda sonlandıkları, bazılarınsa orbital ve anteriör singulat kortekse kadar ilerledikleri gözlenmektedir. Prekomissural forniks olarak nitelenen, forniksın geri kalan lifleri ise ya keskin bir biçimde posteriore dönerek anterior talamik nükleusta sonlandıkları veya forniks sütunu boyunca

hipotalamus boyunca ilerleyerek, esas olarak mamillar cisme olmak üzere, orta beynin (midbrain) retiküler formasyonu veya diğer hipotalamik alanlarda sonlandıkları bilinmektedir. Mamillotalamik yol anterior nukleusta sonlandığı için hippocampal formasyon hem direkt hem de indirekt biçimde talamusun bu parçasını etkileyebilmektedir. Daha sonra anterior talamik nukleus gyrus singulata uzanmak suretiyle; diensefalon ve telensefalon arasında büyük haberleşme döngüsünü tamamlamaktadır (Şekil 11).

Hippokampal formasyondan başlayıp mamillar cisme kadar forniks boyunca ilerleyip giden yol, oradan anterior talamik nukleusa, gyrus singulata ve parahippokampal gyrusun entorhinal korteks olarak adlandırılan bölümüne ulaşmakta ve netice olarak tekrar hippocampal formasyona geri dönmektedir. Sözü edilen bu seyir 1937 yılında James Papez tarafından tespit edilmiş olup, bu döngünün neokorteks, limbik yapılar ve hipotalamus arasında etkileşimi sağladığı tespit edilmiştir. Buna ilave olarak bu alanın emosyonel tecrübe ile ilgili bir tabaka olabileceği de iddia edilmektedir (Chronister ve Hardy, 1997, Nolte, 1993).



Şekil 11 Memeli hippocampal formasyonun afferent ve efferent bağlantılarının şematik görüntüsü (Chronister ve Hardy 1997'den değiştirilerek alınmıştır).

2.4.5. Papez Döngüsü

Yukarıda işaret edildiği gibi Papez devresinin başlangıç segmenti, primer olarak subikulumdan postkommissural forniks yoluyla medial mamillar nukleusa ulaşmakta ve devam eden bağlantılarıyla tam bir döngü meydana getirmektedir. Bu oluşum;

1. Mamillotalamik yol olarak nitelenen ve medial mamiller nukleusu talamusun anterior nukleusuna bağlayan bölüm,
2. Talamusun anterior nukleusundan gyrus singulat korteksine giden talamokortikal fibriller bölümü ve
3. Singulum vasıtasıyla indirekt olarak singulat korteksten entorhinal korteks ve serebral korteksin diğer alanları da gyrus singulatın bağlantılarına değişik seviyelerde katılmak suretiyle, Papez devresinin değişik fonksiyonel ilişkisini tamamlamaktadır. Buna örnek olarak, singulat gyrusun premotor ve prefrontal alanlardan, görme ve işitme merkezlerinden ve somatosensorial korteksten aldığı afferentler söylenebilir.

2.4.6. Limbik Sistem ve Hippokampal Formasyonun Fonksiyonel Önemi

“Limbik” sözcüğü sınır manasını ifade etmekte olup limbik sistem terimi ilk olarak hipotalamus ve diğer ilgili yapılar ile beyin korteksi arasındaki sınır bölgesinde yer alan oluşumları ifade etmek için kullanılmıştır. Son zamanlarda edinilen bilgilere göre bu ikisinin tek bir sistem olarak fonksiyon yaptıkları anlaşılmaktadır. Bu nedenle limbik sistem terimi kişinin emosyonel ve dürtü davranışlarını kontrol eden, beyinin tüm bazal sistemini ifade etmek için kullanılmaktadır (Gökhan ve Çavuşoğlu, 1989). Mutluluk, memnuniyet, neşe, üzüntü, depresyon, kırgınlık, kıskanma gibi psişik durumlar, emosyon olarak nitelenen davranış biçimleridir. Emosyonlar genellikle gülme, durgunluk, hiddet, saldırganlık veya ağlama gibi davranışlar şeklinde dışa vurulmaktadır. Emosyonların oluşmasında serebral korteksin prefrontal bölgesinin, emosyonların dışa vurulmasında ise korpus amygdaloideumun önemli rolü olduğu kabul edilmektedir. İnsanlarda korpus amygdaloideumun deneysel olarak uyarılması, hem emosyonel algılamalarda, hem de bunlarla ilgili otonom cevaplarda değişikliklere sebep olur. Emosyonel algılamalar korpus amygdaloideumun uyarılan nukleusuna bağlı olarak, agresiflik ile mutluluk arasında geniş bir yelpazede değişiklik gösterir. Korpus amygdaloideumu çıkarılan maymunların daha kolay eğitilebildikleri ve diğerlerine göre

daha sakin bir duruma geldikleri gözlenmiştir. Lobus temporalis, korpus amygdaloideum ve formatio hippocampiyi içeren yapılar bilateral olarak çıkarılan maymunlarda, Klüver-Bucy sendromu olarak nitelenen tablo ortaya çıkmaktadır. Bu maymunların korku ve saldırganlık gibi emosyonlarının ortadan kalktığı, her türden objeyi ellerine veya ağızlarına alarak korkusuzca inceleme eğiliminde oldukları, hiperseksüalite ve garip seksüel davranışlar gösterdikleri tespit edilmiştir. Klüver-Bucy sendromu, lobus temporalisi geniş olarak çıkarılan insanlarda da gözlenmiştir.

Limbik sistemin korpus amygdaloideum dışındaki bazı kısımlarının da seksüel fonksiyonlar ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Örneğin gyrus singulide lezyonu olan dişi sıçanların yeni doğurdukları yavrularını korumadıkları ve erkek sıçanlara karşı ilgilerinin arttığı görülür. Erkek sıçanlarda ise gyrus singulinin belirli bir bölgesinin uyarılması, penis ereksiyonuna sebep olmaktadır.

Limbik sistemin, bazı otonom fonksiyonların ortaya çıkmasında rolü vardır. Korpus amygdaloideum, edinilmiş tecrübelerle bağlı olarak bazı otonom fonksiyonları etkileyebilir. Örneğin daha önce bir köpeğin saldırısına uğramış bir şahıs, saldırgan olmayan bir köpek ile karşılaşır bile korkabilir. Kişinin eski tecrübesine bağlı ortaya çıkan bu durumda kalp ritminde artış, terleme, solunum artışı gibi otonom cevaplar görülebilir. Bu cevaplar vücudun fizyolojik ihtiyacına bağlı olarak gelişen refleks cevaplar olmayıp, edinilmiş tecrübeye bağlı olarak ortaya çıkan cevaplardır.

Koku duyusu dışındaki duyular, limbik sisteme, serebral korteksteki sekonder assosiasyon sahalarında değerlendirildikten sonra ulaşır. Koku duyusu ise limbik sistem ile direkt bağlantısı olan tek duydur. Diğer memelilerde, koku duyusunun emosyonel davranışlar üzerindeki etkisi genel olarak bilinmekte birlikte, insanlardaki etkisi tam olarak anlaşılamamıştır.

Öğrenme ve hafıza, limbik sistemde dahil olmak üzere, santral sinir sisteminin birçok bölgeleri ile ilgili kompleks fonksiyonlardır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hippocampal formasyonun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hippokampusu etkilenmiş lezyonlu hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlenmiştir. Lezyonun sol hippocampusta olduğu durumlarda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenmektedir (Taner, 1998). Epilepsi tedavisine yönelik olarak bir kaç vakada hippocampus bilateral olarak çıkarıldığında; bu şahısların daha önce edindikleri bilgilerle ilişkili uygulamaları

kısmi bir azalmaya rağmen yeterli ölçülerde başarmalarına mukabil yeni hiçbir şey öğrenemedikleri gözlenmiştir. Bu hastalarda çok kısa süreli anlık belleğin var olduğu, fakat bu belleğin uzun süreli hafıza formuna dönüştürülmesinde problemler olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar neticesinde edinilen bilgilerin beyinde üç formda kodlandıkları belirlenmiştir. Bunlar;

1. Duyusal Bellek,
2. Primer Bellek ve
3. Sekonder Bellek olarak isimlendirilebilir.

Sekonder bellek olarak nitelenen formun oluşmasında veya primer belleğin pekiştirilerek bu forma dönüştürülmesinde hippokampusun vazgeçilmez etkisi, bu gün tüm otoriteler tarafından kabul edilmektedir (Gökhan ve Çavuşoğlu, 1989).

2.4.7. Fonksiyon Bozuklukları ve Korsakoff Sendromu

Hippokampal formasyonun bilinen en temel görevi, kısa süreli hafızanın gerekli olduğu durumlarda pekiştirilerek uzun süreli hafıza formuna dönüştürülmesidir. Normal olarak bir anda edinilen bilgilerin günler veya aylar sonra geri çağrılabilmesi için uzun süreli bir hafıza formuna gereksinim vardır. Yapılan çalışmalarda hippokampusu lezyonlu kişilerin bu işlemi yürütemedikleri belirlenmiştir. Bu tür hastaların saniye veya dakikalar içinde bir bilgiyi alıp onunla ilgili vazifeyi gerçekleştirmelerine rağmen sonradan aynı işi becerememektedirler. Bilişsel fonksiyonların ve hafıza kaybının birlikte görüldüğü bu durum klinikte yaygın olarak Alzheimer hastalığında ortaya çıkmakta ve yapılan çalışmalarda bu hastalarda nörofibriler düğümler, nörotik plaklar ve spesifik beyin bölgelerinde nöronal kayıplar gözlenmektedir. Subikulum ve entorhinal korteks bu tür anomalilerin gözlemlendiği ilk bölgeler olup sonuç olarak hippokampal formasyon boyunca bilginin nakledilmesi açık bir biçimde engellenmektedir. Üstte genel hatları çizilen bu duruma Korsatoff sendromu adı verilmekte ve bu durum kronik alkoliklerinde ve uzun süreli tiamin eksikliğine bağlı olarak sıkça ortaya çıkabilmektedir. Tiamin eksikliği ile ilgili olarak yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda; mamiller cisim, talamusun dorsomedial nukleusu ve forniks sütunlarında tipik dejenerasyon modellerinin oluşması yanında, hippokampusta nöronal bir kayıpla beraber hafıza pekiştirme problemleri ortaya çıkmaktadır.

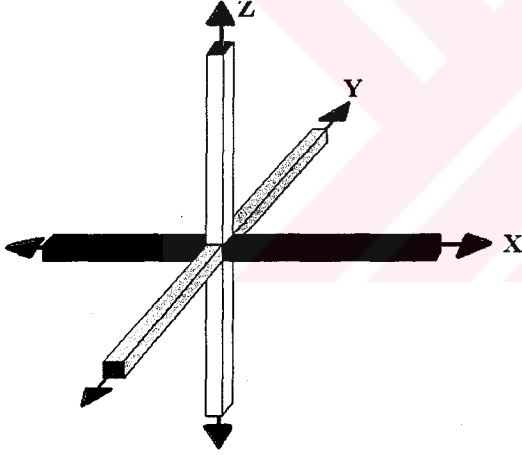
Bilateral hippocampal formasyon hasarı bazen geçici serebral iskemi veya ani kalp krizleri sonucunda görülmekte ve yukarıda bahsettiğimiz klinik tabloyla karşımıza çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar sonunda bir iskemi durumunda, hippocampusun CA1 bölgesinin diğer sahalara oranla daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. Bu gibi durumlarda hastaların iskemi öncesi edindikleri ve uzun süreli hafıza biçimine dönüştürdükleri bilgilerinde anlamlı bir kaybın olmadığı, buna karşılık yeni bilgi edinemedikleri gözlenmiştir.

Ayrıca singulat gyrusun anterior parçasının bilateral lezyonlarında hastaların emosyonel cevaplarının büyük ölçüde azaldığı, ilerleyen zamanda tam bir akinetik mutizm tablosunun ortaya çıktığı belirlenmiştir (Chronister ve Hardy, 1997, Nolte, 1993).



2.5. MORFOMETRİK ÇALIŞMALARDA YENİ VE TARAFSIZ SAYIM METOTLARININ KULLANILMA GEREKLİLİĞİ

Partiküller ile ilgili olan çalışmalarda, çalışılan biyolojik yapıların tümü, gerçekte 3 boyutlu, yani uzunluk, genişlik ve yüksekliğe sahip materyallerdir (Şekil 12). Oysa bunların histolojik incelemelerinde kullanılan “kesitler” yapıların iki boyutu, yani uzunluk ve genişlikleri (x ve y eksenleri) hakkında bir fikir verirken, üçüncü boyutları ile ilgili olarak araştırmacıya doğrudan bilgi sağlayamazlar. Bu eksiklik, uzun yıllar önce fark edilmiş olmasına rağmen, bu durumun üstesinden tamamen gelebilecek pratik bir metodun ortaya çıkması yakın zamana kadar mümkün olmamıştır. Stereoloji; yapıların iki boyutlu görüntülerinden onların üç boyuttaki durumlarını anlamayla ilgili bir bilim dalıdır. Yeni geliştirilen stereolojik sayım metotlarından biri olan “disektör” sayım metodu, geliştirdiği kurallar ile, gerçekte 3 boyutlu olan, yani uzunluk, genişlik ve yüksekliğe sahip biyolojik materyalleri, sahip oldukları bu özelliklerini göz ardı etmeden incelemektedir (Sterio, 1984).



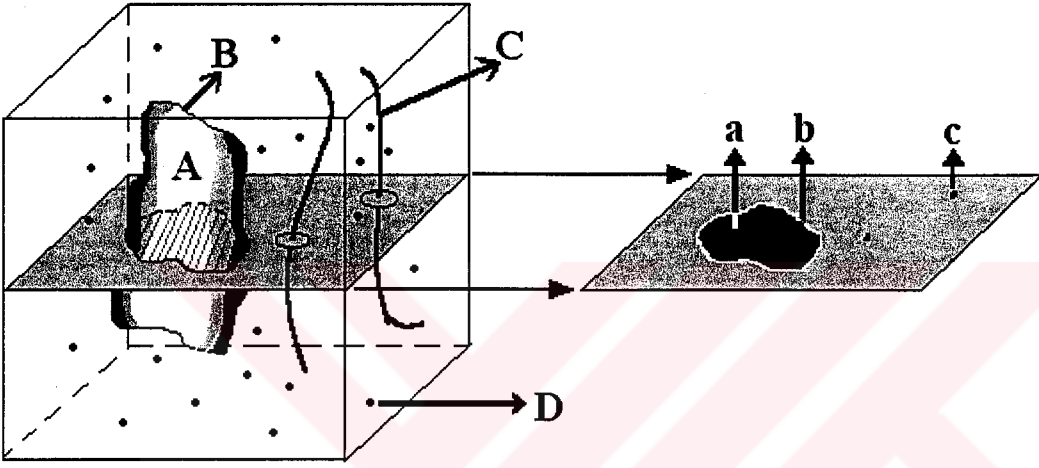
Şekil 12: Üç boyutun uzaydaki yönelimleri.

İncelenecek materyalin, boyutları çıplak gözle algılanabilecek büyüklükteyse, bu yapı hakkında herhangi bir boyutsal yanlışlık söz konusu olamaz, çünkü yapı tamamen görülebilmektedir. Bu nedenle, üç boyutlu algılama evrenimiz içerisindeki yapıların tüm yönleri ve boyutları tanımlanabilir. Fakat bizler konularımız gereği genellikle, görme eşiğimizin çok altında olan biyolojik materyaller ve

onların alt elemanları (hücre, çekirdek vb.) ile çalıştığımızdan, bu yapıların optik cihazlarla büyütülerek incelenmesi gerekmektedir. Mikroskop gibi optik araçlarla yapılacak incelemelerin bazı kuralları vardır. İlgili yapılar, örnek olarak alındıktan sonra, amaca uygun histolojik işlemlerden geçirilir ve mikrotom ya da ultramikrotom gibi araçlar kullanılarak kesitlere ayrılır. Bu kesitler, ışığa geçirgen olduklarından, histolojik çalışmalarda rahatlıkla kullanılırlar. Görüntüleri ise farklı tiplerdeki mikroskoplar aracılığıyla, ya direkt, ya fotoğraflanarak veya monitörlere yansıtılarak

incelenebilirler. Kullanılan görüntüleme yöntemi ne olursa olsun, artık üç boyutlu yapılardan alınmış olan iki boyutlu kesit görüntüleri söz konusudur.

Elde edilen bu görüntülerde, artık görüntü düzlemine dik olan “derinlik” boyutu hakkında doğrudan bir yorum yapma olanağı kalmamıştır. Histolojik çalışmaların başlangıcından, yeni stereolojik metotların ortaya çıkışına kadar olan süre boyunca kullanılan yöntemlerle, bu kayıp olan derinlik bilgisi görmezden gelinmiş veya bir takım eksik düzeltme faktörleriyle, bu verinin yokluğu doldurulmaya çalışılmıştır (Haug, 1986).



Şekil 13 Üç boyutlu yapıdan geçen iki boyutlu bir düzlemde biyolojik objelerin görünümü (Weibel, 1969 ve Royet, 1991’den değiştirilerek çizilmiştir).

Eğer kesit alma işlemini ve sonuçta elde edilen “kesit” kavramını daha yakından inceleyecek olursak, yukarıda anlatılan boyut kaybı olayının önemini daha iyi anlayabiliriz. Şekil 13’te, üç boyutlu bir hacim içerisinden alınan iki boyutlu bir kesit, içinden alındığı yapıyla beraber şematize edilmiştir. Burada, üç boyutlu katı bir eleman olan (A) parçacığı, iki boyutlu bir kesitle kesildiğinde, ortaya iki boyutlu bir izdüşümü çıkar (a). Benzer şekilde, iki boyutlu bir yüzey (sözgelimi bir zar) (B), iki boyutlu bir kesit düzleminde tek boyutlu bir çizgi olarak (b), tek boyutlu bir çizgi (C), sıfır boyutlu bir nokta olarak (c) görülürken, sıfır boyutlu nokta (D) ise kesitte görülemeyecektir.

Yani herhangi bir yapının iki boyutlu bir kesit düzlemi ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan izdüşüm, esas yapının sahip olduğu boyut sayısından bir boyut azalması ile sonuçlanacaktır (Weibel, 1969). Bu ifadeler aşağıdaki gibi formülize edilirler;

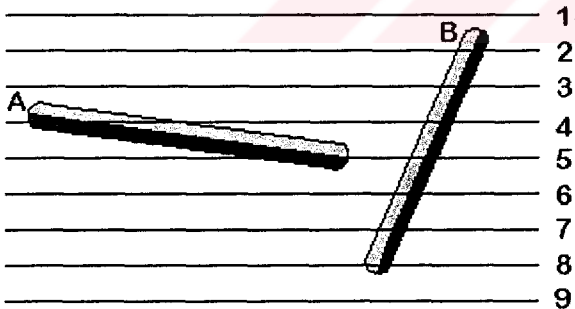
$$d_t = d_o - 1$$

d_t = Partikülün alınan kesitte ortaya çıkan izdüşümünün sahip olduğu boyut sayısı.

d_o = Partikülün gerçekte sahip olduğu boyut sayısı.

Görüldüğü gibi, kesitlerde ortaya çıkan izdüşümlerle bunların alındığı yapılar arasında boyutsal bir uyumsuzluk veya farklılık mevcuttur. Şekil 13’de D harfiyle gösterilen noktalara bakacak olursak, bunların kesit düzleminde ortaya çıkmadıklarını, yani iki boyutlu bir kesitle örneklenemediklerini görmekteyiz. Çünkü, noktasal bir yapı sıfır boyutludur. Dolayısıyla, boyut azalması prensibimize göre, 0-1’lik bir boyut olamayacağından, noktasal yapılar kesitte ortaya çıkamayacaktır (Weibel, 1969).

Stereolojik sayım metotlarının temel amacı kısaca, bir yapı içerisinde bulunan partiküllerin sayısını tarafsız ve etkin bir biçimde belirlemek olarak söylenebilir. Partikül sayısı, çalışılan yapının içerdiği bir özellik olmasına rağmen, “sayı” kavramı yapı içinde herhangi bir yer kaplamaz, yani boyutsuz (sıfır boyutlu) bir özelliktir. Sıfır boyutlu bir özelliği doğru bir biçimde değerlendirmenin tek yolu ise, 3 boyutlu bir sonda kullanmaktır (Howard ve Reed, 1998). Şekil 13’te, sıfır boyutlu noktaların iki boyutlu kesitlerde görülemediğini hatırlayalım. Oysa şekilde, kesit görüntüsüne değil, sol taraftaki şematik üç boyutlu şekle bakarsak, noktaları açıkça görebiliriz. Bu şekilde, sıfır boyutlu bir yapıyı veya “sayıyı” neden üç boyutta örneklememiz gerektiğini daha açık bir biçimde kavrayabiliriz.



Şekil 14: Doku içerisinde farklı yönelimde bulunan aynı büyüklükteki partiküller ve numaralarla gösterilen kesit düzlemleri (Mayhew ve Gundersen, 1996’den değiştirilerek çizilmiştir).

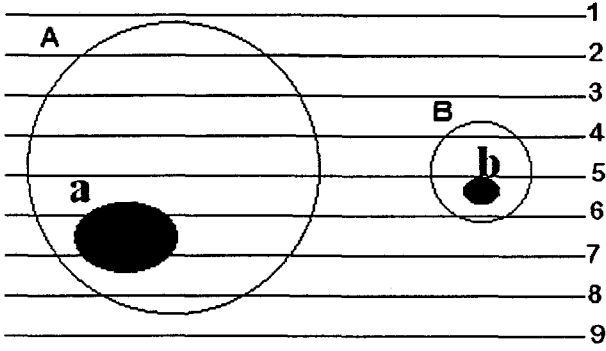
İki boyutlu kesit görüntüleri üzerinde doğrudan yorumlar yapmanın tek sakıncası boyut azalması prensibi değildir. Herhangi bir doku elemanının kesitlerde ortaya çıkan izdüşümlerinin niteliği, a) Partikülün yapı içerisindeki yerleşimine (oryantasyonuna), b) Partikülün büyüklüğüne ve c) Kesit alma yönüne bağlıdır (Mayhew ve

Gundersen, 1996). Bu etkileri kısaca gözden geçirelim.

a) Partikülün Yapı İçerisindeki Yerleşimi:

Bir partikülün kesitlerde ortaya çıkan izdüşümlerinin şekli ve sayısı, o partikülün kesit alma yönüne göre olan pozisyonuna bağlı olarak değişir. Şekil 14’te, her ikisi de

çubuk şekilli ve eşit boyutlarda olan iki partikülün kesitler tarafından kesilmesi şematize edilmiştir. A partikülü, kesit düzlemine B partikülünden daha fazla paralel durumdadır. Dolayısıyla izdüşümleri daha az sayıda kesitte görülecektir. B partikülü ise, kesit düzlemine daha diktir ve çok daha fazla sayıdaki kesit tarafından örneklenmektedir (Mayhew ve Gundersen, 1996). Bu örnek kaba da olsa, partikül pozisyonunun izdüşüm şekline nasıl etki ettiğini göstermektedir.



Şekil 15 Yapı içerisinde bulunan farklı büyüklükteki partiküller ve bunlardan geçen kesit düzlemleri (Mayhew 1991'den değiştirilerek çizilmiştir).

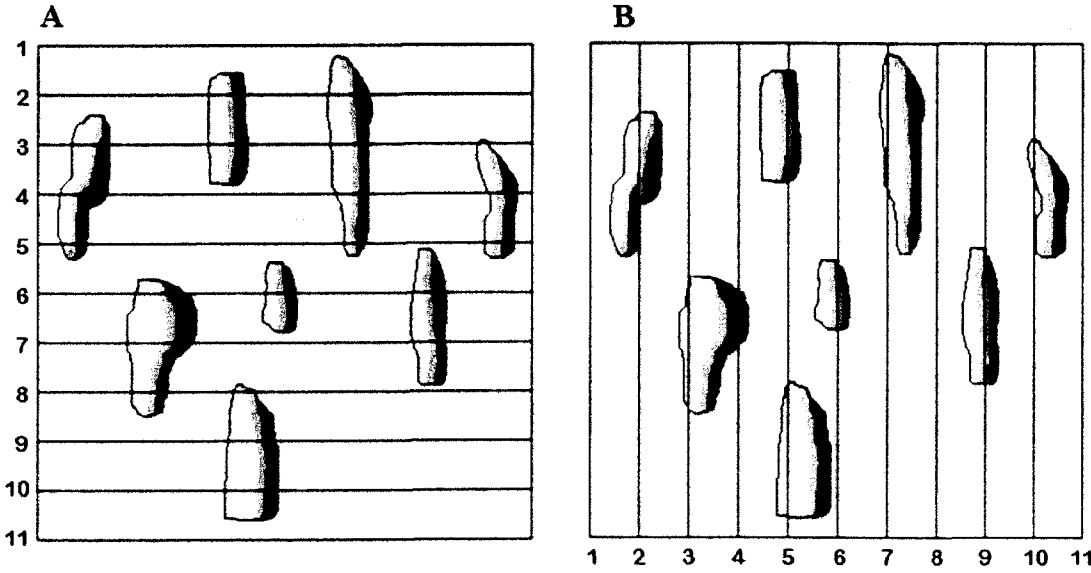
b) Partikül Büyüklüğü:

Partiküller, kesitlerde büyüklükleri ile doğru orantılı sayıda izdüşüm verirler. Şekil 15'de görüldüğü gibi, büyük olan A partikülü, küçük olan B partikülünden daha fazla sayıda kesitte ortaya çıkacaktır. Bu partikülleri hücre, bunların içinde görülen a ve b yapılarını da hücrelerin çekirdekleri olarak kabul

edersek, daha küçük olan çekirdeklerin, hücrelere göre daha az sayıda kesilme şansına sahip olduklarını görebiliriz. Nitekim, bir çok mikrografta, çekirdekçikten daha fazla sayıda çekirdek, çekirdekten daha fazla sayıda hücrenin gözlenmesi, biyolojik yapılarla ilgilenen tüm araştırmacılar tarafından fark edilen bir durumdur. Bu durumun nedeni, seri kesitlerin, partikülleri büyüklükleri ile doğru orantılı olarak örneklemesidir (Mayhew ve Gundersen, 1996).

c) Kesit Alma Yönü:

Kesit alma yönü de partiküllerin örneklenmesinde oldukça önemli bir etkindir (Gundersen, 1992). İçinde bulunan partiküllerin her yöne doğru uniform (tek tip) dağılım gösterdiği yapılar, izotropik yapılar olarak bilinir. Karaciğer, pankreas ve bir çok patolojik doku izotropik (eş yönelimli) yapıya örnektir. Fakat, genelde çalışılan biyolojik yapılar anizotropiktir, yani organ veya yapı içerisindeki elemanların dağılımı farklı gözlem açılarından değişik biçimlerde gözlenir. Sözgelimi, beyin korteksinin yapısı, böbrek üstü bezi, deri gibi tabakalı yapılar, vücuttaki tipik tabakalaşma gösteren anizotropik yapılara örnek olarak verilebilir.



Şekil 16 :Doku içerisindeki partiküllerin yönelimine dik ve paralel alınan aynı kalınlıktaki kesitler (Coggeshall, 1992, Gundersen, 1992'den değiştirilerek çizilmiştir).

Şekil 16'da, partiküllerin belli bir ortak eksene göre yerleşim gösterdiği bir yapıdan alınan seri kesitler görülmektedir. Şeklin A bölümünde kesitlerin partikül uzun eksenlerine dik, B'de ise paralel konumda alındığı şematize edilmiştir. Her iki şekil de aynı yapıya ait olmasına rağmen, A'daki partiküller daha fazla kesit düzlemi tarafından kesilmiş ve tüm kesitlerde toplam 21 tane partikül izdüşümü ortaya çıkmıştır. B kısmında ise, uzun eksene paralel olan kesitler daha az sayıda partiküle isabet etmekte ve tüm kesitlerde toplam 9 tane partikül izdüşümü gözlenmektedir (Coggeshall, 1992, Gundersen, 1992).

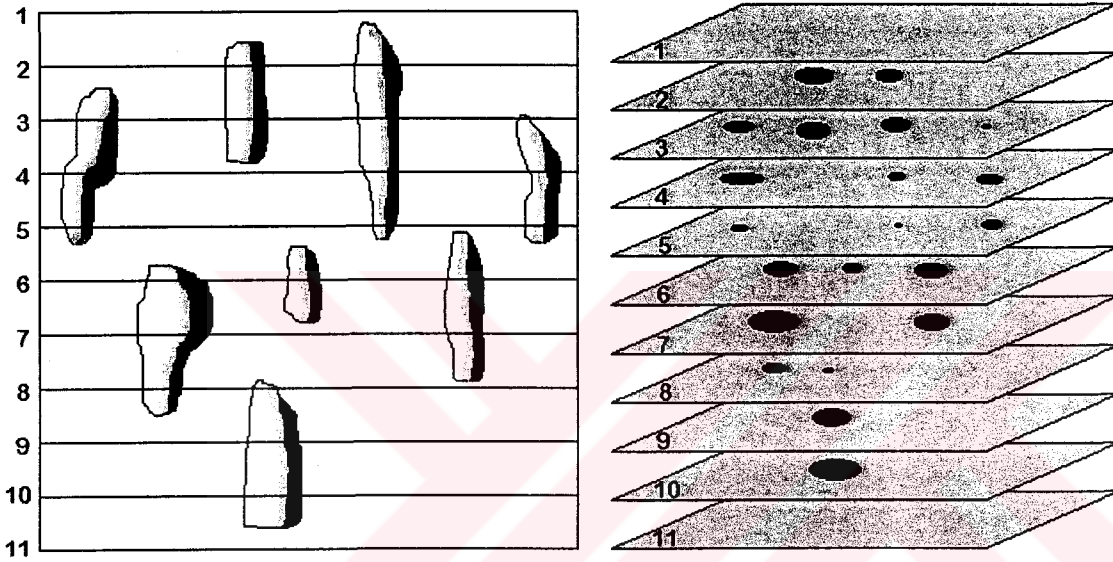
Tüm bu faktörlerden de anlaşılacağı gibi, partiküllerle onların kesitlerde ortaya çıkan izdüşümlerinin sayısı arasında, yukarıdaki etkenlere bağlı bir ilişki söz konusudur. Bundan dolayı, kesitlerde iki boyutta görülen partikül izdüşümlerini esas alarak, bunların alındığı partiküllerin sayıları hakkında doğrudan bir yoruma gitmek, çoğu zaman araştırmacıyı yanlış sonuçlara götürecektir (Coggeshall, 1992, Gundersen, 1992).

2.5.1. Partikül Sayımı İçin Kullanılan Eski Metotlar

Mikroskobik çalışmaların başlangıcından günümüze kadar, ilgili biyolojik yapı içerisindeki partikülleri saymak için bir çok değişik metot kullanılmıştır. Metotların çok sayıda olmasının bir sebebi de, her metodun kendi içerisinde bir takım hata kaynaklarına sahip olması ve bunları telafi etmek için yenilerinin icat edilmesidir

(Haug, 1986). Şimdi kısaca, eski metotlarda kullanılan mantıksal temelleri ve bunların ne tip hatalara yol açabileceğini inceleyelim.

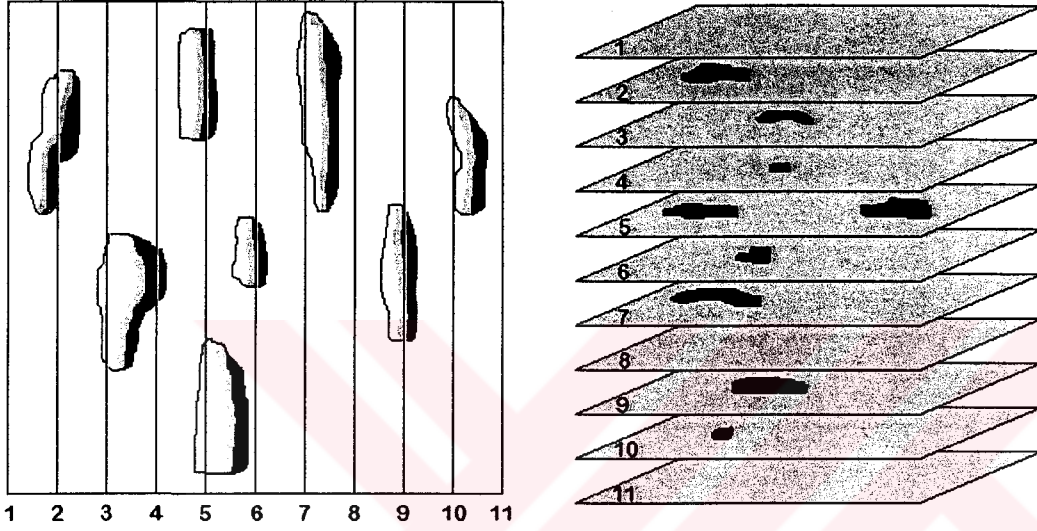
Bir kesit görüntüsünde izdüşümleri görülen partiküllerin sayılması için ilk kullanılan mantık, doğrudan izdüşümlerin sayılmasıdır. Bu yaklaşımda, taraflı bir ön kabul yapılarak, izdüşüm sayısının partikül sayısına eşit olduğu kabul edilmektedir. Halbuki, yukarıda da belirtildiği gibi, kesitlerde ortaya çıkan partikül izdüşümlerinin sayısı, sadece partikül sayısına değil, aynı zamanda kesit yönü, partikülün büyüklüğü ve partikülün yönelimi gibi parametrelere de bağlıdır (Coggeshall, 1992).



