T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

NUCLEUS DORSALIS, NUCLEUS LUMBARIS PRECEREBELLARIS VE NUCLEUS SACRALIS PRECEREBELLARIS: HÜCRESEL MİMARİ VE NÖROKİMYASAL İÇERİKLERİ

Yüksek Lisans Tezi

İbrahim DEMİRÇUBUK

Anatomi Ana Bilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

NUCLEUS DORSALIS, NUCLEUS LUMBARIS PRECEREBELLARIS VE NUCLEUS SACRALIS PRECEREBELLARIS: HÜCRESEL MİMARİ VE NÖROKİMYASAL İÇERİKLERİ

İbrahim DEMİRÇUBUK

Danışman
Prof. Dr. Gülgün ŞENGÜL

Anatomi Ana Bilim Dalı
Anatomi Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)
(İmza)

Başkan	**:** Prof. Dr. Gülgün ŞENGÜL	.....
(Danışman)		
Üye	**:** Prof. Dr. Mete ERTÜRK	.....
Üye	**:** Prof. Dr. Tuncay VAROL	.....

Yüksek lisans tezinin kabul edildiği tarih: .....

Önsöz

Omurilik araştırmaları ile geçmişten günümüze kılavuzluk yapan temel ve klinik bilim sonuçları elde edilmiştir. Ancak hâlen insan omuriliğine dair ortaya konulması gereken verilerin bulunması gerekliliğinden dolayı bu alandaki araştırmalar gelişerek geleceğe taşınmaktadır. Uzun yıllar boyunca şekillenen ve şekillenmeye devam eden bu bilimsel birikime kayda değer bir katkı sağlamayı hedeflemek, bu tez araştırmasının ana çıkış unsurunu oluşturmuştur.

Akademik danışmanımla birlikte insan omuriliğinde bir ilk niteliği taşıyan bu araştırmamızda; problemi, hipotezimizi ve araştırma tasarımımızı ayrıntılı olarak tayin ettik. Araştırmamızı tasarlama aşamasından tamamlanmasına kadar olan süreçte bilimsel etik ilkelere sonuna kadar bağlı kalarak en doğru verilere ulaşmaya çalıştık.

Bu araştırmanın gelecekteki çalışmalara kaynak olması ve yol gösterici olması dileğimi saygılarımla iletiyorum.

İzmir, 27.07.2022 İbrahim DEMİRÇUBUK

Özet

Nucleus Dorsalis, Nucleus Lumbaris Precerebellaris ve Nucleus Sacralis Precerebellaris: Hücresel Mimari ve Nörokimyasal İçerikleri

İnsan omuriliğinde nucleus dorsalis (D), T1(2)-L2(3) segmentleri boyunca, nucleus lumbaris precerebellaris (LPrCb) L1-L5 segmentleri boyunca ve nucleus sacralis precerebellaris (SPrCb) S1-Co1 segmentleri boyunca uzanan ve cerebellum'a projekte olan yuvarlak veya oval şekilli nucleus'lardır. Bu araştırma kapsamında; %10 formalin ile fikse edilmiş ve %30 sukroz ile kriyoproteksiyonu yapılmış insan erkek T1-T12, L1-L5, S1-S5 ve Co1 omurilik segmentlerinden Nissl ve NADPH-d histokimyasal boyaması için 50 µm kalınlığında, kalbindin (Cb), kalretinin (Cr), parvalbumin (Pv), kolin asetil transferaz (ChAT), kokain ve amfetaminle düzenlenen transkript (CART), nöronal nükleer protein (NeuN), glutamik asit dekarboksilaz 65/67 (GAD 65/67), substans P (SP), serotonin (5-HT) ve enkefalin (ENK) immunohistokimyasal boyamaları için 30 µm kalınlığında transvers kesitler alındı. Elde edilen kesitlere ilgili boyama protokollerinin uygulanmasının ardından nucleus'ların hücresel mimari ve immunoreaktivite değerlendirmeleri yapıldı. Image J programı kullanılarak yapılan analizin sonucunda yaklaşık ortalama yüzey alanı D için 0,084 mm^2, LPrCb için 0,116 mm^2 ve SPrCb için 0,118 mm^2 olarak ölçüldü. Nöron yoğunlukları, D için ortalama 400 ± 120, LPrCb için 220 ± 100 ve SPrCb için 190 ± 50 nöron/mm^2 olarak bulundu. Araştırılan on bir adet nörokimyasal içeriğin üç nucleus'ta da bulunduğu görüldü. Bu tez çalışması insan omuriliğinde D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin ilk detaylı hücresel mimari ve nörokimyasal içerik araştırmasıdır. Bu nedenle elde edilen bulguların literatüre önemli bir katkı sağladığı düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler; medulla spinalis; nucleus lumbaris precerebellaris; nucleus sacralis precerebellaris; nucleus dorsalis; immunohistokimya; histokimya

Abstract

Investigation of the Cyto- and Chemoarchitecture of the Dorsal Nucleus, Lumbar Precerebellar Nucleus and Sacral Precerebellar Nucleus

The dorsal nucleus (D) is located in T1(2)-L2(3) segments, lumbar precerebellar nucleus (LPrCb) in L1-L5 segments, and sacral precerebellar nucleus in S1-Co1 segments in the human spinal cord. These nuclei, which have a round or oval shape, project to the cerebellum. T1-T12, L1-L5, S1-S5, and Co1 human male spinal cord segments fixed with 10% formalin and cryoprotected with 30% sucrose were transversely cut at a thickness of 50 µm for Nissl and NADPH-d histochemical stainings. Sections were transversely cut at a thickness of 30 µm for calbindin (Cb), calretinin (Cr), parvalbumin (Pv), glutamate decarboxylase 65/67 (GAD 65/67), cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART), neuronal nuclear antigen (NeuN), choline acetyltransferase (ChAT), substance P (SP), serotonin (5-HT) and enkephalin (ENK) immunohistochemical stainings. Following the relevant staining protocols to the obtained sections, cytoarchitecture and immunoreactivity of neurons in these nuclei were examined. As result of the analysis using the Image J program, the approximate average surface area was measured as 0.084 mm^2 for D, 0.116 mm^2 for LPrCb and 0.118 mm^2 for SPrCb. The average neuron densities were 400 ± 120 for D, 220 ± 100 for LPrCb, and 190 ± 50 neurons/1 mm^2 for SPrCb. In all of these three nuclei, the eleven neurochemical markers investigated were detected. This thesis is the first detailed investigation of the cytoarchitecture and chemoarchitecture of D, LPrCb, and SPrCb in the human spinal cord. Therefore, we believe the obtained findings will significantly contribute to the literature.

Keywords; spinal cord; lumbar precerebellar nucleus; sacral precerebellar nucleus; dorsal nucleus; immunohistochemistry; histochemistry

İçindekiler

Önsöz ..... **II**
Özet ..... **III**
Abstract ..... **IV**
İçindekiler ..... **V**
Tablolar Dizini ..... **VII**
Şekiller Dizini ..... **VIII**
Kısaltma Listesi ..... **XII**
1. Giriş **1**
1.1. Araştırmanın Problemi **6**
1.2. Araştırmanın Sorusu **7**
1.3. Araştırmanın Hipotezleri **7**
1.4. Araştırmanın Varsayımları **7**
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları **8**
1.6. Araştırmanın Amacı **8**
2. Genel Bilgiler **9**
2.1. Kalbindin, Kalretinin ve Parvalbumin **9**
2.2. Kolin Asetil Transferaz (ChAT) **9**
2.3. Nöronal Nükleer Protein (NeuN) **10**
2.4. Kokain ve Amfetaminle Düzenlenen Transkript (CART) **10**
2.5. Glutamik Asit Dekarboksilaz 65/67 (GAD 65/67) **10**
2.6. Substans P (SP) **11**
2.7. Serotonin (5-HT) **11**
2.8. Enkefalin (ENK) **12**
2.9. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) **12**
3. Gereç ve Yöntem **22**
3.1. Araştırma Kapsamında Kullanılan Gereçler **22**
3.2. Araştırma Kapsamında Kullanılan Yöntemler **29**
3.2.1. Omurilik Segmentlerinden Kesitlerin Alınması **29**
3.2.2. Nissl Histokimyasal Boyaması **29**
3.2.3. NADPH-d Histokimyasal Boyaması **32**
3.2.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar **33**
3.1. Görüntüleme ve Görüntülerin Analizi **36**

4. Bulgular **37**
4.1. D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin Hücresel Mimarileri **37**
4.2. D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin Nörokimyasal İçerikleri **50**
4.2.1. Nucleus Dorsalis'in Nörokimyasal İçeriği **50**
4.2.2. Nucleus Lumbaris Precerebellaris'in Nörokimyasal İçeriği **61**
4.2.3. Nucleus Sacralis Precerebellaris'in Nörokimyasal İçeriği **72**
4.3. D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin NOS İçeriği **84**
5. Tartışma **87**
6. Sonuç ve Öneriler **97**
7. Kaynaklar **98**
Ekler **115**
Ek 1: Etik Kurul Onay Belgesi **115**
Ek 2: Olgu Rapor Formu **118**
Teşekkür **119**
Özgeçmiş **120**

Tablolar Dizini

Tablo 1: Rexed laminalarının tanımlanması. 2
Tablo 2: Substantia grisea medullae spinale'deki tanımlanmış nucleus'lar (Sengul ve ark., 2013; Erzurumlu ve ark., 2019). 3
Tablo 3: Çeşitli türlerin merkezi sinir sisteminde Cb'nin dağılımı. 13
Tablo 4: Çeşitli türlerin merkezi sinir sisteminde Cr'nin dağılımı. 14
Tablo 5: Çeşitli türlerin merkezi sinir sisteminde Pv'nin dağılımı. 15
Tablo 6: Çeşitli türlerin merkezi sinir sisteminde ChAT'nin dağılımı. 16
Tablo 7: İnsanın ve sıçanın merkezi sinir sisteminde CART'ın dağılımı. 17
Tablo 8: Çeşitli türlerin merkezi sinir sistemindeki SP'nin dağılımı. 18
Tablo 9: Çeşitli türlerin merkezi sinir sistemindeki 5-HT'nin dağılımı. 19
Tablo 10: Çeşitli türlerin merkezi sinir sistemindeki ENK'in dağılımı. 20
Tablo 11: Çeşitli türlerin merkezi sinir sistemindeki NOS'un dağılımı. 21
Tablo 12: Araştırma kapsamında kullanılan kimyasalların listesi. 26
Tablo 13: Araştırma kapsamında kullanılan serum ve antikorların listesi. 28
Tablo 14: Nissl histokimyasal boyamasının uygulama aşamaları. 31
Tablo 15: İmmunohistokimyasal boyamalar için kullanılan solüsyonların hazırlanması. 34
Tablo 16: Primer antikor solüsyonlarının hazırlanması. 35
Tablo 17: Sekonder antikor solüsyonlarının hazırlanması. 36
Tablo 18: D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin morfometrik özellikleri. 49

Şekiller Dizini

Şekil 1: Çeker ocak (Delta Lab, İstanbul, Türkiye). 23
Şekil 2: Kriyostat (Leica CM1950, Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya). 23
Şekil 3: Distile su cihazı (MP Minipure Basic M UP, Medikal Endüstriyel Sistemler, Ankara, Türkiye). 24
Şekil 4: Orbital karıştırıcı (bioSan PSU-10i, Medical Biological Research and Technologies, Riga, Letonya) ve doku kültürü plakası (well plate). 24
Şekil 5: Hassas terazi (Kern Abj 220-4NM, Kern, Almanya). 25
Şekil 6: Manyetik karıştırıcı (MK 318, Nüve, Ankara, Türkiye) ve pH metre (HI 2211, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, ABD). 25
Şekil 7: 1-10 µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl hacme sahip olan otomatik pipet seti (Finnpipette F2, Thermo Scientific, MA, ABD). 25
Şekil 8: Dokuların kriyostatta sabitlenmesi ve transvers kesitlerin alınması. 30
Şekil 9: Nissl histokimyasal boyamasının uygulama alanı. 30
Şekil 10: T2 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 38
Şekil 11: T4 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 39
Şekil 12: T6 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 40
Şekil 13: T8 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 41
Şekil 14: T12 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 42
Şekil 15: L2 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin ve LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 43
Şekil 16: L4 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 44
Şekil 17: L5 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 45
Şekil 18: S2 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında SPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 46

Şekil 19: S4 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında SPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 47
Şekil 20: Co1 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında SPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü. 48
Şekil 21: T8 segmentinde Cb immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 51
Şekil 22: T12 segmentinde Cr immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 52
Şekil 23: T8 segmentinde Pv immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 53
Şekil 24: T12 segmentinde ChAT immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 54
Şekil 25: T8 segmentinde CART immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 55
Şekil 26: T8 segmentinde GAD 65/67 immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 56
Şekil 27: T8 segmentinde NeuN immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 57
Şekil 28: T12 segmentinde SP immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 58
Şekil 29: T8 segmentinde 5-HT immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 59
Şekil 30: T12 segmentinde ENK immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 60
Şekil 31: L5 segmentinde Cb immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 62
Şekil 32: L5 segmentinde Cr immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 63
Şekil 33: L5 segmentinde Pv immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 64
Şekil 34: L5 segmentinde ChAT immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 65

Şekil 35: L5 segmentinde CART immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 66
Şekil 36: L5 segmentinde GAD 65/67 immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 67
Şekil 37: L4 segmentinde NeuN immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 68
Şekil 38: L4 segmentinde SP immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 69
Şekil 39: L4 segmentinde 5-HT immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 70
Şekil 40: L5 segmentinde ENK immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 71
Şekil 41: S4 segmentinde Cb immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 73
Şekil 42: S4 segmentinde Cr immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 74
Şekil 43: S2 segmentinde Pv immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 75
Şekil 44: S4 segmentinde ChAT immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 76
Şekil 45: S4 segmentinde CART immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 77
Şekil 46: S2 segmentinde GAD 65/67 immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 78
Şekil 47: S4 segmentinde NeuN immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 79
Şekil 48: Co1 segmentinde NeuN immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 80
Şekil 49: S4 segmentinde SP immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 81
Şekil 50: S4 segmentinde 5-HT immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 82

Şekil 51: S4 segmentinde ENK immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü. 83
Şekil 52: T6 segmentinde NADPHd histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan görüntüsü. 84
Şekil 53: L2 segmentinde NADPHd histokimyasal boyaması sonrasında LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan görüntüsü. 85
Şekil 54: S2 segmentinde NADPHd histokimyasal boyaması sonrasında LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan görüntüsü. 86
Şekil 55: İnsan T12 omurilik segmentinin laminar organizasyonu ve D'nin lokalizasyonu (Sengul ve ark., 2013). 88
Şekil 56: İnsan L2 omurilik segmentinin laminar organizasyonu ve LPrCb'nin lokalizasyonu (Sengul ve ark., 2013). 88
Şekil 57: İnsan S2 omurilik segmentinin laminar organizasyonu ve SPrCb'nin lokalizasyonu (Sengul ve ark., 2013). 89
Şekil 58: Postnatal 4. gün farenin L3 omurilik segmentinin laminar organizasyonu, D'nin ve LPrCb'nin lokalizasyonu (Sengul ve ark., 2012). 89
Şekil 59: Fluoro-Gold işaretleyici sonrasında faredeki D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin lokalizasyonu (Fu ve ark., 2012). 91
Şekil 60: Fare omuriliğinde D, LPrCb ve SPrCb nöronal kolonları (sol taraf), Fluoro-Gold ve kolera toksin B enjeksiyonu sonrasında nucleus'ların lokalizasyonları (sağ taraf) (Sengul ve ark., 2015). 92
Şekil 61: Faredeki D'de, LPrCb'de ve SPrCb'de Cb, Cr, Pv ve SMI-32 immunoreaktivitesi (Fu ve ark., 2012). 94
Şekil 62: İnsan omuriliğinin L3 segmentinde D'nin CGRP immunoreaktivitesi (Sengul ve ark., 2013). 95
Şekil 63: İnsan omuriliğinin L2 segmentinde D'nin NeuN ve ChAT immunoreaktivitesi (Sengul ve ark., 2013). 95
Şekil 64: İnsan omuriliğinin T12 segmentinde D'nin NOS immunoreaktivitesi (Sengul ve ark., 2013). 96

Kısaltma Listesi

5-HT	:	Serotonin
ALS	:	Amyotrofik lateral skleroz (amyotrophic lateral sclerosis)
C	:	Servikal (cervical)
CART	:	Kokainle ve amfetaminle düzenlenmiş transkript (cocaine- and amphetamine-regulated transcript)
Cb	:	Kalbindin (calbindin)
CeCv	:	Nucleus cervicalis centralis (central cervical nucleus)
CGRP	:	Kalsitonin geni ile ilişkili peptid
ChAT	:	Kolin asetiltransferaz
Co	:	Koksigeal (coccygeal)
Cr	:	Kalretinin (calretinin)
D	:	Nucleus dorsalis (dorsal nucleus, nucleus thoracicus posterior)
DAB	:	3,3'-Diaminobenzidin tetrahidroklorür
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DOP	:	Delta-opioid reseptörü
DPGi	:	Nucleus paragigantocellularis posterior (dorsal paragigantocellular nucleus)
ENK	:	Enkefalin (enkephalin)
eNOS	:	Endotelyal nitrik oksit sentaz

Gi	:	Nucleus gigantocellularis
IB	:	Nucleus basilaris internus (internal basilar nucleus)
ICI	:	Nucleus intercalatus (intercalated nucleus)
IML	:	Nuclues intermediolateralis
IMM	:	Nuclues intermediomedialis
IP	:	Nucleus interpeduncularis (interpeduncular nucleus)
IRt	:	Intermediate reticular nucleus
iNOS	:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KOP	:	Kappa-opioid reseptörü
L	:	Lumbal
LatC	:	Nucleus cervicalis lateralis (lateral cervical nucleus, LCn)
LM	:	Nucleus mamillaris lateralis (lateral mammillary nucleus)
LPrCb	:	Nucleus lumbaris precerebellaris (lumbar precerebellar nucleus)
LSp	:	Nucleus spinalis lateralis (lateral spinal nucleus, LSN)
M	:	Molar
MdD	:	Meduller reticular nucleus'un dorsal parçası
mg	:	Miligram
MOP	:	Mu-opioid reseptörü
MSA	:	Çoklu sistem atrofisi (multiple system atrophy)

NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NADPH-d	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat-diaforaz
NBT	:	Nitro mavi tetrazolyum klorür (nitro blue tetrazolium chloride, nitrotetrazolium blue chloride)
NeuN	:	Nöronal nükleer protein
NGS	:	Normal keçi serumu (normal goat serum)
NK1R	:	Nörokinin-1 reseptörü (neurokinin-1 receptor)
nNOS	:	Nöronal nitrik oksit sentaz
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
NRS	:	Normal tavşan serumu (normal rabbit serum)
PAG	:	Periaqueduktal gri cevher (substantia grisea periaquaeductalis)
PB	:	Fosfat tampon çözeltisi (phosphate buffer)
PBS	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (phosphate buffer saline)
PCRtA	:	Nucleus reticularis parvocellularis'in alfa parçası
PnC	:	Nucleus reticularis caudalis pontis
Pv	:	Parvalbumin
RNA	:	Ribonükleik Asit
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
S	:	Sakral (sacral)
SCh	:	Nucleus suprachiasmaticus

SDCom	:	Nucleus sacralis commissuralis dorsalis
SNC	:	Substantia nigra pars compacta (pars compacta substantiae nigrae)
SO	:	Nucleus supraopticus
SP	:	Substans P
SPrCb	:	Nucleus sacralis precerebellaris (sacral precerebellar nucleus)
SPSy	:	Nucleus parasympathicus sacralis
SubCV	:	Subcoeruleus nucleus'un ventral parçası
T	:	Torakal
Ve ark.	:	Ve arkadaşları
ZI	:	Zona incerta
α-syn	:	Alfa-sinüklein (Alpha-synuclein)
µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre

1. Giriş

Canalis vertebralis'te yer alan medulla spinalis (omurilik) ve cavum cranii'de yer alan encephalon (beyin), kaudalden (caudalis) kraniyale (cranialis) doğru devamlılık oluşturarak merkezî sinir sistemini meydana getirir (Arıncı ve Elhan, 2014). Medulla spinalis duysal bilginin ilgili üst merkezlere iletildiği, üst merkezlerden gelen motor uyaranların ilgili kaslara yönlendirildiği, refleks mekanizmasının gerçekleştirildiği ve otuz bir çift nervus spinalis'in (spinal sinir) çıktığı otuz bir segmenti kapsayan silindirik bir yapıdır (Erzurumlu, Şengül ve Ulupınar, 2019). Aynı zamanda dorsoventral olarak yassı şekilde bulunan medulla spinalis'in (Watson ve Kayalioglu, 2009), erkeklerde ortalama 44.79 - 46.8 cm ve kadınlarda 41.8 - 43.7 cm uzunluğa sahip olduğu (McCotter, 1916; Pfitzner, 1884; Thomson, 1894)[1] ve taze omurilik dokusunun (fresh spinal cord) 23.5 - 35.8 gr ağırlığında olduğu bildirilmiştir (Barson ve Sands, 1977). Meninksler (dıştan içe doğru dura mater spinalis, arachnoidea mater spinalis ve pia mater spinalis) ile sarılı olarak canalis vertebralis içerisinde seyreden bu yapı, gelişim dönemi içerisinde farklı seviyelerde sonlanır. Medulla spinalis, intrauterin dönemde üçüncü aya kadar S4 vertebra hizasında bulunurken, columna vertebralis'in daha hızlı büyümesinden dolayı doğumda L2 vertebra hizasında bulunur. Doğumdan iki ay sonra ise erişkinlerdeki seviye olan L1-L2 vertebra hizasında sonlanır (Barson, 1970; Watson ve Kayalioglu, 2009). Medulla spinalis'teki transvers çap C3'ten C5 segmentine doğru artar, C5'ten T8'e doğru çap giderek azalır ve alt torakal segmentlerde neredeyse sabit kalmaktadır. Ancak T12'den L4'e doğru tekrar artar ve L4 seviyesinden itibaren tekrar azalır. Ortalama 1173,9 mm^3 ile omurilikteki en geniş hacme ve 75 mm^2 ile en geniş kesit alanına sahip olan C5 segmenti, en geniş transvers çapa sahiptir. T6 segmenti ise ortalama 22,4 mm uzunluğu ile en uzun omurilik segmentidir (Ko, Park, Shin ve Baek, 2004). Medulla spinalis'in transvers kesitinde anteriorda yer alan fissura mediana anterior medullae spinalis ve posteriorda yer alan sulcus medianus posterior medullae spinalis, dokuyu sağ ve sol olmak üzere ikiye ayırır (Baron, 2016).

---

[1] J. Herbert Moorhead'in 40 yetişkin omuriliği üzerine yaptığı uzunluk ölçümleri, Arthur Thomson'ın Büyük Britanya ve İrlanda Anatomik Derneği Toplu Araştırma Komitesi'nin 1893-1894 yılı için hazırladığı beşinci yıllık raporun 48-52 sayfaları arasında yer almaktadır.

Medulla spinalis'in iç kısmında nöronların somalarının, glia hücrelerinin ve kan damarlarının bulunduğu substantia grisea medulla spinale (gri cevher, gri madde), dış kısmında afferent yolların, efferent yolların ve glia hücrelerinin bulunduğu substantia alba medulla spinale (beyaz cevher, beyaz madde) yer alır. Bir "H" görünümde bulunan substantia grisea medullae spinale'deki cornu anterius medullae spinale, cornu laterale medullae spinale ve cornu posterius medullae spinale -ek olarak fissura mediana anterior medullae spinalis ve sulcus medianus posterior medullae spinalis- substantia alba medullae spinale'yi funiculus anterior, funiculus lateralis ve funiculus posterior'a ayırır. Her iki tarafın substantia grisea medullae spinalis'i, commissura grisea anterior ve commissura grisea posterior ile canalis centralis'in çevresinde birleşir (Erzurumlu ve ark., 2019).

İsveçli araştırmacı Bror Rexed 1952 ve 1954 yıllarında yayımladığı makalelerle kedi omuriliğinin substantia grisea medullae spinalis'ini nöronal boyut, şekil ve sitolojik özelliklere göre on adet lamina'ya ayırmıştır. Rexed laminaları olarak bilinen bu laminalar, daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından farklı türlerde tanımlanmıştır **(Tablo 1)**. Laminasyon çalışmalarına ek olarak insan omuriliğinin substantia grisea medullae spinalis'inde hücre gruplarının oluşturduğu çeşitli nucleus'lar tanımlanmıştır **(Tablo 2)**.

Tablo 1: Rexed laminalarının tanımlanması.

Tür	**Referans**
Kedi	(Rexed, 1952, 1954)
Sıçan	(Molander, Xu ve Grant, 1984; Molander, Xu, Rivero-Melian ve Grant, 1989)
Fare	(Sidman, Angevine ve Pierce, 1971)
Postnatal 4. gün fare	(Sengul, Puchalski ve Watson, 2012)
Rhesus maymunu, marmoset maymunu	(Sengul, Watson, Tanaka ve Paxinos, 2013)
İnsan	(Schoenen ve Faull, 2004; Sengul ve ark., 2013)

Tablo 2: Substantia grisea medullae spinale'deki tanımlanmış nucleus'lar (Sengul ve ark., 2013; Erzurumlu ve ark., 2019).

Nucleus	**Konum**	**Bulunduğu Segmentler**
Nucleus cervicalis centralis (CeCv)	Lamina VII	C1-C3(4)
Nucleus basilaris internus (IB)	Lamina IV	C1-C4(6)
Nuclues intermediomedialis (IMM)	Lamina X'nun laterali	C1-L3
Nucleus dorsalis (D)	Lamina VII	T1(2)-L2(3)
Nuclues intermediolateralis (IML)	Cornu laterale	T1-L2(3)
Nucleus lumbaris precerebellaris (LPrCb)	Lamina VII	L1-L5
Nucleus sacralis precerebellaris (SPrCb)	Lamina VII	S1-S5(Co1)
Nucleus parasympathicus sacralis (SPSy)	Lamina VII	S1(2)-S4(5)
Nucleus sacralis commissuralis dorsalis (SDCom)	Canalis centralis'in posterior'u	S1(2)-S5(Co1)

Cerebellum'a projekte olan rhombencephalon'daki ve medulla spinalis'teki hücre grupları, nuclei precerebellares (precerebellar nuclei) olarak adlandırılır (Fu, Tvrdik, Makki, Paxinos ve Watson, 2011). Nucleus cervicalis centralis (CeCv), nucleus dorsalis (D), nucleus lumbaris precerebellaris (LPrCb) ve nucleus sacralis precerebellaris (SPrCb) omurilikte bulunan nuclei precerebellares'i (spinal precerebellar nuclei) oluşturur (Fu, Sengul, Paxinos ve Watson, 2012). Nucleus dorsalis'i (nucleus thoracicus posterior, dorsal column, Clarke'ın sütunu, Clarke'ın nucleus'u, dorsal nucleus, D) İngiliz doktor ve anatomist Jacob Augustus Lockhart Clarke, 1851'de "posterior vesicular column" olarak tanımlanmasına rağmen (Pearce, 1990), Alman cerrah ve anatomist Benedict Stilling, 1859'da omuriliğin dorsal kısmında bulunmasından dolayı "dorsal nucleus" anlamına gelen "dorsal-kern" terimi ile tanımlanmıştır. Birçok araştırmacı tarafından uzun yıllar boyunca D, "Stilling'schen Zellen oder Zellen der Clarke'schen Säulen" (Stilling'in hücreleri veya Clarke'ın sütununun hücreleri) (Waldeyer-Hartz, 1889), "Clarke'sche säulen oder Stilling'scher Kern" (Clarke'ın sütunu veya Stilling'in nucleus'u) (Koelliker, 1896) veya "Stillingi, Clarkii" (Spalteholz, 1909) gibi farklı isimlerle adlandırılmıştır. Ancak günümüzde sıklıkla "nucleus dorsalis", "dorsal nucleus" ve "Clarke'ın sütunu" terimleri tercih edilmektedir (Demircubuk, Candar ve Sengul, 2022). Chang, 1951'de örümcek maymununda D'nin bir kaudal uzantısı olabilecek olan bir hücre grubunu raporladı. 1977 yılında ise Petras, bulgularının Chang'ın bulguları ile uyuştuğunu belirterek rhesus maymununda "Stilling'in hücreleri" (cells of Stilling, St) adını verdiği bir hücre grubunu bildirdi. Bir sene sonra (Snyder, Faull ve Mehler, 1978) sıçanın ve sincap maymununun omuriliğinin sakral ve koksigeal segmentlerinde, Clarke'ın sütununa benzer bir pozisyonda bulunan ancak hücresel mimari ve projeksiyonları açısından farklılık gösteren bir grup hücre tespit edildi. Daha sonra (Molander ve ark., 1984) sıçan omuriliğinin S1-S4 segmentlerinde "ara bölgedeki büyük nöronların medial grubu" (medial group of large neurons in the intermediate zone, MG) olarak bir grup hücre tanımlandı. Günümüzde bu hücre grubu, nucleus sacralis precerebellaris (sacral precerebellar nucleus, Stilling'in sakral nucleusu, SPrCb) olarak ifade edilmektedir. 2013 yılında Sengul ve ark. (2013) ilk defa insan omuriliğinde SPrCb'yi haritalayarak gösterdi (Demircubuk ve ark., 2022). Molander ve ark. aynı zamanda MG'nin sıçan omuriliğinin L1-L3 segmentlerinde de bulunduğunu ifade etmiştir. Bunun ardından bu hücre grubunu Fu ve ark. 2012 yılında

fare, Sengul ve ark. 2013 yılında fare, sıçan, rhesus maymunu, marmoset maymunu ve insan omuriliğinde “nucleus lumbaris precerebellaris” (lumbar precerebellar nucleus) isimlendirmesi yaparak detaylı olarak haritalandırmıştır (Watson, Sengul ve Paxinos, 2022). Bu tarihsel altyapının anlaşılması bu tez araştırmasının önemini ortaya koyacaktır.

Bavyera doğumlu Alman psikiyatri profesörü Franz Nissl (1860-1919) günümüzde "Nissl granülleri, Nissl cisimcikleri, Nissl maddesi" olarak bilinen sinir hücrelerinin daha önce tanımlanmamış bileşenlerini ortaya koydu (Nissl, 1894a). Ardından 3 Haziran 1894 tarihinde Güneybatı Alman Nörologlar ve Psikiyatristler’in (Versammlung der südwestdeutschen Neurologen und Irrenärzte) toplantısında verdiği dersten oluşan "Ueber eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans zur Feststellung der Localisation der Nervenzellen" adlı yayınında (Nissl, 1894b) sinir hücrelerinin lokalizasyonlarının belirlenmesini sağlayacağını ifade ettiği ve günümüzde Nissl histokimyasal boyaması (Nissl staining) olarak bilinen yeni bir boyama tekniğini tanıttı (Bhattacharyya, 2011). Bu tarihten itibaren günümüze kadar Nissl histokimyasal boyama yöntemi, birçok araştırmacı tarafından hücresel mimarinin belirlenmesi (Arnold ve Trojanowski, 1996; Bjarkam, Glud, Orlowski, Sørensen ve Palomero-Gallagher, 2017; de Góis Morais ve ark., 2020; Gioia, Rodella, Petruccioli ve Bianchi, 2000; Gioia ve Bianchi, 1987; Groenewegen, Ahlenius, Haber, Kowall ve Nauta, 1986; Kulesza, 2007) amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır. Bu histokimyasal teknik; krezil viole (genellikle en sık kullanılan), tionin, metilen mavisi veya anilin gibi bazik boyaların ilgili hücrelerdeki nükleik asit içeriğine bağlanması neticesinde nöronlardaki ve glia hücrelerindeki Nissl cisimciklerini ortaya çıkarmaya dayanır (Carter ve Shieh, 2015; Kádár, Wittmann, Liposits ve Fekete, 2009; Watson, Kirkcaldie ve Paxinos, 2010). Bu tekniğin bir kesitteki nöronlar ve glia hücre tipleri olmak üzere tüm hücre topluluğunu değerlendirmeye olanak sağlaması ve daha düşük maliyetli olması yönünden immunohistokimya araştırmalarına göre avantajları bulunur (García-Cabezas, John, Barbas ve Zikopoulos, 2016). Ancak çoğu klasik histolojik boyama tekniğinde olduğu gibi bu teknikte de nöronların uzantılarının tam olarak takip edilmesi pek mümkün değildir (Vints ve ark., 2019).

İmmunohistokimya tekniği Emil Adolf von Behring ve Shibasaburo Kitasato tarafından 4 Aralık 1890 yılında yayımlanan "Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren" adlı araştırmaya dayanmaktadır (Childs, 2014). Bu araştırmacılar aktif bağışıklığa sahip hayvandan alınan bir serumun diğer bir hayvanda difteri toksinini nötralize edebileceğini ortaya koydular (Llewelyn, Hawkins ve Russell, 1992). Ancak onlar bir maddeye değil, bir aktiviteye vurgu yaptılar (Lindenmann, 1984). Bir sene sonra Paul Ehrlich (1891) "antikörper" (antikor) terimini kullandı (Lindenmann, 1984). Ardından Rudolph Kraus 1897'de solüsyondaki antijen-antikor reaksiyonunu saptayan presipitin testini geliştirdi (Childs, 2014). Daha sonra Coons, Creech ve Jones 1941'de direkt immunofloresans tekniğini kullandı (Burnett, Guichard ve Barale, 1997). Direkt yöntemin uygulanırken fazla miktarda birincil antikor (primer antikor) gerektirmesinden ve antikorların aynı zamanda diğer antikor için bir antijen olabileceğinin anlaşılmasından sonra indirekt yöntem geliştirildi (Childs, 2014). Bunun ardından birçok farklı araştırmacı çeşitli türlerin sinir sisteminde immunohistokimyasal yöntemi uygulayarak ilgili bölgenin nörokimyasal içerik dağılımını araştırdılar. Günümüzde immunohistokimyasal yöntemin spesifik olarak antijen-antikor reaksiyonu ortaya çıkararak ilgili molekülün dokudaki dağılımını görselleştirmeyi sağlaması sinirbilim ve patoloji araştırmalarında sıkça kullanılmasını sağlamıştır (Kim, Roh ve Park, 2016).

Bu bilimsel arka plana dayanarak tez araştırmasında; insan omuriliğinde detaylı olarak ilk defa D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin, Nissl histokimyasal boyaması ile hücresel mimarileri, NADPH-d boyaması ve immunohistokimyasal boyamalar ile nörokimyasal içerikleri ortaya konmuştur.

1.1. Araştırmanın Problemi

Bu araştırma D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin yapılan literatür taraması sonucunda detaylı bir hücresel mimari ve nörokimyasal içerik araştırması bulunmaması nedeniyle tasarlanmıştır. İlgili nucleus'lara ait hücresel mimari ve nörokimyasal içeriklerin histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalarla ortaya konmasıyla bu nucleus'ların işlevlerine dair çıkarımların yapılması ve diğer hayvan türleri ile karşılaştırmalı anatomisinin de değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

1.2. Araştırmanın Sorusu

İnsan omuriliğinde tanımlanmış olan D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin hücresel mimarileri nasıldır ve nörokimyasal içerikleri nelerdir?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

H_0: İnsan omuriliğinde tanımlanmış olan nucleus dorsalis'e, nucleus lumbaris precerebellaris'e ve nucleus sacralis precerebellaris'e ait olan nöronlar; kalbindin (calbindin, Cb), kalretinin (calretinin, Cr), parvalbumin (Pv), kolin asetil transferaz (ChAT), kokain ve amfetaminle düzenlenen transkript (CART), nöronal nükleer protein (NeuN), glutamik asit dekarboksilaz 65/67 (GAD 65/67), substans P (SP), serotonin (5-HT), enkefalin (ENK) ve nitrik oksit sentaz (NOS) nörotransmitterlerini kullanmamaktadır.

H_1: İnsan omuriliğinde tanımlanmış olan nucleus dorsalis'e, nucleus lumbaris precerebellaris'e ve nucleus sacralis precerebellaris'e ait olan nöronlar; Cb, Cr, Pv, ChAT, CART, NeuN, GAD 65/67, SP, 5-HT, ENK ve NOS nörotransmitterlerini kullanmaktadır.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Sinirbilim araştırmalarında uzun yıllardır hücresel mimarinin (cytoarchitecture) ortaya konması amacıyla Nissl histokimyasal boyama yöntemi tercih edilmiştir. Bu nedenle bu araştırmada, Nissl histokimyasal boyama yönteminin araştırılan nucleus'ların hücresel mimarisinin belirlenmesi amacıyla uygun bir yöntem olduğu varsayılmıştır.

