

RAT BEYNİNDEKİ YAŞA BAĞLI HACİM DEĞİŞİKLİKLERİNİN CAVALIERİ YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

Determination of age-related volume changes in rat brain by Cavalieri's Method

Ferruh YÜCEL¹, Nedim ÜNAL¹, Murat ERÇAKIR², Gül GÜVEN³

Özet

Amaç: Bu çalışmada ratların beyinde (nörogenезi tamamlanmış) yaşla birlikte oluşan değişikliklerin ortaya konması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bunun için 45, 90 ve 280 günlük erkek Sprague-Dawley ratları kullanılmıştır. Beyin hacimlerinin saptanmasında, etkin bir volume hesaplama yöntemi olan Cavalieri Hacim Hesaplama Yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Ratların hacim hesaplamaları yapılmadan önce tartılan total beyin ağırlıkları, 45 günlük ratlarda 2.376 ± 0.006 , 90 günlük ratlarda 2.348 ± 0.047 , 280 günlük ratlarda ise 2.595 ± 0.059 gr olarak bulunmuştur. Buna göre; 45 ve 90 günlük ratlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, 45 ve 280 günlük ratlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($P < 0.01$) gözlenmiştir. Yine, 90 ve 280 günlük ratların beyin ağırlıkları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P < 0.01$) saptanmıştır. Her üç gruba (45, 90, 280 günlük) ait ratların beyin hacimleri sırasıyla; 0.865 ± 0.026 , 0.963 ± 0.022 ve 1.165 ± 0.071 cm³ olarak hesaplanmıştır. Buna göre; 45 ve 90 günlük ratlar arasında $P < 0.05$, 45 ve 280 günlük ratlar arasında $P < 0.01$, 90 ve 280 günlük ratlar arasında ise $P < 0.05$ derecesinde anlamlı farklar gözlenmiştir.

Sonuç: Gerek beyin ağırlıklarında ve gerekse beyin hacimlerinde gözlenen yaşa bağlı bu farklılıklar, beyin hacminin nörogenез bittikten sonra da değiştiğini ortaya koymaktadır. Bu da bize, beyinde numerical densite (Nv) hesaplamalarında, hacim değişikliklerinin mutlaka göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyin, Rat, Yaşlanma

Ratların beyni doğumda çok az gelişmiş durumdadır. Bu haliyle gebelikteki insan fetus beyninin yaklaşık 15.haftasına karşılık olarak

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 26480-ESKİŞEHİR
Anatomi. Doç.Dr.¹, Y.Doç.Dr.³.
Histoloji-Embriyoloji. Araş.Gör.Dr.².

Geliş tarihi: 13 Ocak 2003

Abstract

Purpose: The purpose of the present study was to reveal age-related changes in rat brain.

Materials and Methods: Forty-five, 90 and 280-day-old male Sprague-Dawley rats were used in this study. The Cavalieri's Volume Estimate Method, very efficient in estimating brain volume, was applied to estimate the total brain volume of the rats.

Results: The mean (\pm S.E.) total brain weights of rats were 2.376 ± 0.006 , 2.348 ± 0.047 and 2.595 ± 0.059 gr. in 45, 90 and 280 day-old animals, respectively. There was no significant difference between 45 and 90 day-old animals, although there were significant differences between 45 and 280 ($P < 0.01$), and between 90 and 280 day old rats ($P < 0.01$). However, total brain volumes of rats showed significant differences among groups of animals. The total brain volume was estimated as 0.865 ± 0.026 , 0.963 ± 0.022 and 1.165 ± 0.071 cm³ in 45, 90 and 280 days old animals, respectively.

Conclusion: These significant differences in both brain weight and brain volume in ageing suggested that brain volume could change even after neurogenesis is completed. Therefore, in estimating the numerical density, changes in brain volume must be taken into consideration.

Key Words: Aging, Brain, Rat

gösterilebilir (1, 2). Rat beyninin hızlı büyüme dönemi (brain growth spurt), doğum sonrası 3.haftanın sonunda tamamlanır. Bu dönemin insandaki karşılığının; gebeliğin 2. trimesterinden postnatal yaşamın 2. yılına kadar uzandığı bildirilmiştir (3).