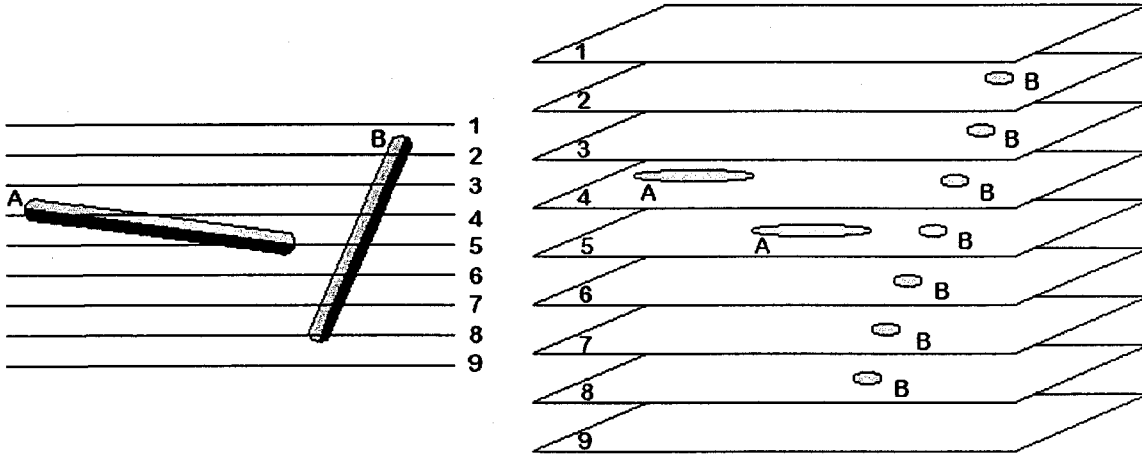
Şekil 17: Doku içerisindeki partikül yönelimine dik alınan kesitler ve iki boyutlu düzlemlerdeki izdüşümleri (Gundersen, 1992).

Şekil-17’de görüldüğü gibi dokudan alınan kesit yönüne bağlı olarak elde edilen iki boyutlu düzlemlerde gözlenen izdüşüm sayısı ile partikül sayıları arasında çoğu zaman doğrusal bir ilişki yoktur. Doku içinde 8 partikül olmasına rağmen ilgili yapıdan alınan 11 kesitte gözlenen izdüşüm sayısının 21 olduğu görülmektedir. Kesitlerde ortaya çıkan izdüşüm sayısının biyolojik yapıdaki partikül sayısının bir ifadesi olduğu ön kabulü ile yapılacak bir çalışmada, sistematik sayım hatalarının yapılması kaçınılmazdır (West, 1993). Eğer araştırmacı tüm kesitlerde değil de, kesitler arasında yapacağı bir örneklemeden sonra izdüşümleri sayacak olursa, sözcülemi 1.,4.,7.,9. ve 11. kesit düzlemlerindeki izdüşümleri sayacak olursa, 6 partikül izdüşümü görecektir. Yapılan örnekleme neticesinde bulunan sonuç, bazen tesadüfi bir biçimde partikül sayısını doğru bulmuş olsa bile, bu tür bir sonuç hiç bir zaman garanti edilemeyeceği için çalışma objektif olmayacaktır (West, 1993).

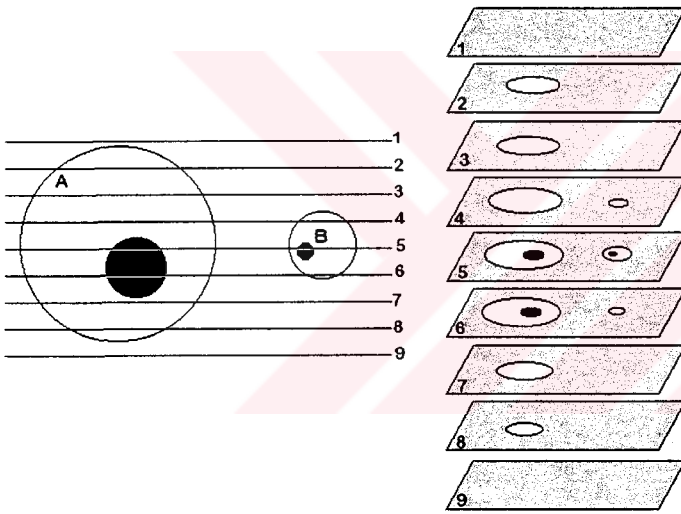
Şekil 18’de partikül yönelimine paralel alınan tüm kesitlerdeki izdüşümler sayılırsa, bunların 9 adet olduğu görülecektir. Yine yukarıdaki gibi kesitler arasında bir örnekleme yapılarak, örneğin 1., 4., 7., 9., ve 11. Kesit düzlemlerindeki izdüşümler sayılırsa, burada toplam 3 adet izdüşüm olduğu görülecektir. Yani bir doku bloğu içindeki partiküllerin, alınan kesit yönüne bağlı olarak izdüşümlerinin sayısının değişebileceği gerçeği göz ardı edilerek yapılacak bir çalışmanın sonuçları güvenilir sonuçlar olamayacaktır.



Şekil 18 Doku içerisindeki partikül yönelimine paralel alınan kesitler ve iki boyutlu düzlemlerdeki izdüşümleri (Gundersen, 1992).



Şekil 19: Doku içerisinde bulunan farklı yönelimdeki partiküller ve iki boyutlu düzlemlerdeki izdüşümleri (Mayhew ve Gundersen, 1996).



Şekil 20 : Doku içerisinde bulunan farklı büyüklükteki partiküller ve iki boyutlu düzlemlerdeki izdüşümleri

Şekil 19'da görüldüğü

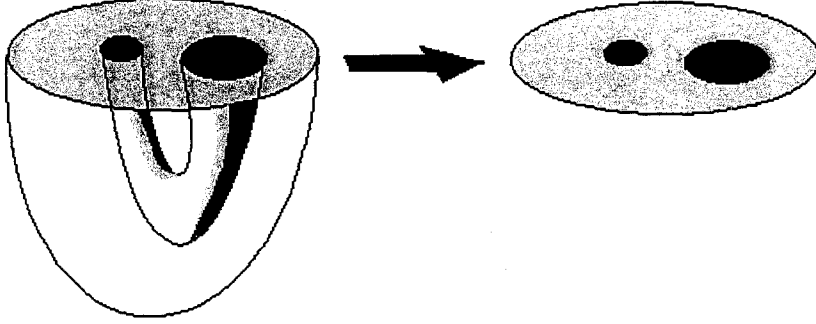
gibi doku içinde yatık duran bir A partikülü ve dik duran bir B partikülünden aynı yönde alınan kesitlerdeki izdüşümlerine bakacak olursak, A partikülünün 2, B partikülünün 7 kesit düzleminde izdüşümlerinin olduğunu görürüz.

Oysa doku içerisindeki

partiküllerin gerçek sayısı ikidir. Bu durum partiküllerin doku içindeki oryantasyon

farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Şekilde görüldüğü gibi, doku içindeki partikül yerleşim ve yönelim farklılıkları, alınan kesit düzlemlerinde gözlenen izdüşümlerin sayısına etki etmektedir (Mayhew ve Gundersen, 1996). Bir büyük ve bir küçük hücre ile bunların çekirdekleri (siyah daireler) şekil 20'de şematize edilmiştir. Bu hücrelerden geçtiği varsayılan kesitler çizgiler halinde ve bu kesitlerdeki partikül izdüşüm görüntüleri de şeklin sağında gösterilmiştir. Görüldüğü gibi, büyük partiküller, aynı aralıkta kesitlerle kesildiklerinde küçük olanlardan daha fazla sayıda kesitte ortaya

çıkma şansına sahiptirler. Belirtilen şekildeki büyük hücre 5, çekirdeği 2, küçük hücre 3, çekirdeği ise 1 kesitte ortaya çıkmıştır. Partikül büyüklüğü göz önüne alınmadığı takdirde, doğrudan izdüşüm sayısından partikül sayısına ulaşmanın mümkün olmadığı açıkça görülmektedir (Coggeshall, 1992).



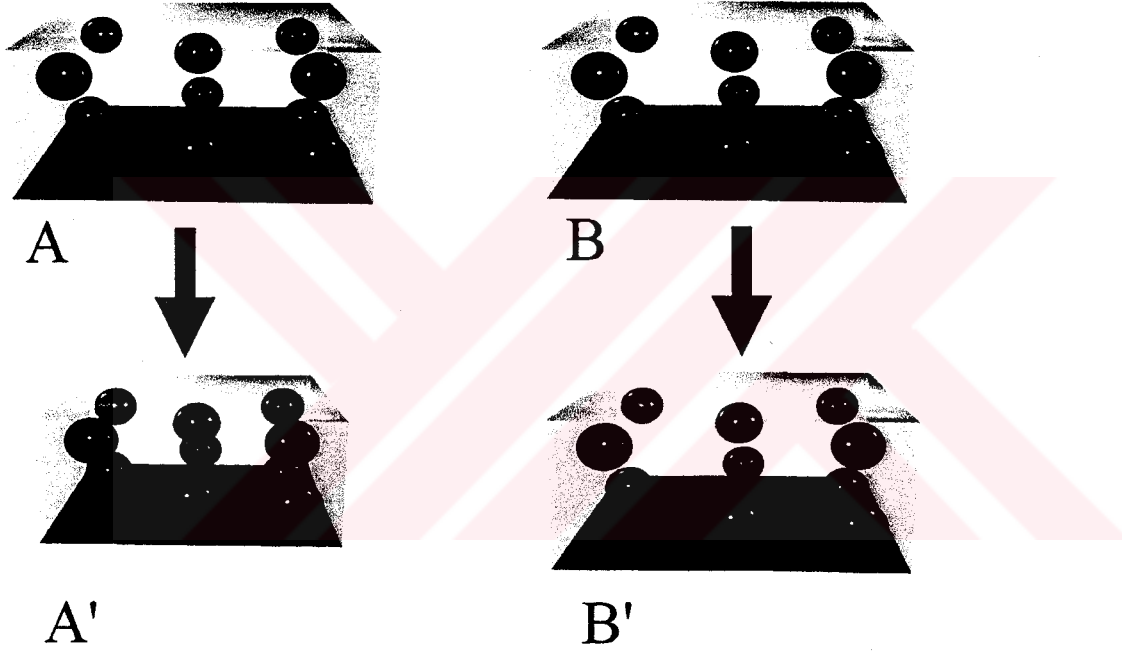
Şekil 21 Doku içerisinde bulunan kıvrıntılı bir partikülün iki boyutlu düzlemdeki izdüşümleri

Şekil 21’de gösterildiği gibi; küresel yapıda olmayan bazı partiküller, iki boyutlu olan kesit düzlemlerinde birden fazla izdüşümle temsil edilebilirler. Dolayısıyla üç boyutlu bir sayım sondası kullanılmazsa ve partikülle ilgili bir ön bilgi de yoksa, yapılan sayımda gerçek değerden önemli sapmalar ortaya çıkabilir (Sterio, 1984).

Partikül sayımı için yaygın olarak kullanılan bir diğer yaklaşım da yine doğrudan izdüşüm sayısını partikül sayısına eşit olarak kabul etmekle beraber, yapılan çalışmada deney ve kontrol gruplarının ilgili bölgeleri arasında oransal ilişkiler kurma çabalarıdır. Yani ilgili bölgeden elde edilen toplam izdüşüm sayısı yerine, karşılaştırılan gruplar arasında izdüşümlerin yüzde oranları değer olarak ifade edilir. Örneğin bir çalışmada, beynin belli bir bölgesinde iskemi (kan akımı azalması) oluşturan bir ajan kullanılarak bu ajanın o bölgedeki toplam nöron sayısına olan etkileri araştırılmak isteniyor olsun. Böyle bir çalışmada, iskemik ajanın tatbik edildiği deney grubu ve bir de zararsız madde ile (örneğin serum fizyolojik ile) muamele edilen kontrol grubu kullanılacaktır. Söz gelişi çalışmanın sonuçları elde edildiğinde, iskemi oluşturan ajana maruz bırakılan grubun ilgili beyin bölgesindeki nöron sayısı, kontrol grubuna göre % 30 azalmış olarak bulunsun. Araştırmacı, elde edilen bu verilere göre bir yorum yapacak olursa, ilacın ilgili bölgede nöron kaybına sebep olduğu sonucunu çıkaracaktır. Ancak daha önce de belirtildiği gibi izdüşüm sayısı çoğu zaman partikül sayısının bir ifadesi olmadığı gibi, partikülün büyüklüğü, yönelimi ve şeklinde ifade edilen oransal değere sistematik yansımaları olacaktır. Ayrıca bu tip bir yaklaşımda, deney ve kontrol gruplarının, uygulanan histolojik işlemlerden aynı oranda etkilendikleri kabul

edilmekte, bu sayede deney ve kontrol gruplarının sonuçları arasında doğrudan bir karşılaştırma yapılmaktadır. Bu tip bir mantığın kullanılmasıyla birden fazla sistematik hatanın yapılması söz konusudur (Gray, 1996). Bu karşılaştırmanın gerçeği yansıtabilmesi için, ilaçlı ve kontrol gruplarının ilgili beyin bölgelerinin hacminde anlamlı bir değişimin olmadığı garanti edilmeli veya eğer bir değişim olmuşsa her iki grupta da bunun aynı oranda olduğunun belirlenmesi gerekmektedir (Oorschot, 1994). Yukarıda verilen örnekte ise bu tip bir değişim göz önüne alınmadığından, yapılan yorumlar da hataya açık olacaktır.

DENEY GRUBU KONTROL GRUBU



Şekil 22 Deney ve kontrol gruplarının doku bütüşmesi açısından karşılaştırılması

Şekil 22'de şematize edildiği gibi; verilen bir ilacın etkisini araştırmak için yapılan bir çalışma sonucunda, denek ve kontrol gruplarının ilgili bölgelerinden alınan doku örneklerinde, ilacın etkisine bağlı olarak meydana gelen bütüşme şematik olarak görülmektedir. Eğer böyle bir çalışmada kullanılan sayım metodu ilacın ilgili bölgede herhangi bir hacim değişikliğine neden olmadığını garanti edemiyorsa ve sadece sayısal yoğunluk değeri esas alınarak bir yorum getirilmeye çalışılıyorsa burada görülen bütüşme sonucu birim hacimde bulunan partikül sayısı artarken, toplam partikül sayısı değişmeyeceğinden, sonuçta yapılacak olan biyolojik yorum yanlış olacaktır. Sayısal

yoğunluk değerini esas veri olarak kullanabilmek için organın toplam hacmindeki değişikliğin saptanması gerekir (Oorschot, 1994).

Önceki bölümlerde bahsettiğimiz mantıksal ve metotsal yaklaşımların olumsuzluklarını fark eden araştırmacılar bu problemlerin giderilmesi amacıyla yönelik bir takım önlemleri ileri sürmüşlerdir. Öne sürülen bu fikirlerin temel mantığında, yine doğrudan izdüşümlerin sayımının esas alınmasının yanında, bir takım hata kaynaklarının matematiksel formüllerle düzeltilme esasına dayanmaktadır (Haug, 1986). Bu amaca yönelik olarak, 1944'te Floderus, 1946'da Abercrombie, 1962'de Weibel ve Gomez ve 1962'de Ebbesson tarafından bir takım düzeltme formülleri geliştirilmiştir (Haug, 1986).

Bu düzeltme formüllerinin geliştirilmesinin temel sebebi aslında izdüşüm sayılarıyla partikül sayıları arasında her zaman bulunmayan doğrusal ilişkinin kurulmasına yöneliktir. Düzeltme formüllerinin kullanıldığı metotlarda yapı ile ilgili bir çok ön kabul tasarlanmakta ve daha sonra bu ön kabullere dayanarak, izdüşüm sayıları formüllerle partikül sayılarına dönüştürülmeye çalışılmaktadır.

Geliştirilen bu tür yaklaşımlar kendi mantık silsilesi içerisinde genel anlamda doğru olmasına rağmen, aynı düzeltme faktörünü kullanan değişik araştırmacıların farklı sonuçlara ulaşmasının sebebi yapı ile ilgili düşündükleri ön kabullerin çoğu zaman gerçekleşmemesidir. Biyolojik yapılarla ilgili en sık yapılan ön kabullerden bazıları; bir partikülün en büyük çaplı izdüşümü onun çapını temsil eder, deney ve kontrol grupları benzer histolojik işlemlerden geçtiklerinde aynı derecede etkilenirler, hücre çekirdekleri küre biçimlidir, hücrelerin doku içerisindeki yönelimi düzenli (izotropik) veya rastgeledir (anizotropik) şeklinde özetlenebilir. Bu ön kabullerin geçerliliklerinin garanti edilememesinden dolayı, buradan kaynaklanabilecek hataları düzeltmek için kullanılacak düzeltme faktörleri de yeterli güvenilirlikte olmayacaktır. Bir başka ifade ile, böyle bir yaklaşımın doğru olabilmesi için, ilgili çalışmada yapılan varsayımların hepsinin gerçek olması gerekmektedir (Williams ve Rakic, 1988). Ayrıca, tek bir metot için birden fazla araştırmacının farklı düzeltme faktörleriyle ortaya çıkmaları, bu düzeltme faktörlerine olan güveni sarsmaktadır.

İlgili düzeltme faktörlerinden en yaygın olarak kullanılanı 1987 yılına kadar 1200 defa atıfta bulunulan, 1946 yılında Abercrombie tarafından geliştirilmiş olanıdır (Williams ve Rakic, 1988). Bu formülün amacı, diğer araştırmacıların formülleri gibi,

izdüşüm sayısının partikül sayısına dönüştürülmesidir. Bir kesit düzleminde gözlenmekte olan tüm izdüşümler (kesitin alt ve üst kenarına isabet eden kesilmiş partiküllerde bütünlük gibi) sayılmakta, daha sonra bir formül ile hata düzeltilmeye çalışılmaktadır.

Abercrombie (Abercrombie, 1946)'nin formülü:

$$N = n \times \frac{t}{t + D}$$

N = Gerçek partikül sayısı

n = İzdüşüm sayısı

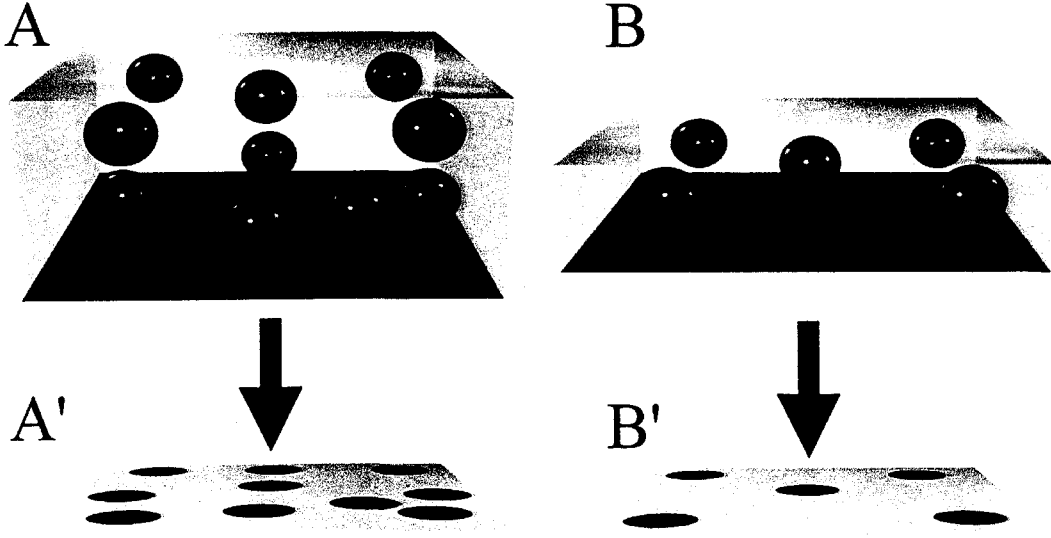
t = Kesit kalınlığı

D = Ortalama partikül çapı

Sözgelimi 10 µm kalınlıktaki bir kesit içerisinde 20 adet partikül izdüşümü sayılmış ve ortalama partikül çapı da 5 µm olarak bulunmuş olsun. Yukarıdaki formüle göre değerler yerlerine konulursa, gerçekte bu kesitin hacmine ait olan partikül sayısı 13 olarak hesaplanacaktır.

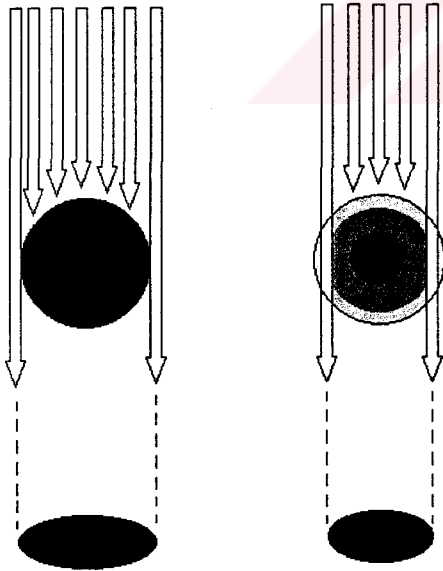
Konu edilen yaklaşımla doğru sonuca ulaşılabilmenin tek yolu yapı ile ilgili önceden düşündüğümüz kabullerin gerçekleşip gerçekleşmeme şartına bağlıdır. Yani partiküllerin şekil ve büyüklüklerinin sabit ve birbirine benzer olması, doku içerisindeki yönelimlerinin öngörüldüğü gibi olması, kesit alma esnasında kalınlığın değişmemesi gerekmektedir (Williams ve Rakic, 1988).

Bilindiği gibi biyolojik ortamlardaki partiküllerin şekil ve büyüklüğü tek tip olmamakla beraber deney koşullarına ve takip işlemlerine bağlı olarak da bahsedilen parametrelerde değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişimlerin hangi yönde ve ne derecede olduğunu çalışma sırasında tespit etmek hemen hemen imkansızdır. Kesit kalınlığı da çok değişken bir parametredir. Özellikle parafin kesitler olmak üzere, dondurma kesitlerde, plastik maddeye gömülmüş doku kesitlerinde mikrotomda alınmak istenen kesit kalınlığı ile bundan sonra çeşitli işlemlerden geçirilen preparatın kalınlığı arasında önemli değişiklikler tespit edilmiştir (Gray, 1996).



Şekil 23: Kesit kalınlığına bağlı olarak partikül izdüşüm sayılarının artması (Weibel, 1969 ve Royet, 1991'den değiştirilerek çizilmiştir).

Eski sayım ve ölçüm metotlarının diğer bir yanlış yaklaşımı da almış oldukları kesitlerin kalınlıklarını sıfır veya yokmuş gibi kabul etmelerinden kaynaklanmaktadır. Oysa elde edilen kesit her ne şekilde alınırsa alınsın belli bir kalınlığa sahip ve şekil 23 A ve B'de gösterildiği gibi kesit kalınlığının artıp azalmasına bağlı olarak içerdiği partikül izdüşüm sayılarının değişecektir.

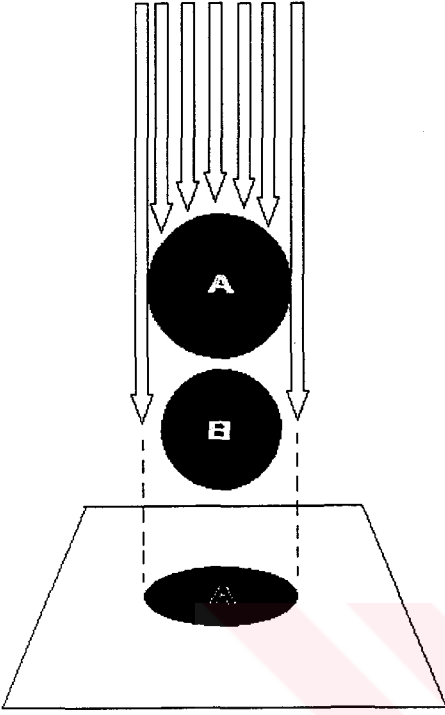


Şekil 24: Saydam ve yarı saydam objelerin iki boyutlu kesit düzlemlerindeki görüntüleri (Royet, 1991).

Şekil 23'te şematize edilen ve Holmes etkisi olarak adlandırılan bu durumu göz ardı ederek, yani pratikte kalınlığı olmayan kesitleri olarak bunlar üzerinde sayım ve ölçüm yapmak olanaksızdır. Sayım işlemleriyle ilgili olarak belirtilmesi gereken bir durumda partiküllerin ve içerisinde buldukları ortamların değişik koyulukta (kontrast) boyanma özellikleridir. Bir ortam içerisinde bulunan opak materyaller, daha az opak materyallerden iki boyutlu kesit düzlemlerindeki görüntüleri itibariyle farklılıklar göstermektedir. Opak bir objenin görüntüsü iki boyutlu düzlem üzerine dış sınırları en geniş şekliyle yansımaya karşın (overprojection), daha az opak bir objenin yansıyan görüntüsünün dış

sınırları daha küçük (underprojection) olacaktır (Şekil 24) (Royet, 1991).

Ortalama partikül çapı değerinin hesaplanmasıyla ilgili olarak şekil 25’de



Şekil 25: Doku içerisinde birbirlerini maskeleyen objelerin iki boyutlu düzlemlerdeki görüntüleri (Royet, 1991).

şematize edildiği gibi, iki boyutlu kesit düzlemlerinde, birbirlerinin görüntülerini örten izdüşümlerin olabileceği ihtimalinin de unutulmaması gerekir. Yine bu durumda da ortalama partikül çapı hesaplamalarında yanlış sonuçlara ulaşılabilecektir. Burada eski sayım metotlarıyla ilgili olarak hatırlatılması gereken Abercrombie'nin düzeltme faktörü yardımıyla, ilgili yapıdaki partiküllerin gerçek sayısı hesaplanmak istendiğinde, formülde (D) ile gösterilen ortalama partikül çapı parametresinin subjektifliğidir (Şekil 24 ve 25)

Biyolojik materyallerde sağlıklı ölçüm ve değerlendirmenin yapılabilmesi için temel ve vazgeçilmez şartlardan birisi de, örneklemin doğru olarak yapılmasıdır. Yaptığımız çalışmaya bağlı olarak, ilgili yapının (organ, doku, çekirdek)

tüm bileşenlerinde ölçüm yapmak, her zaman mümkün olmayabilir. Bir başka ifadeyle çalışılacak bölgenin durumuna bağlı olarak çoğu zaman olduğu gibi bir örneklemin yapılması kaçınılmazdır. Bu gibi durumlarda obje bileşenlerine ayrılarak incelenmelidir. Örneğin sayıları milyonlarla ifade edilebilen merkezi sinir sistemi içerisindeki nöron gruplarının tümünü saymak yerine, tarafsız ve etkin biçimde yapılacak bir örnekleme neticesinde elde edilen bölümlerde yapılacak sayımlar yeterli ve etkin olarak değerlendirilir (Gundersen ve Jensen, 1987).

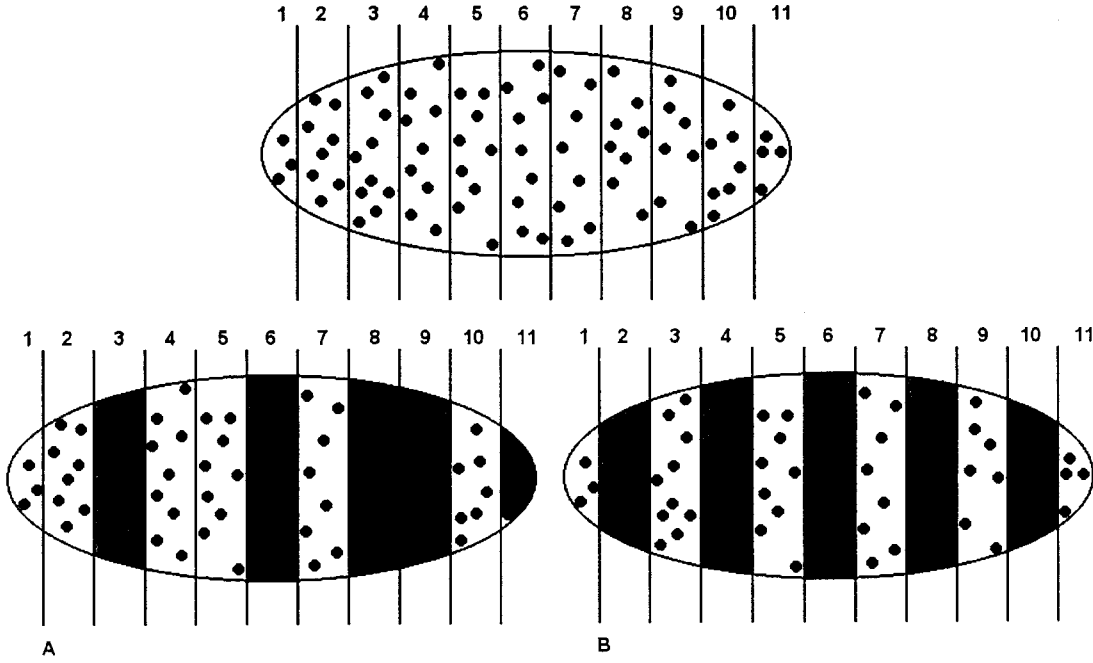
Eski metotlarla yapılan çalışmalarda, örnekleme tamamen rastgele ve isteğe bağlı bir tarzda gerçekleştirilmekte, ilgilenilen yapının bileşenlerinin en tipik veya patolojik bir çalışma yapılacaksa en patognomonik olanları, elde edilen preparatlardan en iyi boyanmış olanları seçilmekte, veya bir yapıdan alınan kesit serilerinden isteğe bağlı biçimde belirlenmiş hep aynı sıraya denk gelenler alınmakta, ve bunun gibi yaklaşımlarla elde edilen verilerden yorumlar yapılmaktadır. Bu tür bir örnekleme

neticesinde elde edilen veriler birbirine benzer ve tekrarlanabilir sonuçlar olsa bile, çoğu zaman gerçek sonucun ifadesi olmayacaktır.

Son on yıl içerisinde, kendi mantık bütünlüğü içerisinde “sistemik rastgele örnekleme” modeli olarak tarif edilip, standardize edilen, tarafsız ve etkin bir örnekleme modeli geliştirilmiştir. Bu model temelinde bileşenlerine ayrılarak incelenmesi gereken yapılar arasında, bir örnekleme yapılacağı zaman, tüm bileşenlere yapıyı temsil edebilme açısından eşit ve tarafsız şekilde şans verilmesi esasına dayanmaktadır.

Yapılan çalışmalarda doğru sonuca ulaşmanın şartlarından en başta geleni işlemlerin her aşamasında sistemik rastgele örnekleme koşuluna bağlıdır. Örnekleminin tarif edildiği gibi yapılmadığı bir çalışmanın diğer aşamalarda yeni stereolojik metotlar kullanılsa bile, gerçek değerlere ulaşma çoğu zaman mümkün olmayacaktır. Burada “sistemik” sözcüğü ile ilgilenilen bölgede yapılan bir ön çalışma sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda örnekleminin tekrar edilen periyodunu, “rastgele” sözcüğü ise belirlenen periyodun ilk elemanının tarafsız biçimde seçilmesini anlatmaktadır (Gundersen ve Jensen, 1987).

Sistemik rastgele örnekleme stratejisini teorik bir örnekleme anlatacak olursak; çalışma yaptığımız doku bloğunun tümünü 10 mikron kalınlığında kesitler haline dönüştürdüğümüzde, 300 kesit elde edilmiş olsun. Daha önce ilgili yapıyla ilgili bir ön çalışma sonunda elde edilen bilgiler ışığında, bu yapının tümünden alınacak 20 kesitte yapılacak ölçüm neticesinde, değerlendirme ve yorum yapılabileceği belirlenecektir. Bu durumda sistemik aralık $300/20 = 15$ olacaktır. Yani 15 sayısı bizim kesitleri seçerken dikkat etmemiz gereken periyot aralığını (sistemik aralık) temsil etmektedir. Örnekleminin rastgele şartını gerçekleştirebilmek için yapılması gereken; 1. ve 15. kesit arasında bulunanlardan (1.ve 15. dahil) herhangi birisinin, ilgili periyodu temsilen önyargısız ve rastgele biçimde seçilmesidir. Örneğin 1. ile 15. kesit arasından 3. kesit rastgele bir biçimde seçilmiş olsun. Belirlenen sistemiklik kuralına göre: $3, 3 + 15 = 18, 18 + 15 = 33, 33 + 15 = 48, \dots, 258 + 15 = 273$ numaralı kesitler alınarak yapı ile ilgili ölçüm ve ya sayımlar yapılabilir. Sistemik rastgele örnekleme neticesinde, ilgili birimden elde edilen tüm kesitlere, yapıyı temsil edebilme açısından eşit ve tarafsız biçimde seçilebilme şansının verilmesi, diğer örnekleme yaklaşımlarıyla arasındaki temel farklılığı göstermektedir (Gundersen ve Jensen, 1987).



Şekil 26 : Doku içerisinde bulunan partiküllerin sayımına yönelik olarak yapılan örnekleme stratejileri.

Şekil 26'da şematize edildiği gibi; ilgilenilen bölgenin tüm bileşenlerinde çalışmak yerine, ihtiyaca göre yapılacak bir örnekleme neticesinde elde edilen parçalarda ölçüm yapmak mümkündür. Örneğimizde partikülleri temsil ettiğini düşündüğümüz 82 nokta yapı içerisinde rastgele yerleştirilmiştir. Daha sonra ilgilenilen bölge belli bir kalınlıkta 11 bileşenine ayrılmıştır. Resimde A ve B ile gösterilen iki ayrı örnekleme modeline göre; A'da araştırmacı, isteğe bağlı bir şekilde, 3. ,6. ,8. ,9. ,11. dilimleri alarak buralarda bulunan noktaları saydığında 38 olduğunu tespit edecektir. İsteğe bağlı şekilde alınan bu 5 dilimin yapıyı temsil edebileceğini varsayan araştırmacı, tüm yapıdaki partikülleri bulmak istediğinde, tüm yapıdaki 11 dilimden 5 tanesini seçerek ölçüm yaptığından, sonucu $11/5$ ile çarpacaktır. Yani $38.11/5=83,6$ değerini elde edecektir.