İmmunoreaktivitenin belirlenmesi için farklı zamanlarda çeşitli araştırmacılar tarafından optimize edilmiş protokoller kullanılarak immunohistokimyasal boyama tekniğinden yararlanılmıştır. Bundan dolayı bu araştırmada, immunoreaktivitenin ortaya konması amacıyla optimize edilmiş immunohistokimyasal boyama protokolünün uygun bir yöntem olduğu varsayılmıştır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Kriyostat ile elde edilen ve serbest şekilde (free floating) immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlere ilgili işlemler uygulanırken kimi zamanlarda kesitlerde -perfüzyonun diğer segmentlere göre daha zayıf olmasından dolayı özellikle torakal segmentlerde- kısmi doku ayrılmalarının meydana geldiği gözlenmiştir.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu araştırma ile günümüze kadar nörokimyasal içeriği ile ilgili detaylı bir araştırma bulunmayan D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin; Nissl histokimyasal boyaması, NADPH-d histokimyasal boyaması ve immunohistokimyasal (Kalbindin (Cb), kalretinin (Cr), parvalbumin (Pv), kolin asetiltransferaz (ChAT), kokainle ve amfetaminle düzenlenmiş transkript (CART), nöronal nükleer protein (NeuN), GAD 65/67, substans P (SP), serotonin (5-HT), enkefalin (ENK)) boyama neticesinde hücresel mimarilerin ve nörokimyasal özelliklerin ortaya konulması hedeflenmiştir. Böylelikle ilgili nucleus'ların nörokimyasal belirteçlerinin anatomik ve fonksiyonel dağılımının belirlenmesi, bu nucleus'ların cerebellum üzerindeki etkilerine vurgu yapılabileceği gibi diğer türlerle olan farklıları ortaya çıkaracaktır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Kalbindin, Kalretinin ve Parvalbumin

Kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) yaygın olarak bulunan ve çok sayıda hücresel fonksiyonun düzenlenmesini sağlayan hücre dışı ve hücre içi bir habercidir (Berridge, Lipp ve Bootman, 2000; Stojilkovic, Tomić, Koshimizu ve van Goor, 2000). Heterojen ve geniş bir protein grubu olan kalsiyum bağlayıcı proteinler (CBPs) (Yáñez, Gil-Longo ve Campos-Toimil, 2012), hücresel işlevlerin gerçekleştirilmesinde temel belirleyicileri olmalarının yanı sıra nöronal alt popülasyonlar için kullanışlı anatomik belirteçlerdir (Zhang ve ark., 2014). Kalsiyum bağlayıcı proteinlerin bir alt grubu olan kalsiyum tamponları (Schwaller, 2010), sitozoldeki kalsiyumun devamlılığını oluşturur (Gilabert, 2012). Kalsiyum tamponlarından olan kalbindin, parvalbumin ve kalretinin (Schwaller, 2010), nöronal alt grupların anatomik ve fonksiyonel olarak ayrıştırılabilmesi için kullanılan ve kalsiyum bağlayıcı proteinler sınıfına dâhil olan anatomik belirteçlerdir (Zhang ve ark., 2014). Farklı araştırmacılar tarafından çeşitli türlerin merkezi sinir sisteminde kalbindin **(Tablo 3)**, kalretinin **(Tablo 4)** ve parvalbumin **(Tablo 5)** dağılımı ortaya konmuştur.

2.2. Kolin Asetil Transferaz (ChAT)

Asetilkolin reseptörleri, metabotropik muskarinik ve iyonotropik nikotinik reseptörler olmak üzere iki temel alt formdan oluşur (Albuquerque, Pereira, Alkondon ve Rogers, 2009). Muskarinik reseptörler, insan omuriliğinde özellikle lamina II ve IX'da yoğun olmak üzere lamina X hariç tüm laminalarda bulunurken (Scatton, Dubois, Javoy-Agid ve Camus, 1984) nikotinik reseptörler laminae II, III, IX ve X'da bulunur (Gillberg, d'Argy ve Aquilonius, 1988). Gillberg ve Aquilonius (1985) ALS vakalarında muskarinik reseptör bağlanma alanlarının motor nöron bölgelerinde belirgin düzeyde azaldığını bildirmişlerdir. Asetilkolinin biyosentezinden sorumlu enzim olan kolin asetiltransferaz (ChAT), kolinerjik nöronların somasında sentezlenir (Oda, 1999). ChAT, kolinerjik nöronların dağılımının belirlenmesinde sıkça kullanılan bir belirteçtir (Sengul ve Watson, 2011) **(Tablo 6**).

2.3. Nöronal Nükleer Protein (NeuN)

1992 yılında keşfedilen (Mullen, Buck ve Smith, 1992) nöronal nükleer protein (NeuN), memelilerin merkezi sinir sistemininde yer alan nucleus'ların çoğunluğunda bulunur. Bu proteinin, sinir dokusu dışında ve glia hücrelerinde tespit edilmemesi onu spesifik bir nöronal belirteç hâline getirmiştir (Gusel'nikova ve Korzhevskiy, 2015). NeuN immunohistokimyasal boyamasının nöronları, glia hücrelerinden ayrı olarak ortaya koyması Nissl histokimyasal boyamasına göre avantaj sağlar (Watson ve ark., 2010).

2.4. Kokain ve Amfetaminle Düzenlenen Transkript (CART)

Spiess, Villarreal ve Vale 1981 yılında koyun hypothalamus'undan somatostatin benzeri bir polipeptidin izolasyonunu gerçekleştirdi. Bunun CART mRNA dizisine kısmen karşılık geldiği düşünülmektedir. Ardından Douglass ve ark. 1995 yılında polimeraz zincir reaksiyonu ile CART'ı keşfettiler (Ahmadian-Moghadam, Sadat-Shirazi ve Zarrindast, 2018).

Hypothalamus'a ait olan çekirdeklerde yaygın olarak bulunan CART'ın **(Tablo 7**) enerji homeostazıyla ve nöroendokrin regülasyonla ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak CART'ın duysal, motor ve limbik sistem işlevleriyle ilgili farklı bölgelerde bulunması, bağımlılık, ağrı, ödül davranışı, öğrenme, hafıza, uyku gibi birbirinden çok farklı fonksiyonlarla bağlantısı henüz birbiriyle ilişkilendirilememiştir (Subhedar, Nakhate, Upadhya ve Kokare, 2014).

2.5. Glutamik Asit Dekarboksilaz 65/67 (GAD 65/67)

Merkezî sinir sisteminde, inhibitör bir nörotransmitter olan γ-aminobütirik asit'i (GABA) bulunduran nöronlarda eksprese edilen ve GAD65, GAD67 olmak üzere iki temel izoformu bulunan glutamat dekarboksilaz (GAD) enzimi, L-glutamik asidin GABA'ya dönüşümünü katalize eder (Li ve Xu, 2008; Tavazzani ve ark., 2014).

Mackie, Hughes, Maxwell, Tillakaratne ve Todd (2003) sıçan omuriliğinde GAD 67 immunoreaktivitesinin, laminae I-III, X'da yoğun olmak üzere tüm laminalarda bulunduğunu bildirmişlerdir. Yoğun GAD65 immunoreaktivitesinin ise laminae I-III'de, laminae IV-VI'nın özellikle medial kısmında ve lamina X'da bulunduğunu bildirirdiler. Ayrıca laminae VII, VIII'de birkaç güçlü profil gözlemlediklerini ve lamina IX'un immunoreaktivitesinin ayrı kümeler hâlinde bulunduğunu gösterdiler.

2.6. Substans P (SP)

On bir adet amino asitin diziliminden oluşan bir nöropeptit olan substans P (Chang ve Leeman, 1970; Gautam ve ark., 2016; Haberberger, Barry, Dominguez ve Matusica, 2019; Severini, Improta, Falconieri-Erspamer, Salvadori ve Erspamer, 2002), merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunur (Sengul ve Watson, 2011) **(Tablo 8**). Taşikinin (tachykinin) ailesine ait olan SP'nin, NK1R'i aktive ettiği bilinmektedir (Schank ve Heilig, 2017). Sıçanda, laminae III ve IV'te NK1R eksprese eden ve laminae I-II'e uzantılar gönderen nöron popülasyonu (Bleazard, Hill ve Morris, 1994; Littlewood, Todd, Spike, Watt ve Shehab, 1995; Mantyh ve ark., 1995) nucleus reticularis lateralis'e, lateral parabrachial nucleus'a, substantia grisea periaquaeductalis'e (Todd, McGill ve Shehab, 2000) ve thalamus'a (Marshall, Shehab, Spike ve Todd, 1996) projekte olur (Polgár, Thomson, Maxwell, Al-Khater ve Todd, 2007).

2.7. Serotonin (5-HT)

Nuclei raphe'de yaklaşık yarım milyon sayıda bulunan serotonin içeren nöronlar beynin çeşitli merkezlerine projekte olur (Hornung, 2003). Sıçanda, nucleus magnus raphes'te, nucleus obscurus raphes'te ve nucleus pallidus raphes'te yer alan serotonin içeren nöronların omuriliğe projekte olduğu bilinmektedir (Bowker, Westlund ve Coulter, 1981). Memelilerin omuriliğinde duysal, motor ve otonomik işlevlerin modülasyonunda önemli bir rol üstlenen serotoninin (Zhang, 2016) **(Tablo 9**) Parkinson hastalığında kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (Scatton ve ark, 1986; Sengul ve Watson, 2011).

2.8. Enkefalin (ENK)

Tarihsel gelişime bakıldığında; öncelikle beyinde opioid reseptör alanlarında bir agonist olarak hareket eden endojen bir maddenin tanımlanmasının (Hughes, 1975; Terenius ve Wahlstrom, 1974; Terenius ve Wahlström, 1975) ardından bu madde karakterize edilmiş ve beyinden köken almasından dolayı "enkephalin" olarak adlandırılmıştır (Grossman ve Clement-Jones, 1983; Hughes ve ark., 1975; Hughes, Smith, Morgan ve Fothergill, 1975). Günümüzde merkezi ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak bulunduğu bilinen opioid reseptörleri (Machelska ve Celik, 2020); DOP, KOP ve MOP olarak üç ana tipe ayrılır (Pathan ve Williams, 2012). Substantia grisea periaquaeductalis gibi ağrıyı modüle eden bölgelerde eksprese edilen bu reseptörlerin (Sobczak, Sałaga, Storr ve Fichna, 2014), met- ve leu-enkefalin, dinorfin-A ve B, neo-endorfin ve β-endorfin olmak üzere endojen peptit ligandları bulunur (Henriksen ve Willoch, 2008). DOP'a bağlanan enkefalinin (Pathan ve Williams) merkezi sinir sistemindeki dağılımı, uzun yıllardır çeşitli araştırmaların konusu olmuştur **(Tablo 10**).

2.9. Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

Scherer-Singler, Vincent, Kimura ve McGeer 1983'te diyaforaz aktivitesine bağlı olarak nöron popülasyonlarını seçici olarak boyayan NADPH-d histokimyasal tekniğini tanımlamıştır. 1990'da ise NO sentezini gerçekleştiren enzim olan nitrik oksit sentazın (NOS), sıçan beynindeki lokalizasyonun belirlenmesinin (Bredt, Hwang ve Snyder, 1990) ardından NADPH-d histokimyasal tekniğininin, NO üreten nöronlara yönelik spesifik bir histokimyasal belirteç olduğu ortaya çıkmıştır (Dawson, Bredt, Fotuhi, Hwang ve Snyder, 1991; Elphick, 1997; Hope, Michael, Knigge ve Vincent, 1991). Günümüzde NOS'un, endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve dendritik dikenlerde yer alan nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) olmak üzere üç formu olduğu bilinmekle (Zhou ve Zhu, 2009) birlikte NADPH-d histokimyasal yönteminin, sinir sistemindeki NOS dağılımının **(Tablo 11**) ortaya konması amacıyla kullanılan en yaygın yöntem olduğu vurgulanmaktadır (Elphick, 1997).

Tablo 3: Çeşitli türlerin merkezi sinir sisteminde Cb'nin dağılımı.

Tür	Konum	Referans
Salamander ve mudpuppy	Retina	(Deng ve ark., 2001)
Zebra balığı	Canalis centralis'in etrafındaki nöronal progenitör hücreler	(Berg, Bertuzzi ve Ampatzis, 2018)
Gekko gecko	Omurilik – laminae I-X	(Morona, López ve González, 2006)
On günlük sıçan yavrusu	Cortex cerebelli'deki Purkinje ve Golgi hücreleri	(Wierzba-Bobrowicz, Lewandowska, Stępień ve Szpak, 2011)
Sıçan	Omurilik – laminae I-X, IB, CeCv, LSp, IML	(Ren ve Ruda, 1994)
Sıçan	Omurilik – laminae I-IV	(Antal ve ark., 1991)
Sıçan	PCRtA, PnC, SubCV, MdD, DPGi, IRt, Gi	(Goodchild ve ark., 2000)
Kedi	Omurilik – laminae I-VIII, X	(Anelli ve Heckman, 2005)
İnsan	Cortex cerebelli'nin tüm katmanları	(Flace ve ark., 2014)

Tablo 4: Çeşitli türlerin merkezi sinir sisteminde Cr'nin dağılımı.

Tür	Konum	Referans
Salamander ve mudpuppy	Retina	(Deng ve ark., 2001)
Gekko gecko	Omurilik – laminae I-X	(Morona ve ark., 2006)
Fare	Omurilik – laminae I-VI	(Sengul, Liang, Furlong ve Paxinos, 2020)
Sıçan	Omurilik – laminae I-VIII, X, IB, CeCv, LSp, IML, IMM	(Ren ve Ruda, 1994)
Sıçan	Gyrus cinguli, tuber cinereum, nuclei raphes medulla oblongatae, LM, ZI, SNC, SCh	(Résibois ve Rogers, 1992)
Sıçan	Nucleus paraventricularis hypothalami, SO	(Arevalo ve ark., 1993)
Kedi	Omurilik – laminae I-VIII, X, IML	(Anelli ve Heckman, 2005; Veshchitskii, Musienko ve Merkulyeva, 2021)

Tablo 5: Çeşitli türlerin merkezi sinir sisteminde Pv'nin dağılımı.

Tür	Konum	Referans
Salamander ve mudpuppy	Retina	(Deng ve ark., 2001)
Sıçan	Omurilik – laminae I-IV[2]	(Antal ve ark., 1991)
Sıçan	Omurilik – laminae V-VIII, X, IB, CeCv, IMM[3]	(Ren ve Ruda, 1994)
Kedi	Omurilik – laminae III-VIII, X	(Anelli ve Heckman, 2005)

[2] Antal ve ark. lamina I'de yalnızca bir adet parvalbumin immunoreaktivitesi gösteren nöron olduğunu not etmiştir.

[3] Ren ve Ruda (1994), lamina II'nin dış kısmında ve lamina III'ün çoğu kısmında parvalbumine immunoreaktif olan hücreleri gözlemlemediklerini ancak lamina II ve III'ün sınırı boyunca bu hücreleri gözlemlediklerini not etmiştir.

Tablo 6: Çeşitli türlerin merkezi sinir sisteminde ChAT'nin dağılımı.

Tür	Konum	Referans
Sıçan	Omurilik – laminae IX, X, ICI, cornu posterius	(Barber ve ark., 1984)
Sıçan	Omurilik – laminae III-V, VII-X, IMM	(Borges ve Iversen, 1986)
Sıçan	Cortex cerebri, IP	(Houser, Crawford, Barber, Salvaterra ve Vaughn, 1983)
Fare	Omurilik – laminae I-VI	(Sengul ve ark., 2020)
Fare	Ganglion spinale	(Matsumoto, Xie, Inoue ve Ueda, 2007)
Domuz	Omurilik – laminae IX, X, IML, IMM	(Calka, Zalecki, Wasowicz, Arciszewski ve Lakomy, 2008)
Rhesus ve marmoset maymunu	CeCv	(Sengul ve ark., 2013)
İnsan	Cornu posterius'ta ve cornu anterius'ta yoğun ChAT aktivitesi	(Aquilonius, Eckernäs ve Gillberg, 1981)

Tablo 7: İnsanın ve sıçanın merkezi sinir sisteminde CART'ın dağılımı.

Tür	Konum	Referans
Sıçan	Hypothalamus, glandula pituitaria	(Koylu ve ark., 1997)
Sıçan	Omurilik – laminae I, II'de, LSp'de, PAG'da, nucleus caeruleus'da, pars compacta substantiae nigrae'de yoğun ve çok yoğun immunoreaktivite	(Koylu, Couceyro, Lambert ve Kuhar, 1998)
İnsan	Pulvinar thalami, nucleus mediodorsalis thalami, zona incerta, nucleus tuberomamillaris, nucleus arcuatus hypothalami	(Hurd ve Fagergren, 2000)
Sıçan ve insan	Nucleus paraventricularis hypothalami, nucleus mediodorsalis thalami, nucleus supraopticus	(Elias ve ark., 2001)

Tablo 8: Çeşitli türlerin merkezi sinir sistemindeki SP'nin dağılımı.

Tür	Konum	Referans
Güvercin	Retina'daki amakrin hücreleri	(Karten ve Brecha, 1980)
Sıçan	Omurilik – laminae I-III	(Hunt ve ark., 1981)
Sıçan	En yoğun lamina I'de olmak üzere tüm laminalarda SP pozitif lifler	(Gibson, Polak, Bloom ve Wall, 1981)
Sıçan	Omurilik – laminae I-III'te ENK ile kolokalize	(Ribeiro-da-Silva, Pioro ve Cuello, 1991)
Sıçan	LSp	(Battaglia ve Rustioni, 1992)
Kedi	LatC	(Giesler ve Elde, 1985)
İnsan	IMM, IML	(Lamotte ve de Lanerolle, 1981)
İnsan	Omurilik – laminae I-VII, IX	(de Lanerolle ve LaMotte, 1982)
İnsan	Tüm laminalarda SP pozitif lifler	(Schoenen, Lotstra, Vierendeels, Reznik ve Vanderhaeghen, 1985)

Tablo 9: Çeşitli türlerin merkezi sinir sistemindeki 5-HT'nin dağılımı.