Rat beynindeki değişiklikler hiperplazi

(hyperplasia) ya da hipertrofi (hypertrophy) şeklinde olmaktadır. Buna göre; Morgane ve arkadaşları (4) herhangi bir organdaki büyümeyi 3 fazda incelemektedir. Bunlardan birincisinde hızlı hücre bölünmesi vardır ve hücrelerin büyüklükleri aynıdır (hiperplazi). İkinci fazda daha yavaş olarak hücre bölünmesi vardır ve ayrıca bu dönemde hücreler boyutlarını artırırlar (hiperplazi ve hipertrofi). Üçüncü fazda ise hücre bölünmesi durmuştur, sadece hücre büyümesi ve farklılaşması görülür (hipertrofi).

Yaşla birlikte rat beyinde görülen hacimsel değişikliklerin saptanmasında Cavalieri Hacim Hesaplama Yöntemi (The Cavalieri's Volume Estimate Method) pek çok organ ya da yapıların hacimlerinin ölçülmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemle sıklıkla ölçülmüş organ insan beyni ve beyin içi yapılar (5-8) olup, bu amaçla; tespit edilmiş beyinler veya CT/MRI (Bilgisayarlı Tomografi / Magnetic Resonance Imaging) görüntülerinden yararlanılmıştır.

Bu çalışmada nörogenesis'i tamamlanmış ratların beyinde yaşla birlikte oluşan değişikliklerin ortaya konması amaçlanmıştır. Diğer taraftan, rat beyinleri hacimlerinin saptanmasında, Cavalieri Hacim Hesaplama Yöntemi'nin bir uygulamasının yapılması amaç edinilmiştir (9, 10).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 45, 90 ve 280 günlük, toplam 19 erkek Sprague-Dawley rat kullanıldı. Total beyin hacimlerinin saptanmasında, etkin bir hacim hesaplama yöntemi olan Cavalieri Hacim Hesaplama Yöntemi tercih edildi (9, 10). Başlangıçta tüm ratlar 15-20 mg/kg intraperitoneal Rompun ile anestezi edildi ve daha sonra intrakardiyak perfüzyon yöntemiyle nötral formalin ile fikse edildi. Disseke edilen beyinler, fiksasyonun devamı ve sertleşmeleri için aynı solüsyona kondu ve bu solüsyonda bir gece bekletildi. Sertleşen beyinlerden cerebellumlar uzaklaştırıldı ve beyinlerin ağırlıkları ölçüldü. Elde edilen her bir beyinden yaklaşık 3 mm'lik 5'er dilim halinde

dokular alındı. Bu dilimlerin her birinin occipital loba bakan yüzleri üste gelecek şekilde dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5 µm'lik kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Alınan kesitler üzerinde test grid uygulaması yapılarak, Cavalieri Hacim Hesaplama Yöntemi ile beyin hacimleri aşağıdaki formüle göre saptandı (Resim 1, 2).

$$V = SP \times a(p) \times t$$

SP = Tüm dilimler üzerine düşen toplam nokta sayısı

a(p) = Birim test grid alanı (mm²)

t = Dilim kalınlığı (mm)

Gruplar arasındaki farklılıklar Student's t-test yöntemiyle değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda 45, 90 ve 280 günlük ratlar total beyin ağırlığı yönünden değerlendirildiğinde; 45 ve 90 günlük ratlar arasında total beyin ağırlıkları istatistiksel bakımdan önemli bir farklılık göstermezken, 90 ve 280 günlük ratlar arasında % 10.5'lik ve istatistiksel olarak anlamlı (P<0.01) bir farklılık göstermiştir. Aynı şekilde, 45 ve 280 günlük ratlara ait beyin ağırlıkları arasında da % 9.2'lik ve istatistiksel olarak anlamlı (P<0.01) bir artış gözlenmiştir. Ortalama total beyin ağırlıkları sırasıyla 45. günde 2.376 ± 0.006 gr, 90. günde 2.348 ± 0.047 gr ve 280. günde de 2.595 ± 0.059 gr olarak bulunmuştur (Tablo 1).