Böyle bir yaklaşım ile ulaşılan sonuçlar tesadüfen gerçek değer veya ona yakın olsa bile, yapıyı oluşturan bileşenler örneklenirken isteğe bağlı davranıldığı ve tüm bileşenlere eşit derecede örneklenme şansı verilmediği için sonuçlar güvenilir olmayacaktır.

B şeklinde yapılan örnekleme de ise; bir ön çalışmayla elde edilen bilgilerle, ilgilenilen bölgenin $1/2$ sinde yapılan ölçümün yeterli olduğu tespit edildikten sonra, eşit aralıklı 11 dilim arasında sistematik rastgele örnekleme yapılmıştır. Daha sonra 1. ve 2. dilimler arasında, yapıyı eşit biçimde temsil edebilmeleri için rastgele seçim

yapılarak örnekleme gerçekleştirilmiştir. Örneğimizde 1.ve 2. dilim arasında 2.'nin belirlenmesiyle beraber, sistematik olarak 4., 6., 8., 10. dilimler alınarak ölçümler yapılmıştır. Burada 2. ,4. ,6. , 8. ,10. dilimlerde bulunan değer sayıldıktan sonra sonuç iki ile çarpılmak suretiyle (fraksiyon oranı) toplam sonuç olan 82 sayısı bulunmuştur.

Daha önce çalıştığımız yapı içerisindeki tüm partikülleri saymak yerine, iyi bir örneklemeyle elde edilen bileşenlerde değerlendirmeler yapmanın yeterli olduğunu belirtmiştik. Peki istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşmak için örneklemenin miktarı hangi kriterlere göre yapılmalıdır? Şimdi bu sorunun cevabını anlatmak için 'örnekleme stratejileri' incelenecektir. Bu noktada dikkat edilmesi gereken sadece 'sistematik rastgele' kuralına uymak değil, aynı zamanda yapıyı en iyi şekilde temsil edebilecek aralığın da doğru olarak tespit edilmesi zorunluluğudur. Yani bulunacak sonuçların 'hata katsayısı' (CE) ile 'varyasyon katsayısı' (CV) değerleri istenilen sonuca ulaşmak için araştırmacıya yol gösterecektir. Bir araştırmada yapılması gereken örnekleme stratejisinde kullanılan deneklerin yaşları, cinsleri, hormonal evreleri, ilgilenilen yapıların özel durumları, alınacak blokların fraksiyon oranları, blokların kaçta kaçının kesitler haline dönüştürüleceği ve kesitler üzerindeki alansal örneklemenin nasıl yapılacağı gibi parametrelerin her biri doğrudan etkilidir (Gundersen ve Jensen, 1987).

Grupta gözlenen nispi varyans (CV^2); grubun biyolojik doğal nispi varyansı (ICV^2) ile bireysel hesaplamalardan kaynaklanan hata katsayısı (CE^2) toplamına eşittir.

Bunu formülle:

$$CV^2 = ICV^2 + CE^2 \text{ şeklinde ifade edebiliriz (West ve ark., 1991).}$$

CV = Grupta gözlenen nispi varyansı

ICV = Grubun doğal nispi varyansı

CE = Bireysel hesaplamalardan kaynaklanan hata katsayısı

Sayı parametresi incelenen bir çalışmada, yapıdan belli bir kalınlıkla geçen tüm bileşenler üzerinde tarafsız ve etkin metotlarla ölçüm yapılırsa, bu gibi durumlarda bireysel hesaplamalardan kaynaklanan hata katsayısı (CE) değeri istatistiksel olarak bir anlam ifade etmez. Grupta gözlenen toplam nispi varyans değeri tamamen grupta gözlenen doğal biyolojik varyans (ICV)'tan etkilenecektir. Böyle bir çalışmada CV değeri istatistiksel açıdan yüksek bulunduğunda, yapılacak işlem denek sayısını

artırarak, denekler arasında var olan doğal varyansı (ICV) düşürmek olacaktır (West ve ark., 1991).

Ancak $CV^2 = ICV^2 + CE^2$ formülündeki bireysel hesaplamalardan kaynaklanan hata katsayısı (CE)'nin devreye girdiği durumlarda, sadece bireyler arasında gözlenen doğal nispi varyans (ICV) değil aynı zamanda hesaplamalardan kaynaklanan hata katsayısı (CE) değeri de sonuca katkıda bulunmaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi, bir ön çalışma sonunda elde edilen veriler ışığında, yapılacak etkin örneklemelemlerle bireysel hesaplamalardan kaynaklanan hata katsayısı (CE) değeri daha düşük değerlere çekilmeye çalışılır. Bir başka ifadeyle denekler arasında bulunan doğal nispi varyans (ICV) parametresi üzerinde manipülasyon yapma gücümüz kısıtlı olduğundan, yapılması gereken; hesaplamalardan kaynaklanan hata katsayısını (CE) etkin örneklemelemlerle kabul edilebilir sınırlara çekmek olacaktır (West ve ark., 1991).

Tüm bu açıklamalardan sonra, bir çalışmanın etkinliğinin nasıl artırılabilceğine bakacak olursak;

1. Grupta gözlenen toplam nispi varyans (CV) değeri üzerinde bireysel hesaplamalardan kaynaklanan hata katsayısı (CE) daha fazla etkinse, yapılacak şey hesaplamalarda kullanılan örnekleme sayısının artırılmasıdır (daha fazla sayıda blok almak, daha fazla kesitte partikül saymak vb. gibi).
2. Toplam nispi varyans değerine denekler arasında bulunan doğal biyolojik varyansın katkısı daha fazlaysa, yapılacak şey denek sayısının artırılması olacaktır.

Örneğin medulla spinalisin herhangi bir segmentindeki nöronların sayılması söz konusu ise, öncelikle yapılması gereken, en üst seviyedeki varyans hakkında bilgi edinilmesi olacaktır. Yani işe en düşük örnekleme seviyesiyle başlanılarak, aşama aşama istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılmaya gayret edilmelidir (önce elde edilen kesitlerin 1/10'u incelenir, değerler tatmin edici bulunmazsa kesitlerin 1/5'i incelenir vb)

Yapılan bir çalışmada, stereolojik hesaplamalardan kaynaklanan hata katsayısının (CE) grupta gözlenen toplam nispi varyansın (CV) yarısından küçük veya eşit olacak biçimde ayarlamasıdır. Yani $CE \leq \frac{1}{2} CV$ olmalıdır (West ve ark., 1991) Bilimsel çalışmalar sonunda elde edilen verilerin istatistiksel bir anlamının olabilmesi için "Grupta gözlenen toplam nispi varyans" (CV) değerinin 0,10'dan (% 10) küçük olması gerekmektedir. En fazla %10'luk toplam varyans değerine ulaşmak için $CE^2 \leq$

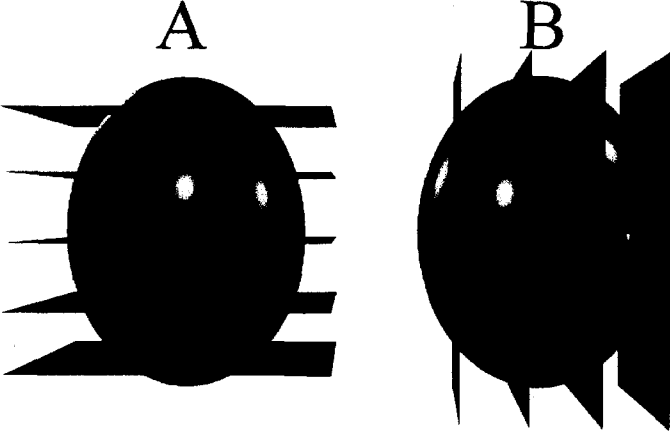
$\frac{1}{2} CV^2$ eşitliğinden yararlanarak yapılması gereken, CE değerinin yaklaşık 0.05 (%5) olacak biçimde bir örnekleme stratejisinin belirlenmesi olacaktır. Daha önceki çalışmalarda bulunmuş olan $1/2^n \leq 0,05$ (n=hayvan sayısı) eşitliğinden yararlanarak “n”sayısının 5 ve 5’ten büyük olduğu durumlarda sonucun 0,05’ten küçük olduğu açıkça görülmektedir. Yani hayvanlar arasında mevcut olan doğal biyolojik varyans değerini 0,05’te tutmak istiyorsak, her grupta en az 5 hayvan bulundurmak gerekmektedir (West ve ark., 1991).

2.5.2. Yeni ve Tarafsız Stereolojik Sayım Metotları

Modern anlamda ilk defa 1984 yılında Sterio tarafından geliştirilip yeniden tarif edilen disektör sayım metodu, daha önce belirttiğimiz kesit alma yönü, sayılacak olan partikülün büyüklüğü ve doku içindeki oryantasyonu, dokunun büzüşme ve genişlemesi gibi hesaplama hatalarına sebep olabilen tüm hata kaynaklarından bağımsız olan ve istenilen sonuca “tarafsız” bir biçimde ulaşabilen bir metottur (Sterio, 1984). Disektör sayım kurallarının temel mantığı, 1932 yılında, William R. Thompson tarafından tarif edilmiş olsa da, daha sonraki araştırmacılar tarafından göz ardı edilmiştir. 1984 yılında Sterio tarafından tekrar gündeme getirilmesi ile birlikte, partikül sayımı alanında yeni bir çığır açılmıştır.

Yapı ve fonksiyon arasındaki ilişkiyi anlamayı kolaylaştırmak için, doğru bir biçimde elde edilmiş sayısal verilerin değeri açıktır. Biyolojik materyallerden elde edilen sayısal morfolojik değerler (hacim, yüzey alanı, sayı, uzunluk, vb.) ilgili yapının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmasının yanı sıra, fonksiyonla olan ilişkisinin belirlenmesinde de etkilidir. Örneğin, çizgili kas hücresindeki mitokondrionların sayısı bize bu yapının enerji ihtiyacı ile ilgili temel bir ipucu verir. İşte bu sayısal morfolojik değerlerden biri olan sayı parametresinin hesaplanmasında kullanılan disektör metodu, iki boyutlu iki kesit düzleminin kullanılmasıyla oluşturulan üç boyutlu bir sonda yardımıyla, bilinen bir hacimde yer alan partikülleri, şekillerinden, büyüklüklerinden ve yönelimlerinden etkilenmeksizin, belirleyebilen yöntemin adıdır. Dolayısıyla, bu sistemin temeli, belirli bir “t” mesafesi ile birbirlerinden ayrılmış iki paralel kesit düzleminden oluşmaktadır. Disektör metodu ile yapılacak sayım kuralının yaklaşımı oldukça basittir. İzdüşümü, alınan kesit çiftlerinden sadece birinde gözlenip diğerinde gözlenmeyen partiküller sayıma dahil edilir. Stereoloji terminolojisinde, bu şekilde sayılabilen partikül izdüşümleri “disektör partikülü” olarak isimlendirilir ve “Q⁻”

simgesi ile gösterilirler. Metodun uygulanması sırasında tek dikkat edilmesi gereken nokta, izdüşümlerin her birinin hangi partiküle ait olduğunun belirlenmesidir (Sterio, 1984). Toplam partikül sayısının, bir kaç yüz gibi küçük sayılarla ifade edilebildiği yapılarda yapılacak iş tüm partikülleri ayrıntılarından daha sonra bahsedeceğimiz



Şekil 27 Objelerden herhangi bir yönde geçen kesit kalınlığı sabit ve paralel kesitler

disektör metodunun kuralları uyarınca saymaktır. Sayıları binlerle veya daha büyük rakamlarla ifade edilen partikülleri saymak için ise, toplam partikül sayısını belirlemek gayesiyle bir örnekleme yapmak gerekecektir (Gundersen ve Jensen, 1987).

Örnekleme ile yapılacak olan toplam partikül sayısı

hesaplamaları için, disektör metodunun bir çok uyarlanması geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi, fraksiyonlama yaklaşımı ile yapılan örnekleme uygulamalarıdır. Bu metotta, incelenen bölgede, bir ön çalışma sonucu elde edilen bilgiler ışığında, yapının belirli bir parçasında (fraksiyonunda) bulunan partiküllerin sayılması söz konusudur. Toplam partikül sayısını hesaplamak için, çalışılan fraksiyonda elde edilen verilerin, fraksiyonlama katsayıları ile çarpılması gerekir. Yapılan fraksiyonlamada belirlenen örnekleme aralığı yeterli ise, hesaplar doğru ve güvenilir olacaktır (Gundersen ve Jensen, 1987). Örnekleme sonucu 1/3 oranında örneklenen bir yapıda uygulanan disektör sayım metodundan elde edilen sonuçlar 3 ile çarpıldığında, yapıdaki toplam partikül sayısı hesaplanır. Toplam partikül sayısı hesaplamalarında yaygın olarak kullanılan bir diğer yaklaşım da, önce birim hacimde bulunan partikül sayısının (N_v , yani sayısal yoğunluğun) sonra yapının toplam hacminin (V_{ref} yani referans hacminin) hesaplanmasını gerektiren iki aşamalı bir işlemin gerekliliğidir (Gundersen, 1986).

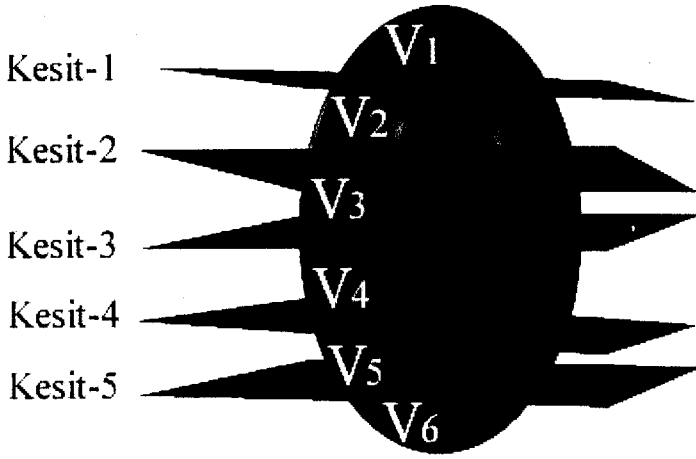
Disektör Metodunun Uygulanmasındaki Temel Kurallar

1. Alınan kesitler birbirlerine paralel olmalıdır.
2. Kesit kalınlığı veya disektör yüksekliği yani iki kesit düzlemi arasındaki mesafe, sayılan en küçük çaplı partikülün $1/3$ veya $1/4$ 'ünden küçük olmalıdır.
3. Kesit çiftlerinden birisi örnek kesit, diğeri gözlem kesiti olarak değerlendirilmeli ve iki kesit arasındaki mesafe bilinmelidir.
4. Eğer sayım yapmak için bir çerçeve kullanmak gerekiyorsa bunun alanı bilinmelidir.
4. Kesitlerin ilk başlama noktası, sistematik ve rastgele biçimde seçilmelidir. Yani önceden belirlenmiş bir örnekleme aralığının ilk adımında rastgele bir kesitin seçimiyle başlanmalıdır.
5. İzdüşümleri kesit çiftlerinin birinde (örnek kesitte) bulunup, diğesinde (gözlem kesitinde) bulunmayan partiküller, (ayrıntılarında daha ileride bahsedilecek olan) tarafsız sayım çerçevesinin kurallarına göre sayılmalıdırlar (Sterio, 1984).

Şekil 27'de gösterildiği gibi; alınan kesitlerin birbirine paralel olmasının yanında kesit kalınlığı sayılmak istenen en küçük partikülün $1/3$ 'ü veya $1/4$ ünden küçük olmalıdır. Alınacak paralel kesitlerde oryantasyon önemli değildir. Yani organ doku ve benzeri yapıların her hangi bir ucundan başlayarak veya her hangi bir ekseninden (uzun eksen, kısa eksen vb.) başlayarak kesitler alınabilir.

Ayrıca incelen yapı ile ilgili olarak sayım yapılacak partiküller yani iki komşu kesit düzlemi arasındaki mesafe hakkında ön bilgi sahibi olunması gerekmektedir. Bu bilginin elde edilmesiyle kesit kalınlığı sayılacak partikülden daha küçük olacak biçimde ayarlanır. Kesit kalınlığı çalışmanın başında belirlendikten sonra çalışma bitene kadar kalınlık değiştirilmez. Hesaplamalar iki boyutlu düzlemden elde edilen üçüncü boyut göz önüne alınarak yapılacağından (bilinen bir hacimde) kesitlerin paralel olması ile beraber kesit kalınlığı da standardize edilmek zorundadır. Eğer partikül çapına göre ayarlanmış kesit aralığı ve paralel kesit alma kuralına uyulmayacak olunursa çalışılan bölge hacminin hesaplanması zorlaşacaktır.

Şekil 28'de gösterilmeye çalışıldığı gibi birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kesit düzlemleriyle oluşturulan dilimlerdeki kalınlıkların farklı olması ve paralel olmamalarından kaynaklanan her bir aralığın hacimsel değişikliklerini hesaplamak mümkün olmayacağından elde edilen veriler güvenilir olmayacaktır.

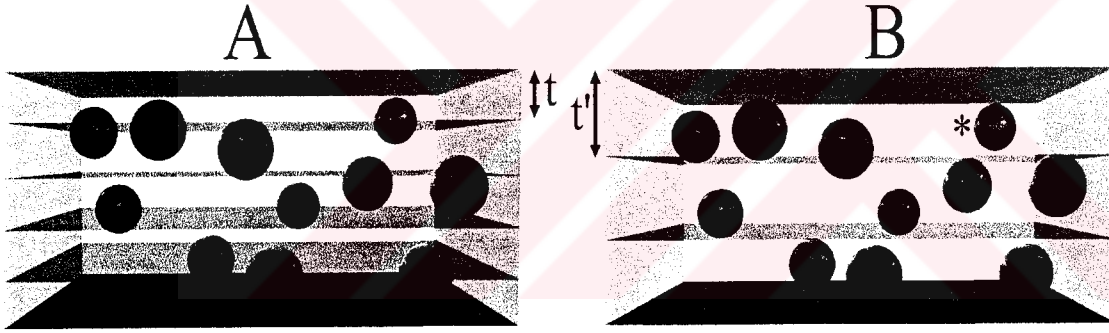


Şekil 28 Bir objeden geçen, farklı kalınlıkta ve paralel olmayan kesitler.

Dikkat edilmesi gereken diğer bir özellik ise kesit kalınlığının en küçük partikülün 1/3'ü veya 1/4'ünden küçük olacak şekilde ayarlanmasıdır (Sterio, 1984).

Şekil 29 B'de gösterildiği gibi eğer kesit kalınlığı incelenecek partikülden büyük olursa, iki kesit arasında yani disektör çiftinde izdüşüm vermeyen

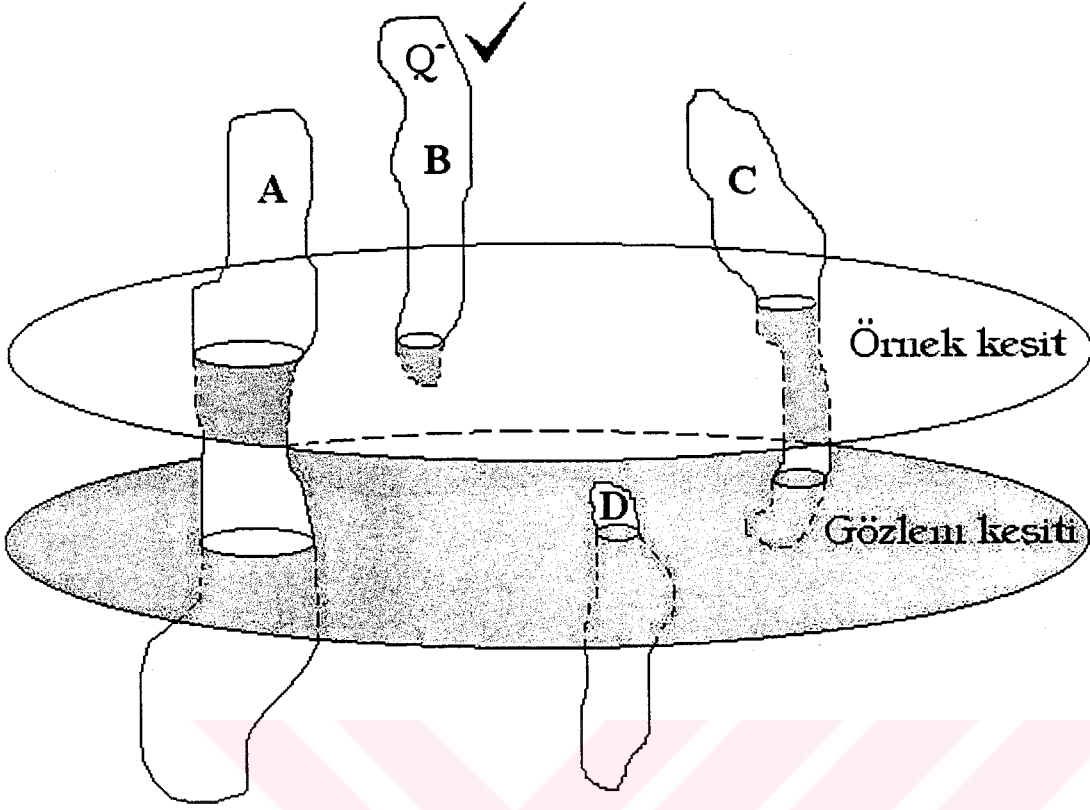
partiküllerin varlığı söz konusu olacağından incelenen kesit düzlemlerinde bu partiküller sayılamayacaktır.



Şekil 29: Yapı içerisinde bulunan partikül çaplarıyla buradan alınan kesit kalınlığının izdüşümler üzerine etkisi. A)'da kesit kalınlığı (t) en küçük partikül çapından daha küçük olduğu için bütün partiküller kesilmektedir. B)'de ise kesit kalınlığı (t') en küçük partikül çapından daha büyük olduğu için, (*) işareti ile gösterildiği gibi bazı partiküller kesilememektedir.

Gerçekte var olan bir kısım partiküller bu gibi durumlardan dolayı sayıma dahil edilemeyeceği için elde edilen veriler yeterli güvenilirlikte olmayacaktır. Şekil 29'un A bölümünde ise alınan paralel kesitlerin partikül çaplarından daha küçük olması nedeniyle kesilmeyen hiç bir partikülün olmadığı görülmektedir. Dolayısıyla sayım yapılırken göz ardı edilen veya sayılamayan herhangi bir partikülün olmadığı görülmektedir.

Alınan iki adet iki boyutlu kesit düzlemlerinden birisi örnek, diğeri gözlem kesiti olarak değerlendirilir (Sterio, 1984). Bu düzlemlerde partikül sayımı yapılırken birinde bulunan, diğesinde bulunmayan izdüşümler sayılır.



Şekil 30 : İki boyuta sahip iki kesit düzlemindeki yerleşik disektör ve disektör olmayan partiküller

Şekil 30'da şematize edilen iki kesit düzlemindeki partikül ve partikül izdüşümlerinden yukarıda izah edilen kurala göre sayım yapılırsa;

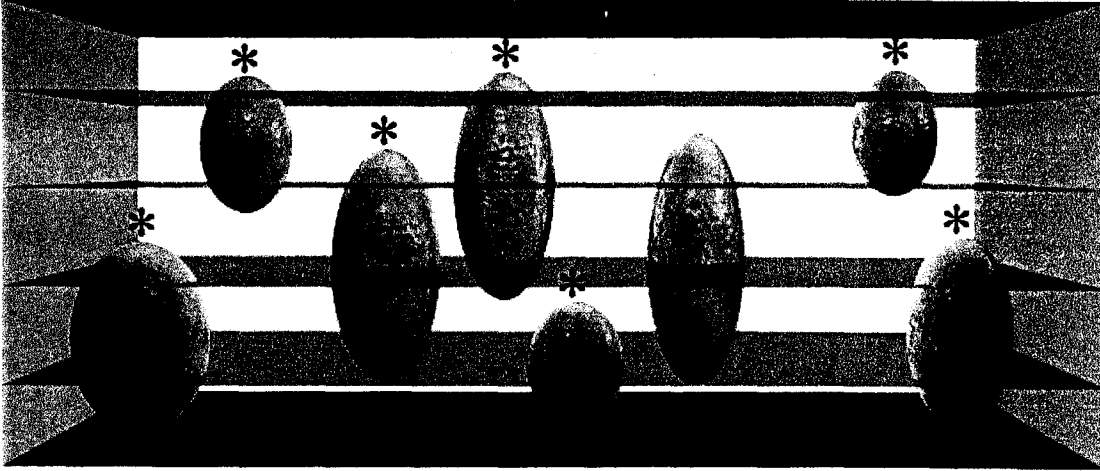
A partikülü: Hem örnek, hem de gözlem kesitinde izdüşüm verdiği için sayılmayacak,

B partikülü: Yalnızca örnek kesitte gözlendiğinden sayılacak,

C partikülü: Hem örnek, hem de gözlem kesitte izdüşüm verdiği için sayılmayacak ve

D partikülü: Örnek kesitte gözlenmediğinden hesaba dahil edilmeyecektir.

Bu işlem sonunda disektör sayım kuralına göre yalnızca bir tane disektör partikülü sayılacaktır. Eğer işlem tersten yapılacak olursa yani alttaki kesiti örnek, üstteki kesiti gözlem kesiti olarak kabul edersek, yalnızca D partikülü kurala göre disektör partikülü olarak sayılabilecektir.



Şekil 31:Doku içerisinde yerleşik çeşitli boy ve biçimdeki partiküllerin üst uçları (*) işareti ile belirtilmektedir.

Sayım sırasında uyulması gereken kuralların temel mantığı bir partikülün yalnızca bir defa örneklenmesini sağlamaktır. Şekil 31’de doku içerisinde çeşitli boy ve sayıda partiküller bulunmaktadır. Bu yapıdan elde edilecek 4 kesitin her birinde bulunan tüm partiküllerin izdüşümleri sayılacak olunursa, açıkça görüleceği gibi bu durum gerçek partikül sayısını ifade etmeyecektir. O halde kesit düzlemlerindeki her bir izdüşümünü saymak yerine ilgili partiküllerin bir yöne bakan uçlarını saymak (alt veya üst uç olabilir) doğru sonuca ulaşmamızı sağlayacaktır. Son bahsedilen durumda dikkat edilmesi gereken önemli bir özellik hangi izdüşümün hangi partiküle ait olduğunun dikkatli bir şekilde takip edilerek belirlenmesi gerekmektedir (Sterio, 1984).

Şekil 32’de bir doku bloğunun içinde bulunan partiküller görülmektedir. Şeklin yan tarafında dokudan alınan 11 kesit ve yapılarıdaki partiküllerin izdüşümleri şematize edilmiştir. Burada konunun daha iyi anlaşılması açısından yalnızca (a) partikülünü ele alacak olursak:

Birinci kesit düzleminde (a) partikülünün izdüşümü yok.

İkinci kesit düzleminde (a) partikülünün izdüşümü yok.

Üçüncü kesit düzleminde (a) partikülünün izdüşümü mevcuttur (Ama 4.kesitte de aynı partikülün izdüşümü bulunduğundan sayıma bu kesit düzleminde dahil edilemeyecektir).

Dördüncü kesit düzleminde (a) partikülünün izdüşümü mevcuttur.(Ama 5.kesitte de aynı partikülün izdüşümü bulunduğundan bu düzlemde sayıma dahil edilmeyecektir.

Beşinci kesit düzleminde (a) partikülünün izdüşümü mevcuttur. Dikkat edilirse 6.kesit düzleminde (a) partikülünün herhangi bir izdüşümü görülmemektedir. Yani ilgili partikülün son izdüşümü yani ucu 5.kesitte görülmüştür. Bu yüzden bu partikül bu düzlemde sayıma dahil edilmektedir.

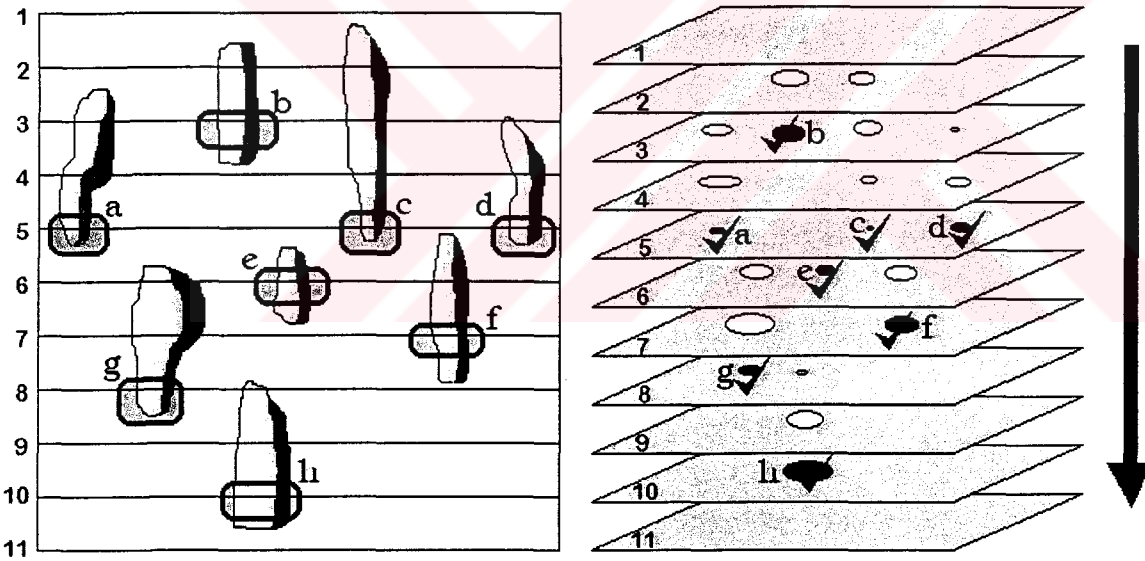
Örnekte ifade edildiği gibi (a) partikülü sadece 5. kesit düzleminde örneklenerek sayıma dahil edilmiştir. Eğer tüm kesitlerdeki izdüşümleri sayılırsa gerçekte bir adet (a) partikülü olduğu halde;

3.kesitte bir izdüşüm

4.kesitte bir izdüşüm

5.kesitte bir izdüşüm sayılarak değerlendirme yapılacaktır.

Yapı içerisindeki diğer partikülleri de düşünürsek, gerçek partikül sayısının bulunmasında yalnızca bir kesitteki izdüşümlerin sayılmasının yanlış olduğu görülmektedir.

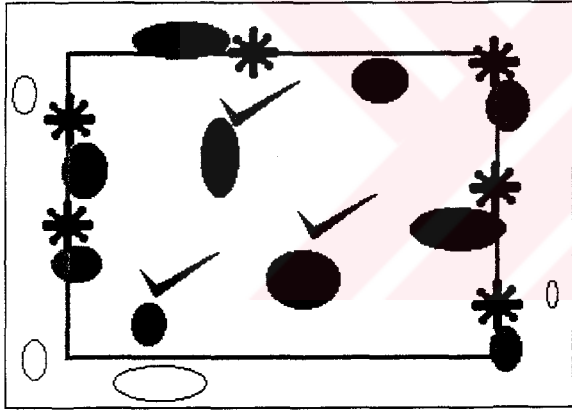


Şekil 32: Doku içerisinde yerleşik partiküllerden geçen iki boyutlu kesit düzlemlerindeki disektör ve disektör olmayan partikül izdüşümleri.

Bir önceki paragrafta anlatıldığı gibi yapıların gerçekte sahip oldukları derinlik boyutlarının göz önüne alınmasının temel nedeni, bir partikülün yalnızca bir defa örneklenebilmesinin sağlanmasıdır. Yine aynı mantık ile, yani bir partikülün yalnız bir defa örneklenebilmesinin sağlanması için 2 boyutlu kesit düzlemlerinde de (örnek kesit düzleminde) bir takım sayım kuralları geliştirilmiştir. Eğer doğal sınırları başka alanlar ile karışmayan bölgelerde sayım yapılıyor ve tamamı aynı anda gözleniyorsa iki boyutta

sondalama yapma ve tarafsız sayım çerçevesinin kullanılmasına ihtiyaç yoktur. Bu durumda tüm görüntü alanında sayılması istenilen obje doğrudan sayılabilir (Sterio, 1984). Örneğin böbrek glomerülündeki hücreler sayılırken eğer bir glomerüldeki tüm hücreler aynı anda görüntülenmesi mümkünse bu tür yapıların örnekleme tarafsız sayım çerçevesine ihtiyaç duyulmaz. Yani bu tür yapılarda bir hücrenin 2 veya daha fazla sayıda örnekleme söz konusu değildir. Eğer elde edilen 2 boyutlu düzlemlerde sayım yaptığımız bölgede bir hücrenin hangi hacme ait olduğu ayırt edilemiyor ise sınırları bilinen bir alanda örnekleme yapılarak sayım yapılması zorunludur. Daha önce yapılan çalışmalarda, 2 boyutlu düzlemlerde ölçüm ve değerlendirme yapılırken bir takım örnekleme çerçeveleri giriş bölümünde sözünü ettiğimiz bir çok yanlış yaklaşım yanında, kullanılan çerçevelere bağlı sayım hataları da yapılmaktadır.