Tür	Konum	Referans
Sıçan ve kedi	PAG, IP	(Takeuchi, Kimura ve Sano, 1982)
Sıçan	Omurilik – laminae I-IV	(Marlier ve ark., 1991)
Sıçan	Nucleus magnus raphes, nucleus obscurus raphes ve nucleus pallidus raphes	(Skagerberg ve Björklund, 1985)
Kedi	Omurilik – laminae I, II'de serotonerjik aksonlar	(Ruda, Coffield ve Steinbusch, 1982)
Macaca fascicularis	Omurilik – lamina X'da ve IMM'de serotonerjik sonlanmalar	(Lamotte, 1988)

Tablo 10: Çeşitli türlerin merkezi sinir sistemindeki ENK'in dağılımı.

Tür	Konum	Referans
Fare	Omurilik – Laminae I-III, V	(Aronin, DiFiglia, Liotta ve Martin, 1981)
Sıçan	LSp	(Cliffer, Urca, Elde ve Giesler, 1988)
Sıçan	CeCv	(Ikeda ve ark., 1995)
Sıçan	En yoğun lamina II ve X'da olmak üzere tüm laminalarda ENK pozitif lifler	(Gibson ve ark. 1981)
Sıçan	En yüksek immunofloresan yoğunluğa sahip alanlardan birkaçı: Omurilik – laminae I ve II, corpus striatum ve PAG	(Simantov, Kuhar, Uhi ve Snyder, 1977)
Sıçan	CA2, thalamus, nucleus caeruleus	(Sar, Stumpf, Miller, Chang ve Cuatrecasas, 1978)
Sıçan	LDCom ve SDCom	(Romagnano, Braiman, Loomis ve Hamill, 1987)
Kedi	Omurilik – laminae I, II, V-VII ve X	(Glazer ve Basbaum, 1981)
Macaca fascicularis	Hypothalamus	(DiFiglia ve Aronin, 1984)
İnsan	Tüm laminalarda ENK pozitif lifler	(Schoenen ve ark., 1985)

Tablo 11: Çeşitli türlerin merkezi sinir sistemindeki NOS'un dağılımı.

Tür	Konum	Referans
Sıçan	PAG, IP, nucleus posterior raphes	(Leigh, Connick ve Stone, 1990)
Sıçan	Putamen, globus pallidus, pallidum ventrale	(Kayalıoğlu, Gövsa ve Ertürk, 1999)
Fare, sıçan, kedi, sincap maymunu	Omurilik – laminae I, II, X, IML ve SPSy	(Dun ve ark., 1993)
Fare	Omurilik – laminae I-VI	(Sengul ve ark., 2020)
İnsan	Cornu anterius'ta zayıf, cornu posterius'ta güçlü immunoreaktivite	(Phul, Shaw, Ince ve Smith, 2000)
İnsan	Claustrum	(Hinova-Palova ve ark., 2014)

3. Gereç ve Yöntem

Tez araştırması, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun 09.09.2021 tarihindeki 21-9T/7 numaralı onay kararının (Ek 1) ardından Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Ana Bilim Dalı'nın Nöroanatomi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Araştırma kapsamında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Ana Bilim Dalı'nın kadavra arşiv materyaline ait olan %10 formalin ile fiksasyonu ve %30 sukroz ile kriyoproteksiyonu yapılmış erkek T1-T12, L1-L5, S1-S5 ve Co1 insan omurilik segmentleri kullanılmıştır.

3.1. Araştırma Kapsamında Kullanılan Gereçler

Tez araştırması sırasında; çeker ocak **(Şekil 1**), kriyostat **(Şekil 2**), distile su cihazı **(Şekil 3**), orbital karıştırıcı, doku kültürü plakası (well plate) **(Şekil 4**), hassas terazi **(Şekil 5**), manyetik karıştırıcı, pH metre **(Şekil 6)**, otomatik pipet seti **(Şekil 7)**, Leica DM4000B mikroskobu, etüv (Kenton PX-40 SN 60106001), immunohistokimyasal ve histokimyasal boyama protokolleri için çeşitli kimyasallar **(Tablo 12**), serumlar ve antikorlar **(Tablo 13)** kullanılmıştır.



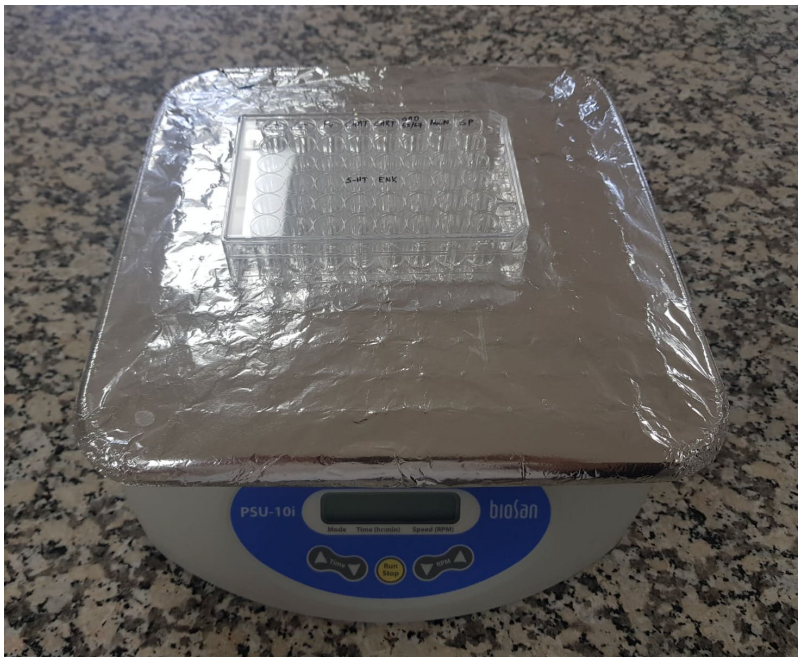
Şekil 1: Çeker ocak (Delta Lab, İstanbul, Türkiye).



Şekil 2: Kriyostat (Leica CM1950, Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya).



Şekil 3: Distile su cihazı (MP Minipure Basic M UP, Medikal Endüstriyel Sistemler, Ankara, Türkiye).



Şekil 4: Orbital karıştırıcı (bioSan PSU-10i, Medical Biological Research and Technologies, Riga, Letonya) ve doku kültürü plakası (well plate).



Şekil 5: Hassas terazi (Kern Abj 220-4NM, Kern, Almanya).



Şekil 6: Manyetik karıştırıcı (MK 318, Nüve, Ankara, Türkiye) ve pH metre (HI 2211, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, ABD).



Şekil 7: 1-10 µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl hacme sahip olan otomatik pipet seti (Finnpipette F2, Thermo Scientific, MA, ABD).

Tablo 12: Araştırma kapsamında kullanılan kimyasalların listesi.

Kullanılan Kimyasal	Kimyasalın Formülü	Marka ve Katalog Numarası
0.01 M PBS'nin Hazırlanması		
Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat	$Na_2HPO_4.2H2O$	Merck KGaA, 1.06580.1000
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat	$NaH_2PO_4.H2O$	Merck KGaA, 1.063646.1000
Sodyum klorit	NaCl	Merck KGaA, 1.06400.5000
Potasyum klorit	KCl	Merck KGaA, 1.04936.1000
Nissl Histokimyasal Boyaması		
Cresyl violet asetat	$C_{18}H_{15}N_3O_3$	Sigma Life Science, C5042-10G
Glasiyal asetik asit	$C_2H_4O_2$	Carlo Erba, 401424
Etanol (≥ 99.5)	C_2H_5OH	Tekkim, TK.200655.05001
Ksilen (xylene)	$C_6H_4(CH_3)_2$	Merck KGaA, 1.08685.2500

Kullanılan Kimyasal	Kimyasalın Formülü	Marka ve Katalog Numarası
NADPH-d Histokimyasal Boyaması		
NBT	$C_{40}H_{30}N_{10}O_6 \cdot 2Cl$	Sigma Aldrich, N6876
NADPH tetrasodyum tuz hidrat	$C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_2.xH_2O$	AK Scientific, 6179AH
İmmunohistokimyasal Boyamalar		
NGS Bloklama Solüsyonu		Vector Laboratories, S-1000-20
NRS Bloklama Solüsyonu		Vector Laboratories, S-5000-20
Hidrojen peroksit solüsyonu (%30)	H_2O_2	Carlo Erba, 412072
Triton X-100	t-Oct-C_6H_4-$(OCH_2CH_2)_xOH$,x= 9-10	Fluka, 93420
Streptavidin peroksidaz		Thermo Scientific, TS-125-HR
DAB tablet	$(NH_2)_2C_6H_3C_6H_3(NH_2)_2 \cdot 4HCl$	Sigma-Aldrich, D5905
Preparatların Kapatılması		
Entellan		Merck KGaA, 1.07961.0500

Tablo 13: Araştırma kapsamında kullanılan serum ve antikorların listesi.

Primer Antikor	**Marka ve Katalog Numarası**	**Biyotinli Sekonder Antikor**	**Marka ve Katalog Numarası**
Cb	Santa Cruz, SC-265360	Goat-anti mouse	Chemicon, AP124B
Cr	Santa Cruz, SC-365956		
GAD 65/67	Santa Cruz, SC-365180		
ChAT	Santa Cruz, SC-55557		
Pv	Abcam, AB-32895	Goat anti-polyvalent (Universal Sekonder)	TP-125-BN
CART	Phoenix Pharmacoeticals, H-003-62	Goat-anti rabbit	Chemicon, BA-1000
NeuN	Sigma Aldrich, ABN78		
ENK	Abcam, AB-22620		
SP	Abcam, AB-7340	Rabbit-anti rat	Vector Laboratories, BA-4001
5-HT	Sigma Aldrich, MAB-352		

3.2. Araştırma Kapsamında Kullanılan Yöntemler

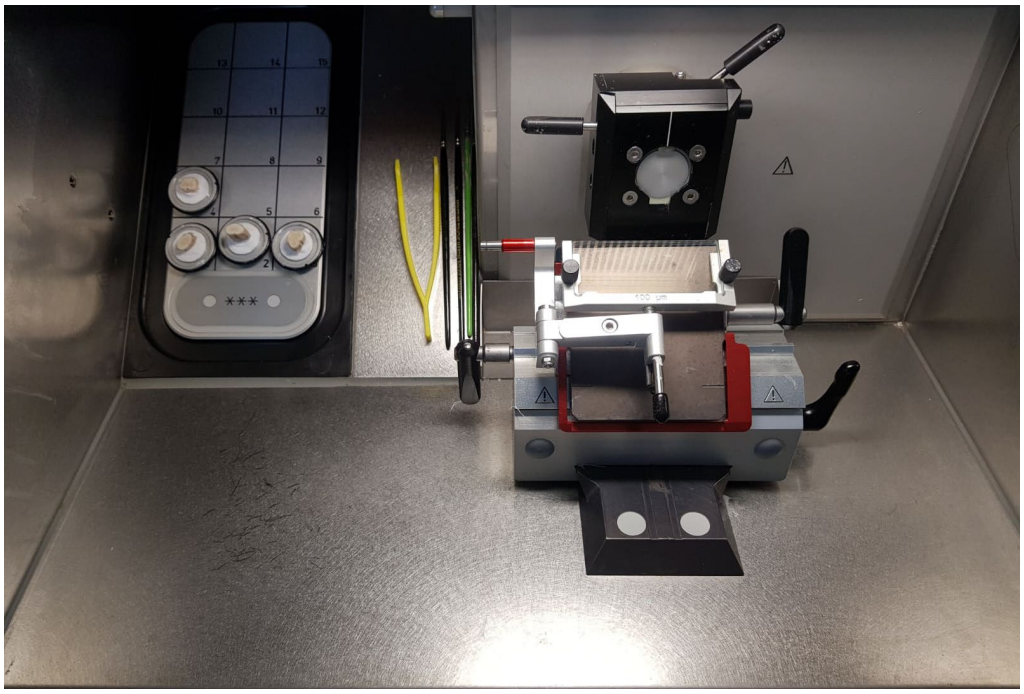
3.2.1. Omurilik Segmentlerinden Kesitlerin Alınması

İmmunohistokimyasal ve histokimyasal boyamaların yapılması amacıyla öncesinde %30 sukroz çözeltisi ile kriyoproteksiyonu sağlanmış olan insan omuriliğinin T1-T12, L1-L5, S1-S5 ve Co1 segmentlerinden, doku dondurma ortamında (tissue freezing medium) tabakalara sabitlendikten sonra, kriyostat aracılığıyla immunohistokimyasal boyamalar için 30 µm kalınlığında Nissl histokimyasal boyaması ve NADPH-d histokimyasal boyaması için 50 µm kalınlığında transvers kesitler alındı **(Şekil 8**). Kriyostatta alınan kesitler, içi 0.01 M PBS solüsyonu[4] ile doldurulmuş olan kuyucuklara aktarıldı.

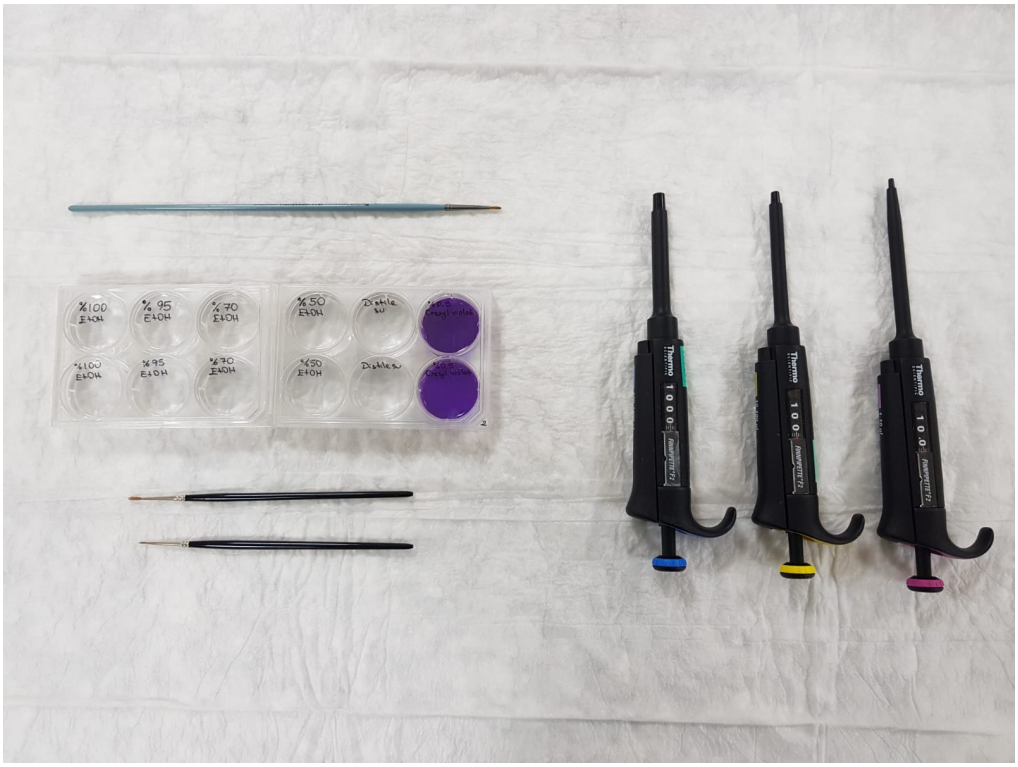
3.2.2. Nissl Histokimyasal Boyaması

Nucleus dorsalis'in, nucleus lumbaris precerebellaris'in ve nucleus sacralis precerebellaris'in hücresel mimarisinin analiz edilmesi amacıyla kriyostat ile elde edilen 50 µm'lik transvers kesitlere Nissl histokimyasal boyaması uygulandı. Başlangıçta hassas terazi aracılığıyla 0,5 g tartılan cresyl violet asetat'a hacimce 10 ml'e tamamlanana kadar distile su eklendi. Ardından homojenize edilmesi amacıyla cresyl violet asetat, manyetik karıştırıcıya alındı. Daha sonra pH metrede pH 3.9'a ayarlanana kadar glasiyal asetik asit eklendi. Solüsyonun tortulardan arındırılması için çözelti filtre edildi. Son olarak farklı konsantrasyonlarda etanol solüsyonları hazırlandı **(Şekil 9**). Nissl histokimyasal boyamasının aşamaları **(Tablo 14**) uygulandıktan sonra kesitler Entellan ile kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.

[4] 0.01 M PBS solüsyonu hazırlanırken; hassas terazide tartılarak hazırlanan 1,441 g di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat, 0,296 g sodyum dihidrojen fosfat monohidrat, 8 g sodyum klorit ve 0,2 g potasyum klorit karışımına distile su eklenerek hacim bir litreye tamamlandı ve pH metre ile pH 7.4'e ayarlandı.



Şekil 8: Dokuların kriyostatta sabitlenmesi ve transvers kesitlerin alınması.



Şekil 9: Nissl histokimyasal boyamasının uygulama alanı.

Tablo 14: Nissl histokimyasal boyamasının uygulama aşamaları.

Aşama	Aşamanın Süresi	Amaç
%100 etanol	1 dak.	Hidratasyon
%95 etanol	1 dak.	
%70 etanol	1 dak.	
%50 etanol	1 dak.	
Distile su	Dokunun batırılıp çıkarılması	
%0.5 cresyl violet solüsyonu	10 dak.	Hücrelerin boyanması
Distile su	Dokunun batırılıp çıkarılması	Dehidratasyon
%50 etanol	1 dak.	
%70 etanol	1 dak.	
%95 etanol	1 dak.	
%100 etanol	1 dak.	
Ksilen	5 dak.	Şeffaflaştırma

3.2.3. NADPH-d Histokimyasal Boyaması

D'de, LPrCb'de ve SPrCb'de, NOS içeriğini araştırmak amacıyla NADPH-d boyaması uygulandı. Kriyostatta alınan 50 µm kalınlıktaki kesitler, 0.1 M PB içeren kuyucuklara aktarıldı. Ardından otomatik pipet seti kullanılarak üç defa 0.1 M PB yıkaması yapıldı. Yıkamaların ardından dokular, 5.400 µl PB, 600 µl %0.3 Triton-X-100'den oluşan solüsyona alındı. Doku plakası, yirmi dakika 37°C etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından var olan solüsyon kuyucuklardan çekilerek, 3 ml 0.1 M PB içinde bulunan 3 mg NADPH tetrasodyum tuz hidrat, 500 µl distile su içerisinde bulunan 2 mg nitroblue tetrazolium (NBT) ile hazırlanan 300 µl NBT solüsyonu ve 300 µl %0.3 Triton X-100'den oluşan ve karanlık ortamda hazırlanan solüsyon, kuyucukların içerisinde bulunan dokulara eklendi[5]. Bir saat süreyle 37°C etüvde yapılan inkübasyonun ardından dokular, 0.1 M PB'de yıkandı. Son olarak dokular lama alındıktan sonra Entellan ile kapatıldı.