45, 90 ve 280 günlük ratlar total beyin hacmi yönünden değerlendirildiğinde ise; her bir yaş grubu birbiriyle karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. 45 ve 90 günlük ratlara ait total beyin hacimleri arasında % 11.3 (P<0.05), 45 ve 280 günlük ratlar arasında % 34.7 (P<0.01), 90 ve 280 günlük ratlar arasında ise % 21.0 (P<0.05) oranında bir farklılık saptanmıştır. Ortalama total beyin hacmi 45 günlük ratlarda 0.865 ± 0.026 cm³, 90 günlük ratlarda 0.963 ± 0.022 cm³, 280 günlük ratlarda ise 1.165 ± 0.071 cm³ olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 1. Değişik yaşlardaki ratlara ait total beyin ağırlıkları (gr)

Grup	Yaş (gün)	n	Total beyin ağırlığı (gr)
I	45	6	2.376 ± 0.006
II	90	7	2.348 ± 0.047
III	280	6	2.595 ± 0.059
% Farklılık			
I – II			1.2 ^{ns}
I – III			9.2 ^{**}
II – III			10.5 ^{**}

Ortalama değerler standart hata ile verilmiştir.

n: kullanılan hayvan sayısı

ns: İstatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (P>0.05).

** P<0.01

Tablo 2. Değişik yaşlardaki ratlara ait total beyin hacimleri (cm³)

Grup	Yaş (gün)	n	Total beyin hacmi
I	45	6	0.865 ± 0.026
II	90	6	0.963 ± 0.022
III	280	6	1.165 ± 0.071
% Farklılık			
I – II			11.3*
I – III			34.7**
II – III			21.0*

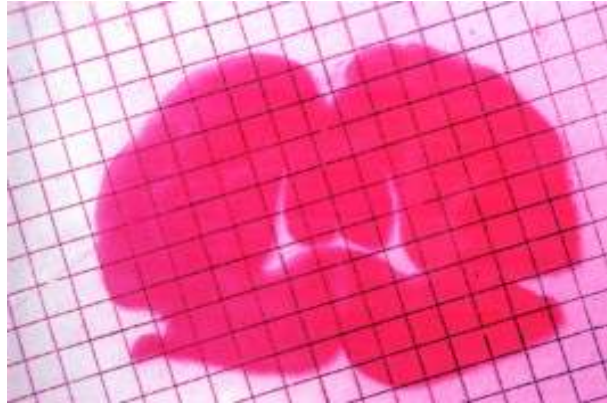
Ortalama değerler standart hata ile verilmiştir.

n: kullanılan hayvan sayısı

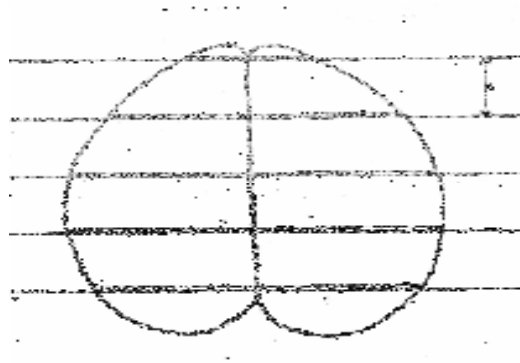
* P<0.05, ** P<0.01



Resim 1. Her bir dilimde alınan beyin kesitinin Hematoksilen Eozin ile boyanmış hali



Resim 2. Hematoksilen-Eozin ile boyanmış bir beyin kesiti üzerinde nokta sayımında kullanılan grid uygulaması. Bu kesit yüzeyi üzerine düşen nokta sayısı (P) 113'tür.



Şekil 1. Rat beyninin 5 dilime ayrılmasını gösteren şematik görünüm. t = Dilim kalınlığı.