Şekil 33'deki gibi bir sayım çerçevesi kullanıldığında: çerçevenin ortasına düşen partiküllerin sayılmasında araştırmacılar arasında anlaşmazlık yoktur. Problem



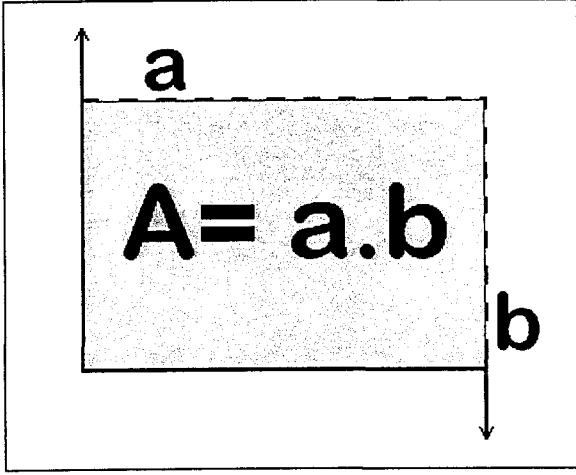
Şekil 33: Tarafli sayım çerçevesi içindeki partikül izdüşümleri.

çerçevenin sınırları tarafından kesilen partikül izdüşümlerinin sayılıp sayılmamasından kaynaklanmaktadır.

Eğer çerçeve sınırları tarafından kesilen partikül izdüşümleri sayılacak olursa, 2 veya daha fazla ayrı hacim tarafından ortak kullanılan izdüşümler birden fazla sayıda örnekleneceğinden, gerçekte bulunan sayıdan daha fazla sayıda partikül hesaplanacaktır. Eğer kenarlar tarafından kesilen partikül

izdüşümleri sayılmazsa gerçekte bulunan partiküller sayıma dahil edilemeyeceğinden bu defa da olduğundan daha az sayıda partikül hesaplanacaktır. Sayı parametresi ile ilgili olarak bir başka yaklaşım ise; test çerçevelerinin belirli (önceden tayin edilmiş) bir kısım kenarlarına isabet eden partikül izdüşümlerinin sayıma dahil edilmesi, diğer kenarlarına isabet eden partikül izdüşümlerinin sayıma dahil edilmemesi gibi fikirler öne sürülmüşse de bu tür yaklaşımların da gerçek değerden sistematik sapmalar gösterdiği ispatlanmıştır (Gundersen, 1977).

Çeşitli sayım çerçevelerinin kullanılması ile yapılan yanlışlıklar saptandıktan sonra iki boyutlu düzlemlerde gerçek sayının nasıl bulunacağını izah edelim. 1977’de



Şekil 34: Tarafsız sayım çerçevesi (Gundersen, 1977’den değiştirilerek çizilmiştir).

Gundersen tarafından “Tarafsız Sayım Çerçevesi” olarak adlandırılan bir sayım çerçevesi modeli geliştirilmiştir.

Şekil 34’de gösterilen “Tarafsız Sayım Çerçevesi”ne göre uyarlanmış kurallar;

1. Tamamen çerçeve içerisinde izdüşümleri kalan, yani herhangi bir kenar veya köşeyle kesişmeyen partiküller sayıma dahil edilir.

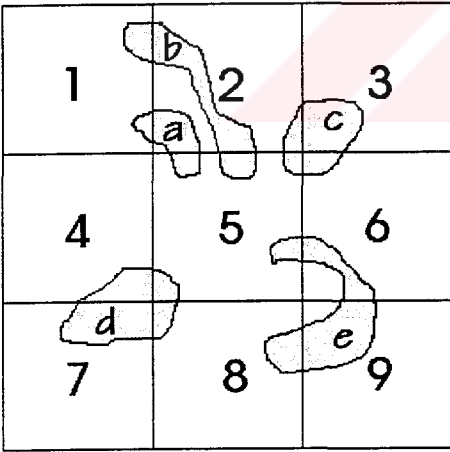
2. Çerçevenin kalın ve kesintisiz

çizgileri ile ifade edilen kenarları ile kesişen izdüşümler sayılmazlar.

3. Kesintili çizgi ile teması olan partikül izdüşümleri sayıma dahil edilir.

4. Çerçevenin kalın ve kesintisiz çizgilerinin uzantıları ile kesişen izdüşümlerin bir

kısmı sayıma dahil olan alan içinde buluns bile sayılmazlar (Gundersen, 1977).



Şekil 35: Doku içerisinde yerleşik iki boyutlu düzlemlerdeki partikül izdüşümlerinin taraflı ve tarafsız sayım çerçevelerine göre örneklenmesi (Gundersen, 1977’den değiştirilerek çizilmiştir).

Tarafsız sayım çerçevesinin etkinliğini ve sayım kurallarının gerçekçi olup olmadığını göstermek için 1977 yılında Gundersen tarafından çizilen, bir görüntü düzleminde bulunan çeşitli boy ve sayıdaki izdüşümlerin taraflı ve tarafsız sayım çerçevelerine göre sayımları anlatılmıştır (Şekil 35). Araştırmacı ilgili alanı dokuz eşit parçaya (örnekleme alanına) ayırarak sayım yapmıştır. Şekilde gerçekte beş partikül görülmektedir.

Kural olarak yalnızca sayım çerçevelerinin içerisinde bulunan izdüşümler

sayılacak olursa, alanda ‘0’ partikül olduğu söylenecektir.

Kural olarak hem çerçevelerin içerisinde bulunanlar, hem de çerçevelerle kesişen partikül izdüşümleri sayılacak olursa;

Birinci çerçevede iki partikül izdüşümü,
İkinci çerçevede üç partikül izdüşümü,
Üçüncü çerçevede bir partikül izdüşümü,
Dördüncü çerçevede bir partikül izdüşümü,
Beşinci çerçevede beş partikül izdüşümü,
Altıncı çerçevede iki partikül izdüşümü,
Yedinci çerçevede bir partikül izdüşümü,
Sekizinci çerçevede iki partikül izdüşümü,
Dokuzuncu çerçevede bir partikül izdüşümü sayılacaktır.

Burada dikkat edilirse,

- (a) partikülü 1.,2.,5. Çerçevelerinde görüldüğünden gerçekte bir partikül olduğu halde üç defa örneklenmiştir.
- (b) partikülü 1.,2.,5. çerçevelerinde görüldüğünden gerçekte bir partikül olduğu halde üç defa örneklenmiştir.
- (c) partikülü 2.,3.,5.,6. çerçevelerinde görüldüğünden gerçekte bir partikül olduğu halde dört defa örneklenmiştir.
- (d) partikülü 4.,5.,7.,8. çerçevelerinde görüldüğünden gerçekte bir partikül olduğu halde dört defa örneklenmiştir.
- (e) partikülü 5.,6.,8.,9. çerçevelerinde görüldüğünden gerçekte bir partikül olduğu halde dört defa örneklenmiştir.

Açıkça görüldüğü gibi 5 adet partikül bahsedilen kurala göre 18 defa örneklenecektir. Kural olarak; herhangi bir köşe ve kenara değen partikül izdüşümlerinin sayılıp, diğerlerinin sayılmaması prensibine dayandırılarak yapılan yaklaşımlarla da gerçek değerden sistematik olarak sapan sonuçlara ulaşıldığı yukarıdaki örnekte gösterilmiştir (Gundersen, 1977).

Söz gelişi yine aynı şekil üzerinde düşünerek, çerçevelerin sol ve alt kenarlarıyla, bunların kesiştiği köşeye isabet eden partikül izdüşümleri sayım dışı bırakılırken, simetrisinde bulunan kenar ve köşeye isabet eden partikül izdüşümlerini sayacak olursak;

- (a) partikülü: Birinci ve beşinci çerçevede birer defa örneklenecektir.

(b) partikülü: Birinci ve beşinci çerçevede birer defa örneklenecektir.

(c) partikülü: Yalnızca beşinci çerçevede bir defa örneklenecektir.

(d) partikülü: Yalnızca yedinci çerçevede bir defa örneklenecektir.

(e) partikülü: Beşinci ve sekizinci çerçevede birer defa örneklenecektir.

Görüldüğü gibi gerçekte beş olan partikül izdüşüm sayısı bu tür bir yaklaşımla sekiz defa örneklenecektir. (a) partikülü hem birinci hem de beşinci çerçevede iki defa örneklenmiş, (b) partikülü hem birinci hem de beşinci çerçevede iki defa örneklenmiş ve (e) partikülü hem beşinci hem de sekizinci çerçevede iki defa örneklenmiştir.

Kural olarak 1977 yılında Gundersen tarafından geliştirilen “tarafsız sayım çerçevesi” esaslarına göre aynı şekil üzerinde sayım yapacak olursak, a partikülü: birinci çerçevede yasak kenarlara değmediğinden örneklenirken, ikinci çerçevede yasak kenarlara temas ettiği için, beşinci çerçevede ise yasak kenarlara temas etmediği halde izdüşüm uzantısının beşinci çerçevenin yasak kenarlarının uzantılarıyla temas etmesi nedeniyle örneklenmeyecektir. Diğer izdüşümler de aynı kurala göre değerlendirilirse gerçek değer olan 5 izdüşümün olduğu bulunacaktır.

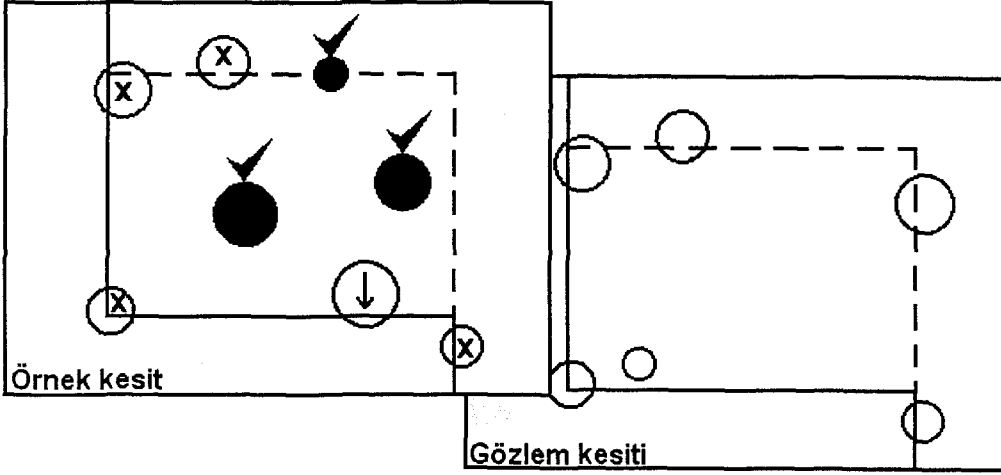
Daha önceki bölümlerde eski sayım metotlarının ne gibi sakıncalarının olduğu izah edilmişti. Burada fiziksel disektör metodunu kısaca anlatalım. Şekil 36’da görüldüğü gibi:

Doku bloğu içerisinde birisi örnek, diğeri gözlem kesiti olmak üzere kesit çiftleri alınmıştır. Bunlardan, örnek kesitte gözlenip, gözlem kesitte gözlenmeyen, yani komşu kesitlerden bir kesitte olup, diğeri kesitte olmayan partikül izdüşümleri disektör kuralına göre sayıma dahil edilecektir. Buradaki mantıksal yaklaşımın temelinde, bir partikülün yalnızca bir defa örneklenebilmesi yatmaktadır. Kesit çiftleri alınarak incelemelerin yapılmasında elde edilen avantajların en başında, gerçekte üç boyutlu olan yapıların, bu özellikleri göz ardı edilmeden incelenebilmeleridir. Yani derinlik boyutu da hesaplamalara dahil edilerek, yalnızca ilgili hacme ait objeler sayılmakta, bir başka hacimle ortak kullanılan objeler sayım dışı bırakılmaktadır. Şekil 21’e bakılacak olunursa; sözgelimi (c) partikülünün 2. ,3. ,4. , ve 5. kesitlerde izdüşüm verdiği halde yalnızca 5. kesitte örneklenmesinin sebebi; 2. kesitte izdüşümü varken 3. kesitte de aynı partikülün devamı görüldüğünden,yani iki ayrı hacim tarafından ortak kullanıldığından sayım dışı bırakılmıştır. Aynı durum 3. ve 4. kesitlerle ,4. ve 5. kesitler arasında da görülmektedir. Dikkat edilirse bu partikülün 5. kesitte izdüşümü varken 6. kesitte

herhangi bir görüntüsü mevcut değildir. Kurala göre; ilgili partikül bir defa 5. kesitte örneklenmiş olacaktır. Burada son söz olarak, “Derinlik boyutu göz önüne alınarak izlenen partiküllerin yalnızca ilgili hacimde sayıma dahil edilmeleri gereklidir” denilecektir.

Birinci maddede ki kurala ilaveten, örnek ve gözlem kesiti olarak adlandırılan iki boyutlu iki kesit düzleminde, sayım yapılacak olan kesitte (örnek kesitte) unutulmaması gereken; hesaba dahil edilecek partiküllerin ortak hacimler tarafından paylaşılmaması olacaktır. Bu problemin çözümü daha önce ayrıntıları anlatılmış olan “tarafsız sayım çerçevesi” ile sağlanır. Bu çerçevenin temel mantığı, iki boyutlu düzlemlerde bir partikülün yalnızca ilgili alanda örneklenmesini sağlamaktır. Şekil 33’de gösterilen taraflı sayım çerçevesi kuralına göre yapılan hesaplamalar ve sakıncaları ayrıntısıyla anlatılmıştı. Bu tür bir yaklaşımla, (*) ile işaretli partiküller sadece çerçeve sınırları dahilindeki alan tarafından değil, aynı zamanda başka alanlar tarafından da ortaklaşa kullanılmaktadır. O halde yapılacak olan örnekleme esnasında, bir partikülün yalnızca ait olduğu alanda bir defa sayılacak biçimde örneklenmesi olacaktır.

Şekil 36’da görüldüğü gibi, alınan iki kesitten örnek kesitte bulunup, gözlem kesitte bulunmayan partiküller sayılarak, hacimde örnekleme yapılırken, örnek kesit görüntüsü üzerine yerleştirilen tarafsız sayım çerçevesi ve kurallarına göre de alansal örnekleme yapılmıştır. Partikül izdüşümlerinin herhangi bir ucu devamlı çizgilerle ifade edilen yasak bölge ve bunların uzantılarına temas etmiyorsa sayıma dahil edilecektir. Ayrıca çerçevenin ortasında bulunanlar da sayılacaktır.



Şekil 36: Komşu iki boyutlu iki düzlem (örnek ve gözlem kesit) ile oluşturulan üç boyutlu bir hacimde disektör partiküllerinin sayılması.

Bu bilgiler kısaca tekrar edildikten sonra, şekil 36'daki partikül izdüşümlerini disektör sayım kuralına göre sayacak olursak;

X işaretiyle belirlenmiş partiküller sayılmayacaktır.

✓ işareti ile belirlenmiş partiküller ise sayılacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. CİVCİVLERİN GRUPLANDIRILMASI VE DENEY DÜZENİ

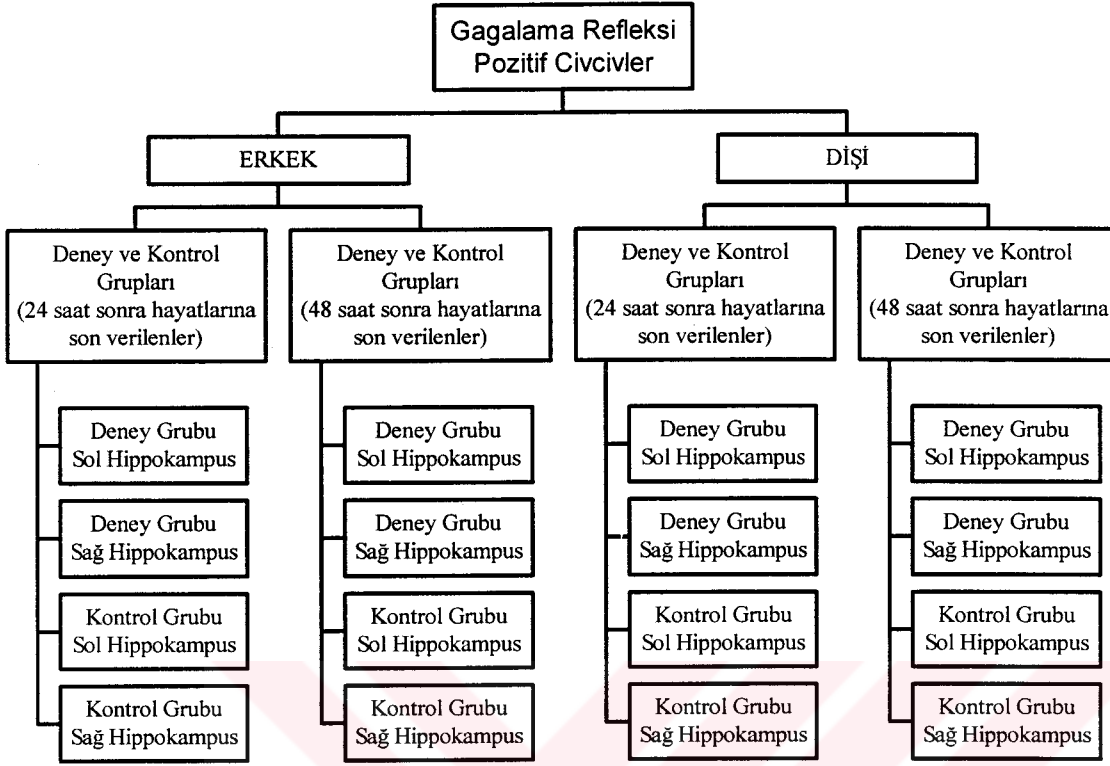
Çalışmada kullanılan sıfır günlük civcivler, Köy-Tür tavuk işletmeciliğinden satın alındı. Adı geçen kuruluştaki civcivler cinsiyetlerine göre ayrılmış olmasına rağmen tarafımızdan yeniden gözden geçirildi. Erkek ve dişi olarak sınıflandırılan hayvanlar, tek tek alınıp ayrı bir kutu içerisinde bir telin ucuna yerleştirilen beyaz bir boncuğu gagalayıp gagalamamaları esas alınarak test edildiler. Doğuştan var olması gereken gagalama refleksi aktif olan civcivler boncuğu gagalarken, hayvanların bir kısmı ya bu aktiviteyi hiç göstermedi veya gecikerek başardılar. Test sırasında gagalama eylemini başaramayanlar veya bunu gerçekleştirmede gecikenler ile ilgili işlemin beş dakika ara ile iki defa daha tekrarlamak suretiyle herhangi bir aşamada başarısız olanlar çalışmadan çıkarıldılar. Bir sonraki aşamada uygulanacak olan PSÖ modelinde hayvanların gagalama refleksinin aktif olması gerekliliğinden dolayı bu tür bir ayırıma gidildi.

Yukarıda anlatılan şartlara uygun erkek ve dişi civcivler Şekil 37'de şematize edildiği gibi planlanan deneye uygun bir biçimde 16 alt gruba ayrıldı. Böylece bu 16 gruptan (Şekil 37) elde edilecek veriler kıyaslanarak öğrenmenin farklı cinsiyet, sağ ve sol hippokampus bölgeleri ve süre ile bir ilişkisinin olup olmadığını belirleme imkanı sağlanmış oldu.

Gagalama refleksi aktif olan erkek ve dişi civcivlerden oluşan her bir grup kendi içerisinde bu aşamadan itibaren deney ve kontrol grubu olmak üzere alt gruplara ayrıldılar.

Daha sonra; dişi ve erkek kontrol grubu olarak ayrılanlara, demir bir çubuğun ucuna yerleştirilen beyaz boncuk suya batırılarak her bir hayvanın görüntü sahası içerisine getirildi. Daha önceden gagalama refleksleri kontrol edilerek seçilen bu hayvanların suya batırılmış boncuğu gagaladıkları gözlemlendi. Bu gruptaki civcivler gagaladıkları objenin kendileri için zararlı olmadığını öğrendiler.

Dişi ve erkek eğitim grubu olarak nitelenen civcivlere aynı boncuk irrite edici ve pis kokulu bir maddeye (methylantranilate) batırıldıktan sonra, daha önce böyle bir obje ile hiç karşılaşmayan hayvanlar, bu boncuğu gagaladıklarında maddenin etkisine bağlı olarak tipik irkilme hareketleri gösterdiler.



Şekil 37: Çalışmada bulunan hayvanların gruplandırma şeması.

Bu uygulamalar tamamlandıktan sonra hayvanlar yukarıda belirlenen gruplar halinde sakin bir ortamda 24 saat bekletildiler. 24 saat sonra hayvanlar ayrıntısı aşağıda anlatılacak davranışları gösterip göstermemeleri yönünden kontrol edildiler.

Sonuçta; önce suya batırılmış boncuğu gagalayan erkek ve dişi cıvcıvlere 24. saatte aynı renk boncuk (bu defa kuru olarak) sunulduğunda, bunun kendileri için zararlı bir obje olmadığını öğrenen hayvanların büyük çoğunluğu her hangi bir sakinme göstermeksizin gagalama eylemini gerçekleştirdiler (Bu gruptaki toplam 4 cıvciv kuru boncuğu gagalamadıkları için çalışmanın bu safhasından sonra ihraç edildiler). İrrite edici maddeye batırılan boncuğu gagalayan cıvcıvlere 24. saatte yukarıdaki işlemin aynısı tekrarlandığında bunun kendileri için zararlı olduğunu öğrenen hayvanların büyük bir çoğunluğu boncuktan şiddetle sakinme gösterdiler (Sakinme göstermeyen 3 denek çalışma dışına çıkarıldı). Tüm bu uygulamalar daha sonra 48 saatlik grup olarak adlandırılanlara da tekrarlandı. Böylece bir öğrenme modelini takiben meydana gelen davranışsal farklılığın cıvciv beyнинin hippocampus bölgesindeki sinaps yoğunluğuna ve morfolojisine de yansıyor yansımadığını araştırılabileceğimiz bir araştırma düzeneği oluşturuldu.

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında yapılacak hatalara bağlı olarak gruptan ihraç edilmesi olası deneklerin olabileceği düşünülerek her bir gruptaki hayvanların sayısı 10 adetle sınırlı tutuldu (her bir grupta 5 hayvanın incelenmesi hedeflendiği halde). Burada belirtmemiz gereken diğer bir husus, önceden (canlı olarak) cinsiyet tespiti yapılarak sınıflandırılan hayvanların perfüzyondan sonra da genital bölgeleri açılarak 3. defa cinsiyet kontrollerinin yapılmış olmasıdır. Böylece dış görünümüne göre yapılan kontroller sırasında cinsiyet tayinindeki hatalar düzeltilerek, civcivlerin cinsiyet ayırımı kesin bir biçimde yapıldı.

3.1.1. Fiksasyon İşlemleri

Araştırmamızda incelemeyi hedeflediğimiz oluşumlar sinapsların sayı ve morfolojileri olduğu için fiksasyon işlemleri elektron mikroskobu (EM) tekniklerine uygun olacak biçimde yapıldı.

Kullanılan fiksatifler ve fiksasyon işlemlerinin temel mantığı ışık mikroskobunda incelenecek biyolojik materyaller için yapılanlara benzese de, daha güçlü ayırım özelliğine sahip olan EM düzeyindeki araştırmalarda uygun fiksatifin tercihi ve hazırlanmasında bir takım farklılıklar mevcuttur. Canlıdan alınan biyolojik materyallerin doğrudan bir mikroskop ortamında incelenmeleri söz konusu olmadığından, bunların bir takım işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Bu işlemlerin en başta yapılması gerekeni fiksasyondur. Yapılan çalışmada en etkin sonucun elde edilebilmesi için kullanılacak fiksatifin seçimi ve hazırlanması çok önemlidir.

Çalışmamızda perfüzyonla tespit etme metodu kullanıldı. Bu işlem için glutaraldehit (GAL) ve paraformaldehit (PARA) bileşiminden oluşan bir tespit maddesi hazırlanarak kullanıldı. Solüsyonlar hazırlanırken % 4'lük PARA ve % 4'lük GAL eşit oranlarda birleştirilerek % 2'lik bir tespit solüsyonu kullanıma hazır hale getirildi. % 4'lük PARA hazırlamak için; 40 gr paraformaldehit 1000 ml distile su içerisinde 3 saat boyunca bir karıştırıcı kullanılarak çözüldü. Diğer fiksatif olan GAL'in % 4'lüğünü hazırlamak için % 25'lik ilgili madde belli oranlarla bir tampon çözeltiyle karıştırılarak elde edildi (% 25'lik hazır olarak satın alınan GAL, 840 ml hazırlanan tampon çözeltinin içine 160 ml % 25'lik GAL karıştırılarak % 4'lük oran elde edilmiştir). Bu solüsyon kullanılabildiği kadar renkli şişelerde ve + 4 derecede korundu.

PSÖ eğitimi uygulanan hayvanlar, 24 ve 48 saat yaşatıldıktan sonra, perfüze edilebilmek için anestetik eterle uyutuldu. Tam olarak uyuyup uyumadıkları ayaklarına

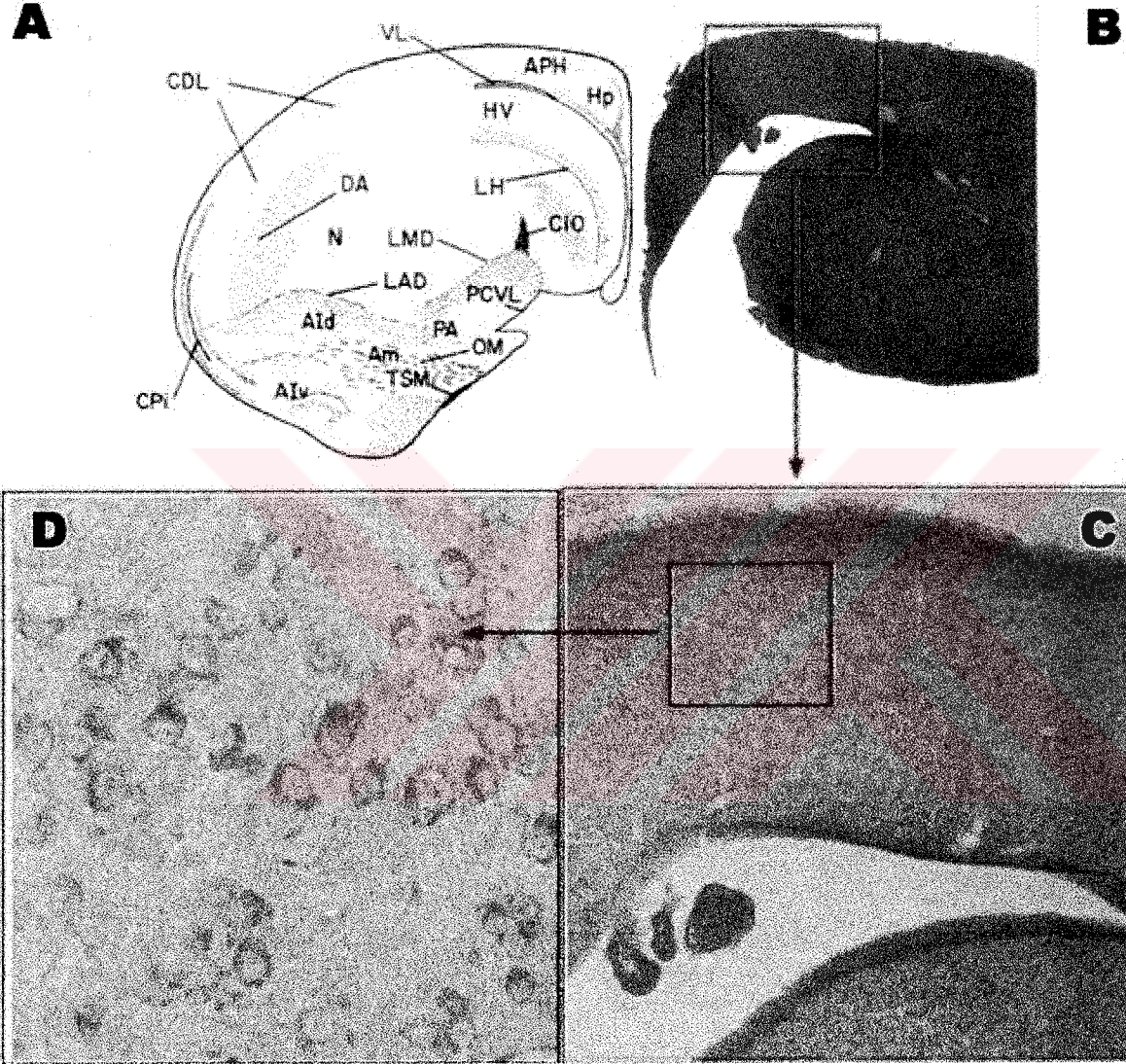
ağrılı uyaran verilerek kontrol edildi. Derin anestezi altında olan hayvanların, göğüs kafesleri açılarak kalp görünür biçime getirildi. Sonra etrafındaki zarlardan kurtarılarak kalbe rahat bir kasılma ortamı sağlandı. Çalışır durumdaki kalbin sol ventrikülüne bir kanül aracılığıyla girilerek dolaşıma 0.5 ml heparin verildi. Bundan sonra hayvanların sağ atriumlarında küçük bir kesi ile delik açılmasını takiben % 0.9'luk serum fizyolojik (SF) yaklaşık 2 veya 3 dakika boyunca sol ventrikülden dolaşıma verildi. Böylece dolaşımdaki kanın dışarıya boşaltılması sağlandı. Ardından aynı yol ile her bir hayvana yaklaşık olarak 150-200 ml fiksatif verildi. Tüm bu işlemler yapılırken kalbin çalışır konumunu maksimum süre devam ettirmesine özen gösterildi. Bu şekliyle hem tespit maddesinin dolaşıma verilmesi sırasında oluşturulan pozitif basınçtan, hem de çalışır durumdaki kalbin pompalama gücünden yararlanılarak, etkin bir fiksasyon sağlanmaya çalışıldı. İşlem esnasında verilen solüsyonun etkisine bağlı olarak hayvanlarda ortaya çıkan tipik kasılma hareketleri gözlenerek, perfüzyonla tespit işleminin yeterli derecede olup olmadığı kontrol edildi.

Bu uygulamalar esnasında; heparinizasyonun uygun biçimde yapılamamasına, fiksatifin gönderiliş basıncına ve veriliş ısısına, damarların büzüşmelerine, dolaşımın herhangi bir yerinde istenmeden açılan kollaterale bağlı olarak ortaya çıkan hatalar, anında saptanarak, gerekli önlemler alınabiliyordu. Tüm bu önlemlere rağmen perfüzyon sonrası hayvanların beyinleri tek tek kontrol edilerek iyi fikse olmayanlar gruptan çıkartıldılar. Yapılan perfüzyonda istenilen derecede tespit olan hayvanların beyinleri çıkartılarak 2 gün boyunca aynı fiksatifte bekletildi (tespit sonrası işlem).

3.1.2. Çalışılan Bölgenin Tanımlanması ve Disseksiyonu

Tespit işleminin ardından her bir beynin üzerinde kıkırdaktan oluşan kafatası uzaklaştırıldı. Daha sonra Kuenzel ve Masson (1988) tarafından hazırlanan "Civciv Beyninin Stereotaksik Atlası" ve bu konuda önceden yapılan araştırmalar esas alınarak (Bradley ve ark., 1994), frontal uçtan yaklaşık 4-5 mm ilerlenerek transvers kesitte hippokampus görünür hale getirildi (Şekil 38). Üzerinde çalıştığımız bir günlük civcivlerin, hangi seviyedeki transvers kesitlerinden itibaren hippokampusun başladığı ve hangi seviyedeki transvers kesitlerinden itibaren sona erdiğini saptamak için ön çalışma yapıldı. Disseksiyon ve demonstrasyon işlemleri bir stereotaksik mikroskop yardımıyla gerçekleştirildi. Bu işlemler yapılırken yukarıda adı geçen referansların yanı sıra Horn (1991)'un metodu olarak bilinen, IMHV'nın görünür hale getirildiği seviyede,

hippokampus disseke edildi (Szekely ve Krebs, 1996). Şekil 38'de gösterilen seviyeden (frontal uçtan arkaya doğru yaklaşık 4. ve 5. mm'ye rastlayan aralık) alınan doku diliminden, yine stereotaksik mikroskop altında incelemeyi hedeflediğimiz dorsolateral hipokampus parçası çıkartılarak doku takip işlemlerine geçildi.



Şekil 38: Cıvciv hipokampusunda sinaps sayısal yoğunluğunun araştırıldığı kesit seviyesinin stereotaksik atladaki (Kunzel ve Masson 1988) (A) ve histolojik preparattaki panoramik görüntüsü (B). B fotoğrafında işaret edilen alan Szekely ve ark., (1996)'nın tariflerine göre dorsolateral hipokampusun sınırları (taralı çizgiler arasında kalan hipokampus bölgesi) ve C-D'de ilgili sahalar büyütülerek görüntülenmiştir. D'de dorsolateral hipokampustaki nöronlar görülmektedir.

3.1.3. Doku Takip İşlemleri

Fiksasyondan sonra dokular önce 2 gün, sonra 4 saat olmak üzere 0.1 M fosfat tampon solüsyonunda bekletildiler. Son uygulamalarla doku içinde birikmesi muhtemel olan GAL'ın, daha sonra kullanılacak osmium tetroksitle reaksiyona girerek yoğun birikintiler oluşturması önleildi. Burada dikkat edilmesi gereken bir özellik, fiksatif hazırlanırken kullanılan tampon çözelti ile yıkama işleminin gerçekleştirilme zorunluluğudur. Bu aşamadan sonra 3 gün sürecek olan diğer takip işlemlerine geçildi.