[5] Histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalar birden fazla çalışma (run) sonrasında tamamlanmıştır. Bu nedenle solüsyon miktarları bir çalışmada kullanılan örnek oranları ifade etmektedir. Yapılan çalışmanın içerdiği kesit sayısına göre solüsyon miktarı ayarlanmıştır.

3.2.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar

Cb, Cr, Pv, GAD 65/67, ChAT, CART, NeuN, SP, 5-HT ve ENK belirteçlerine karşı gelişen immunoreaktivitenin değerlendirilmesi amacıyla ilgili omurilik segmentleri serbest bir şekilde (free floating) immunohistokimyasal olarak boyandı. Kriyostat aracılığıyla 30 µm kalınlıkta elde edilen kesitler, fırça yardımıyla içinde 0.01 M PBS bulunan kuyucuklara aktarıldı. Ardından üç defa 10'ar dakika 0.01 M PBS ile yıkandı. En son yıkamanın ardından kuyucukların içindeki 0.01 M PBS tamamen çekildi ve %0,3'lük H_2O_2 **(Tablo 15)** dokuların bulunduğu kuyucuklara eklendi. Doku kültürü plakası (well plate), karanlık ortamda orbital karıştırıcının üzerinde 50 rpm hızda 30 dakika muamele edildi. Ardından kuyucuklardaki %0,3'lük H_2O_2 otomatik pipet ile tamamen çekildikten sonra üç defa 10'ar dakika 0.01 M PBS boyaması yapıldı. Son 0.01 M PBS yıkamasının ardından dokulara, %10'luk bloklama serumu eklendi ve iki saat orbital karıştırıcı üzerinde 50 rpm hızda oda sıcaklığında muamele edildi. İki saatin ardından bloklama serumları kuyucuklardan çekildikten sonra uygun konsantrasyonlarda hazırlanan primer antikor solüsyonları **(Tablo 16)** kuyucuklara eklendi. Solüsyonun dokunun her bir bölgesine eşit miktarda yayılabilmesi amacıyla fırça ile doku üzerinde düzeltmeler yapılarak doku katlanmaları engellendi. Dokuların kurumasının engellenmesi için doku kültürü plakası streç film ile kaplandıktan sonra +4 derecede orbital karıştırıcı üzerinde 48 saat inkübe edildi.

48 saatlik inkübasyonun ardından üç defa 10'ar dakikalık 0.01 M PBS yıkaması yapıldı. Yıkamaların ardından primer antikorlara uygun sekonder antikorlar **(Tablo 17)** ile iki saat orbital karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında iki saat muamele edildi. Daha sonra sekonder antikorlar kuyucuklardan çekildi ve on dakika boyunca uygulanacak olan streptavidin peroksidaz eklendi. Streptavidin peroksidaz uygulamasının ardından, üç defa 10'ar dakika boyunca 0.01 M PBS yıkaması yapıldı. Yıkamaların sonunda dokunun boyanma durumu göz önüne alınarak 3-5 dakika DAB çözeltisi karanlık ortamda dokulara uygulandı. Ardından boyanan dokular fırça ile kuyucukların içerisinden distile su dolu petri kaplarına alındı ve beş dakika bekletildi. Daha sonra distile sudaki dokular, fırça ile lamların üzerine alındı. Dokuların üzerindeki su kuruduktan sonra Entellan ile preparatlar kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.

Tablo 15: İmmunohistokimyasal boyamalar için kullanılan solüsyonların hazırlanması.

Solüsyon	Solüsyonun İçeriği	Oran
%0,3'lük H_2O_2	%30'luk H_2O_2	%1
	%20'lik Triton X-100	%1.5
	0.01 M PBS	%97.5
%10'luk Bloklama Serumu	NGS veya NRS	%10
	%20'lik Triton X-100	%1.5
	0.01 M PBS	%88.5
DAB Solüsyonu[6]	DAB tablet (10 mg) 0.01 M PBS (10 ml) %1'lik H_2O_2 solüsyonu (200 µl)	

[6] Bir çalışma (run) için kullanılan örnek solüsyon miktarı verilmiştir.

Tablo 16: Primer antikor solüsyonlarının hazırlanması[7].

Primer Antikor	Oran	Serum	Triton X-100
Anti-Cb	1:200	Toplam solüsyonun %4	%0.03
Anti-Cr	1:200		
Anti-Pv	1:250		
Anti-GAD 65/67	1:250		
Anti-ChAT	1:100		
Anti-CART	1:5000		
Anti-NeuN	1:1000		
Anti-SP	1:200		
Anti-5-HT	1:200		
Anti-ENK	1:1000		

[7] Toplam solüsyonun geri kalan kısmı, 0.01 M PBS'ten oluşmaktadır.

Tablo 17: Sekonder antikor solüsyonlarının hazırlanması[8].

Sekonder Antikor	Oran	Serum	Triton X-100
Goat-Anti Mouse	1:100	Toplam solüsyonun %4	%0.3
Goat-Anti Rabbit			
Rabbit-Anti Rat			

3.1. Görüntüleme ve Görüntülerin Analizi

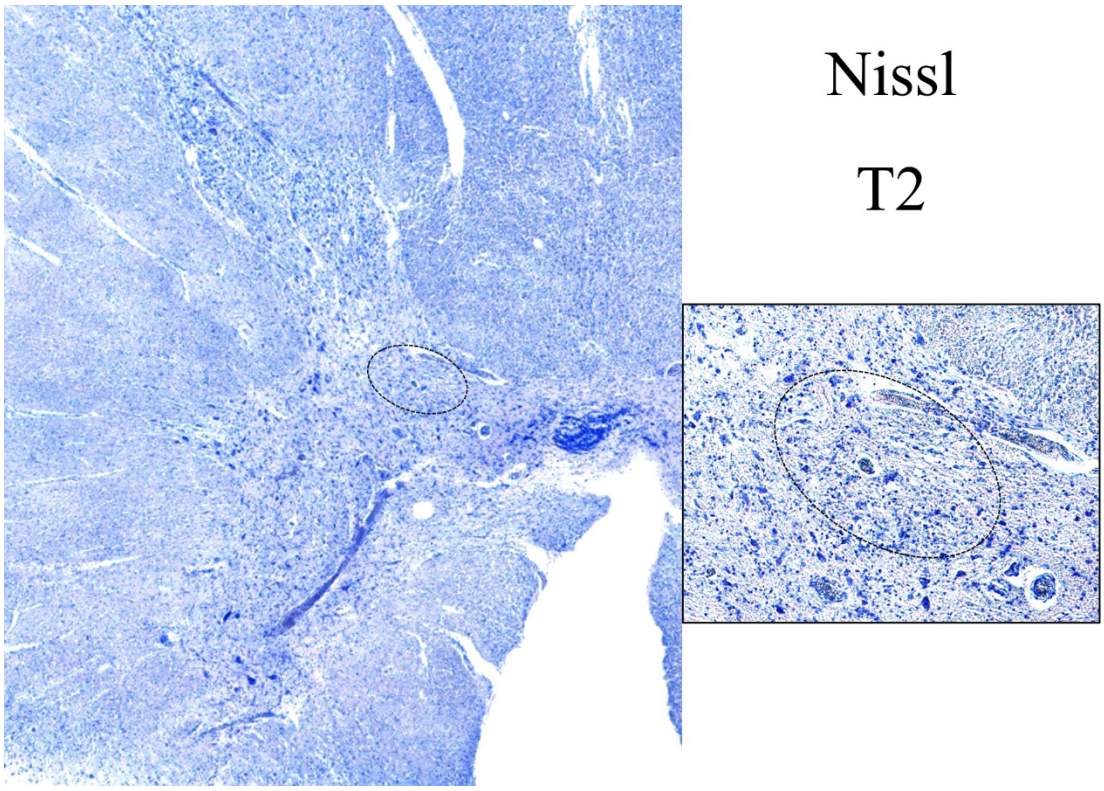
İmmunohistokimyasal ve histokimyasal boyamaların ardından elde edilen preparatların tamamı Leica DM4000B mikroskobunun (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) aydınlık alan ayarında görüntülendi. Kesitler, mikroskop kamerası (QICAM Fast 1394, Qımaging, Surrey, Kanada) ve MBF Stereo Investigator (11.01, MBF Bioscience, MicroBrightField Inc., Williston, VT, ABD) programı aracığıyla 10X büyütmede uygun netlikte fotoğraflandı. Her bir kesit için fotoğraflanan görüntüler, Image Composite Editor (Version 2.0.3.0, Microsoft Corporation, Redmond, WA, ABD) programı aracılığıyla birleştirildi. Birleşen kesit görüntülerinin analiz edilebilmesi amacıyla Adobe Photoshop (Adobe Photoshop 7.0, Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, ABD) ve Image J (ImageJ 1.52a, Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MA, ABD) programları kullanıldı. Analize hazır hâle gelen kesit görüntülerinde ilgili nucleus'ların bölgesi -Sengul ve ark. (2013) ile Watson ve ark. (2022) tarafından detaylı olarak hazırlanan omurilik atlaslarına göre- tespit edilerek hücresel mimarileri ve nörokimyasal içerikleri değerlendirildi.

[8] Toplam solüsyonun %94.5'i 0.01 M PBS'ten oluşmaktadır.

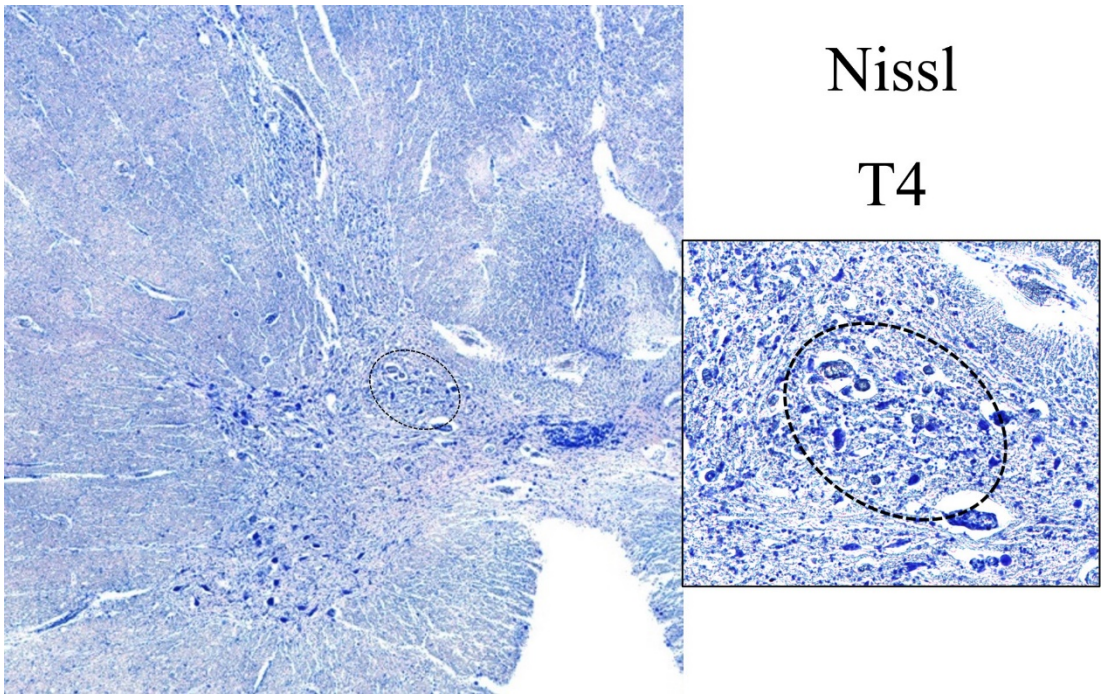
4. Bulgular

4.1. D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin Hücresel Mimarileri

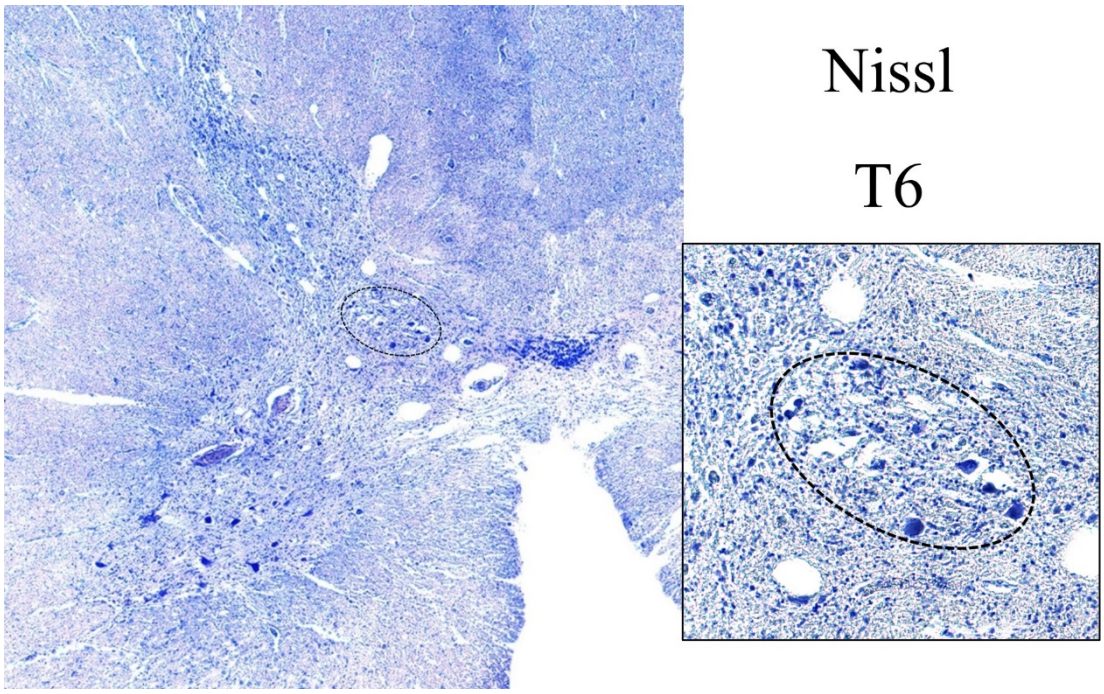
D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin Nissl histokimyasal boyaması sonrasında bölgesel lokalizasyonları, Sengul ve ark. (2013) ile Watson ve ark. (2022) tarafından hazırlanan omurilik atlasları kullanılarak belirlendi. Lokalizasyonların belirlenmesinin ardından D'nin (**Şekil 10, 11, 12, 13, 14, 15**), LPrCb'nin (**Şekil 15, 16, 17**) ve SPrCb'nin (**Şekil 18, 19, 20**) hücresel mimarileri değerlendirildi.



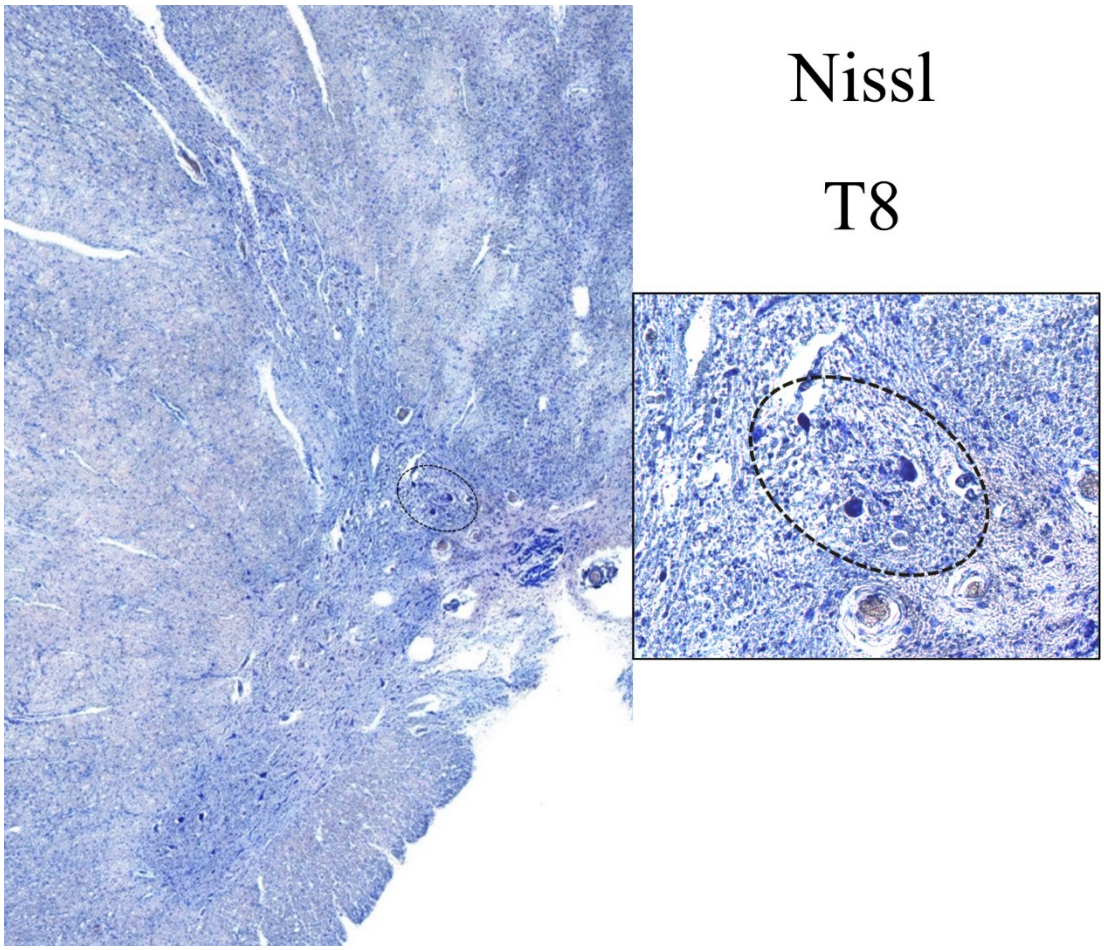
Şekil 10: T2 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