TARTIŞMA

Çalışmamızda, total beyin ağırlığında 45 ve 90 günlük ratlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın, 90 ve 280 günlük ratlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu da bize beyindeki ağırlık artışının 45 ve 90. günler arasında oldukça az olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, aynı günler arasında beyin hacmindeki artışın % 11.3 olması, bu günler arasında rat beyininin ağırlıkça artmak yerine, bir genişleme yaptığını göstermektedir. Yapılan bir çalışmada yetişkin ratlar üç ayrı döneme ayrılarak incelenmiştir. Bunlardan 3 aylık ratlar için genç, 20 aylık ratlar için yaşlı ve 29 aylık ratlar için de aşırı yaşlı değerlendirilmesi yapılmıştır (11).

Ratların beyni genç ergin (90. gün) olduktan sonra da büyümeye devam etmektedir. Nitekim, yapılan değişik çalışmalarda ratların beyinleri ya da beyinlerinin değişik bölümleri 90. günden sonra da sürekli olarak ağırlık artışı göstermiştir (4, 12-15). Beyinde gözlenen bu ağırlık artışı hiç şüphesiz nöron artışı olmaksızın, glia hücresi, miyelin, kolesterol, fosfolipit ve glikolipit miktarındaki artıştan kaynaklanabilir (16). Nitekim, miyelin beyinin kuru ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturmakta olup, oligodendroglia hücreleri tarafından oluşturulmaktadır (16). Rat beyindeki hiperplazi periyodu vücudun diğer organlarındaki hiperplaziye göre daha erken sona ermektedir. Yani, yavrular annelerinden ayrıldıktan sonra beyinlerindeki tüm nöronlar oluşmuş olmaktadır (4).

Beyinin farklı dönemlerindeki hücre bölünmesi gerek hız, gerekse sonlanma zamanı açısından farklılık gösterir. Örneğin, rat cerebellum'unda hücre bölünmesi çok hızlı olup, postnatal 16-17. günlerde sona ererken; beyin sapında 15. günden sonra hücre bölünmesi yoktur. Hippocampus'da ise hücre bölünmesi çok daha erken dönemde olup, postnatal 6. günde son bulmaktadır (4).

Ratlarda beyinin hızlı büyüme döneminin postnatal hayatta gerçekleşmesi, ratları postnatal dönemde sinir sisteminin gelişimini araştırmada ideal bir deney hayvanı modeli yapmaktadır (2). Bu dönem, beyindeki nöron sayısı sona erdikten sonra başlar ve bu dönemde dendritik arborizasyon, axonal büyüme, synaptogenesis, gliogenesis, miyelinizasyon, nörotransmitter ve nörotransmisyon sistemleri olgunlaşır (17).

Rat, fare, kedi ve köpek gibi hayvanlarda makronöronlar (uzun aksonlu nöronlar) prenatal dönemde gelişirken, mikronöronlar (kısa aksonlu nöronlar) postnatal dönemde gelişirler (18). Dolayısıyla, bu tip hayvanlarla yapılan deneysel çalışmalarda uygulanan yetersiz beslenme gibi olumsuz koşullar, eğer prenatal dönemde ise makronöronları, postnatal dönemde ise mikronöronları etkiler (18).

Ratlarda, beyin hızlı büyüme döneminin tamamı postnatal dönemde olduğundan, bu dönemdeki olumsuz koşullar sinaptogenesis'i, gliogenesis'i, miyelinizasyon'u ve kapillarizasyon'u etkileyebilmektedir (17).

Dobbing'e göre; nörogenesis ratlarda 2. postnatal günde, insanda ise hamileliğin 25. haftasında (2. trimester son bulmadan önce) tamamlanmaktadır (3). Daha sonra da beyinin hızlı büyüme dönemi başlamaktadır ki, bu dönem, ratlarda 25. postnatal günde; insanda ise 2. trimesterin sonundan 2. postnatal yaşa kadar sürmektedir.

Deney hayvanları üzerinde, total beyin hacminin yaşla birlikte nasıl değişime uğradığını gösteren bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak, yaşın etkisiyle beyinin değişik bölümlerinin hacimlerini araştıran bazı çalışmalar bulunmaktadır (19-22).