Bunlar;

1. Gün takip işlemleri

Dokular önce %5'lik GAL'de 4 saat,
Ardından fosfat tampon çözeltisinde 10 dakika yıkanarak,
Aynı çözeltide 1 gece (12 saat) boyunca bekletildikler.

2. Gün takip işlemleri

Osmium tetroksit içerisinde dokular 2 saat boyunca tespit edildiler.

Ardından 10'ar dakikalık periyotlar halinde iki defa fosfat tamponuyla yıkanma işlemini takiben dehidratasyon aşamasına geçildi.

Dehidratasyon aşamasında ise yapı içinde bulunan serbest suyun tamamen uzaklaştırılması için dokular etil alkol serilerinden geçirildi.

Burada sırasıyla ,

%50'lik etil alkolde 15 dakika,

%70'lik etil alkolde 15 dakika,

%86'lık etil alkolde 15 dakika,

%96'lık etil alkolde 15 dakika,

Mutlak etil alkolde 15 dakika ve

Mutlak etil alkolde 15 dakika dokular bekletilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı.

Dehidratasyon esnasında kullanılan etil alkol ise propilen oksit ile dokudan uzaklaştırıldı.

Bunun için dokular,

Propilen Oksitle 15'er dakikalık iki periyotta bekletildiler.

Dehidrate edilen dokuların, gömme solüsyonuyla tam olarak infiltre edilmeleri gerektiğinden, bu işlem aşamalı olarak yapıldı. Yani dokuda biriken propilen oksitin gömme maddesiyle yer değiştirmesi işlemi aşamalı biçimde gerçekleştirildi.

Bu amaçla; propilen oksit + gömme maddesi eşit oranlarda karıştırılarak 30'ar dakika bu ortamlarda bekletildiler.

Dokular son infiltrasyon işleminden sonra saf gömme ortamında bir gece boyunca bekletildiler.

3. Gün Takip İşlemleri;

Doku takip işlemlerinin son aşamasında dokular aynı gün 3-4 saat önce, taze olarak hazırlanan gömme ortamına gömülerek işlem tamamlandı.

3.1.4. Dokuların Bloklanması

Elektron mikroskopu tekniklerine uygun olarak küçültülen dokular (yaklaşık olarak 1-2 mm³) piramit uçlu polietilen kapsüllerin uç kısımlarına yerleştirildikten sonra üzerlerine yeni hazırlanan resin dökülerek gömüldü. Bu uygulama sırasında her bir bloğa rastgele numaralar verilerek kodlandı.

3.1.5. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

Tampon çözeltisinin hazırlanması

1 litre distile su içerisinde 22,6 gr sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) veya mono bazik sodyum fosfat eritildi.

200 ml distile su içerisinde 5.04 gr NaOH eritildi.

Daha sonra 830 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ile 170 ml NaOH karıştırılarak tampon çözelti oluşturuldu. Hazırlanan bu çözeltinin pH değerinin 7.2-7.4 arasında olmasına özen gösterildi. Kullanılacağı zamana kadar renkli şişelerde ve +4 derece korundu. Hazırlanan bu tampon çözelti hem %5'lik takip işlemlerinde kullanılan GAL'in elde edilmesinde (80 ml tampon çözelti ve hazır olarak satın alınan %25'lik GAL karıştırılarak elde edildi) hem de fiksasyon için kullanılan %4'lük GAL in hazırlanmasında (840 ml tampon çözelti ile 160 ml %25'lik GAL karıştırılarak elde edildi) kullanıldı.

Resinin hazırlanması

Araldit	20 ml,
DDSA	20 ml,
N Benzildimethylamin	0.6 ml ve
Difululat	1 ml

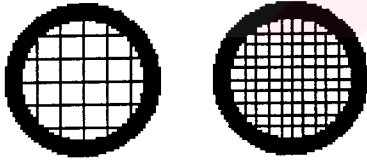
Bir şişe içerisinde 30 dakika boyunca cam veya demir bir çubukla karıştırılarak hazırlanır.

Osmium Tetroksitin Hazırlanması

1 gramlık kapsüller halinde satın alınan osmium tetroksit bir şişe içerisinde bir cam baget ile ezildikten sonra 0.54 gr glikoz ilave edildi. Bu iki katı bileşiğe 10 ml distile su ve 90 ml tampon çözelti ilave edilerek kullanıma hazır hale getirildi. Burada dikkat edilmesi gereken önemli bir özellik bileşiğin kullanılması düşünülen zamandan bir gün önce hazırlanarak +4 derecede saklanmasıdır.

3.1.6. Gridlerin Hazırlanması¹

Bloklardan kesitler bir ultramikrotomla kesildikten sonra ışık mikroskopunda kullanılan cam yüzeyler (lam) yerine grid adı verilen metalden yapılmış kesit taşıyıcılara alınarak diğer işlemlere hazır duruma getirildiler. Bilindiği gibi elektron opak (bakır, nikel vb) maddelerden imal edilen bu taşıyıcıların, yapılan çalışmanın özelliğine göre seçilebilecek bir çok çeşidi mevcuttur.



Grit-A

Grit-B

Şekil 39 Grid çeşitleri ve içlerindeki elektron opak barlar.

Çalışmanın amacına uygun gridin seçimi, ilerleyen aşamalarda araştırmacıya büyük avantajlar sağlamaktadır. Çalışmamızda ilk tercih ettiğimiz gridlerin (Şekil 39B) döşemesini oluşturan bölümünde yatay ve dikey olarak 10 adet demir bar mevcuttu. Adı

geçen bu tür gridlerin üzerine alınan seri kesitlerin incelenmesi sırasında fotoğrafını görüntülendirmeyi planladığımız bir çok bölgenin elektron opak bakır barlara isabet

¹ Projemizin bu aşamasından itibaren laboratuarda yapılması gereken diğer tüm işlemler Newcastle Upon Tyne Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nörobiyoloji Bölümü, İngiltere'de yapıldı.

etmesi nedeniyle istenilen sahaların bulunmasında problemlerle karşılaşıldığından (bakır barların yoğunluğu bakımından incelenecek bir çok saha örtülüydü) bir sonraki aşamada grid tercihimizi değiştirerek yaklaşık olarak bir birini dik biçimde kesen 5'er adet bakır bardan oluşan gridlerin (Şekil 39A) kullanılması ile komşu kesitlerdeki disektör çiftlerinin mikroğraflarının çekilmesi hızlandırıldı.

Kesitleri almadan önce olası kontaminasyonu elimine etmek için gridler % 25'lik amonyaklı solüsyonda çalkalandıktan sonra, önce bidistile sudan, ardından % 99.9'luk alkolden geçirilerek, filtre kâğıtları üzerinde kapalı kutular içinde kurutuldu. Yukarıdaki işlemlerden sonra gridleri bu halleriyle de kullanmak mümkünken, bizim de yaptığımız gibi üzerlerine yerleştirilen ince kesitler elektron bombardımanının olumsuz etkisinden korumak için gridlerin yüzeylerini ince film tabakasıyla kaplayarak kullandık².

3.1.7. Çalışmanın Örneklenme Stratejisinin Belirlenmesi

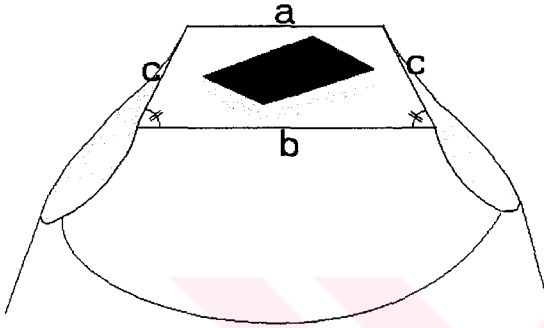
Civcivlerden disseke edilen dorsolateral hippocampus bölgeleri elektron mikroskopik (EM) takip işlemlerinden geçirilip bir bütün olarak bloklandıktan sonra kesit alınabilecek duruma getirildi. Doku bloğunun, üç farklı seviyesinde, aralarında en az iki mikrometre olacak şekilde 9 adet gride her birinin üzerinde sayıları 8-10 arasında değişen seri ince kesitler (85-90 nanometre kalınlıkta) alındı. İnce kesit serileri alınırken, seriyi oluşturan kesitlerin düz bir hatta dizilmelerine dikkat edildi. Serilerin ortasında bulunan kesitlerin uygun olanlarından rastgele başlanarak disektör çifti olabileceklerin fotoğrafları çekildi (Geinisman ve ark., 1996). Böylece bir hayvandan yaklaşık 15 disektör çifti elde edildi.

² Gridlerin yüzeyinde bir destekleyici örtü olan formvar film tabakası hazırlanırken; 0.2 gr formvar, 500 ml 1.2 dikloroetan da eritildikten sonra solüsyon bir şişe içerisine yerleştirildi. Daha sonra üzerinde herhangi bir kontaminasyonun olmadığı (iyice temizlenmiş) düz bir cam (lam) formvar solüsyonu ile dolu şişe içerisine daldırıldı. Camın kullanmak istediğimiz tarafı üstte kalacak biçimde bir kurutma kağıdının üzerine yerleştirildi. Camın (lam) üzerini kaplayan bileşik 2-3 dakika içerisinde kurutulduktan sonra oluşan film tabakası distile su ile dolu bir kap için 45 derecelik açıyla daldırılarak film tabakasının camdan suyun yüzeyine geçişi sağlandı. Böylece sıvı üzerinde yüzen bir film tabaka elde edildi. Daha sonra ince uçlu pens yardımıyla alınan her bir grid bu tabaka üzerine parlak yüzleri gelecek biçimde yerleştirildi. Oluşturulan tabaka ile bir yüzleri kaplanan gridler bir kurutma kağıdı yardımıyla alındı ve petri kutusunda kurutulurken, ultramikrotomda alınacak ince kesitlerin üzerine alınabilmesi için hazır hale getirildiler.

Elde edilen bu disektör çiftleri toplam 16500'lük (mikroskop + ağırandizör) büyütmede basılarak incelenebilecek duruma getirildi. Fotoğraflar disektör sayım metoduyla değerlendirilirken her bir hayvanda toplam 100–150 partikül sayabilecek boyutta olan (14×14 cm) bir tarafsız sayım çerçevesi kullanılarak yapıldı (Gundersen, 1977).

3.1.8. Kesitlerin Alınması

Çalışmamızın özelliği nedeniyle ardışık kesitlere ihtiyacımız olduğundan



Şekil 40: Seri ve düzgün kesitlerin alınabilmesi için; blokların kesilmeden önce İkiz kenar yamuğ biçiminde tıraşlanması gerekmektedir. Burada "a" ve "b" ile ifade edilen kenarlar birbirine paralel ve "b" kenarının "a" kenarından uzun olmasına dikkat edilmelidir. İlaveten kesitler alınırken "b" kenarının bıçakla önce temas edecek biçimde mikrotoma yerleştirilmesi araştırmacıyı istenilen kalitede seri kesitlerin alınması sağlanacaktır.

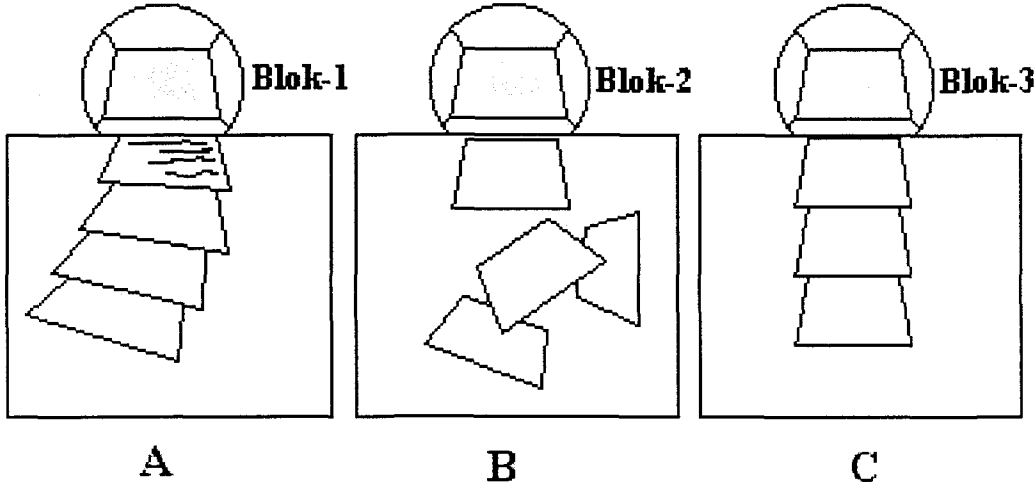
blokların tıraşlanma aşamasının önemi bizim için büyüktü. Şekil 40'ta şematize edildiği gibi tıraşlama yapılırken bloğun uç kısmının yani tıraşlama yapılan taraftaki yüzeylerin birbirine paralel ve bıçakla ilk temas eden tarafın diğer taraftan uzun olacak şekilde ayarlanması gerekmektedir.

Şekil 41'A, B ve C'de yapılan tıraşlamaya göre alınan kesitlerin görüntüleri şematize edilmiştir. A'da tıraşlama yapılırken yukarıda sözü edilen özelliklere dikkat edilmemiş, oluşturulmaya çalışılan ikiz kenar

yamuğun üst ve alt kenarları arasındaki paralellik tam olarak sağlanamamış, bu nedenle seri kesitlerin eğri ve birbirine eşit olmayan büyüklükte gelmesine sebep olmuştur. B'de bir önce bahsedilen yanı sıra ilaveten eşkenar yamuğu oluşturan kenarlar tam olarak bir hat gibi düzeltilmeyerek, kesitlerin tek tek kesilmesine sebep olmuştur. C'de uygun tıraşlama yapılarak seri ve düzgün kesitler alınmıştır.

Çalışmada, yukarıda belirtildiği gibi seri kesitlerin alınması için gerekli koşullar yerine getirildi. Almak istediğimiz kalınlık ultramikrotomun özelliklerinden yararlanılarak ayarlandıktan sonra (yaklaşık 90-100 nanometre), binoküler mikroskop altında su üzerinde yüzen kesitlerin yansıyan ışıkta verdikleri yansımaya (refleye) bakılarak kesitlerin kalınlıklarının kontrolleri yapıldı (yapılan çalışmalarla bu

kalınlıktaki kesitlerin sarı renkte refle verdikleri bilinmektedir). Araştırmanın amacına uygun kesitler alındıktan sonra bunlar önceden anlatılan biçimde hazırlanan gridlere alınarak çalışmanın diğer aşamaları için hazır duruma getirildiler.



Şekil 41: Değişik biçimde kesilen kesitlerin şematik görüntüsü.

Kesitler alınmadan önce stereolojik metotlar göz önünde bulundurularak bir örnekleme stratejisi belirlendi. Buna göre her bir bloktan 9 ayrı gride yerleştirilmek üzere toplam 54 ardışık kesit alındı (Her bir grid üzerine yaklaşık 6 ardışık kesit alınarak 9 gride 54 kesit elde edildi). Burada üzerinde hassasiyetle durduğumuz strateji, her bir bloğun üç farklı seviyesinden kesit alınmasıydı. Düzgün ve seri kesitlerin alınmaya başlandığı noktaya seviye 1 (S-1) adı verilerek, buradan toplam 18 kesit (6 şarlı üç seri kesit) alınmak suretiyle 3 farklı gride yerleştirildi. Seviye 1 (S-1) kesitleri alındıktan sonra, seviye 2 (S-2) ve seviye 3 (S-3) 'de kesit alma işlemleri tamamlanarak her bir bloktan üç farklı düzeyden 54 kesit elde edildi. Bu esaslar göz önünde tutularak pasif sakınmanın öğrenilmesi eğitiminden 24 ve 48 saat sonra perfüze edilen hayvanlardan elde edilen toplam 96 (24 saatlik gruptan 48 blok+48 saatlik gruptan 48 blok =96 blok) bloktan yaklaşık 1000 seri kesit alındı.

3.1.9. Kesitlerin Boyanması

Işık mikroskobu düzeyindeki kesitlerde olduğu gibi, EM düzeyinde de materyallerin incelenebilmesi için boyanmaları gerekmektedir. Doku takip işlemleri sırasında uygulanan osmium tetroksit, yapılar arasında belirli bir derece kontrast oluştursa da daha kaliteli görüntüler için ayrıca bir boyama yapılması mikrograflardaki

kaliteyi artırmaktadır. İnce (ultrathin) kesitlerin boyanması için laboratuvarlarda kurşun sitrat, kurşun nitrat, kurşun hidroksit ve uranil asetat gibi ağır metal tuzları kullanılmaktadır. Bu tür işlemlerde kullanılan manuel tekniklerin yanında son zamanlarda tamamen otomatik cihazlar (ultrastainer) üretilerek boyama işlemleri yapılabilmektedir.

Bizim yaptığımız çalışmada da Leica marka otomatik EM boyama makinası kullanılmış olup, bu makine araştırmacıya dokularını fikse etmek için kullandığı maddeye, takipte kullandığı solüsyonun cinsine, gömme işlemlerinde tercih ettiği ortama, incelenen biyolojik dokunun türüne ve gridlerin kaplanması için kullanılan kimyasalın çeşidine göre değişik alternatifleri içeren programlar sunmaktaydı. Ultrastainerin bu avantajlarından yararlanılarak kesitler boyandı.

Boyama yapılırken kullanılan maddeler (solüsyonlar) ;

Boyama evresi 1 olarak adlandırılan 200 ml'lik sıvı içine konulan 1gr Uranyl asetat

Boyama evresi 1 H olarak adlandırılan 200 ml'lik sıvı içine konulan 2 gr Uranyl asetat

Boyama evresi 2 olarak adlandırılan 200 ml'lik sıvı içine konulan 1 gr kurşun sitrat

Yıkama solüsyonu olarak ya 0.02 M nitrik asit veya % 5'lik alkolden ibaretti.

Çalışmamızda gömme ortamı olarak kullandığımız araldit ve gridlerin üzerini kapladığımız maddeye bağlı olarak düşük ısıda ve kısa süreli bir program kullanmamız önerilmekteydi. Yaptığımız deneme çalışmalarında boyama , yıkama , süre ve ısı ile ilgili olarak denenen çeşitli seçeneklerden sonra en iyi sonucu, toplam 1 saat 3 dakikalık "program bir" olarak adlandırılan boyama programı verdi.

Bu işlem için;

8 dakika süreyle kesitlerin nemlendirilmesi için %5'lik alkol kullanıldı.

Boyama evre 1'de ön boyama 1 dakika 2 saniye olarak yapıldı.

Boyama evre 1'de 25 °C'de 30 dakika boyama yapıldı.

H₂O ile 5 dakika ilk yıkama işlemi gerçekleştirildi.

Boyama evresi 2 ile ön boyama 1 dakika 2 saniye olarak yapıldı.

Boyama evresi 2 ile 25 °C'de 10 dakika boyama yapıldı.

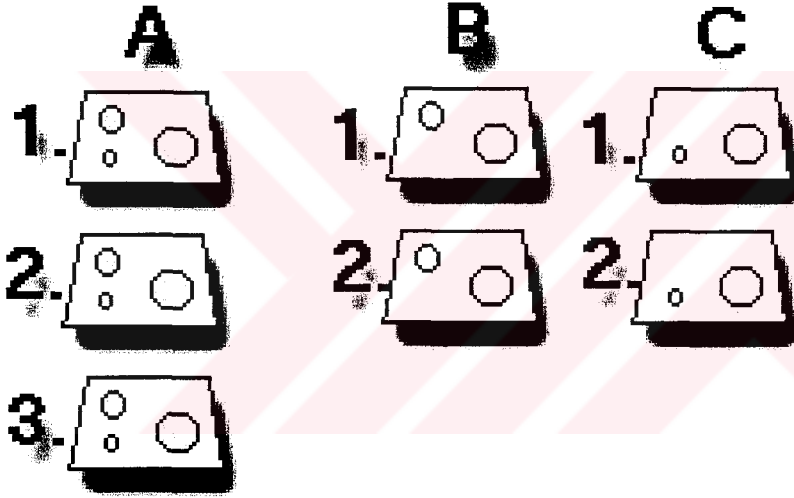
H₂O ile 5 dakika ikinci yıkama işlemi yapıldı.

Üç dakika 20 saniye kesitlerin kurutulma işlemine ayrıldı.

Tüm bu işlemler otomatik olarak yapıldığından gerekli süreler ve ısı dereceleri önceden programlanarak işlem tamamlandı.

3.1.10. Elektronmikroğrafların Çekilmesi

Şimdiye kadar ilgili bölümlerde anlatılan hazırlıklar tamamlandıktan sonra elektron mikroğrafların çekilmesine geçildi. Daha önceki bölümlerde olduğu gibi öncelikle bu konuyla ilgili bir pilot çalışma yapıldıktan sonra işleve süreklilik kazandırıldı. Bu çalışmada JEM-100S marka mikroskop kullanıldı. Mikroğraflar çekilirken, yapılan işlemler aşağıda özetlenmiştir.



Şekil 42: A' da ardışık üç kesitteki benzer alanlar bulunarak görüntülenmiştir. Bu mikroğraflardaki 1. ve 2. Kesit görüntülerinden (1. Örnek kesit, 2.gözlem kesit olarak) birinci, 2. ve 3. kesit görüntülerinden (2. Örnek kesit, 3. Gözlem kesit olarak) ikinci disektör çifti seçildikten sonra aynı Mikroğraflar yer değiştirilerek (1. Gözlem kesit, 2. Örnek kesit ve 2. Gözlem kesit, 3. Örnek kesit olarak) toplam 4 disektör çifti elde edilmiştir. Eğer incelediğimiz gride ardışık 3 kesit görüntüsü bulunamıyorsa B ve C deki gibi iki farklı alandan ardışık iki kesitten toplam 4 disektör çifti elde edilmiştir. B ve C ile ifade edilen iki farklı alandaki 1. ve 2. Kesit görüntülerinden birinci bunların terslerinden ikinci disektör çifti incelenerek toplam 4 disektör çifti inceleme hedefine ulaşılmıştır.

Ekranaya düşürülen görüntüler önce 1000'lik büyütmede incelendi. Böylece elde edilen kesitlerin kalite kontrolü yapılırken, aynı zamanda fotoğraflarını çekeceğimiz bölgeler hakkında ön bilgi sahibi olundu. Ön incelemeden sonra aynı büyütmede (1000) kesit serilerindeki kesitlerin her biri kontrol edilerek bunlar üzerinde mevcut benzer alanlar saptanmaya çalışıldı. Bu aşamada belirtilmesi gereken husus, elde edilen mikroğrafların disektör metoduyla incelenecek olması nedeniyle her bir gritte yerleşik

olan 6-7 ardışık kesitteki benzer alanların bulunma ve görüntülenme zorunluluğudur. Aynı büyütmede griddeki seri kesitlerde birbirine benzer veya birbirini takip eden görüntülerden, toplam 4 disektör yapılabilecek sahalar saptandı (Şekil 42).

Tespit edilen benzer alanların görüntüleri 5000 büyütmede kontrol edildikten sonra, aynı büyütmede bu alanların mikroğrafları çekildi. Bu özelliğe dikkat edilerek 24 ve 48 saatlik gruptan elde edilen 96 bloktan yaklaşık 1000 adet mikroğraf elde edilerek disektör sayım metoduyla analiz edilebilecek duruma getirildi.

3.1.11. Sinapsların Morfolojisi, Ortalama Yüksekliklerinin Hesaplanması ve Sayımı İçin Belirlenen Kriterler

Presinaptik elemanında en az üç adet sinaptik vezikül bulunduran, pre ve post sinaptik membran kalınlaşmasının aynı (simetrik) veya post sinaptik membranda daha fazla olduğu yapılar (asimetrik) sinaps olarak kabul edildi (Mayhew, 1979, Horner ve ark., 1995). Bir sinapsın iki veya üçe parçalanması ile oluşan perfore sinapslar ise parçalar hayali bir çizgide birleştirilirse tek sinaps, aksi durumda iki ayrı sinaps olarak sayıldı.

Elektronmikroğraflar üzerindeki görüntülerden hangi yapıların sinaps olduğuyla ilgili kriterler belirlendikten sonra, disektör sayım kuralına göre spin ve şaft tipindeki sinapslar ayrı ayrı sayılarak değerlendirildi. Eğer sinaps dendritik diken üzerinde ise diken sinaps, dendritik şaft üzerinde ise şaft sinaps olarak kabul edilerek işlemler yürütüldü (Horn ve ark., 1985, Curtis ve Stewart, 1989). Tüm bunlara ilave olarak grupta bulunan hayvanların ilgili bölgelerindeki sinapslarının ortalama yükseklikleri de yukarıdaki sinaps için belirlenen kriterler dahilinde, eldeki mikroğraf (Doubell ve Stewart, 1993) görüntülerinden, disektör uygulamasında farklı bir biçimde, hesap edilerek, ayrıca değerlendirildi.

3.1.12. Fiziksel Disektörün Uygulanması

Sinaps morfolojileri ve sayım için belirlenen kriterler bölümünde anlatıldığı gibi elde edilen elektron mikroğraflardaki görüntülerden hangi morfolojik oluşumların sinaps olarak kabul edilmesi ve sayılacak sinaps tipleri belirlendikten sonra diğer uygulamalara geçildi.

Şekil 43'de ardışık iki kesitten alınan bir disektör çiftinin elektron mikroğrafları ve bunların üzerine yerleştirilen "tarafsız sayım çerçevesi" görülmektedir. Burada

dikkat edilmesi gereken iki önemli husustan birincisi, tarafsız sayım çerçevelerinin disektör çiftlerinin aynı alanlarına yerleştirilmesi, diğeri kullanılan çerçevenin alanının bilinmesidir. Sayım yapılırken önce ardışık görüntü çiftlerinden biri örnek, diğeri gözlem, sonra örnek kesit, gözlem, gözlem kesit, örnek olarak değerlendirilerek iki adet elektronmikrografta 2 disektör uygulaması gerçekleştirildi. Tablo VI'da gösterilen parametrelerin her biri disektör partikülü ve ortalama sinaps yüksekliklerinin hesaplanmasında veri olarak kayıt edildi. Genel bilgiler bölümünde ayrıntılı olarak disektör sayım kuralları anlatılmış olmasına rağmen, bu kurallar kısaca, kesitler arasındaki mesafesi bilinen, ardışık iki paralel kesit üzerinde, sınırları bilinen benzer alanlardan birinde olup diğeri olmayan tüm izdüşümlerin disektör partikülü olarak hesap edilmekte olduğu şeklinde özetlenebilir.

Ortalama sinaps yükseklikleri ise, fiziksel disektör uygulamasından farklı olarak, örnek ve gözlem kesitlerinden örnek kesitteki tüm sinapsların sayılmasının ardından (daha önce sinapslar için belirlenen kriterlerle beraber tarafsız sayım çerçevesinin sınırları dahilinde olanlar), elde edilen değer, aynı kesit çiftinde hesaplanan disektör partikülü (Q^-) sayısına bölümünün, kesit kalınlığıyla çarpılmasıyla elde edildi.

Yukarıda sözü edilen bu yaklaşım (Doubell ve Stewart, 1993),

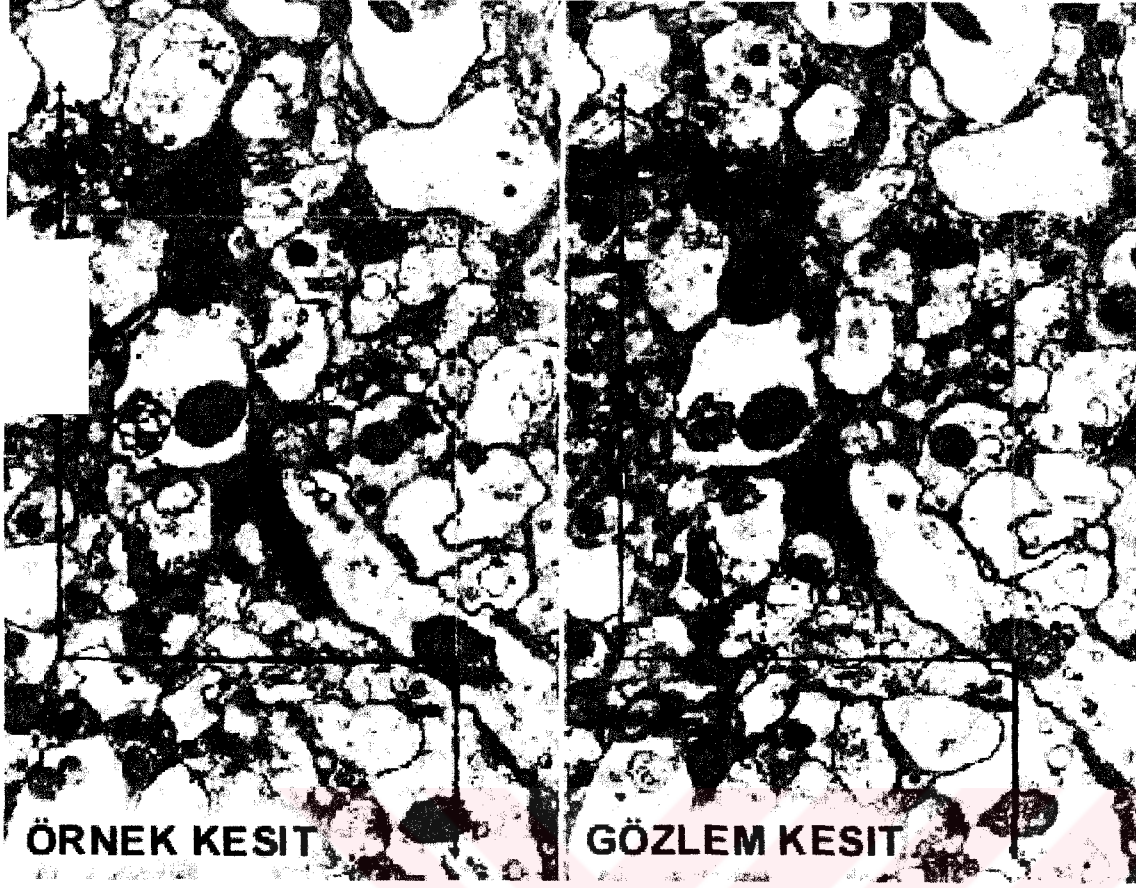
$$H_{(Ort)} = \left(\frac{\sum Q}{\sum Q^-} \right) \times t \text{ şeklinde formülize edilmektedir.}$$

$H_{(Ort)}$: Sinapsların ortalama yüksekliği

t: Kesit kalınlığı

$\sum Q$: Değerlendirilen iki kesit çiftinden bir tanesinde (Örnek Kesitte) gözlenen sinapsların tümü

$\sum Q^-$: Toplam disektör partikülü sayısı



Şekil 43: Disektör çifti olarak alınan iki ardışık kesitin elektron mikroğrafları üzerine yerleştirilen tarafsız sayım çerçeveleri ve fiziksel disektör uygulaması. Bu uygulamada bir izdüşümün disektör partikülü olarak sayılabilmesi için öncelikle incelenen ardışık iki kesit görüntüsünde de benzer alanların bulunup tarafsız sayım çerçevesiyle sınırlandırılmasının ardından, örnek kesitte gözlenip gözlem kesit bulunmayan ve tarafsız sayım çerçevesinin sayım kurallarına uyan tüm izdüşümler disektör partikülü olarak sayılmaktadır. Disektör partikülleri yukarıda bahsedilen kurallara göre tespit edildikten sonra elde edilen verilere $Q / a \times t$ formülü uygulanarak, ilgili kesit çiftindeki partiküllerin sayısal yoğunluğu (N_v) hesaplanmaktadır. Formüldeki (Q) simgesi disektör partiküllerini, (a) simgesi kullanılan tarafsız sayım çerçevesinin alanını, (t) simgesi ise kesit kalınlığını temsil etmektedir. Elektronmikroğraflar üzerindeki yeşil oklar disektör partikülü (Q) olarak sayılan (Örnek kesitte görülüp, gözlem kesitinde olmamaları yanında tarafsız sayım çerçevesinin sayım kurallarına uyan), mavi oklar ise sayılmayan (Örnek ve gözlem kesitinde birlikte bulunmaları veya tarafsız sayım çerçevesinin sayım kurallarına uymayan) sinapsları göstermektedir. İlgili bölgede bulunan sinapsların ortalama yükseklikleri ise incelenen kesit çiftlerinden yalnızca bir tanesinin tarafsız sayım çerçevesi sınırları dahilindeki tüm sinapslarının sayılmasının ardından elde edilen veri aynı bölgede bulunan disektör partikülü sayısına bölündükten sonra sonuç kesit kalınlığıyla çarpılarak hesap edilmektedir. Ortalama sinaps yüksekliğiyle ilgili kullanılan bu ifade (Q / Q) $\times t$ şeklinde formülize edilmektedir. Formüldeki Q simgesi sayılan tüm partikülleri, Q' simgesi sayılan disektör partiküllerini, t simgesi kesit kalınlığını temsil etmektedir.

Tablo VI: Örnek kesit ile ardışığı olan gözlem kesitte sinapsların sayısal yoğunluğu, sinaps tipleri ve ortalama sinaps yüksekliğinin hesaplanmasındaki uygulama stratejisi için çizilen tablo.