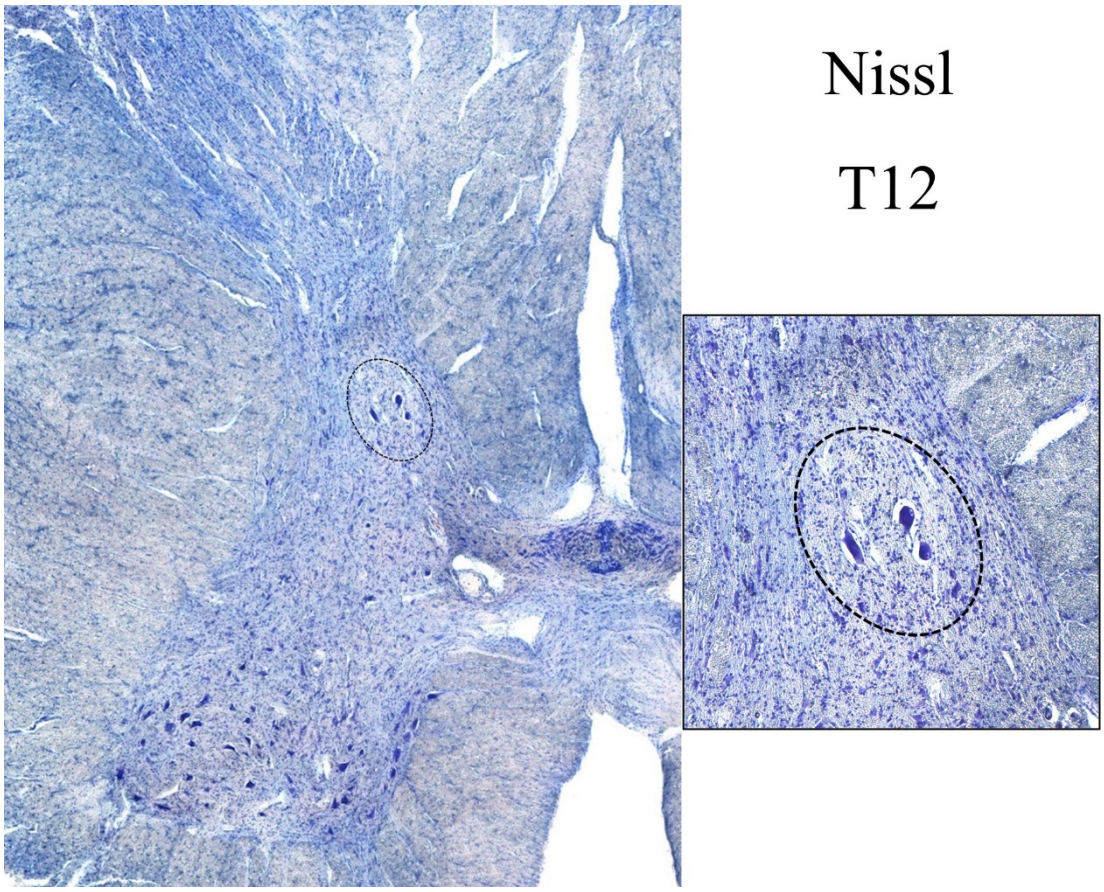
Şekil 11: T4 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



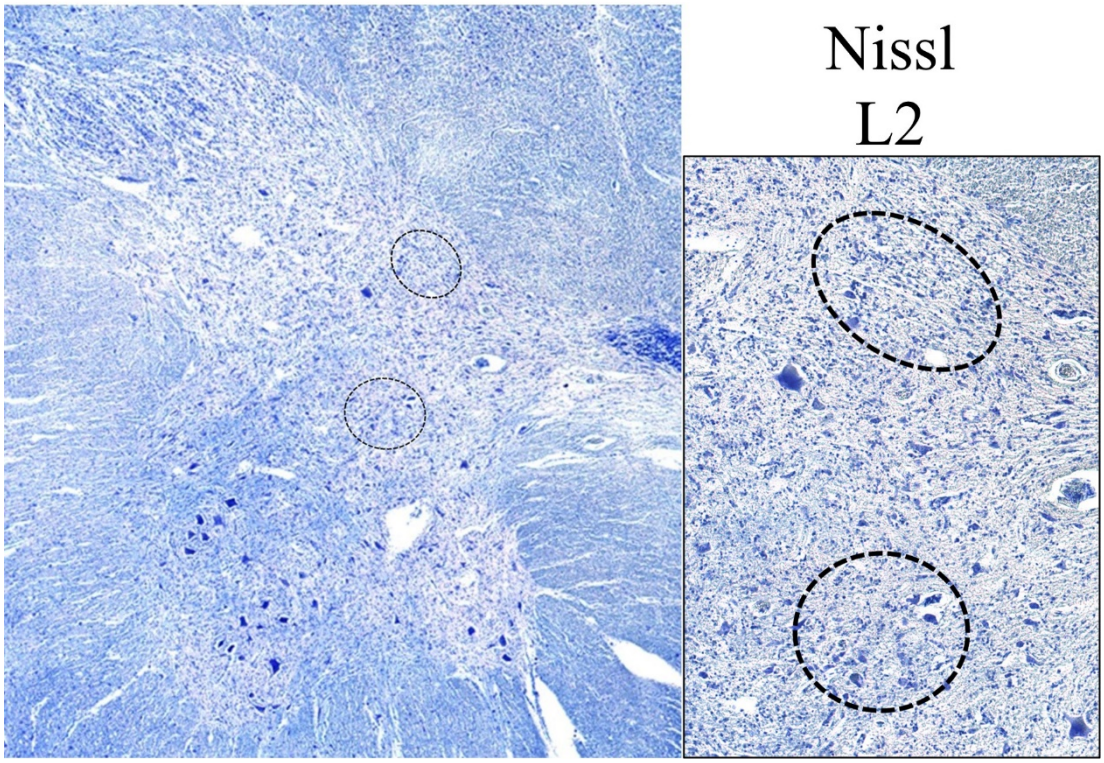
Şekil 12: T6 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



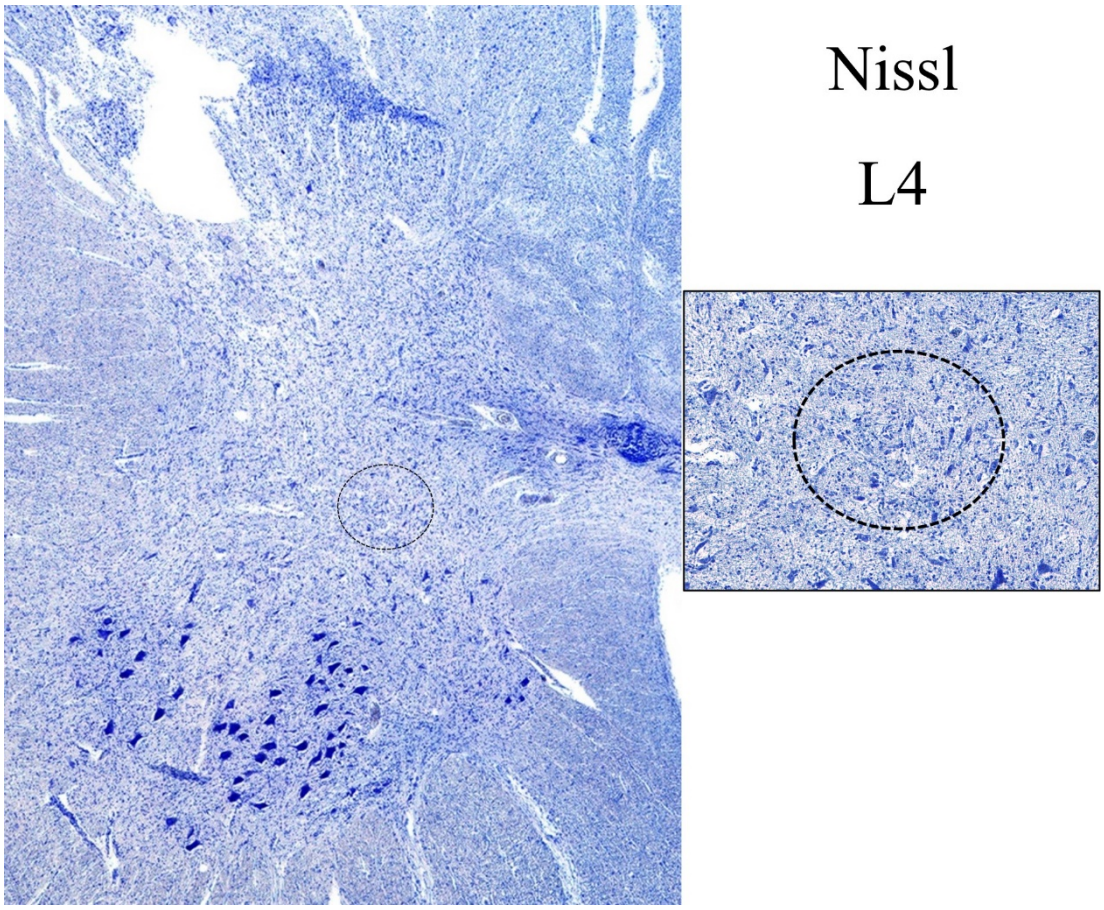
Şekil 13: T8 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



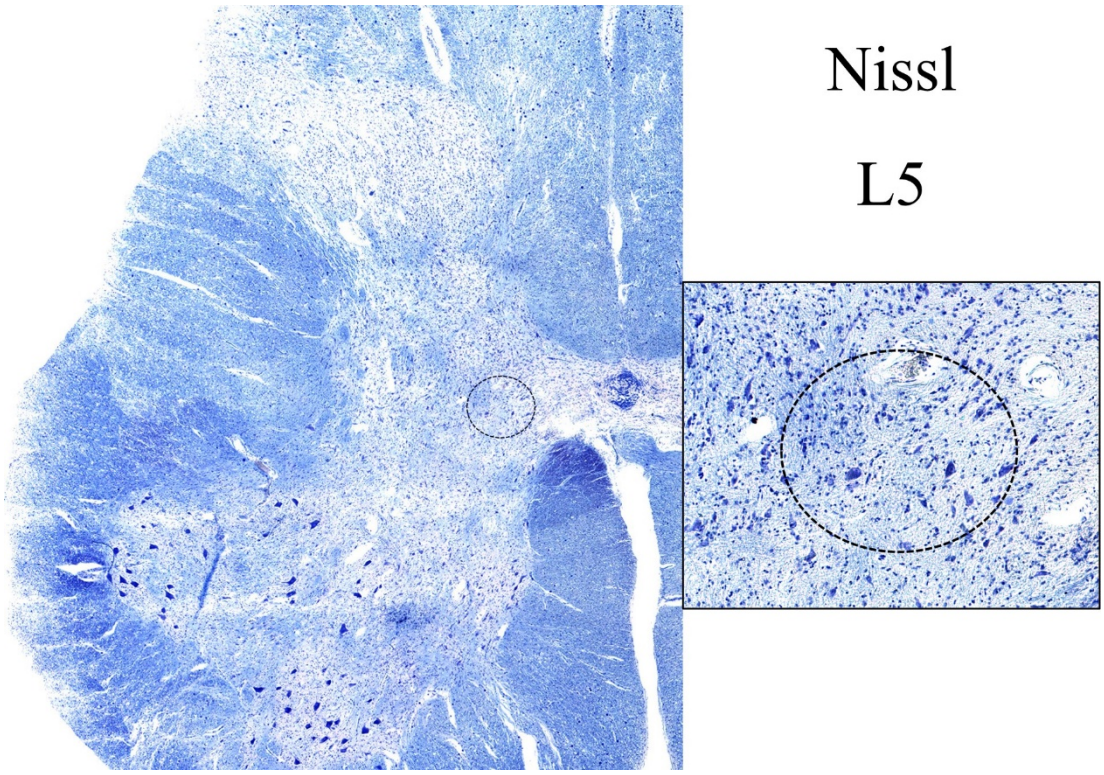
Şekil 14: T12 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



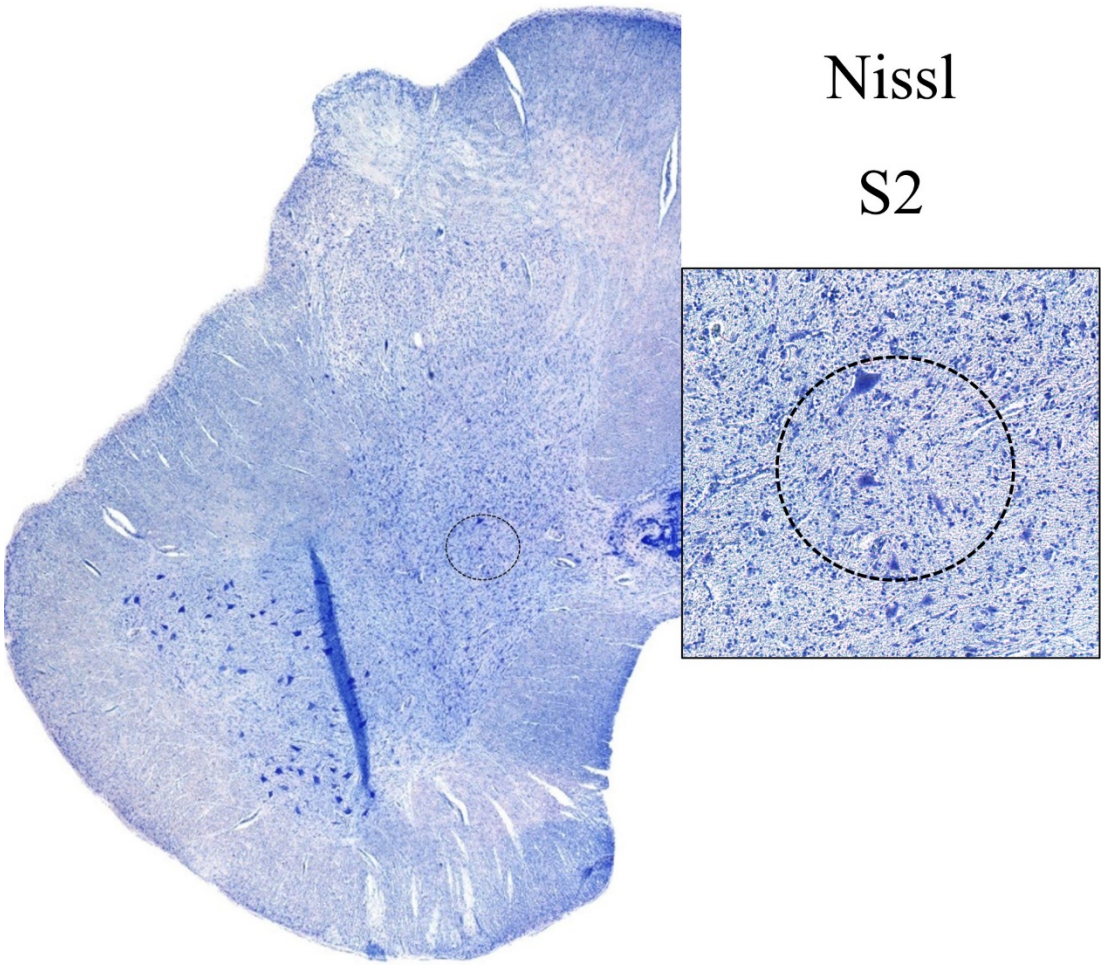
Şekil 15: L2 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında D'nin ve LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



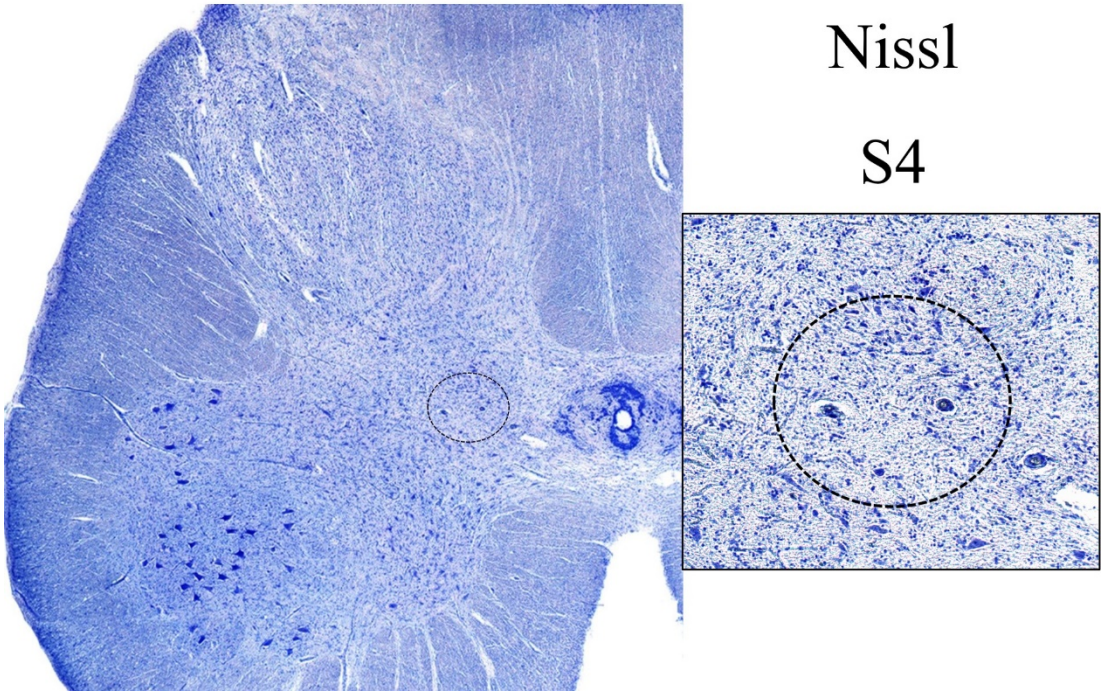
Şekil 16: L4 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



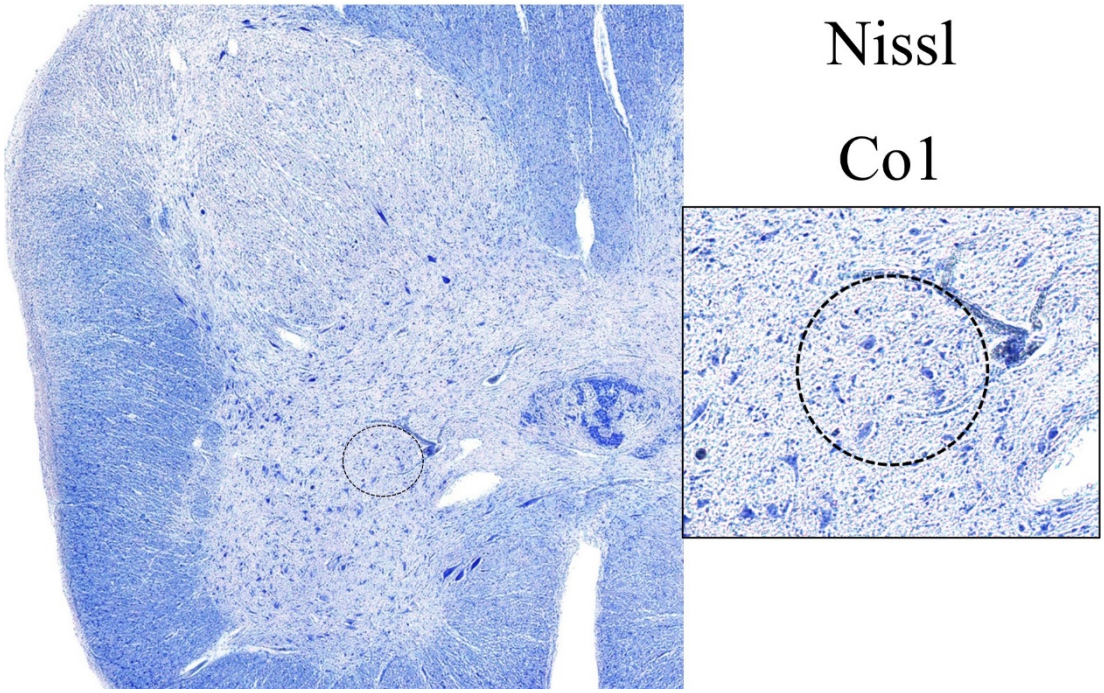
Şekil 17: L5 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



Şekil 18: S2 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında SPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



Şekil 19: S4 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında SPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.