Bunlardan 4-6 aylık ve 30-32 aylık ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada parietal cortex'de herhangi bir hacim değişikliğine rastlanmazken; glia hücresi densitesinde artış saptanmıştır (21). Yine, frontal cortex ve hippocampus hacmini araştıran bir başka çalışmada, 12 aylık ratlarla 24 aylık ratların frontal cortex hacminde anlamlı bir farklılık

saptanmazken; hippocampus hacminin 24 aylık ratlarda anlamlı olarak arttığı görülmüştür ki, bu artışın astrosit sayısındaki artıştan kaynaklandığı belirtilmiştir (20). Hippocampus üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise, hippocampus'un moleküler tabakasının orta bölümünün hacminin yaşlı ratlarda yetişkinlere göre arttığı gözlenmiştir (19). Buna karşın, nucleus geniculatus dorsalis lateralis hacminin 3-28 aylık ratlar arasında artmış olduğu belirtilmiştir. Bu artışın 24 aylık ratlarla 28 aylık ratlar arasında çok daha belirgin olduğu görülmüştür (22).

Çalışmamızda kullandığımız ratların beyinlerinin hacimlerinin yaklaşık 3mm'lik toplam 5 sistematik dilim (slice) üzerinde nokta sayımı (point count) yaparak, Cavalieri'nin Hacim Hesaplama Yöntemi ile kolaylıkla hesaplanabilmesi; beyin üzerinde yapılacak araştırmalarda bu yöntemin, su içerisine direkt olarak atarak hacim ölçme yöntemine bir alternatif oluşturduğu görülmektedir. Beyindeki cortex, ventrikül ve beyaz cevher gibi değişik yapıların hacimlerinin sadece Cavalieri Yöntemi ile hesaplanabilir olması, bu yöntemin etkinliğini ortaya koymaktadır. Yine, nöronal numerik densitesi (Nv) hesaplanan bir bölgenin bu yöntemle hacmini de (V) hesaplayabileceğimiz için, bu iki parametrenin çarpımından total nöron sayısına da kolaylıkla ulaşılacağı açıktır (23).

Beyin üzerinde pek çok çalışma yapılmaktadır ve bu çalışmalarda çoğu kez total nöron sayısı yerine, ilgili bölgedeki nöronların numerik densiteleri verilmektedir (24, 25, 26, 27, 28). Rat beynindeki yaşla birlikte görülen hacim artışları göz önünde bulundurulmadan deney ve kontrol hayvanlara ait değerler karşılaştırıldığından; numerical densite hesaplamalarında, hacimde görülen artışlardan dolayı bu değerlerde azalmalar gözlenebilmektedir ki, bu da sonuçların yanlış yorumlanmasına sebep olmaktadır.

Sonuç olarak, rat beyni yaşla birlikte hacimsel değişiklikler göstermektedir. Bu da bize, rat beyni üzerinde yapılan çalışmalarda mümkünse hacimdeki artışları da hesaba katmamız gerektiğini, ya da nöronların numerik densitesi yerine total

nöron sayısının verilmesinin daha doğru olacağını göstermektedir. Nümerik densite verilen çalışmalarda da en azından, volume fraction (Vv) ve mean diameter gibi değişik parametrelerin de verilmesinin sonuçların yorumlanmasında yardımcı olacağı görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Dobbing J, Sands J. Maternal nutrition and neurological development. In: Jilek L, Trojan S (eds). *Ontogenesis of the Brain*. Prague, Universita Karlova 1974, Vol 2, 167-172.
2. Dobbing, J. The later development of the brain and its vulnerability. In: Davis JA, Dobbing J (eds). *Scientific Foundations of Pediatrics* (2nd ed). London, Heinemann 1981, pp 744-759.
3. Dobbing, J. Undernutrition and the developing brain: The relevance of animal models to the human problem. *Am J Dis Child* 1970; 120: 411.
4. Morgane, PJ, Miller, M, Kemper, T, et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1978, Vol 2, 137-230.
5. Henery CC, Mayhew TM. The cerebrum and cerebellum of the fixed human brain: efficient and unbiased estimates of volumes and cortical surface areas. *J Anat* 1989; 167: 167-80.
6. Pakkenberg B, Gundersen HJG. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *J Microsc* 1988; 150, 1-20.
7. Pakkenberg, B, Boesen, J, Albers, M, Gjerris, F. Unbiased and efficient estimation of total ventricular volume of the brain obtained from CT-scans by a stereological method. *Neuroradiology* 1989; 31: 413-417.
8. Mayhew TM, Olsen DR. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. *J Anat* 1991; 178: 133-144.
9. Cruz-Olive L-M, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: A brief survey. *Am J Physiol* 1990; 258, L148-156.
10. Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of

- systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147: 229-263.
11. Console GM, Gomez Dumm CL, Brown OA, Ferese C, Goya RG. Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mech Ageing Dev* 1997, May: 95: 157-66.
 12. Warren MA, Bedi KS. A quantitative assessment of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats; *J Comp Neurol* 1984; 227, 104-108.
 13. Ahmed MGE, Bedi KS, Warren MA, Kamel MM. The effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse-to-granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 1987; 263: 146-158.
 14. Warren MA, Bedi KS. The effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the granule-to-Purkinje cell ratio in the rat cerebellum. *J Anat* 1988; 159:147-153.
 15. Yücel F, Warren MA, Gümüşburun E. The effects of undernutrition on connectivity in the cerebellar cortex of adult rats. *J Anat* 1994; 184: 59-64.
 16. Shoemaker WJ, Bloom FE. Effects of undernutrition on brain morphology. In: Wurtman RJ, Wurtman JJ (eds). *Nutrition and the Brain*, New York, Raven Press 1977, Vol 2, 147-199.
 17. Burns EM. Some effects of malnutrition on synaptic systems: An intergration of morphologic neurochemical and neurophysiologic data. In: D.Gareth Jones (ed). *Current Topics in Research on Synapses*. Alan R Liss, Inc., New York 1984, Vol 2, 59-91.
 18. Altman J, Das GD, Sudarshan K. The influence of nutrition on neural and behavioral development: I. Critical review of some data on the growth of the body and the brain following dietary deprivation during gestation and lactation. *Dev Psychobiol* 1970; 3: 281-301.
 19. Rapp PR, Stack EC, Gallagher M. Morphometric studies of the aged hippocampus: I. Volumetric analysis in behaviorally characterized rats. *J Comp Neurol* 1999, 403: 459-70.
 20. Amenta F, Branzetti E, Sabbatini M, Vega JA. Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: A quantitative immunohistochemical study. *Microsc Res Tech* 1998, Oct 1: 43: 29-33.
 21. Peinado MA, Quesada A, Pedrosa JA, et al. Light microscopic quantification of morphological changes during aging in neurons and glia of the rat parietal cortex. *Anat Rec* 1997, Mar: 247: 420-5.
 22. Diaz F, Villena A, Gonzales P, Requena V, Rius F, Perez De Vargaz I. Stereological age-related changes in neurons of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *Anat Rec* 1999, Aug 1: 255: 396-400.
 23. Howard, CV, Reed, MG: *Unbiased Stereology*, BIOS Scientific Publishers, 1998.
 24. McConell P, Berry M. The effects of undernutrition on Purkinje cell dendritic growth in the rat; *J Comp Neurol* 1978-a; 177: 159-172.
 25. Paula-Barbosa MM, Andrade JP, Castedo JL, et al. Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation of adult rats after long-term low-protein diet. *Exp Neurol* 1989; 103: 186-193.
 26. Dobbing J, Hopewell JW, Lynch A. Vulnerability of developing brain: VII. Permanent deficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. *Exp Neurol* 1971; 32: 439-447.
 27. Neville HE, Chase HP. Undernutrition and cerebellar development; *Exp Neurol* 1971; 33: 485-497.
 28. McConell P, Berry M. The effects of refeeding after varying periods of neonatal undernutrition on the morphology of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *J Comp Neurol* 1981 ; 200: 463-79.