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>H</u>
Örnek Kesit								
Gözlem Kesit								

A: Diken (spine) sinaps, B: Gövde (shaft) sinaps, C. Simetrik sinaps, D: Asimetrik sinaps, E: Kullanılan tarafsız sayım çerçevesinin alanı, F: Kesit kalınlığı, G: Disektör hacmi ($V_{(dis)} = \bar{t}xa$), H: Ortalama sinaps yüksekliği (Sayım kurallarına uyan ve örnek kesitte gözlenen tüm sinapslar)



4. BULGULAR

Sıfır günlük civcivlere PSÖ modelinin uygulamasından sonra, dorsolateral hippocampus bölgelerindeki sinapsların sayısal yoğunlukları ve tipleri elektron mikroskobu seviyesinde yeni stereolojik yaklaşımlardan “disektör” metoduyla hesaplandıktan sonra, bu çalışmada elde edilen veriler göz önüne alınarak farklı bir yaklaşımla her bir hayvanın ortalama sinaps yükseklikleri de hesaplandı.

Materyal ve metot bölümünde anlatıldığı gibi, elimizdeki hayvanlarda, öğrenmenin etkisini yukarıda belirtilen morfolojik kriterleri temel alarak değerlendirebilmek için, denekler sistematik bir biçimde alt gruplara ayrılmıştır (Şekil 37). Gruplamalar yapılırken öncelikle öğrenmenin etkisiyle beraber bu etkinin zamana bağlı seyrini izleyebilmek için hayvanlar öğrenme eğitiminden 24 ve 48 saat sonra hayatlarına son verilenler ve bunların kontrolleri şeklinde 4 gruba ayrıldı. Ardından her bir grup, cinsiyetlerin etkisini görebilmek için, erkek-dişi, öğrenmenin incelediğimiz beyin bölgesinde lateralizasyon gösterip göstermediğini belirlemek için ise sol-sağ hippocampus sınıflandırılmasına tabi tutuldu. Bu tür bir yaklaşımla elde edilen 16 alt gruba ait toplu sonuçlar Tablo 7 ve 8’de, verilerden elde edilen grafikleri ise şekil 44, 45, 46, 47, 48, 49 ve 50’de sunulmuştur.

Çalışmamızda karşılaştırmalar her bir hayvan grubuna ait özelliklerden (eğitim - kontrol, dişi - erkek, sağ - sol, 24 saat - 48 saat) üç tanesi sabit tutulup etkisini gözlemek istediğimiz parametre değiştirilerek belli bir sistematik mantıkla, verilerin istatistiksel değerlendirilmesi grupların ortanca değerini temel alan Mann Whitney U testi ile yapıldı (Tablo 10, 11, 12, 13, 14, 15). Yukarıda sözü edilen sistematik mantık kapsamında;

I. Zamana bağlı değişimi görebilmek için, örneğin; kontrol-eğitim, erkek-dişi, sol-sağ hippocampus bölgeleri 24 saatlik grup ile bunların 48 saatliklerinde, sayısal yoğunluk verileri (Şekil 44, 45) ile bu verilerin istatistiksel analizleri (Tablo 10, 11),

II. Eğitimin gruplar üzerindeki etkisini anlamak için, örneğin; 24 saat-48 saat, erkek-dişi, sol-sağ kontrol grubu ile bunların eğitimlilerinin sayısal yoğunluk verileri (Şekil 46, 47) ve istatistiksel değerlendirmeleri (Tablo 12, 13),

III. Öğrenmenin lateralizasyon gösterip göstermediğini belirleyebilmek için, örneğin; kontrol-eğitim, 24 saat-48 saat, dişi-erkek sağ hippocampus ile bunların sol taraflarının sayısal yoğunluk verileri (Şekil 49, 50) ve istatistiksel karşılaştırmaları (Tablo 15) ve

IV. Cinsiyetlerin gruplar üzerindeki etkisini ise, eğitim-kontrol, 24 saat - 48 saat, sağ-sol dişi bireylere sahip gruplar ile bunların erkeklerini bulandıran grupların sayısal yoğunluk (Şekil 44 - 48) ve istatistiksel değerlendirmeleri sunulmuştur (Tablo 14).

Tüm bunlara ilave olarak yukarıda sözü edilen gruplar esas alınarak, materyal ve metot bölümünde anlatıldığı biçimiyle, hayvanların dorsolateral bölgesindeki sinapslarının ortalama yükseklikleri hesap edilmiş olup, elde edilen veriler tablo 9'da sunulmuştur.



Tablo VII (A, B, C, D, E, F, G): bölgelerindeki toplam ve toplamı oluşturan spin ve shaft sinapların sayısal yoğunluk değerlerinin fiziksel disektör metoduyla hesap edilen toplu sonuçları. Cıvıv satırındaki 1, 2, 3,4, 5 rakamları hayvanları, "p" değerleri kaç tane disektör çiftinde ölçüm yapıldığı, "Q" değeri bu ölçümlerde sayılan disektör partiküllerinin toplam sayısını göstermektedir. Ortalama kesit kalınlığı ve kullanılan tarafsız sayım çerçevesinin alanı (a) mikrometre cinsinden verilmiştir (16500 olan büyütmeye değeri) Pasif sakınmanın öğrenilmesi uygulamasından 24 saat sonra perfüze edilen her bir gruptaki 5 hayvan ve bunların kontrollerinin dişi / erkek, sağ / sol hippokampus 5000'lik E.M büyütmesiyle ortalama 3.3'lük agrandisör büyütmeye uygundur. HK (CE) bireysel hesaplamaların nispi varyansı, VK (CV) gurubun gözlenen nispi varyansıdır.

A) KONTROLİ ERKEK -SAĞ (24 SAAT)

Cıvıv	1			2			3			4			5		
	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft
Sinaps Tipi	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Kesit Kalınlığı (µm)	71,91	71,91	71,9104	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,9104	71,91	71,91	71,91	71,91
a(çer) µm ²	97	67	30	98	66	32	95	65	30	96	68	28	97	64	33
Q	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
P	1,67	1,15	0,52	1,68	1,13	0,55	1,63	1,12	0,52	1,65	1,17	0,48	1,67	1,1	0,57
N _v	0,102			0,101			0,103			0,102			0,102		
Spin (%)		68,9			67,3			68,7			70,9			65,9	
Shaft (%)			31,1			32,7			31,9			29,1			34,1
GRUP ORT.	1,66	1,13	0,53												
SEM	0,01	0,01	0,02												

VARYASYON KATSAYISI 0,01

B) EĞİTİMLİ ERKEK -SAĞ (24 SAAT)

Cıvıv	1			2			3			4			5		
	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft
Sinaps Tipi	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Kesit Kalınlığı (µm)	71,91	71,91	71,9104	71,91	71,9104	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,9104	71,91	71,91	71,9104	71,91
a(çer) µm ²	110	49	51	107	51	56	104	49	55	102	52	50	105	52	53
Q	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
P	2,12	0,95	0,99	2,07	0,99	1,08	2,01	0,95	1,06	1,97	1	0,97	2,03	1	1,02
N _v	0,095			0,097			0,098			0,099			0,098		
Spin (%)		44,8			47,8			47,3			50,8			49,3	
Shaft (%)			46,7			52,2			52,7			49,2			50,2
GRUP ORT.	2,04	0,98	1,02												
SEM	0,03	0,01	0,02												

VARYASYON KATSAYISI 0,03

Tablo VIII (A, B, C, D, E, F, G): Pasif sakınmanın öğrenilmesi uygulamasından 48 saat sonra perfizle edilen her bir gruptaki 5 hayvan ve bunların kontrollerinin dişi / erkek, sağ / sol hippokampus bölgelerindeki toplam ve toplamlı oluşturan spin ve shaft sinapsların sayısal yoğunluk değerlerinin fiziksel disektör metoduyla hesap edilen toplu sonuçları. Cıvıv satırındaki 1, 2, 3, 4, 5 rakamları hayvanları, "p" değerleri kaç tane disektör çiftinde ölçüm yapıldığını, "Q" değeri bu ölçümlerde sayılan disektör partiküllerinin toplam sayısını göstermektedir. Ortalama kesit kalınlığı ve kullanılan tarafların sayısını çerçevesinin alanı (a) mikrometre cinsinden verilmiştir (16500 olan büyüme değerini 5000'lik E.M büyümesiyle ortalama 3.3'lük agrandizör büyümesi oluşturmaktadır). HK (CE) bireysel hesaplamaların nispi varyansı, VK (CV) gurubun gözlenen nispi varyansıdır.

A) KONRTOL DİŞİ -SOL (48 SAAT)

Cıvıv	1			2			3			4			5		
	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft
Sinaps Tipi	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Kesit Kalınlığı (µm)	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91
a(çer) µm ²	89	63	26	97	71	26	94	69	25	89	62	27	94	70	24
Q	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
N _v	1,72	1,22	0,5	1,87	1,37	0,5	1,82	1,33	0,48	1,72	1,2	0,52	1,82	1,35	0,46
HK	0,106			0,102			0,103			0,106			0,103		
Spin (%)		70,9			73,3			73,1			69,8			74,2	
Shaft (%)			29,1			26,7			26,4			30,2			25,3
GRUP ORT.	1,79	1,29	0,49												
SEM	0,03	0,04	0,01												

VARYASYON KATSAYISI

0,03

B) EĞİTİMLİ DİŞİ -SOL (48 SAAT)

Cıvıv	1			2			3			4			5		
	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft	Toplam	Spin	Shaft
Sinaps Tipi	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Kesit Kalınlığı (µm)	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91	71,91
a(çer) µm ²	113	59	54	110	55	55	108	55	53	113	58	55	108	54	54
Q	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
N _v	2,49	1,3	1,19	2,43	1,21	1,21	2,38	1,21	1,17	2,49	1,28	1,21	2,38	1,19	1,19
HK	0,094			0,095			0,096			0,094			0,096		
Spin (%)		52,2			49,8			50,8			51,4			50	
Shaft (%)			47,8			49,8			49,2			48,6			50
GRUP ORT.	2,43	1,24	1,19												
SEM	0,02	0,02	0,01												

VARYASYON KATSAYISI

0,02

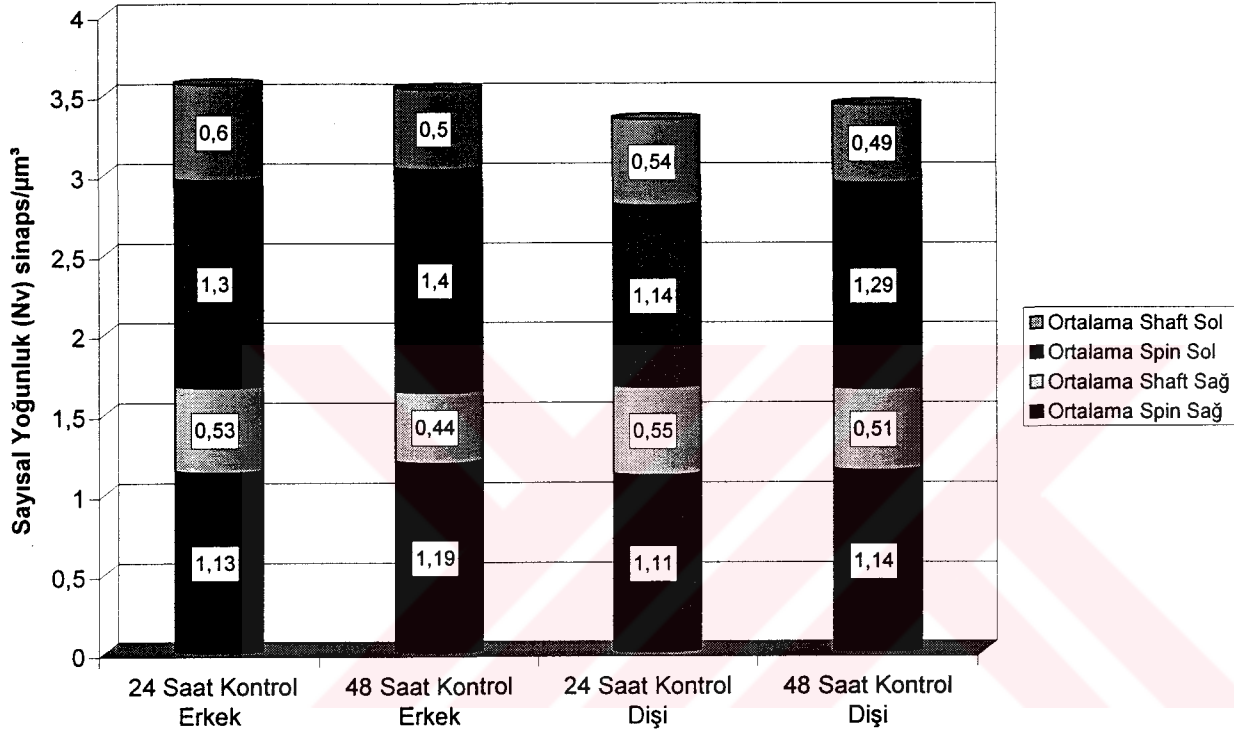
Tablo IX: Pasif sakinmanın öğrenilmesi uygulamasından 24 (şekil B) veya 48 saat (şekil A) sonra hayatlarına son verilen her bir gruptaki 5 hayvan ve bunların kontrollerinin dişi / erkek, sağ / sol hippokampus bölgelerindeki sinapsların ortalama yüksekliklerinin hesapla elde edilen toplu sonuçları. Hayvan sütünundaki 1, 2, 3, 4, 5 rakamları hayvan sayılarını, toplam ortalama değer verisi ise grupta bulunan 5 hayvanın değerlerinin ortalamasını mikrometre cinsinden göstermektedir. Ortalama sinaps yükseklikleri hesaplanırken; $H_{(ort)} = \Sigma Q / \Sigma Q \times t$ eşitliğinden yararlanılmış olup, $H_{(ort)}$: Sinapsların ortalama yüksekliğini, t: Kesit kalınlığını, ΣQ : Değerlendirilen iki kesit çiftinden bir tanesinde gözlenen sinapsların tümünü ve $\Sigma Q'$ Toplam disektör partikülü sayısını temsil etmektedir. Elde edilen bu veriler sayısal yoğunluk verilerinde yapılmış olan grup içi karşılaştırmaları esas alarak Mann-Whitney U testiyle değerlendirilmiş olup gruplar arasında anlamlı hiçbir sonuca rastlanmamıştır.

(A) HESAPLANAN ORTALAMA SİNAPS YÜKSEKLİKLERİ (48 Saatlik Gruplar)												
	Kontrol Dişi		Eğitim Dişi		Kontrol Dişi		Eğitim Dişi		Kontrol Erkek		Eğitim Erkek	
	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol
1. HAYVAN	0,113	0,111	0,095	0,096	0,122	0,122	0,095	0,095	0,117	0,117	0,095	0,095
2. HAYVAN	0,112	0,118	0,094	0,094	0,114	0,114	0,092	0,092	0,115	0,115	0,096	0,096
3. HAYVAN	0,119	0,115	0,093	0,095	0,115	0,115	0,094	0,094	0,116	0,116	0,094	0,094
4. HAYVAN	0,11	0,119	0,096	0,094	0,115	0,115	0,093	0,093	0,112	0,112	0,094	0,094
5. HAYVAN	0,114	0,114	0,096	0,096			0,096	0,096	0,116	0,116	0,095	0,095
TOPLAM ORTALAMA	1,136 μm	0,1154 μm	0,0948 μm	0,095 μm	0,116 μm	0,116 μm	0,094 μm	0,094 μm	0,1152 μm	0,1152 μm	0,0948 μm	0,0948 μm

(B) HESAPLANAN ORTALAMA SİNAPS YÜKSEKLİKLERİ (24 Saatlik Gruplar)												
	Kontrol Dişi		Eğitim Dişi		Kontrol Dişi		Eğitim Dişi		Kontrol Erkek		Eğitim Erkek	
	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol
1. HAYVAN	0,114	0,117	0,102	0,102	0,118	0,118	0,1	0,1	0,118	0,118	0,103	0,103
2. HAYVAN	0,116	0,118	0,105	0,104	0,116	0,116	0,099	0,099	0,121	0,121	0,102	0,102
3. HAYVAN	0,115	0,12	0,103	0,101	0,114	0,114	0,101	0,101	0,12	0,12	0,108	0,108
4. HAYVAN	0,117	0,121	0,104	0,103	0,117	0,117	0,102	0,102	0,128	0,128	0,102	0,102
5. HAYVAN	0,114	0,122	0,104	0,1	0,114	0,114	0,103	0,103	0,129	0,129	0,104	0,104
TOPLAM ORTALAMA	1,152 μm	1,196 μm	0,107 μm	0,102 μm	1,158 μm	1,158 μm	0,101 μm	0,101 μm	1,232 μm	1,232 μm	0,104 μm	0,104 μm

Grup Karşılaştırmaları	Shaft	Spin	Toplam
Kontrol 24 Erkek Sağ	0,0131	0,1743	0,3832
Kontrol 48 Erkek Sağ			
Kontrol 24 Erkek Sol	0,0212	0,7526	0,6015
Kontrol 48 Erkek Sol			
Kontrol 24 Dişi Sağ	0,7110	0,6183	1,0000
Kontrol 48 Dişi Sağ			
Kontrol 24 Dişi Sol	0,0164	0,0078	0,0267
Kontrol 48 Dişi Sol			

Tablo X:Tüm kontrol gruplarında zamanın etkisine bağlı değişimin (24 veya 48. saatte hayatlarına son verilen hayvanlarda) gözlenebilmesi için yapılan karşılaştırmaların Mann Whitney U testiyle değerlendirilmesi (0,05'ten küçük olan P değerleri istatistiki açıdan anlamlı kabul edilmiştir).

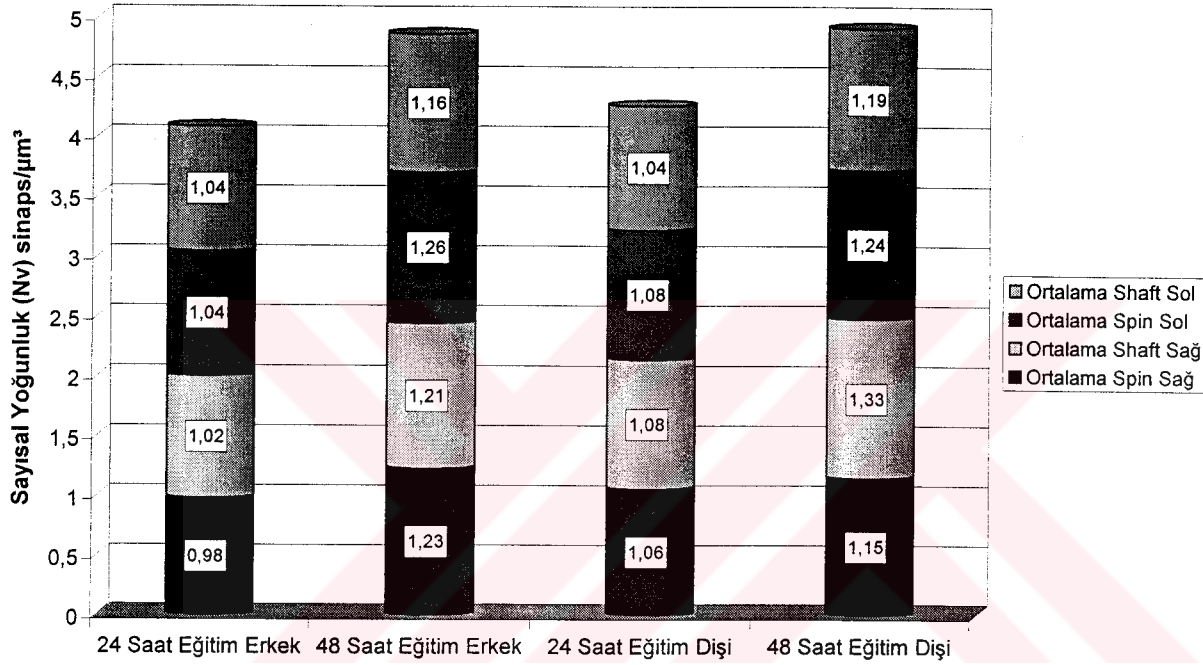


Şekil 44 Kontrol gruplarında sinapsların sayısal yoğunluklarına zamanın bir etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmak için grubun diğer özellikleri sabit tutulup zaman (24–48. Saat) parametresi değiştirilerek yapılan karşılaştırmalar (Grafiklerde bantlardan alttan ilk ikisi sağ, üsttekiler sol taraflara ait verileri gösterirken, her bir sütündeki 1. ve 3. bantlar spin sinapsları, 2. ve 4. bantlar shaft sinapsları temsil etmektedir).

Karşılaştırmalardan zamana bağlı değişimler incelendiğinde kontrol gruplarının 24 ve 48 saatliklerinde toplam ortalama sinaps sayısal yoğunluk verilerinde (Şekil 44) istatistiki olarak anlamlı bir farklılığa rastlanmazken (Kontrol 24 saatlik dişi sol- Kontrol 48 saatlik dişi sol hariç) (Tablo 10), aynı yaklaşımla eğitilmiş grupların 24 ve 48 saatliklerinde ortalama sinaps sayısal yoğunluk verileri (spin, shaft ve ortalama toplam sinapsların sayısal yoğunlukları) (Şekil 45) istatistiksel olarak 48 saatliklerin lehine bulunmuştur (Tablo 11).

Grup Karşılaştırmaları	Shaft	Spin	Toplam
Eğitim 24 Erkek Sağ Eğitim 48 Erkek Sağ	0,0086	0,0084	0,0090
Eğitim 24 Erkek Sol Eğitim 48 Erkek Sol	0,0086	0,0080	0,0088
Eğitim 24 Dişi Sağ Eğitim 48 Dişi Sağ	0,0086	0,0064	0,0088
Eğitim 24 Dişi Sol Eğitim 48 Dişi Sol	0,0086	0,0086	0,0080

Tablo XI: Eğitimli gruplarda zamanın etkisine bağlı değişimin (24 veya 48. saatte hayatlarına son verilen hayvanlarda) gözlenebilmesi için yapılan karşılaştırmaların Mann Whitney U testiyle değerlendirilmesi (0,05'ten küçük olan P değerleri istatistiki açıdan anlamlı kabul edilmiştir).



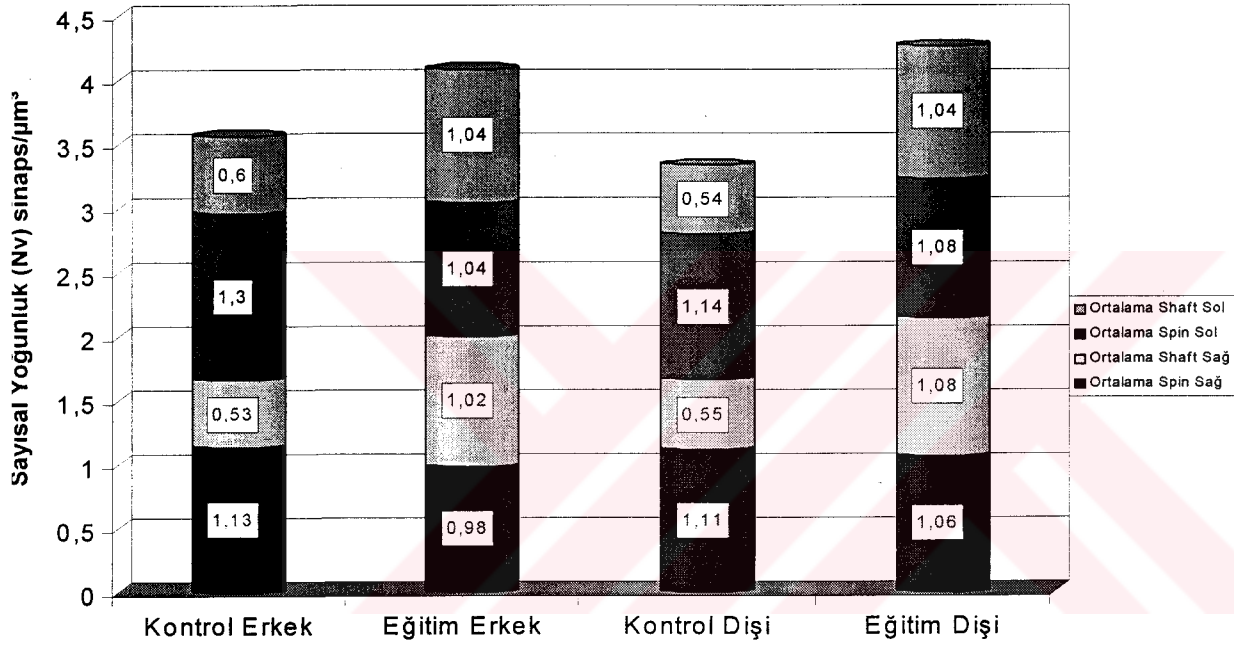
Şekil 45 Eğitimli gruplarda sinapsların sayısal yoğunluklarına zamanın bir etkisi olup olmadığını ortaya çıkarmak için grubun diğer özellikleri sabit tutulup, zaman (24. – 48. Saat) parametresi değiştirilerek yapılan karşılaştırmalar (Grafiklerde bantlardan alttan ilk ikisi sağ, üsttekiler sol taraflara ait verileri gösterirken, her bir sütundaki 1. ve 3. bantlar spin sinapsları, 2. ve 4. bantlar shaft sinapsları temsil etmektedir).

Çalışmada eğitimin gruplar üzerindeki etkisini gözleyebilmek için gruba ait özelliklerden diğerleri sabit tutulup eğitim ve kontrol parametreleri karşılaştırıldığında 24 ve 48 saatlik kontrol ve eğitimlilerinin tüm shaft ve ortalama toplam sayısal yoğunluklarının (Şekil 46, 47) eğitimlilerin lehine bir seyir izlemesinin yanında bu verilerin hepsi istatistiki açıdan da anlamlı bulunmuştur (Tablo 12, 13). Bu karşılaştırmada dikkatimizi çeken diğer bir özellikse 24 saatlik kontrol- eğitim gruplarındaki eğitimlilerin lehine shaft ve toplam ortalama sinaps sayısal yoğunluk veri

oranlarının (Şekil 46, Tablo 12) 48 saatliklerde daha da belirginleşmesi gerçeğidir (Şekil 47, Tablo 13).

Grup Karşılaştırmaları	Shaft	Spin	Toplam
Kontrol 24 Erkek Sağ	0,0088	0,0086	0,0088
Eğitim 24 Erkek Sağ	0,0086	0,0086	0,0090
Kontrol 24 Erkek Sol	0,0131	0,0838	0,0139
Eğitim 24 Erkek Sol	0,0061	0,1395	0,0062
Kontrol 24 Dişi Sağ			
Eğitim 24 Dişi Sağ			
Kontrol 24 Dişi Sol			
Eğitim 24 Dişi Sol			

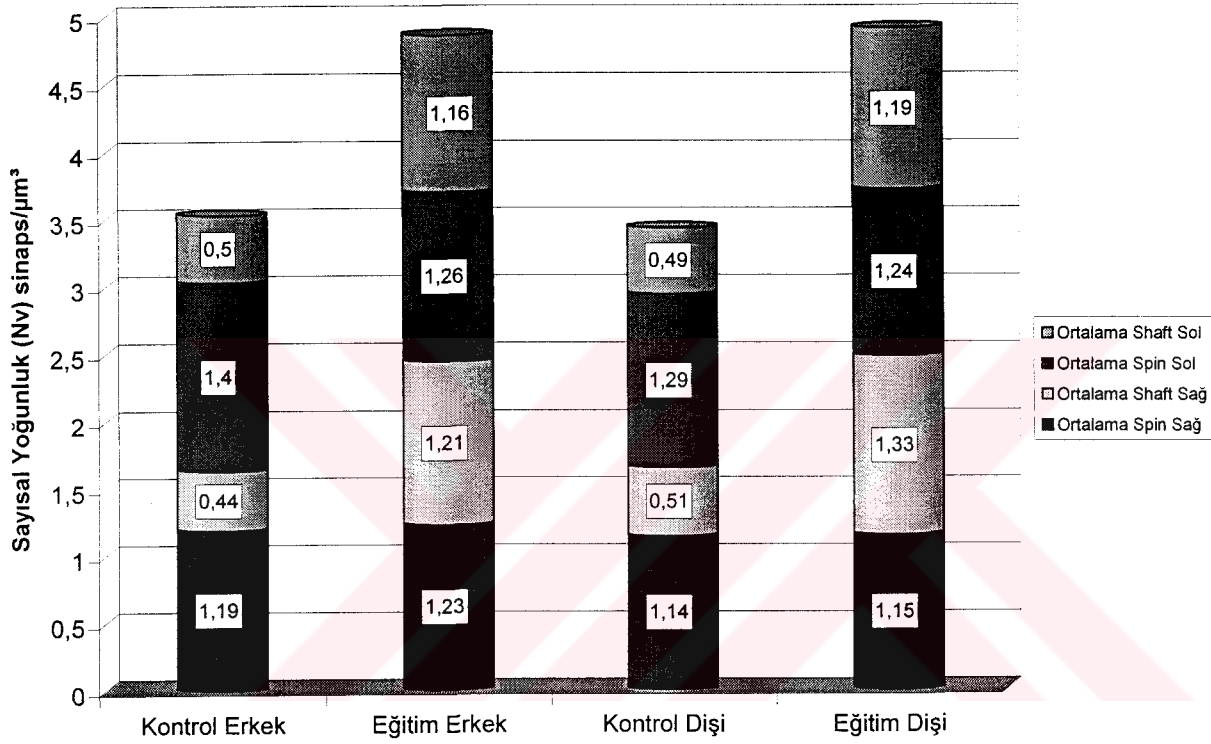
Tablo XII: 24. Saatte perfüze edilen hayvanlarda eğitimin etkisini gözlemek için kontrol ve eğitim gruplarında yapılan karşılaştırmaların Mann Whitney U testiyle değerlendirilmesi (0,05'ten küçük olan P değerleri istatistiki açıdan anlamlı kabul edilmiştir).



Şekil 46: 24. saatte perfüze edilen hayvanlarda sinapsların sayısal yoğunluklarına eğitimin bir etkisi olup olmadığını ortaya çıkarmak için grubu oluşturan diğer özellikler sabit tutulup kontrol-eğitim parametresi değiştirilerek yapılan karşılaştırmalar (Grafiklerde bantlardan alttan ilk ikisi sağ, üsttekiler sol taraflara ait verileri gösterirken, her bir sütundaki 1. ve 3. bantlar spin sinapslar, 2. ve 4. bantlar shaft sinapsları temsil etmektedir).

Grup Karşılaştırmaları	Shaft	Spin	Toplam
Kontrol 48 Erkek Sağ	0,0127	1,0000	0,0143
Eğitim 48 Erkek Sağ	0,0090	0,1475	0,0088
Kontrol 48 Erkek Sol	0,0090	0,7533	0,0090
Eğitim 48 Erkek Sol	0,0084	0,1732	0,0082

Tablo XIII: 48. Saatte perfüze edilen hayvanlarda eğitimin etkisini gözlemek için kontrol ve eğitim gruplarında yapılan karşılaştırmaların Mann Whitney U testiyle değerlendirilmesi (0,05'ten küçük olan P değerleri istatistiki açıdan anlamlı kabul edilmiştir).



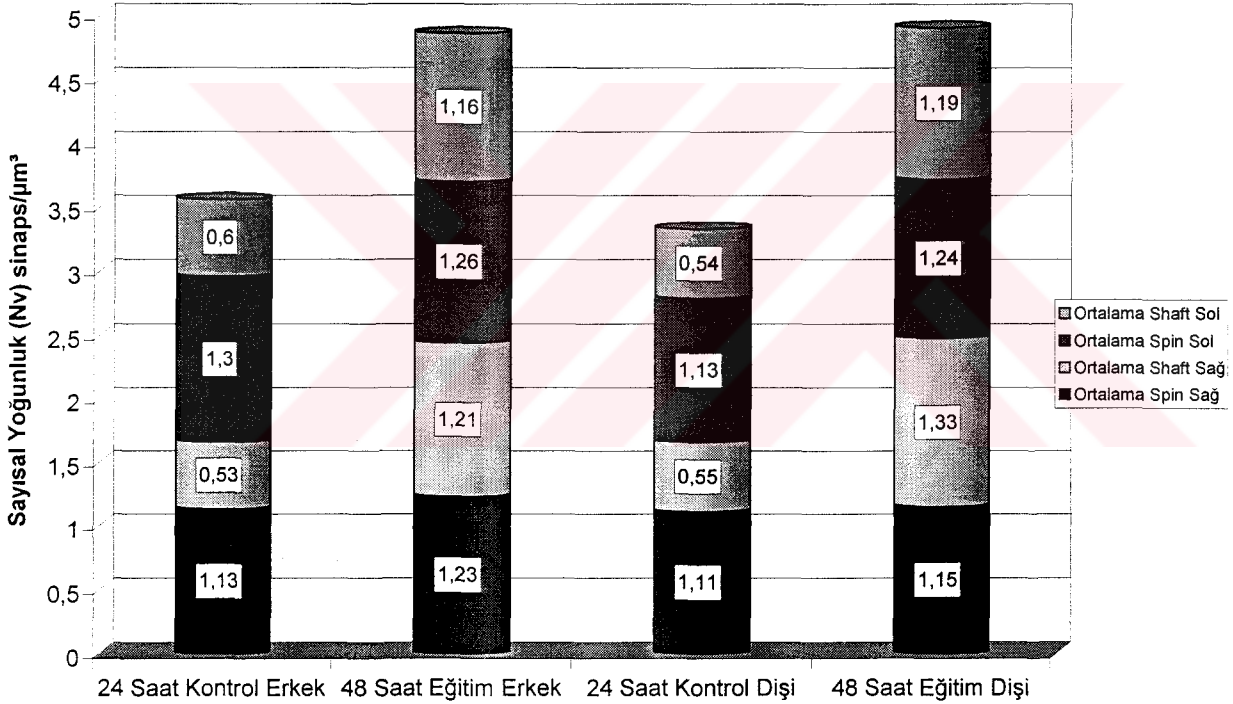
Şekil 47: 48. saatte perfüze edilen hayvanlarda sinapsların sayısal yoğunluklarına eğitimin bir etkisi olup olmadığını ortaya çıkarmak için grubu oluşturan diğer özellikler sabit tutulup kontrol-eğitim parametresi değiştirilerek yapılan karşılaştırmalar. (Grafiklerde bantlardan alttan ilk ikisi sağ, üsttekiler sol taraflara ait verileri gösterirken, her bir sütundaki 1. ve 3. bantlar spin sinapsları, 2. ve 4. bantlar shaft sinapsları temsil etmektedir).