Şekil 20: Co1 segmentinde Nissl histokimyasal boyaması sonrasında SPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan hücresel mimari görüntüsü.

Nissl histokimyasal boyamasının ardından yapılan gözlemle D'ye, LPrCb'ye ve SPrCb'ye ait nöronların multipolar, ovoid, fusiform ve triangular şekilli olduğu görülmüştür. Image J üzerinde yapılan değerlendirmelerin neticesinde; yaklaşık ortalama yüzey alanı D için 0,084 mm^2, LPrCb için 0,116 mm^2 ve SPrCb için 0,118 mm^2 olarak ölçüldü. İlgili nucleus'lar için nöron yoğunluğu, ölçüme uygun 1 mm^2'lik birim alanda bulunan nöron sayısını ifade etmektedir. Bu değerler D için ortalama 400 ± 120, LPrCb için 220 ± 100 ve SPrCb için 190 ± 50 nöron/mm^2 olarak hesaplandı. D'deki nöronların uzun çapları 7,05-81,54 µm arasında değişmekle birlikte ortalama 18,94 ± 8,7 µm, kısa çapları 3,58-43,97 µm arasında ortalama 12,31 ± 5,86 µm ölçüldü. LPrCb'deki nöronların uzun çapları 9,45-44,33 µm arasında değişmekle birlikte ortalama 23,6 ± 6,62 µm, kısa çapları 6,67-26,4 µm arasında ortalama 13,2 ± 3,58 µm ölçüldü. SPrCb'deki nöronların uzun çapları 8,1-40,8 µm arasında değişmekle birlikte ortalama 19,26 ± 7,5 µm, kısa çapları 6,23-23,99 µm arasında ortalama 10,79 ± 3,25 µm olarak bulundu **(Tablo 18**).

Tablo 18: D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin morfometrik özellikleri.

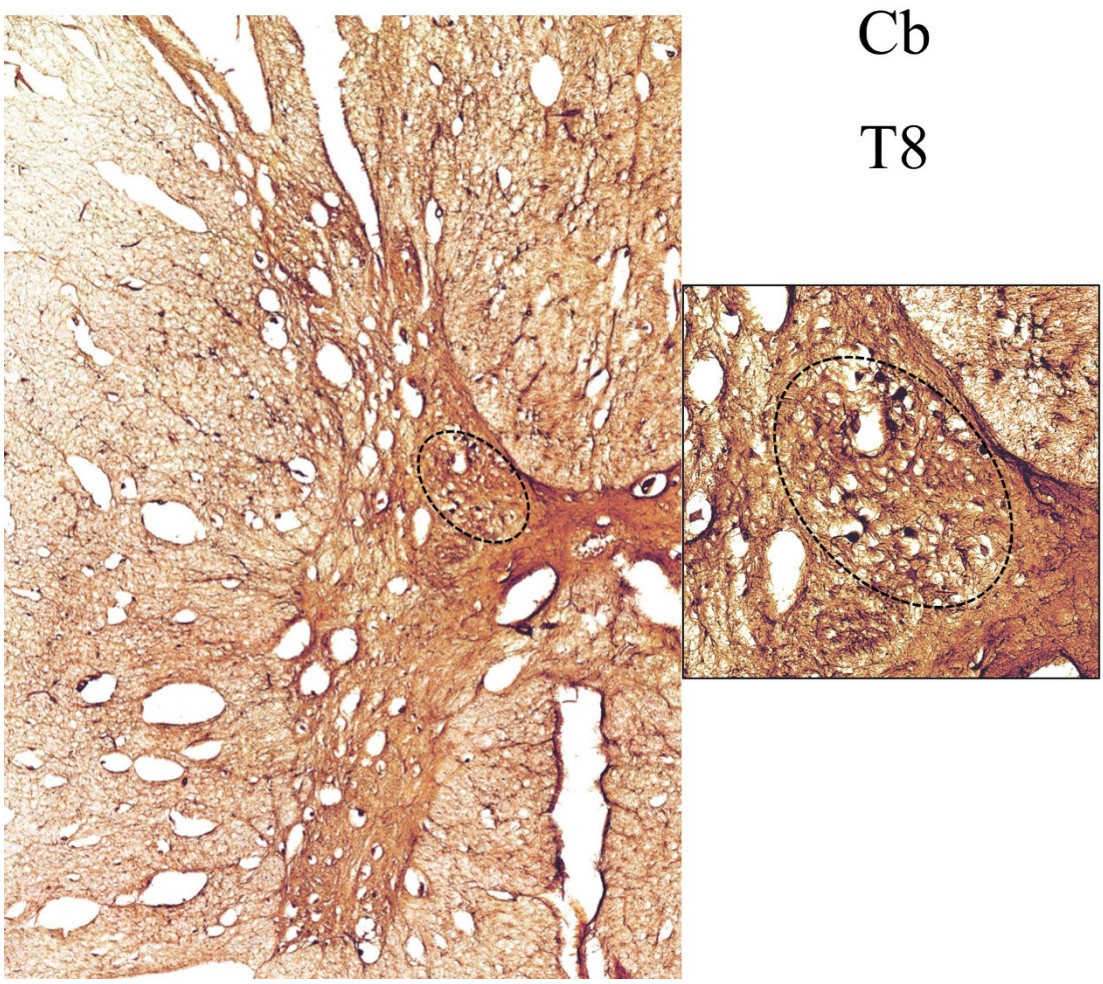
		D	**LPrCb**	**SPrCb**
Nöron yoğunluğu (nöron sayısı/mm^2)	Min.	230	120	150
	Maks.	510	330	240
	Ort. ± SD	400 ± 120	220 ± 100	190 ± 50
Nöron uzun çap (µm)	Min. (µm)	7,05	9,45	8,1
	Maks. (µm)	81,54	44,33	40,8
	Ort. ± SD (µm)	18,94 ± 8,7	23,6 ± 6,62	19,26 ± 7,5
Nöron kısa çap (µm)	Min. (µm)	3,58	6,67	6,23
	Maks. (µm)	43,97	26,4	23,99
	Ort. ± SD (µm)	12,31 ± 5,86	13,2 ± 3,58	10,79 ± 3,25

4.2. D’nin, LPrCb’nin ve SPrCb’nin Nörokimyasal İçerikleri

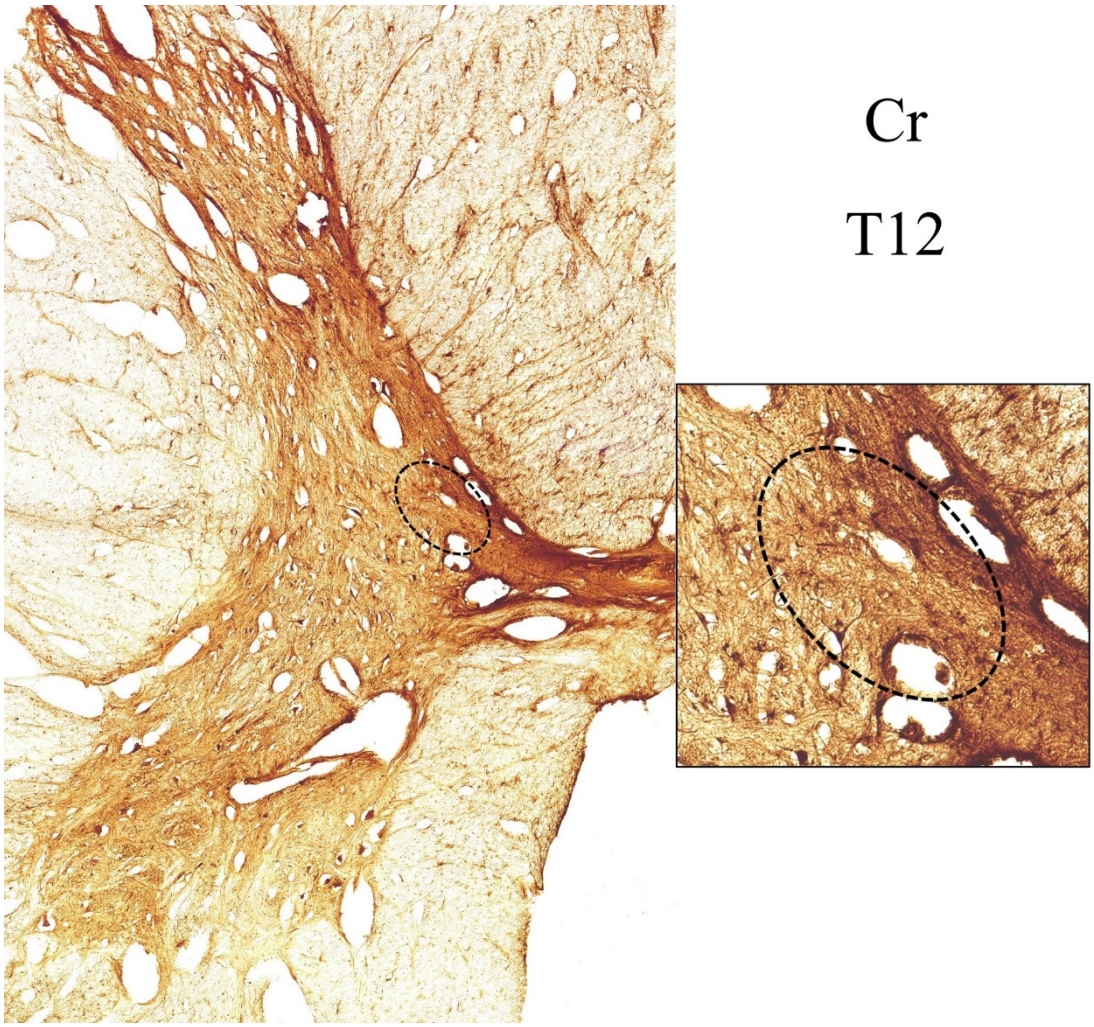
İmmunohistokimyasal boyamalar ile D’nin, LPrCb’nin ve SPrCb’nin nörokimyasal içerikleri ortaya koyuldu.

4.2.1. Nucleus Dorsalis’in Nörokimyasal İçeriği

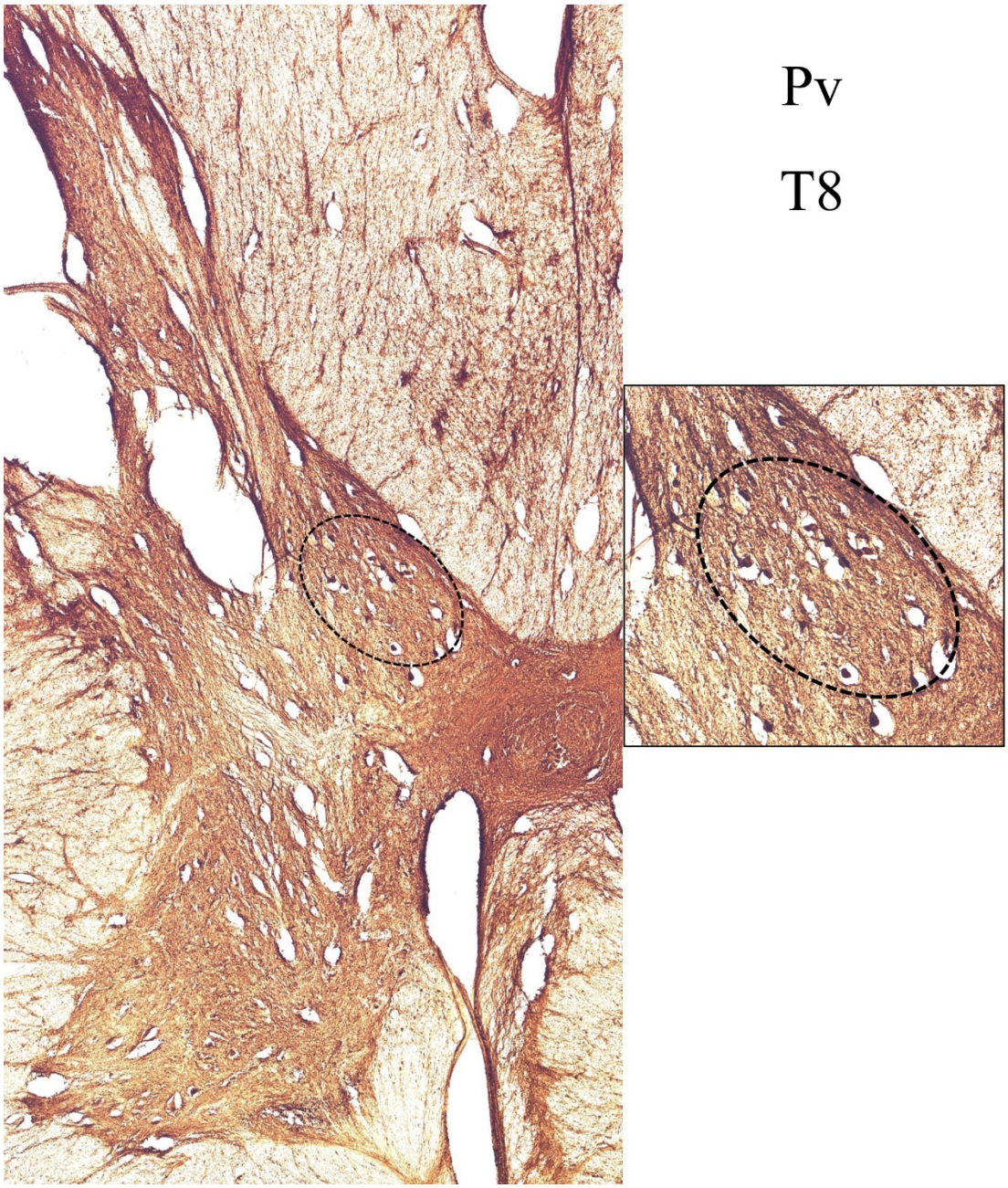
Cb (**Şekil 21**), Cr (**Şekil 22**), Pv (**Şekil 23**), ChAT (**Şekil 24**), CART (**Şekil 25**), GAD 65/67 (**Şekil 26**), NeuN (**Şekil 27**), SP (**Şekil 28**), 5-HT (**Şekil 29**), ENK (**Şekil 30**) immunoreaktivitesi gösteren D’ye ait nöronlar izlendi.