İlk yaptığımız karşılaştırmada (Şekil 44, 45, Tablo 10, 11), zamanın değişimine bağlı (24-48 saat) yapılan değerlendirmeleri içermekteydi. Burada adı geçen parametrenin değiştirilmesinin kontrol grupları arasında herhangi bir farklılığı ortaya çıkarmamasına karşın eğitilmiş gruplarda 48 saatliklerin lehine bir dönüşüme sebep olduğu belirtilmişti. İkinci değerlendirmede ise tüm kontrol ve eğitilmiş grupların karşılaştırmalarında (Şekil 46, 47, Tablo 12, 13), sonuçların eğitilmişlerin lehine olduğu görülmesine ilave olarak, sayısal yoğunluk verilerinin en büyük değeri eğitilmiş 48

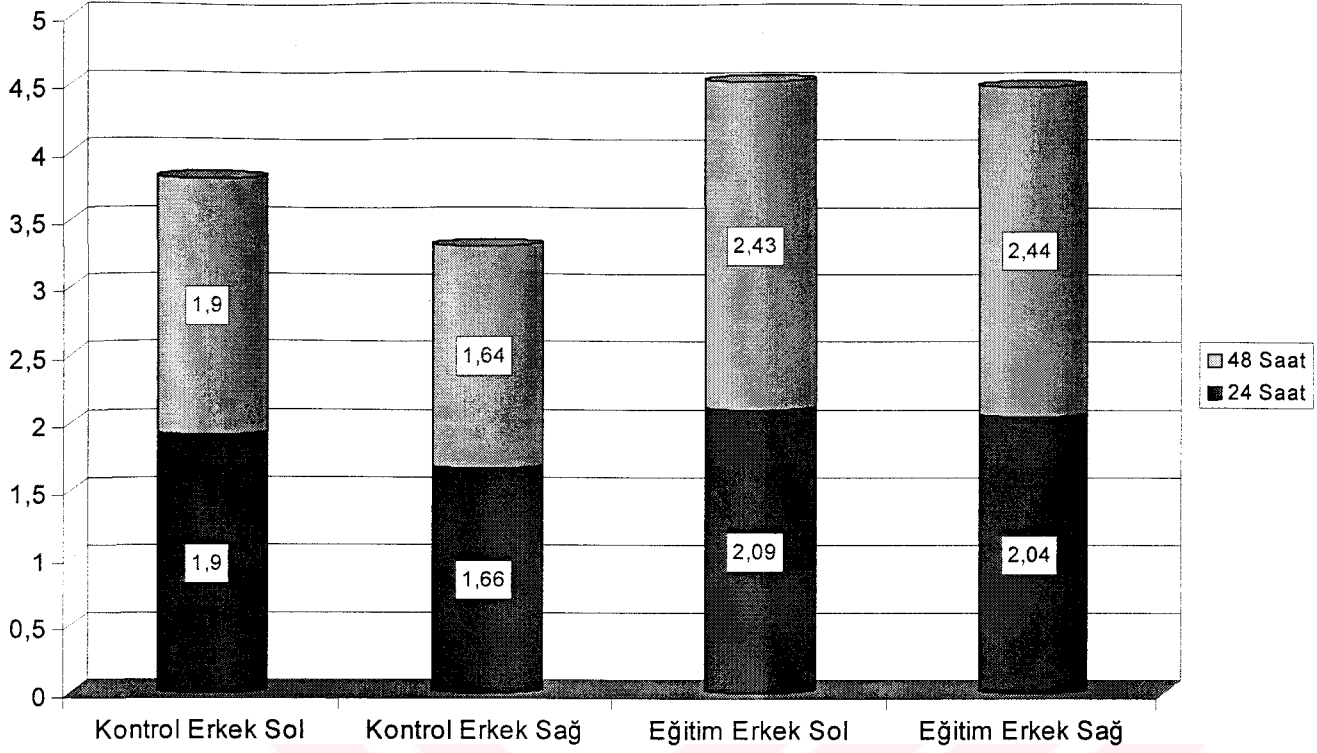
saatliklerde olduğu belirtilmişti. O halde bu son iki bulgunun yeniden test edilmeleri amacıyla yönelik kontrol 24 saatliklerle, eğitilmiş 48 saatlikler karşılaştırıldığında (Tablo 14), sayısal yoğunluk verileri (Şekil 48) ve istatistiksel olarak tüm toplam ve shaft sinapsların 48 saatlik eğitimlilerin lehine gerçekleştiği ortaya çıktı.

Grup Karşılaştırmaları	Shaft	Spin	Toplam
Kontrol 24 Erkek Sağ	0,0084	0,0150	0,0088
Eğitim 48 Erkek Sağ			
Kontrol 24 Erkek Sol	0,0090	0,0714	0,0088
Eğitim 48 Erkek Sol			
Kontrol 24 Dişi Sağ	0,0139	0,6228	0,0143
Eğitim 48 Dişi Sağ			
Kontrol 24 Dişi Sol	0,0058	0,0102	0,0059
Eğitim 48 Dişi Sol			

Tablo XIV: Eğitim ve zamanın birlikte nasıl bir etki oluşturduğunu görebilmek için kontrol gruplarının 24 saatlikleri ile eğitilmiş grupların 48 saatliklerinde yapılan karşılaştırmaların Mann Whitney U testiyle değerlendirilmesi (0,05'ten küçük olan P değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir).



Şekil 48: Zaman ve eğitimin sinapsların sayısal yoğunluklarında meydana getirebileceği toplam etkinin birlikte değerlendirilebileceği 24. saatte perfüze edilen kontrol grupları ile 48. saatte perfüze edilen eğitilmiş grupların karşılaştırmaları (Grafiklerde bantlardan alttan ilk ikisi sağ, üsttekiler sol taraflara ait verileri gösterirken, her bir sütundaki 1. ve 3. bantlar spin sinapsları, 2. ve 4. bantlar shaft sinapsları temsil etmektedir).



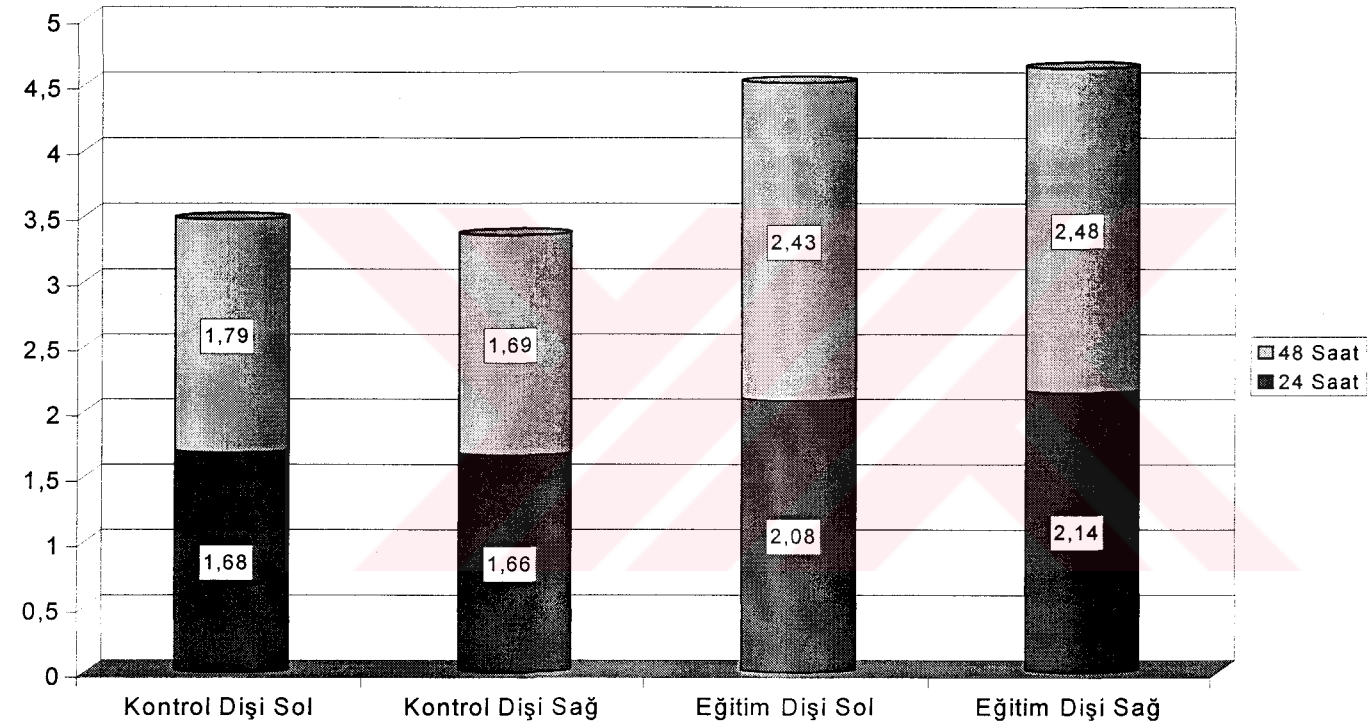
Şekil 49: Kontrol veya eğitilmiş erkek gruplarının tümünde sinapsların sayısal yoğunluklarının hipokampus bölgesinde lateralizasyon gösterip gösterdiklerini ortaya çıkarabilmek için grubu oluşturan diğer özellikler sabit tutularak sağ-sol parametresi değiştirilerek elde edilen karşılaştırmalar.

Bir grubun sağ ve sol hipokampus bölgelerindeki farklılıklar değerlendirildiğinde (Tablo 15), kontrol gruplarının 24 ve 48 saatliklerinin tümünde toplam ortalama sinaps yoğunluklarının sol tarafların lehine gözükmesi yanında istatistiksel olarak da kontrol 24 saatlik erkek sağ / sol, kontrol 48 saat erkek sağ / sol sonuçlarının da anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 49). Aynı değerlendirme eğitilmiş 24 ve 48 saatlik grupların sağ / sol taraflarında yapıldığında toplam ortalama sayısal yoğunluk verileri arasındaki farkın azalması yanında istatistiksel olarak hiçbir anlamlı bulguya da rastlanmamıştır (Şekil 50, Tablo 15).

Kontrol gruplarında sol tarafların lehine gözlenen asimetrinin eğitilmiş gruplarda nasıl değiştiği, kontrol 24 saatlik erkek sol grubun toplam ortalama sinapslarının sayısal yoğunluklarında eğitilmiş erkek sol 24 veya 48 saatliklere dönüşürken gösterdiği oransal artmanın, aynı grupların sağ taraflarındaki oransal artmadan daha düşük olması sebebiyle ortaya çıktığını düşündürmektedir. Yani başta sol tarafın lehine gözlenen asimetri eğitilmiş gruplarda sağ tarafa çıktığını düşündürmektedir. Yani başta sol tarafın lehine gözlenen asimetri eğitilmiş gruplarda sağ tarafa çıktığını düşündürmektedir. Yani başta sol tarafın lehine gözlenen asimetri eğitilmiş gruplarda sağ tarafa çıktığını düşündürmektedir.

Tablo XV: Kontrol ve eğitimli gruplarında (24 veya 48. saatte hayatlarına son verilen hayvanların) sağ / sol hippocampus bölgelerinde herhangi bir farklılığın olup olmadığını gözlenebilmesi için yapılan karşılaştırmaların Mann-Whitney U testiyle değerlendirilmesi (0,05'ten küçük olan P değerleri istatistikî açıdan anlamlı kabul edilmiştir).

Grup Karşılaştırmaları	Shaft	Spin	Toplam	Grup Karşılaştırmaları	Shaft	Spin	Toplam
Kontrol 24 Erkek Sağ	0,0160	0,0088	0,0088	Eğitim 24 Erkek Sağ	0,5232	0,0232	0,1150
Kontrol 24 Erkek Sol				Eğitim 24 Erkek Sol			
Kontrol 24 Dişi Sağ	0,9135	0,5906	0,3909	Eğitim 24 Dişi Sağ	0,1284	0,5918	0,7469
Kontrol 24 Dişi Sol				Eğitim 24 Dişi Sol			
Kontrol 48 Erkek Sağ	0,0799	0,0481	0,0143	Eğitim 48 Erkek Sağ	0,1363	0,1945	0,4606
Kontrol 48 Erkek Sol				Eğitim 48 Erkek Sol			
Kontrol 48 Dişi Sağ	1,0000	0,2850	0,2835	Eğitim 48 Dişi Sağ	0,0094	0,0309	0,8202
Kontrol 48 Dişi Sol				Eğitim 48 Dişi Sol			



Şekil 50: Kontrol veya eğitimli dişi gruplarının tümünde sinapsların sayısal yoğunluklarının hippocampus bölgesinde lateralizasyon gösterip göstermediklerini ortaya çıkarabilmek için grubu oluşturan diğer özellikler sabit tutulup sağ-sol parametresi değiştirilerek elde edilen karşılaştırmalar.

Çalışmada son olarak cinsiyetin etkisini gözleyebilmek için gruba ait özelliklerden diğerleri sabit tutulup dişi/erkek parametreleri karşılaştırıldığında (Tablo 16), bir kısım veriler arasında 0.05'den küçük P değerleri varolmasına rağmen genel anlamda cinsiyetler arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir.

Tablo XVI: Kontrol ve eğitimli gruplarında (24 veya 48. saatte hayatlarına son verilen hayvanların dişi/erkek civcivler arasında her hangi bir farklılığın olup olmadığının gözlenebilmesi için yapılan karşılaştırmaların Mann Whitney U testiyle değerlendirilmesi (0,05'ten küçük olan P değerleri istatistiki açıdan anlamlı kabul edilmiştir)

Grup Karşılaştırmaları	Shaft	Spin	Toplam	Grup Karşılaştırmaları	Shaft	Spin	Toplam
Kontrol 24 Erkek Sağ Kontrol 24 Dişi Sağ	0,3727	0,3812	1,0000	Eğitim 24 Erkek Sağ Eğitim 24 Dişi Sağ	0,0472	0,0135	0,0249
Kontrol 48 Erkek Sağ Kontrol 48 Dişi Sağ	1,0000	0,7702	0,3094	Eğitim 48 Erkek Sağ Eğitim 48 Dişi Sağ	0,0135	0,2187	1,0000
Kontrol 24 Erkek Sol Kontrol 24 Dişi Sol	0,0219	0,0059	0,0062	Eğitim 24 Erkek Sol Eğitim 24 Dişi Sol	0,8525	0,4081	0,4611
Kontrol 48 Erkek Sol Kontrol 48 Dişi Sol	0,7832	0,2722	0,1961	Eğitim 48 Erkek Sol Eğitim 48 Dişi Sol	0,2599	0,8525	0,4070

5. TARTIŞMA

Öğrenmenin araştırılmasında izlenen metodolojik yaklaşımlar, uzun süreli hafızanın beyinde hangi bölgede ne şekilde yerleştiği, bu tür belleğin varlığının belirlenmesinde hangi morfolojik kriterlerin göz önüne alınması gerektiği ve son olarak morfolojik bir kriterin değerlendirilmesinin ne şekilde yapılabileceği gibi kavramlar genel bilgilerde ayrıntısıyla anlatılmıştı. Şimdi ise bulgularımızın genel kabullerle uyumunu tartışacağız.

Öğrenme; edinilen deneyimler ışığında davranışları değiştirebilme yeteneği, hafıza ise geçmişte edinilen bu bilgilerin gerektiğinde tekrar hatırlanması olayı olarak tanımlanabilir (Ganong, 1995). Birlikte ele alınması gereken öğrenme ve hafızalama kavramları insanlık tarihinin en ilgi çekici konularının başında gelmektedir. Gelişmişlik düzeyi ne olursa olsun, tüm canlılar, edindikleri bir bilgiyi yaşamda avantaj haline dönüştürebilmek için gerektiğinde kullanıma hazır bir hafıza biçiminde saklamak zorundadırlar. Günümüze kadar bu konularla ilgili yapılan çalışmalarda konunun anlaşılması yönünde bir çok veri elde edilmesine karşın, ayrıntıları hala tam olarak açıklanamamıştır. Nöronal mekanizmaları kapsamlı bir biçimde açıklanamayan öğrenme ve hafızalama çalışmalarında ilgili işlemlerin oluşumu sırasında beyinde meydana gelen morfolojik, biyokimyasal ve elektrofizyolojik değişiklikler izlenerek bir çok hipotez ileri sürülmüştür (Patel ve ark., 1997, Raymond ve ark., 1996, Joder ve Kaneto, 1995, Rolls ve Treves, 1994, Wieraszko ve Ball, 1991, Alkon ve ark., 1991).

Bu tür deneysel çalışmalarda güvenilir sonuçlara ulaşmak için uygun bir model hayvan ve bunun eğitimi için uygun bir eğitim modeline duyulan gereksinimden başka, çalışmanın doğru ve etkin metotlarla değerlendirilmesi kaçınılmazdır. Bu güne kadar bir çok farklı tür ve bunların eğitimleri için çeşitli öğrenme modelleri ile değişik değerlendirme metotları öğrenme-hafızalama çalışmalarında uygulanmıştır (Healy ve Krebs, 1996, Clayton ve Cristol, 1996, Clayton, 1995a-b, Steele ve ark., 1995, Lowndes ve Stewart, 1994, Stewart ve ark., 1992, Cramer, 1988). İlgili çalışmaların stratejilerinde temelde uygulanan iki tip yaklaşım göze çarpmaktadır. Birincide; nöronal aktiviteyi etkilediği bilinen bir takım biyokimyasal araçların öğrenme öncesi veya sonrasında çeşitli ajanlarla bloklanması sonucunda hayvanlarda ortaya çıkan davranışların izlenmesidir (Morris ve ark., 1988). Örnek olarak; uzun süreli hafızanın oluşumunda etkili olduğu düşünülen protein sentezinin (Montarolo ve ark., 1986, Duffy

ve ark., 1981) bazı protein sentez inhibitörü maddelerle (Cycloheksimide, anisomiysin) bloklanmasının ardından hayvan davranışlarının izlenmesi (Ng ve Gibbs, 1991), model hayvanların eğitiminden önce bir takım amnezik ajanların (glutamat, oubain, emetin) hafıza işlemleriyle ilgili olduğu bilinen beyin bölgelerine enjeksiyonu sonucunda ortaya çıkan davranışların değerlendirilmesi çalışmaları (Serrano ve ark., 1992) veya öğrenmeyle ilgisi olduğu bilinen beyin bölgelerinde öğrenme öncesi ve sonrasında oluşturulan lezyonların (Sandi ve ark., 1992, McCabe, 1991) ilgili bölgenin kanlanmasıyla (Horner ve ark., 1995) ortaya çıkan davranışsal etkilerinin izlenmesi çalışmaları verilebilir.

İkinci yaklaşım ise, model hayvanın belirli bir bilgiyi öğrenmesine paralel olarak farklı beyin bölgelerinde ortaya çıkan biyokimyasal, elektrofizyolojik ve morfolojik değişikliklerin belirlenmesidir (Morris ve ark., 1988). Bu amaçla uzun süreli hafıza biçiminin ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülen glutamat reseptörleri yoğunluğu biyokimyasal (Wierasko ve Ball, 1993), öğrenmeye bağlı olarak değişen beyin dalgaları elektrofizyolojik (Wieraszko ve Ball, 1991) ve öğrenme işleminin ardından beynin ilgili bölgelerindeki sinapsların sayısal yoğunluk değişimleri göz önüne alınarak (Doubell ve Stewart, 1993, Stewart ve ark., 1992, Horn ve ark., 1985) morfolojik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Bilindiği gibi edinilen bilgilerin hatırlanma dereceleri de birbirlerinden oldukça farklıdır. Bellek türlerinin bazıları anlık, bazıları dakikalık dilimler halinde tutulurken, bir kısmı günler, aylar, hatta yıllarca hatırlanabilir bir biçimde saklanmaktadır. Başta belirtildiği gibi, bir bilginin avantaja dönüştürülmesi veya başka nesillere aktarılması için uzun süre saklanması gerekmektedir. Araştırmalar hemen hemen tüm beyin korteksi ile sayısız bağlantılara sahip olmasının yanında, limbik sistemin temel yapılarıyla olan iletişimi ve her türlü duyuşsal algının sonlandığı hippocampal formasyonun, uzun süreli hafızanın depolanabileceği en olası yer olduğuna işaret etmektedirler (Parra ve ark., 1998, McBain ve Maccaferri, 1997, Bernabeu ve ark., 1995, Calverley ve Jones, 1990, Cotman ve Nieto-Sampedro, 1984). Uzun süreli hafızayı, sinir sisteminin sürekli aktive olmasından çok, genel anestezi, hipoksi, iskemi veya başka bir nedenle beynin total olarak inaktive olduğu durumların ardından, şahsın önceden edindiği bilgilerin beynin tekrar aktif durumdayken hatırlayabilmesinden anlamaktayız. Bu bilgiden hareketle, bu tür bir hafızanın sinapslardaki kalıcı fiziksel

değişikliklerden kaynaklandığı söylenebilir (Ganong, 1995, Fazeli, 1992). *Sinaps düzeyinde, bu şekildeki dinamik değişikliklere sinaptik plastisite adı verilmektedir* (Hölscher, 1997, Jodar ve Kaneto, 1995, Ganong, 1995, Schuman ve Madison, 1994, Fazeli, 1992, Cragg, 1974). Canlılar iç veya dış uyaranların ancak küçük bir bölümüne ani cevaplar vermekte, geri kalanların büyük bir bölümünü ise motor aktivitenin gelecekteki kontrolü veya düşünme işlemlerinde kullanılmak üzere ilgili beyin bölgelerinde depo etmektedirler. Bellek denilen bilgilerin depo işleminin sinapsların bir fonksiyonu olduğu, belirli tipteki duyusal sinyalleri geçiren sinaps dizilerinin aynı sinyalleri bir sonraki seferde daha kolay biçimde iletme yeteneği kazanmalarına dayandırılarak savunulmaktadır (Ganong, 1995). Yaklaşık yüz yıl önce İspanyol nörolog Cajal öğrenme ve oluşum mekanizmalarıyla ilgili hipotezinde, öğrenmeye bağlı olarak serebral kortikal hücreler arasındaki bağlantıların sayılarındaki artışı açıklarken, dendrit ve aksonlardaki yeni filizlenmelerin bu olayın altındaki sebep olduğunu savunmuştur (Shepherd ve Erulkar, 1997, Calverley ve Jones, 1990). Sinir sistemi çevresel veya organizmanın kendi içindeki değişikliklere verdiği cevaplar açısından oldukça özel bir sistem olup, bu tür değişikliklere uygun cevapları vermede eşsiz bir plastisite yeteneğine sahiptir (Kalil, 1989, Cotman ve Nieto-Sampedro, 1984). Merkezi sinir sistemindeki bu dinamik yapılanmanın, mevcut nöronal bağlantıların değişik uyaranlarla stümüle edilmesiyle devreye giren bir takım hücre içi oluşumlarca gerçekleştirildiği düşünülmektedir (Hölscher, 1997, Schuman ve Madison, 1994, Rolls ve Treves, 1994, Fazeli, 1992). Canlının gelişimi esnasındaki rejenerasyon ve dejenerasyon olaylarında veya gelişim sonrasındaki yeni durumlara adaptasyon sürecinde merkezi sinir sisteminin hemostatik dengesinde aktif rol üstlendiği düşünülen sinaptik plastisite yaklaşımı yeni olmayıp, genç kedi ve köpeklerde omurilik kesilerini takiben ortaya çıkan dendritik ve aksonal filizlenmelerle gösterilmiştir (Jodar ve Kaneto, 1995, Calverley ve Jones, 1990, Gökhan ve Çavuşoğlu, 1989). Günümüze kadar morfolojik düzeydeki sinaptik plastisite ile ilgili deneysel çalışmalar iki ana koldan ilerlemiştir. Bunlardan ilki ve en yoğun araştırmalara sahne olanı, lezyonla uyarılan yenilenme çalışmaları, diğeri ise doğal biçimde ortaya çıkan şekillenmelerdir. Lezyonla uyarılan plastisite çalışmalarında kısmi denervasyonu takip eden süreçte geriye kalan sağlam sinirlerin ya yeni sinaps şekillendirilmesini gerçekleştirmesi veya restorasyon yoluyla aynı fonksiyonu görmesi anlamındadır (Shepherd ve Erulkar, 1997,

Cragg, 1974). Bu oluşumların, lezyon tarafındaki denervasyonla doğrudan etkilenme suretiyle değil de, merkezi sinir sisteminin komşu bölgelerinden gelen akışın kesilmesi ile tetiklendiği düşünülmektedir. Bu tip plastinasyonlar serebellum, hippokampus, hipotalamus, lateral vestibüler nükleus, beyin korteksi ve omurilikte gösterilmiştir (Sorra ve ark., 1998, Vincent, 1996). Bu oluşumun tersine, doğal olarak ortaya çıkan sinaptik plastisite hasara bağlı olmayan bir uyarıcı veya merkezi sinir sisteminin normal fizyolojik aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Bu oluşumu elektrofizyolojik veya hormonal bir takım iç veya dış değişiklikler tetikleyebilir. Normal olgun merkezi sinir sisteminde kendiliğinden oluşan sinaptik dönüşümün bir çok örneği bildirilmiştir (Kennedy, 1994). Bunlara her 10 - 20 günde yenilenen bulbus olfaktoriusun koku nöronları ve daha uzun bir periyotta yenilenen gyrus dentatus sinapsları örnek olarak verilebilir. Ayrıca gebelik ve laktasyon esnasında hipotalamusta sinapsların sayısı, morfolojisi veya her iki parametrede birlikte gözlenen değişiklikleri konu edinen çalışmalar da mevcuttur (Calverley ve Jones, 1990).

Beyindeki nöronlar arasında bağlantıların öğrenmeye bağlı olarak güçlü ve sürekli biçimde bozulup yeniden yapılandığı bilinmektedir. Kısa, bir biri ardına tekrarlayan (tetanik) presinaptik nöron aktivasyonuna karşı hızlı bir şekilde gelişme gösteren kalıcı değişiklikler olarak bilinen uzun süreli potansiyalizasyon (LTP) ve 20 mV'dan daha küçük afferent girişlerle, nöronların depolarize olmaları sonucu ortaya çıkan ve elektriksel akımın protein fosforilaz inhibitörlerince uzun ve kalıcı biçimde kesilmesini ifade eden uzun süreli depresyon (LTD)'un sebep olduğu spesifik değişikliklerin öğrenme ve belleğin bir şeklini temsil ettiği düşünülmektedir. Sinir sisteminin bir çok farklı bölgesinde gerçekleştiği bilinen plastisitenin en yoğun olarak hippokampusta incelendiğini söyleyebiliriz. Yapılan çalışmalarla nöronal devrenin aktivasyonu şeklinde ifade edilen ilk basamak, öğrenmenin değişik şekilleri tarafından harekete geçirilmektedir. Nöronal devrenin aktivasyonundan sonra ikinci adım olarak nöronal sinyallerin başlaması aşaması devreye girmekte ve bu evrede sinaptik terminallerden salınan aracı maddelerin nöronlar ile onları birbirine bağlayan bölgelerin kullanımı için esas teşkil etmektedir. Aracı maddelerin salınımı esas bir faktör olup, öğrenmenin bir çok biçiminde ortaya çıkan nöronal plastisite değişikliklerine sebep olan biyokimyasal ve moleküler olaylar bu yolla tetiklenmektedir. Bu aşamadan sonra, örneğin hippokampusta presinaptik terminallerden salınan glutamat AMPA ve kainat,

reseptörleri aracılığıyla postsinaptik zarın depolarizasyonuna sebep olmaktadır. Bu olay NMDA reseptörlerinin Mg^{+} bloğunu çözerek, Ca^{+} ve Na^{+} ile birlikte Mg^{+} 'un girişini sağlar. Bunu izleyen olaylar tam olarak anlaşılmasına rağmen Ca^{+} , hem Ca^{+} /kalmodulin kinaz II, hem de protein kinaz C yoluyla etki ederek hücre içi bazı proteinlerin fosforilasyonuna neden olur. Böylece presinaptik terminallerin stimülasyonuna bağlı olarak daha büyük eksitator postsinaptik potansiyellerin (EPSP) oluşumuna neden olur. LTP oluşumunda her ne kadar presinaptik nöron aktifse de, olayların gelişiminde post sinaptik nöronunda araşidonik asit veya nitrik oksit serbestleştirerek presinaptik nöronun daha da aktifleşmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Gelişmenin son aşamasında ise önce gen regülasyonunun sebep olduğu yeni proteinlerin sentezi ve nöronlarda büyüme veya bir başka ifadeyle kalıcı değişimler ortaya çıkmaktadır (Ganong, 1995, Jodar ve Kaneto, 1995, Freeman, 1994, Fazeli, 1992).

Biyolojik araştırmaların amacı olayların mekanizmalarını çözmek ve elde edilen bilgileri yaşamı kolaylaştırmak için kullanmaktır. Bu yaklaşımla, canlıdaki bir yapının fonksiyonunun anlaşılması için, yapıda olaylanan, moleküler, biyokimyasal ve genetik bilinmezlerin aydınlatılması yanında, toplam sayı, sayısal yoğunluk, hacim, uzunluk, çap ve yüzey alanı gibi morfolojik parametrelerin de gerçeğe uygun şekilde belirlenmesi gerekmektedir (Gundersen, 1986). Buraya kadar anlatılan yaklaşımlardan hareketle çalışmamızda sıfır günlük civcivlere uygulanan bir öğrenme modeli (PSÖ) sonrasında edinilen bilgilerin depolandığı yerlerden biri olarak düşünülen dorsolateral hipokampus bölgesinde sinaps düzeyinde ortaya çıkabilecek morfolojik değişiklikleri tarafsız ve etkin bir yaklaşım olduğu bilinen disektör sayım metodunu (Sterio, 1984) kullanarak değerlendirdik.

Biyolojik objeler gerçekte üç boyutlu ortamlarda bulunurlar. Eğer böyle bir yapı gözle görülebilecek büyüklükte ise yapı ile ilgili herhangi bir boyutsal yanılma söz konusu olamaz. Konularımız gereği çoğu zaman görme sınırlarımız dahilinde olmayan yapılarla uğraştığımızdan optik bir takım araçlara gereksinim duyarız. Optik cihazların kullanılmasını gerektiren durumlarda ise bir seri ön hazırlıkların yapılması kaçınılmazdır. Önce incelenmek istenen yapı alınır, uygun histolojik işlemlerden geçirilir ve histolojik kesitler haline getirilir. Bu aşamadan itibaren obje her ne şekilde incelenirse incelensin, artık üç boyutlu objeden elde edilen iki boyutlu kesit düzlemleri

söz konusudur (Royet, 1991). Bu nedenle incelenen histolojik kesitler, yapıların kaybolan derinlik boyutuyla ilgili araştırmacıya doğrudan bir fikir veremezler. Histolojik çalışmaların başlangıcından yakın zamana kadar, kullanılan yöntemlerle doğrudan incelenemeyen veya kesit düzlemlerinde kaybolan derinlik bilgisi, ya yokmuş gibi kabul edilmiş veya bir takım yetersiz düzeltme faktörlerinin (Abercrombie, 1946) kullanılması ile telafi edilmeye çalışılmıştır (Haug, 1986).

Partikül sayısı ilgilenilen yapının içerdiği özelliklerden birisi olduğu halde “sayı” kavramının kendisinin boyutu yoktur, yani sıfır boyutludur. Çünkü her hangi bir objenin sayısı söz konusu olduğunda objenin sahip olduğu boyutsal özellikleriyle ilgilenilmeksizin, değeri “bir” olarak ifade edilir. *Yeni stereolojik yaklaşımların bu konuda ileri sürdüğü prensibe göre, incelenen parametrenin gerçekte sahip olduğu boyut ile yapıyı sorgulamada kullanılan sonda boyutu toplamının üç olması gerekmektedir.* Böylece sayı gibi sıfır boyutlu bir parametrenin iki boyutlu kesit düzlemlerinde, değil de üç boyutlu bir sorgulama metoduyla doğru olarak değerlendirilebileceği ifade edilmektedir (Howard ve Reed, 1998).

Bir doku elamanının kesitlerde ortaya çıkan izdüşüm sayılarının, ilgili yapı içindeki partiküllerin ebatlarına (Coggeshal, 1992), yapıdaki yerleşim ve yönelimine, kesitlerin alınış yönü ve kesitlerin kalınlıklarına göre (Gray, 1996), değişebileceği açıkça gösterilmiştir (Mayhew ve Gundersen, 1996). Bu nedenle, bu gibi özelliklerden etkilenen izdüşüm sayılarından yola çıkılarak, partikül sayılarıyla ilgili doğrudan veya dolaylı yorum yapan eski sayım metotlarının sonuçlarına kuşkuyla bakılması gerekir.

1984 yılında Sterio tarafından, geliştirilmiş bir biçimde yeniden tarif edilen fiziksel disektör metodu, sayı parametresinin doğru bir şekilde belirlenebilmesinde bu gün için en geçerli yaklaşım olduğundan, çalışmamızda sinapsların sayısal yoğunluklarının saptanması için tercih edilmiştir. Bu yaklaşım, iki boyutlu iki ardışık kesit görüntüsünün birlikte değerlendirilmesiyle yapıların üçüncü boyutunu da dikkate alarak, sayım yapılacak partiküllerin büyüklüğü, kesitlerin alınış yönü ve doku içindeki yerleşim biçiminden etkilenmeksizin, sayı parametresinin tarafsız ve etkin bir biçimde hesaplanmasını sağlamaktadır (Sterio, 1984).

Yukarıda anlatılanlara ilave olarak belirtilmesi gereken diğer önemli bir sorun, partikül sayımı yapılırken, sayım alanının içerdiği tüm izdüşümlerin sayılamayacağı

görüntü alanlarında veya sınırlı alanlarda sayım yapmak gibi ihtiyaçların ortaya çıktığı durumlarda bunun hangi kriterlere göre yapılması gerektiğidir. Bu amaca yönelik olarak değişik bir çok tip sayım çerçevesi ve bunlarla ilişkili farklı sayım kuralları belirlenmiştir. Her ne şekilde bir çerçeve kullanılırsa kullanılsın sayım alanının ortasına düşen partikül izdüşümlerin sayılmasıyla ilgili her hangi bir tartışma olmamasına karşın, kullanılan çerçevelerin sınır ve/veya köşeleriyle kesişen izdüşümlerin hangi kurallara göre sayılacağı konusunda tartışmalar süre gelmektedir. Bu durum literatürlerde “kenar etkisi” adıyla geçmektedir (Gundersen, 1977). Böyle bir sınırlamaya gereksinim duyulduğu durumlarda sayım için öyle kriterler belirlenmelidir ki, her partikül yalnızca bir defa sayılma şansına sahip olsun. Kenar etkisi olarak adlandırılan bu problemin üstesinden gelmenin bilinen en etkili yolu, bizim de bu çalışmada kullandığımız, geometrik olarak doğru bir örnekleme sağladığı kanıtlanmış olan tarafsız sayım çerçevesinin kullanılmasıdır (Gundersen, 1977).

PSÖ uygulanan sıfır günlük civcivlerle, bunların kontrol gruplarında, edinilen bilgilerin uzun süreli olarak depolandığı düşünülen hippokampusta (özellikle dorsolateral bölgesinde) sinaps tipleri ve bunların sayısal yoğunluk değişimleri göz önüne alınarak (Curtis ve ark., 1989, Horn ve ark., 1985) fiziksel disektör metoduyla araştırıldı. Eğitimin etkisiyle değişmesi beklenen parametrelerin cinsiyete, hemisferlere ve zamana göre nasıl bir seyir izlediğini araştırıldı. Yukarıda belirtilen kriterler göz önüne alınarak yapılan çalışmamızın sonuçları;

- I. Grupların tümünde anlamlı değişimin (sinapsların sayısal yoğunlukları) eğitimlilerin lehine olduğu (Şekil 46, 47, Tablo 12, 13),
- II. Zamanın ilerlemesine paralel olarak, yalnızca eğitilmiş grupların sayısal yoğunluk değerlerinde anlamlı değişimin olduğu (Şekil 44, 45, Tablo 10, 11),
- III. Anlamlı bir lateralizasyonun yalnızca kontrol gruplarında ortaya çıktığı (Şekil 49, 50, Tablo 15) ve
- IV. Cinsiyetler arasında genel olarak kayda değer bir farklılığın olmadığı (Şekil 44, 45, 46, 47, Tablo 16) şeklinde özetlenebilir.

Günümüze kadar öğrenme ve edinilen bilgilerin depolanması ile ilgili bir çok hayvan türünde ve değişik değerlendirme metotlarıyla çalışmalar yapılmış olmasına karşın, dorsolateral hippokampustan elde edilen sonuçlarımızı doğrudan karşılaştıracığımız bir çalışmaya, kaynak taramalarımızda rastlanamamıştır. Bu nedenle

bulgularımız aynı amaca yönelik farklı bölgelerdeki çalışmalarla karşılaştırılarak yorumlanacaktır.

Tüm gruplarda PSÖ eğitiminin etkisiyle sinapsların sayısal yoğunluklarındaki artışına istatistiksel olarak anlamlı derecede, shaft tipteki sinapsların katkı sağladığı saptandı. Bu değerlendirmede dikkati çeken diğer bir özellik ise, eğitimin etkisiyle beraber ortaya çıkan bu farklılıkların 24 saatliklere (eğitimden 24 saat sonra hayatlarına son verilenler ve bunların kontrolleri) oranla 48 saatliklerde (eğitimden 48 saat sonra hayatlarına son verilenler ve bunların kontrolleri) daha da belirgin hale gelmesiydi. Bulgularımız, öğrenmenin etkisiyle civciv beyninin değişik bölgelerinde sinapsların sayı ve/veya sayısal yoğunluklarında ortaya çıkan artışları gösteren çalışmaların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (Doubell ve Stewart, 1993, Hunter ve Stewart, 1993, Stewart ve Lowdnes, 1993, Stewart ve ark., 1992, Horn ve ark., 1985).

Öğrenmenin etkisiyle hippokampus bölgesinde meydana gelen morfolojik değişiklikler, hippokampusun öğrenme ve hafızalamada etkili roller üstlendiğini düşündürmektedir. Horner ve arkadaşlarının (1995) sıfır günlük civcivlerde internal karotis arterin geçici bir süre kapatılmasıyla oluşturdukları iskemi sonucunda sol ve sağ hippokampus bölgelerindeki sinapsların sayısal yoğunluklarının iskemik gruplarda, kontrollerine göre % 27 oranında azalması (stereolojik metotlarla değerlendirilmiştir) yanında, yapılan iskeminin spesifik sinaps tipleri üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir.

Belirtilen çalışma sonuçları, hafıza oluşumunda sinapsların etkili olması gerçeğine ilaveten, yaptığımız çalışmada öğrenmeye koşut olarak artan sinaps sayısal yoğunluğunun spesifik bir sinaps tipinde yoğunlaştığı (Horner ve ark., 1995) bulgusuyla da uyumludur. Göç etme (Healy ve Krebs, 1996), yumurtalarını başka kuşların yuvalarına bırakma (Reboreda ve ark 1996) veya yiyecek depolama (Healy ve Krebs, 1993) gibi karmaşık fonksiyonları yürüten kuş türlerinin böyle bir davranış göstermeyen veya bu yetenekleri deneysel olarak kısıtlanmış türlere oranla, belirtilen işlemlerin öğrenilmesi tecrübesine paralel olarak, hippokampus hacminin artması yanında, bunların ilgili bölgesinde nöronların sayısal yoğunluk ve toplam değerlerinin artması da öğrenme ve hafızalamada bu bölgenin aktif roller üstlendiğini stereolojik olmayan çalışmalar göstermektedir.

Zamanın değişmesine bağlı olarak sinapsların sayısal yoğunluğunda ne tür bir değişimin olduğunu gösterebilmek için PSÖ eğitiminden 24 veya 48 saat sonra perfüze ettiğimiz hayvanları kontrolleriyle karşılaştırdığımızda, kontrol grupları arasında (24 ve 48 saatlik kontrol grupları) anlamlı bir farklılık gözlenmezken, eğitimli grupların tümünde verilerin 48 saatliklerin lehine artış gösterdiği saptandı. Kontrol gruplarında gözlenmeyip, eğitimli gruplarda zamanın ilerlemesine bağlı olarak ortaya çıkan bu durum, yeni sinaps oluşumu için tetikleyici (eğitim gibi) bir mekanizmaya ihtiyaç olduğu görüşünü savunanların sonuçlarıyla uyumludur (Halasy ve ark., 1996, Jodar ve Kaneto, 1995, Calverley ve Jones, 1990, Cotman ve Nieto-Sampedro, 1984).

Normal sinaptik plastisiteye organizmanın iç veya dışındaki bir takım noninvaziv uyarıların sebep olmasının yanında, öğrenme ve hafızalama işleminin de süreci başlattığı bildirilmektedir. Bunlara ilave olarak sonuçlarımız, öğrenme ve hafızalama çalışmalarında ilgili beyin bölgelerinde zamana bağlı olarak artan veya azalan yeni sinaps oluşumlarını gösteren çalışma sonuçlarıyla da (Bradley ve ark., 1994, Stewart ve ark., 1992, Lowndes ve Stewart, 1994, McCabe, 1991) uyumludur.

Öğrenmeye bağlı olarak beyinde her hangi bir lateralizasyonun olup olmadığını araştırdığımızda, kontrol gruplarında ortalama toplam sinapsların (spin + shaft) sayısal yoğunluk verileri sol tarafın lehine oluşmasına karşın, eğitimli grupların sağ ve sol tarafları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. Yukarıdaki bulgularımız, kontrol gruplarında kuluçka sonrası sol tarafın lehine bir asimetrinin var olduğu ve öğrenmenin her hangi bir asimetri ile sonuçlanmadığını ifade etse bile, bu değerlendirme gerçeğin tam ifadesi olmayacak ve bir açıklama getirmemiz yararlı olacaktır. Kontrol 24 ve 48 saatlikleri içeren grupların sol taraflarının lehine gözlenen sayısal yoğunluk verilerindeki asimetri, aynı özelliğe sahip eğitimli grupların sağ taraflarındaki sinapsların sol taraflardakine oranla daha hızlı bir biçimde artmasıyla, iki taraf arasında var olan fark ortadan kaldırılmaktadır. Eğitimli grupların sağ ve sol hippokampus bölgelerindeki sinapsların sayısal yoğunlukları arasında bir fark gözlenmiyor olsa da, eğitimle birlikte sağ tarafın sol tarafa oranla daha aktif olduğunu görmekteyiz. Bu açıklamalar, PSÖ işleminde sağ hemisferin sol hemisfere oranla daha aktif olduğunu göstermektedir. Lateralizasyonla ilgili olarak elde ettiğimiz bu sonuçlar model hayvan olarak civcivleri kullanan araştırmacıların öğrenmeyle ilgili olduğu düşünölen hippokampus ve diğer beyin bölgelerinde yaptıkları çalışmaların sonuçlarıyla

da benzerlik göstermekteydi. Buna göre, bir öğrenme modeli uygulamasının ardından civciv IMHV (Doubel ve Stewart, 1993, Stewart ve Lowdnes, 1992, Horn ve ark, 1985) ve LPO (Stewart ve ark., 1992, Hunter ve Stewart, 1992) bölgelerinde sinaps sayı ve sayısal yoğunluklarını izleyerek, öğrenmenin etkisini araştıran çalışmalarda, belli zaman dilimlerinde ilgili bölgenin (sağ veya sol hemisfer) diğerine oranla öğrenme ve hafızalamada daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Bunlara ilave olarak Sandi ve ark., (1992)'nın civciv hippocampusunda, öğrenme modelini takiben yaptıkları lezyon uygulamalarının ardından ulaştıkları sonuçlar çalışmamızın ve yukarıda belirtilen araştırmacıların bulgularıyla birlikte, beyinde öğrenmeye bağlı bir asimetrinin varlığını belirlemesi açısından benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmayla ilgili olarak şimdiye kadar anlatılanlara ilave olarak incelediğimiz bölgedeki sinapsların ortalama yükseklik veya çaplarını da bulduğumuzu söylemekle beraber elde edilen verilerin hem grup içi karşılaştırmalarının anlamlı olmaması, hem de elde edilen verilerin bu tür yeni sinaps oluşumlarının daha önceden var olan sinapsların bölünmesiyle gerçekleştiği görüşünü savunan (Bradley ve ark., 1994, Horn ve ark., 1985, Horner ve ark., 1995, Lowndes ve Stewart, 1994) çalışmaların sonuçlarıyla uyuşmadığını görmekteyiz.

Sonuç olarak bulgularımız, *dorsolateral hippocampus bölgesinin uzun süreli hafıza merkezi veya bu fonksiyonu gerçekleştiren beyin bölgelerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.*

6. KAYNAKLAR

- Abercrombie, M., (1946). Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Record*, **94**; 239-247.
- Alkon, D. L., Amaral, D. G., Bear, M. F., (1991). Learning and memory. *Brain Research Reviews*, **16**; 193-220.
- Amaral, D. G., (1993). Emerging principles of hippocampal organisation. *Current Opinion In Neurobiology*, **3**; 225-229
- Andrew, R. J., (1991). The chick in experiment: techniques and test. In: *Neural and Behavioural Plasticity*. Ed: Andrew, R. J., Oxford University Press, Sayfa: 1-5
- Ashton, D., Van Reempts, J. ve Haseldonckx, M., (1989). Dorsal ventral gradient in the vulnerability of cal hippocampus to ischaemia: a combined histological and electrophysiological study. *Brain Research*, **487**; 368-372
- Basil, J. A., Kamil, A. C., Balda, R. P., Fite, K. V., (1996). Differences in hippocampal volume among food storing corvids. *Brain Behaviour and Evolution*, **47**; 156-164
- Bernabeu, R., Levi de Stein, M., Fin, C., (1995). Role of hippocampal no in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. *NeuroReport*, **6**; 1498-1500.
- Bingham, V. P., Loale, P., Casini, G. ve Bagnoli, (1985). Dorsomedial forebrain ablation and home lost association behaviour in homing pigeon. *Brain Behaviour And Evolution*, **26**; 1-9.
- Bradley, P. M., Burns, B. D., Kaplan, S., Webb, A., C., (1994). Effects of light hatching on synapse number and size in the intermediate and medial part of the hyperstriatum ventrale of the domestic chick. *Developmental Brain Research*, **80**; 295-298.
- Bradley, P., Davies, D. C., Horn, G., (1985). Connections of the hiperstriatum ventrale of the domestic chick. *Journal Of Anatomy*, **140**; 577-589.
- Calverley, R. K. S. ve Jones, D. G., (1990). Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Research Reviews*, **15**; 215-249.
- Casini, G., Bingham, V. P., Bagnoli, P., (1986). Connections of The Pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and H-proline. *Journal Of Comparative Neurology*, **245**; 454-470
- Chronister, R. B., ve Hardy, S. G. P., (1997). The Limbik System. In: *Fundamental Neuroscience*, Ed: Haines, D. E., **First Edition**, Chuchill Livingstone Inc., Sayfa: 443-455.

- Clayton, N. S. (1995a). The Neurological development of food-storing memory: a case of use it or lose it. *Behavioural Brain Research*, **70**; 95-102
- Clayton, N. S. (1995b). Development of memory and hippocampus: comparison of food-storing and nonstoring birds on a one trial associative memory task. *Journal Of Neuroscience*, **15** (4); 2796-2807.
- Clayton, N. S., Cristol, D. A., (1996). Effects of photoperiod on memory and food storing in captive marsh tits, *Parus Palustis*. *Animal Behaviour*, **52**; 715-726.
- Coggeshall, R. E., (1992). A Consideration of neural counting methods. *Trends In Neurosciences*, **15** (1); 9-13.
- Cotman, W. C. ve Nieto-Sampedro, M., (1984). Cell biology of synaptic plasticity. *Science*, **225**; 1287-1295.
- Cragg, B. G., (1974). Plastisty of synapses. *British Medical Bulletin*, **30**(2); 141-144.
- Cramer, C. P., (1988). Experience during suckling increases weight and volume of rat hippocampus. *Developmental Brain Research*, **42**; 151-155.
- Csillag, A., Szekely, A. D. ve Davies, D. C., (1994). The Termination pattern of hiperstriatum ventrale efferents in the domestic chick archistriatum: a anterograd tracing study combined with calbindin. *Journal of Comparative Neurology*, **348**; 394-402
- Curtis, E. M., Stewart, M. G., (1989). Quantitation of synaptic, neuronal and glial development in the intermdiate and medial hiperstriatum ventrale of the chick, pre-and post-hatch. *Developmental Brain Research*. **48**; 105-118.
- Davey, J. E., McCabe, B. J. ve Horn, G., (1987). Mechanisms of information storage after imprinting in the domestic chick. *Behavioural Brain Research*, **26**; 209-215
- Doubell, T. P., Stewart, M. G., (1993). Short-Term changes in the numerical density of synapses in the intermediate and medial hiperstriatum ventrale following one-trial passive avoidance training in the chick. *Journal of Neuroscience*, **13** (5); 2230-2236
- Dubbeldam, J. L., (1991). The Avian And Mammalian Forebrain Correspondences And Differences. In: *Neuronal and Behavioural Plasticity*. Ed: Andrew, R.J, Oxford University Press, New York, Sayfa: 67-91.
- Duffy, C., Teyler, T. J., Shashoua, V. E., (1981). Long-term potantiation in the hippokamous slice: evidence for stimulated secretion of newly synthesised proteins. *Science*, **212**, 1148-1151.

- Erichsen, J. T., Bingham, V. P. ve Krebs, J. R., (1991). The Distribution of neuropeptides in the dorsomedial forebrain of the pigeon (*Columba Liva*). *Journal Of Comparative Neurology*, **314**; 478-492.
- Fazeli M. S., (1992). Synaptic plasticity on the trail of the retrograde messenger. *Trends In Neurosciences*, **15**; (4), 115-117.
- Freeman, W. J., (1994). Role of Chaotic Dynamics in Neural Plasticity in: *Progress In Brain Research*, **Vol, 102**. Ed: Pelt, J., Corner, M. A., Uylings, H. B. M.; Lopez da Silva, F. H., 1994, Elsevier Science B. V., Sayfa, 319-333.
- Gamlin, P. D. R. ve Cohen, D. H., (1986). A Second ascending visual pathway from the optic tectum to the telencephalon in the pigeon. *Journal Of Comparative Neurology*, **250**; 296-310.
- Ganong, F. G., (1995). "Higher Functions of The Nervous System": Conditioned Reflexes, Learning in: *Review of Medical Physiology*. Ed: Ganong, F. G, A Siman & Schuster Company, USA, Sayfa: 243-255.
- Ganong, F. G., (1995). Synaptic & Junctional Transmission in: *Review of Medical Physiology*. Ed: Ganong, F. G, A Siman & Schuster Company, USA, Sayfa: 75-143.
- Geinisman, Y., Gundersen, H. J. G., West, M. J., (1996). Unbiased. stereological estimation of the total number of synapses in a brain region. *Journal Of Neurocytology*, **25**; 805-819.
- Gökhan, N. ve Çavuşoğlu, H., (1989). Serebral Korteks ve Beyin Entelektüel Fonksiyonları, *Tıbbi Fizyoloji (Çeviri)'de*, **3. Baskı**, Nobel Yayınevi, İstanbul, 935-952.
- Gray, T., (1996). Quantitation in Histopathology in: *Theory and Practice of Histological Techniques*, Ed: Bancroft, J. D., Stevens, A., **First Published**, Pearson Professional Limited, Churchill Livingstone, Sayfa: 641-673.
- Gundersen, H. J. G., (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: the edge effect. *Journal Of Microscopy*, **111**; 219-223.
- Gundersen, H. J. G., (1986) Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R. Thompson. *Journal Of Microscopy*, **143**; 3-45
- Gundersen, H. J. G., (1992). Stereology: the fast lane between neuroanatomy and brain function or still only a tightrope ? *Acta Neurologica Scandinavica*, **137**; 8-13.
- Gundersen, H. J. G., Jensen, E. B., (1987). The Efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal Of Microscopy*, **147 (3)**; 229-263.

- Güntürkün, O. ve Karten, H. J., (1991). An immunocytochemical analysis of the lateral geniculate complex in the pigeon (*Columbia Livia*). *Journal of Comparative Neurology*, **314**; 721-749
- Halasy, K., Lörinczi, Z., (1996). Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus*, **6**; 306-329.
- Haug, H., (1986). History of neuromorphometry. *Journal Neuroscience Methods*, **18**; 1-17.
- Healy, S. D., Gwinner, E. ve Krebs, J. R., (1996). Hippocampal volume in migratory and non-migratory warblers: effect of age and experience. *Behavioural Brain Research*, **81**; 61-68.
- Healy, S. D., Krebs, J. R., (1993). Development of hippocampal specialisation in a food storing bird. *Behavioural Brain Research*, **53**; 127-131.
- Healy, S. D., Krebs, J. R., (1996). Food storing and the hippocampus in paridae. *Brain Behaviour And Evolution*, **47**; 195-199.
- Healy, S. D., Suhonen, J., (1995). Memory for locations of stored food in Willow Tits and Marsh Tits. *Behaviour*, **133**; 71-80.
- Horn, G., (1981). Neural mechanisms of learning: an analysis of imprinting in the domestic chick. *Proc. R. Soc. Lond*, **213**; 101-137
- Horn, G., (1991). Learning, memory and the brain. *Indian Journal Of Physiology And Pharmacology*, **35**; 3-9
- Horn, G., Bradley, P., McCabe, J., (1985). Changes in the structure of synapses associated with learning. *The Journal Of Neuroscience*, **15 (12)**; 3161-3168.
- Horner, C. H., Davies, H. A., Brown, J., Stewart, M. G., (1995). Reduction in numerical synapse density in chick (*Gallus Domesticus*) dorsal hippocampus following transient cerebral ischemia. *Brain Research*, **703**; 245-250
- Howard, C.V., Reed, M. G., (1998) *Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy*. Bios Scientific Publishers, U.K.
- Hölscher, C., (1997). Nitric oxide the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends In Neuroscience*, **20**; 298-303.
- Hunter, A., ve Stewart, M. G., (1993). Long-Term increases in the numerical density of synapses in the chick lobus parolfactorius after passive avoidance training. *Brain Research*, **605**; 251-255.

- Jodar, L. ve Kaneto, H., (1995). Synaptic plasticity: staitway to memeory. *Japanese Journal Of Pharmacology*, **68**; 359-387.
- Kalil, R. E., (1989). Synapse formation in the developing brain. *Scientific American*, , **261**;(6), 39-45.
- Kato, H., Kogure, K. ve Nakato, S., (1989). Neural damage following repeated brief ischaemia in the gerbil. *Brain Research*, **479**; 366-370
- Kennedy, M. B., (1994). The biochemistry of synaptic regulation in the central nervous system. *Annual Review Of Biochemistry*, **63**; 571-600.
- Kirino, T., (1982). Delayed neural death in the gerbil hippocampus following ischaemia. *Brain Research*, **239**; 57-69
- Konsut, M ve Rose, S. P. R., (1984). 2 Deoxyglukose uptake into chick brain structures during passive avoidance learning. *Neuroscience*, **12**; 971-974.
- Krebs, J. R., Ericson, J. T. ve Bingham, V. P., (1991). The Distribution of neurotransmitters and neurotransmitter related enzymes in the dorsomedial telencephalon of pigeons (Columba Liva). *The Journal Of Comparative Neurology*, **314**; 467-477.
- Krebs, J. R., Sherry, D. F., Healy, S. D., Perry, V. H., Vaccarino, A. L., (1989). Hippocampal specialisation of food-storing birds. *Proceedings National Academy Of Sciences Of USA*, **86**; 1388-1392.
- Kuenzel, W. J., Masson, M., (1988). *A Stereotaxic Atlas of The Brain of The Chick (Gallus Domesticus)*. **The Johns Hopkins University Press**, Baltimore- London
- Lawdnes, M., Stewart, M.G., (1994). Dendritic spine density in the lobus parolfactorius in the domestic chick is increased 24 h after one- trial passive avoidance training. *Brain Research*, **654**; 129-136.
- Lowndes, M. ve Stewart, M. G., (1994). Dendritic spine density in the lobus parolfactorius of the domestic chick is increased 24 h after one-trial passive avoidance training. *Brain Research*, **654**; 129-136.
- Mayhew, T. M., (1979). Stereological approach to the study of synapse morphology with particular regard to estimating number in a volume and on a surface. *Journal Of Neurocytology*, **8**; 121-138.
- Mayhew, T. M., (1991). Review Article: The New stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Experimental Physiology*, **76**; 639-665

- Mayhew, T. M., Gundersen, H. J. G., (1996). If you assume, you can make an ass out of you and me: a decade of the disector for stereological counting of particles in 3d space. *Journal Of Anatomy*, **188**;1-15.
- McBain, C. J., ve Maccferri, G., (1997). Synaptic plasticity in hippocampal interneurons? *Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology*, **75**; 488-494.
- McCabe, (1991). Hemispheric asymmetry of learning-induced changes, In: *Neuronal and Behavioural Plasticity*. Ed: Andrew, R.J, Oxford University Press, Newyork, 262-277.
- Micheli, D., Reperant, J., (1987). Extratelencephalic projection of the avian visual wulst: a quantitative autoradiographic study in the pigeon (Columbia Livia). *Journal Of Hirnforsch*, **28**; 45-57
- Mishkin, M. ve Appenzeller, T., (1987). The Anatomy of memory, *Scientific American*, **256 (6)**; 62-71.
- Molla, R., Rodriguez, J., Calvet, S., Garcia-Verdugo, J. M., (1986). Neuronal types of the cerebral cortex of the adult chicken (Gallus Domesticus): a golgi study. *Journal Of Hirnforsch*, **27 (4)**;381-390.
- Montagnese, C. M., Geneser, F. A. ve Krebs, J. R., (1993a). Histochemical distribution zinc in the brain of the zebra finch. *Anatomy And Embryology*, **188**; 173-187
- Montagnese, C. M., Krebs, J. R., Meyer, G. (1996) The Dorsomedial and dorsolateral forebrain of the zebra finch (Taeniopygia Guttata): a golgi study. *Cell And Tissue Research*, **283**; 263-282
- Montagnese, C. M., Krebs, J. R., Szekely, A. D., Csillag, A., (1993). A subpopulation of large calbindin-like immunopositive neurones is present in the hippocampal formation in food-storing but not in non-storing species of bird. *Brain Research*, **614**; 291-300.
- Montarolo, P. G., Goelet, P., Castellucci, V. F., (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long- term heterosynaptic fasilitation in aplysia. *Science*, **234**; 1249-1254.
- Morris, R. G. M., Kandel, E. R., Squine, L. R., (1988). The Neuroscience learning and memory: cells, neuronal circuits and behaviour. *Trends In Neuroscience*, **11**; 125-127.
- Ng, K. T. ve Gibbs, M. E., (1991). Stages in Memory Formation: A Rewiev. In: *Neuronal and Behavioural Plasticity*, Ed: Andrew, R.J, Oxford University Press, Newyork, 351-370.

- Nitatori, T., Sato, N. ve Wagusi, S., (1995). Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischaemia is apoptosis. *Journal Of Neuroscience*, **15**; 1001-1011
- Nolte, J., (1993). Olfactory and Limbic Systems, In: *The Human Brain*, Ed: Nolte, J., **Third Edition**, A Mosby İmprint of Mosby-Year Book Inc, St. Louis, Missouri, Sayfa, 391-410. .
- Noyan, A., (1993). Sinir Sistemi. Yaşamda ve *Hekimlikte Fizyoloji'de*, **8. Baskı**; Meteksan A.Ş., 197-378
- Oorschot, D. E., (1994). Are you using neuronal densities, synaptic densities or neurochemical densities as your definitive data? there is a better way to go. *Progress In Neurobiology*, **44**; 233-274.
- Parra, P., Gulyas, A. I., Miles, R., (1998). How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus. *Neuron*, **20**; 983-993.
- Patel, S. N., Clayton, N. S., Krebs, J. R., (1997). Spatial learning induces neurogenesis in the avian brain. *Behavioural Brain Research*, **89**; 115-128.
- Raymond, J. L., Lisberger, S. G., Mauk, M. D., (1996). The Cerebellum: a neuronal learning machine? *Science*, **272**; 1126-1131.
- Reboreda, J. C., Clayton, N. S., Kacelnik, A., (1996). Species and sex differences in hippocampus size in parasitic and non-parasitic cowbirds. *Neuroreport*, **7**; 505-508.
- Rehkamper, C. ve Ziller, K., (1985). A quantitative approach to cytoarchitectons the areal pattern of neostriatum in the domestic pigeon. *Anatomy and Embryology*, **171**; 345-355.
- Rehkamper, G., Frahm, H. D., Zilles, K., (1991). Quantitative development of brain and brain structure in birds (Galliformes and Passeriformes) compared to that in mammals (Insectivores and Orimates). *Brain Behavior And Evolution*, **37**; 125-143
- Rolls, E. ve Treves A., (1994). Neural Networks in The Brain Involved in Memory and Recal in: *Progress In Brain Research*, **Vol, 102**. Ed: Pelt, J., Corner, M. A., Uylings, H. B. M.; Lopez da Silva, F. H. 1994, Elsevier Science B. V., Sayfa, 335-341.
- Rose, S. P. R., (1989). Glycoprotein synthesis and postsynaptic remodelling in long term memory. *Neurochemistry International*, **14**; 299-307
- Rose, S. P. R., ve Csillag, A., (1985). A passive avoidance traing results in lasting changes in deoxyglukose metobolizm in left hemisphere region of chick Brain. *Neural Biol.*, **44**; 315-324.

- Royet, J. P., (1991). Stereology: A Method for analysing images. *Progress In Neurobiology*, **37**; 433-474.
- Sandi, C., Rose, S. P. R., Patterson, T. A., (1992). Unilateral hippocampal lesions prevent recall of a passive avoidance task in day-old chicks. *Neuroscience Letters*, **141**; 255-258.
- Schmidt-Kastner, R. ve Freund, T. F., (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischaemia. *Neuroscience*, **40**; 599-606.
- Schuman, E. M. ve Madison D. V., (1994). Nitric oxide and synaptic function. *Annual Review Of Neuroscience*, **17**; 153-183.
- Serrano, P. A., Ramus, S. J., Bennet, E. L., (1992). Comparative study of roles of the lobus parolfactorius and intermediate medial hyperstriatum ventrale in memory formation in the chick brain. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, **41**; 761-766.
- Shepherd, G. M., Erulkar, S. D., (1997). Centenary of the synapse from sherrington to the molecular biology of the synapse and beyond. *Trends In Neuroscience*, **20**; 385-392.
- Sorra, K. E., Fiala, J. C., Harris, K. M., (1998). Critical assessment of the involvement of perforation, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation. *The Journal of Comparative Neurology*, **398**; 225-240.
- Steele, R.J., Stewart, M.G., (1995). Increases NMDA receptor binding specially related to memory formation for a passive avoidance task in chick: a quantitative autoradiografic study. *Brain Research*, **674**, 352-356.
- Sterio, D. C., (1984). The Unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. *The Journal Of Microscopy*, **134 (2)**; 127-136.
- Stewart, N. G., (1994). Transient cerebral ischemia disrupts performance on a one-trial passive avoidance task in the domestic chick and is associated with the neuronal degeneration in the central nervous system. *Neuroscience*, **4**; 975-981.
- Stewart, M. G., Lowdnes, M., Hunter, A., (1992). Memory storage in chicks involves an increase in dendritic spine number and synaptic density. *Brain Dysfunct*, **5**; 50-64
- Szekely, A. D., Krebs, J. R., (1996). Efferent connectivity of the hippocampal formation of the zebra finch (*Taenopygia Guttata*): an anterograde pathway tracing study using phaseoleus vulgaris leucoagglutinin. *The Journal Of Comparative Neurology*, **368**; 198-214.

- Szekely, A. D., Boxer, M. I., Stewart, M. G., (1994). Connectivity of the lobus parolfactorius of the domestic chicken: An anterograde and retrograde pathway tracing study. *The Journal of Comparative Neurology*, **348**; 374-393.
- Taner, D., (1998). *Fonksiyonel Nöroanatomi*. Ed: Taner, D., Metu Press, **İlk Baskı**, sayfa; 226-232.
- Vincent, S. R., (1996). Nitric oxide and synaptic plasticity; no new from cerebellum. *Behavioral And Brain Sciences*, **19(3)**; 362-367.
- Weibel, E. R., (1969). Stereological Principles for morphometry in electron microscopic cytology. *International Review Of Cytology*, **26**; 235-302.
- West, M. J., (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology Of Aging*, **14**; 275-285.
- West, M. J., Slomianka, L., Gundersen, H. J. G., (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anatomical Record*, **231**; 482-497.
- Wieraszko, A., Ball, G. F., (1991). Long-Term enhancement of synaptic responses in the songbird hippocampus. *Brain Research*, **538**; 102-106.
- Wieraszko, A., Ball, G. F., (1993). Long-term potentiation in the avian hippocampus does not require activation of the N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor. *Synapse*, **13**; 173-178
- Wild, J. M., (1987a). Thalamic projection to the palaeostriatum and neostriatum in the pigeon. *Neuroscience*, **20**; 305-327.
- Wild, J. M., (1987b). The Avian somatosensory system: connection of regions of body representation in the forebrain of the pigeon. *Brain Research*, **412**; 205-223.
- Williams, W. R., Rakic, P., (1988). Three-Dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of the cells in sectioned material. *The Journal of Comparative Neurology*, **278**; 344-352.
- Willson, R. J., Szekely, A. D., Stewart, M. G., (1994). Transient cerebral ischaemia disrupts performance on a one-trial passive avoidance task in the domestic chick and is associated with the neuronal degeneration in the central nervous system. *Neuroscience*, **4**; 975-981.

ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Erzurum'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Erzurum'da tamamladıktan sonra, 1988 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 1994 yılında mezun oldum. Bir süre Erzurum'da pratisyen doktor olarak çalıştıktan sonra, aynı yıl Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açmış olduğu Histoloji – Embriyoloji Anabilim Dalı doktora programı sınavını kazanarak, doktora eğitimine başladım. Doktora eğitimini “Civcivlerde Pasif Sakınmanın Öğrenilmesini Takiben Dorsolateral Hippokampusta Sinaps Yoğunluğu ve Yüksekliğinin Disektör Sayım Metoduyla Hesaplanması (Elektron Mikroskopik Düzeyde Stereolojik Bir Çalışma)” adlı tezle tamamlayarak, 1999'da bitirdim. Evli ve üç çocuk babasıyım.