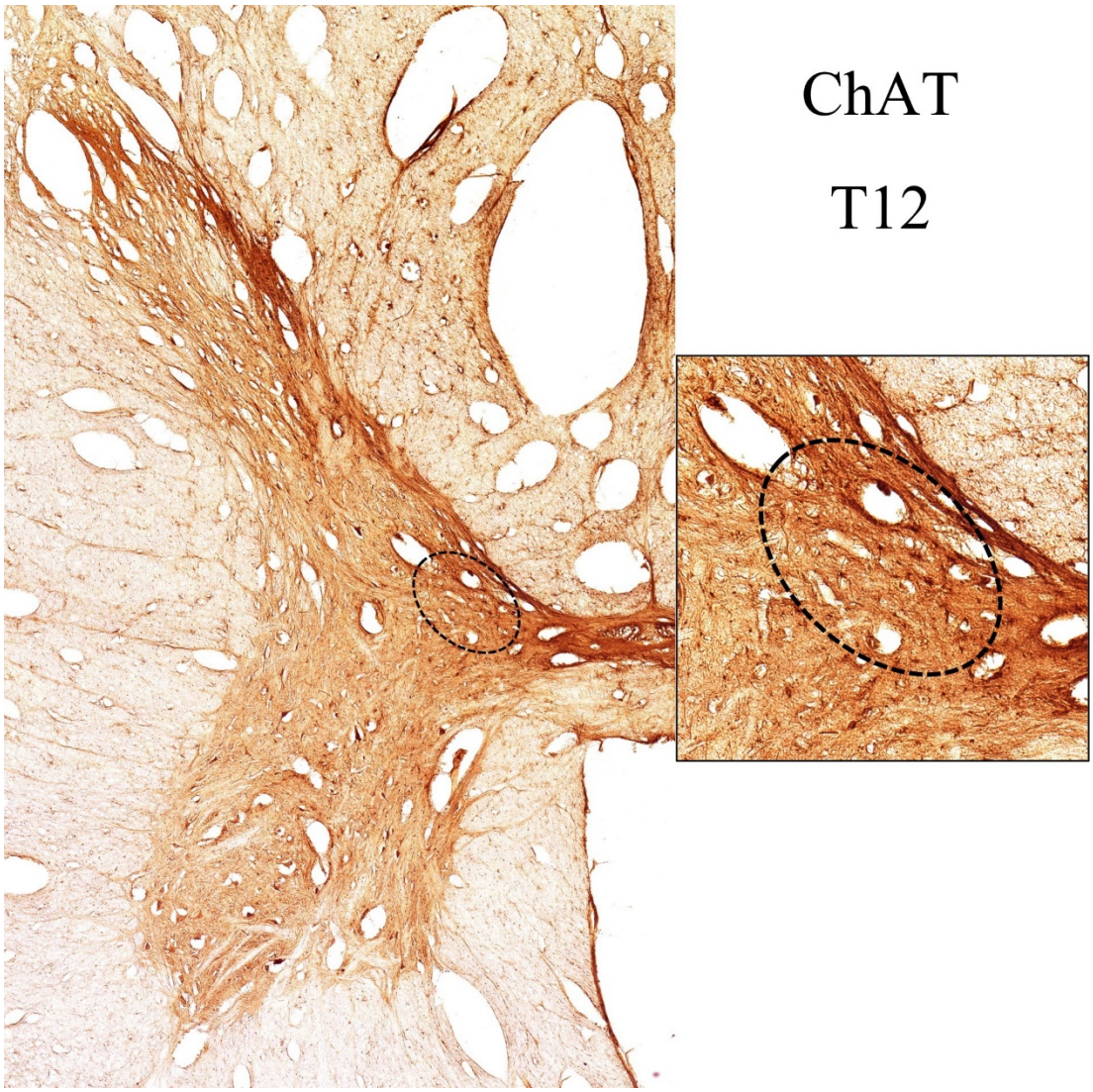
Şekil 21: T8 segmentinde Cb immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



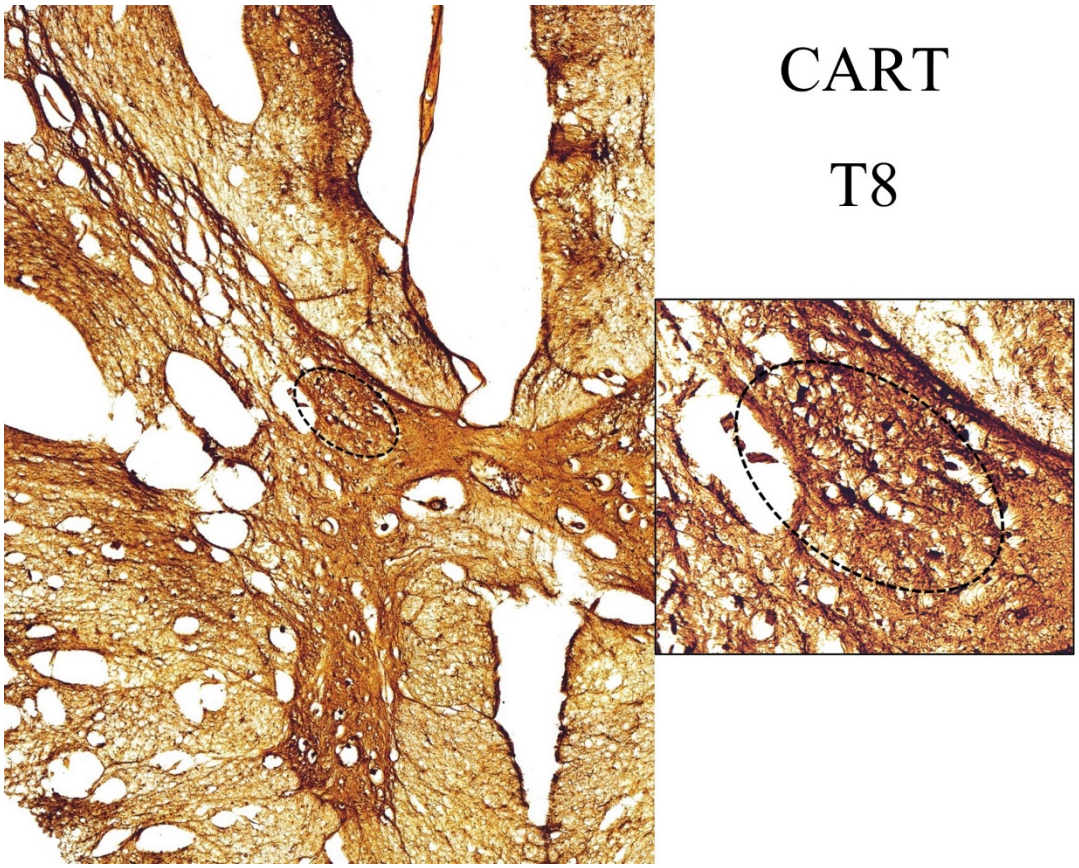
Şekil 22: T12 segmentinde Cr immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



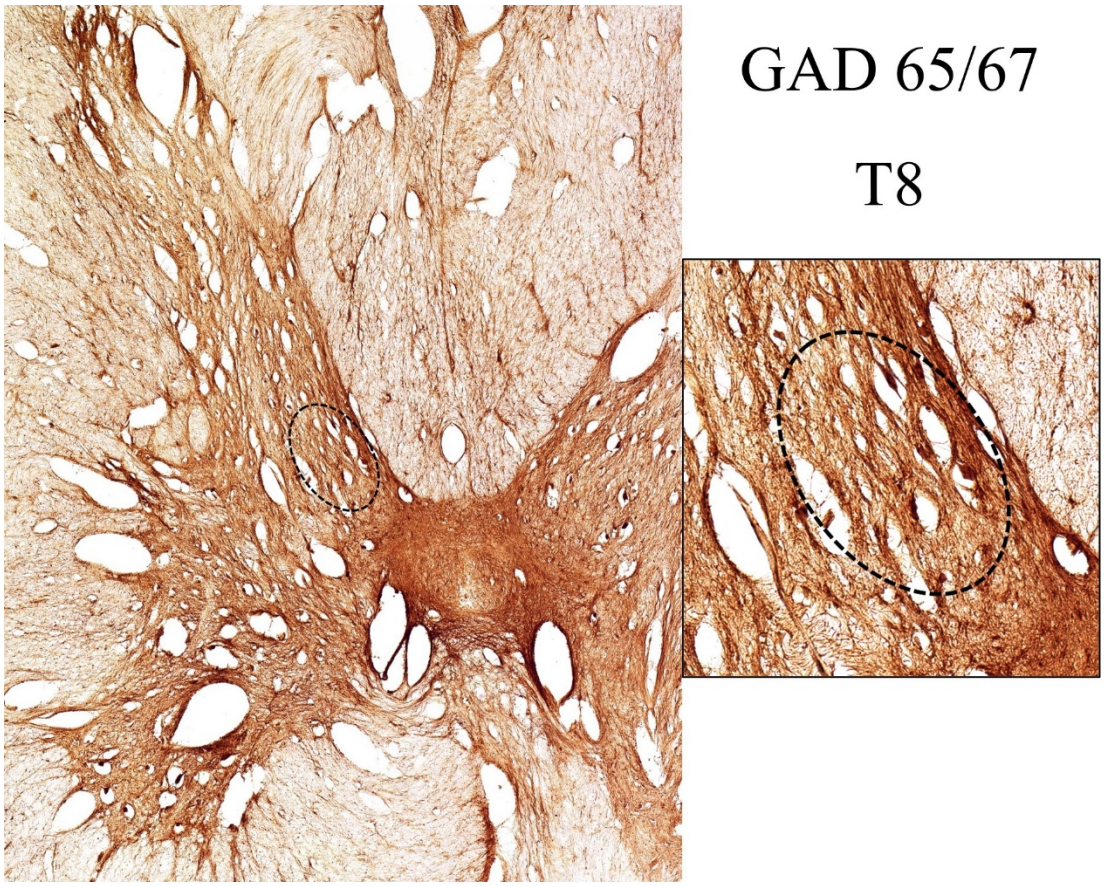
Şekil 23: T8 segmentinde Pv immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



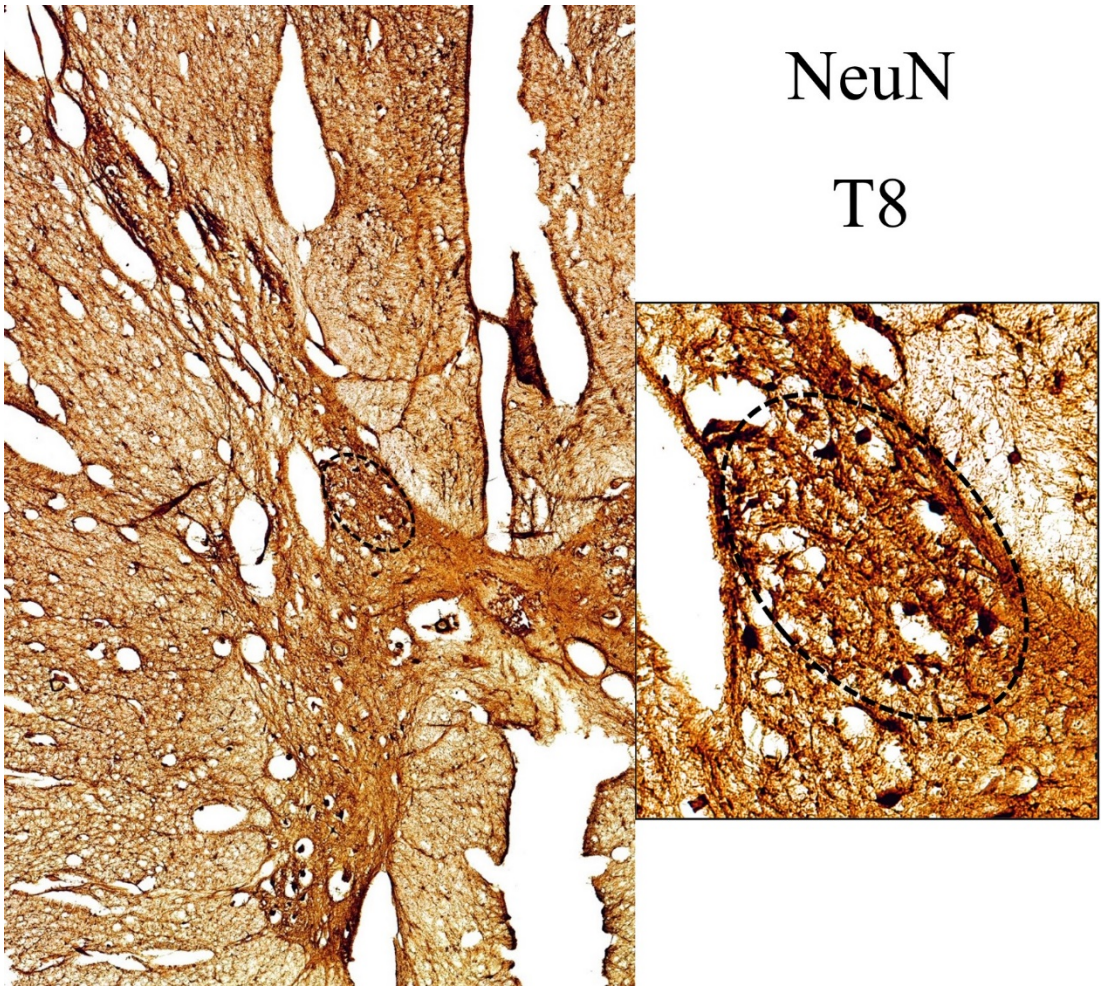
Şekil 24: T12 segmentinde ChAT immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



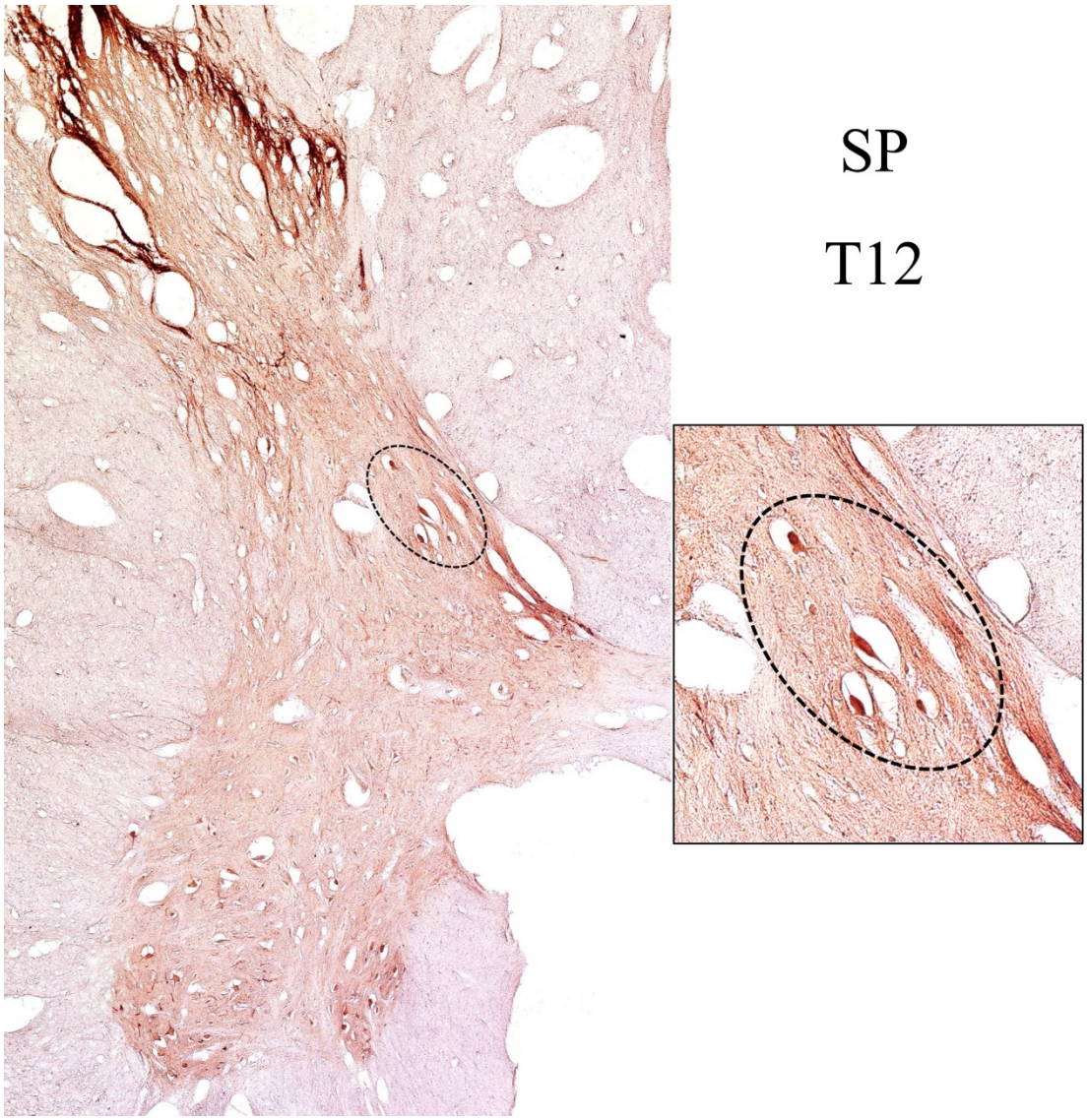
Şekil 25: T8 segmentinde CART immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



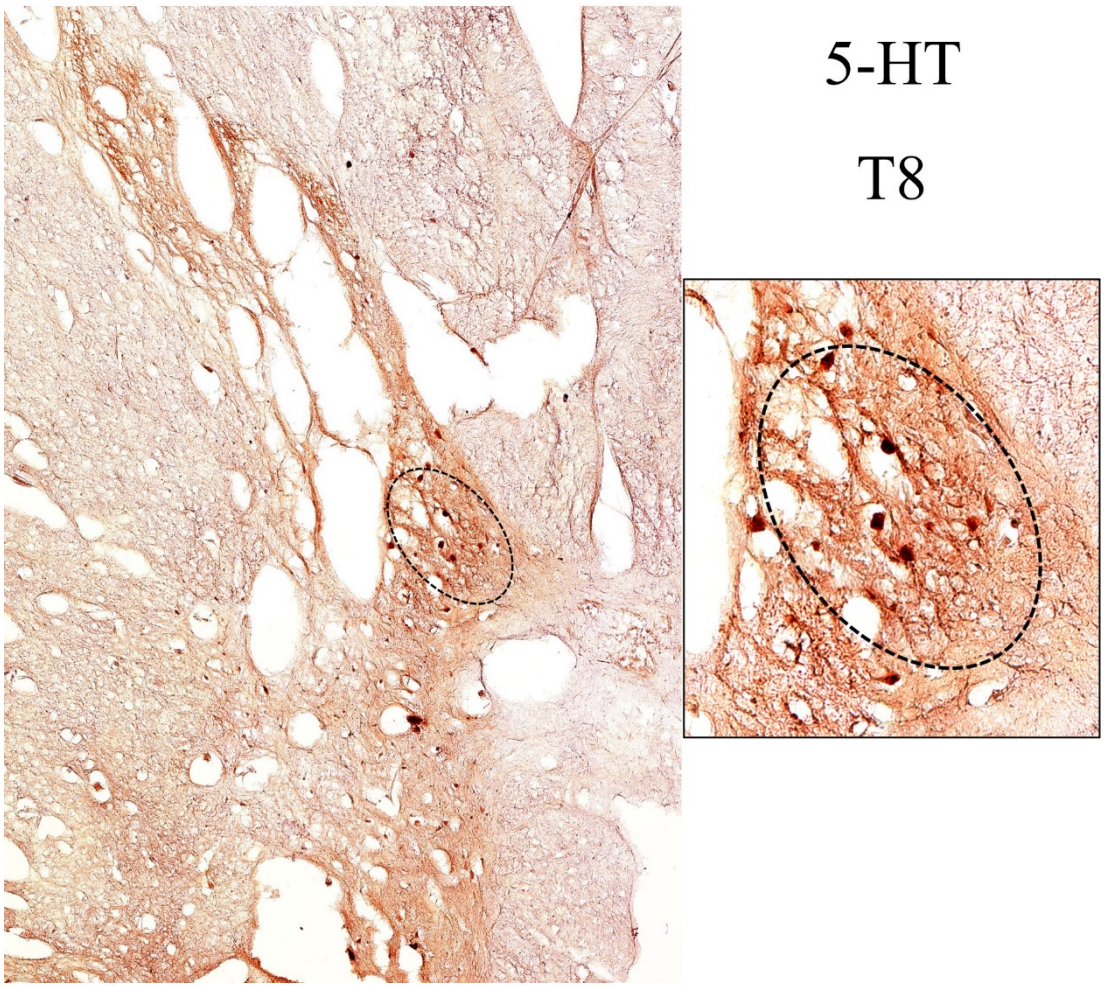
Şekil 26: T8 segmentinde GAD 65/67 immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



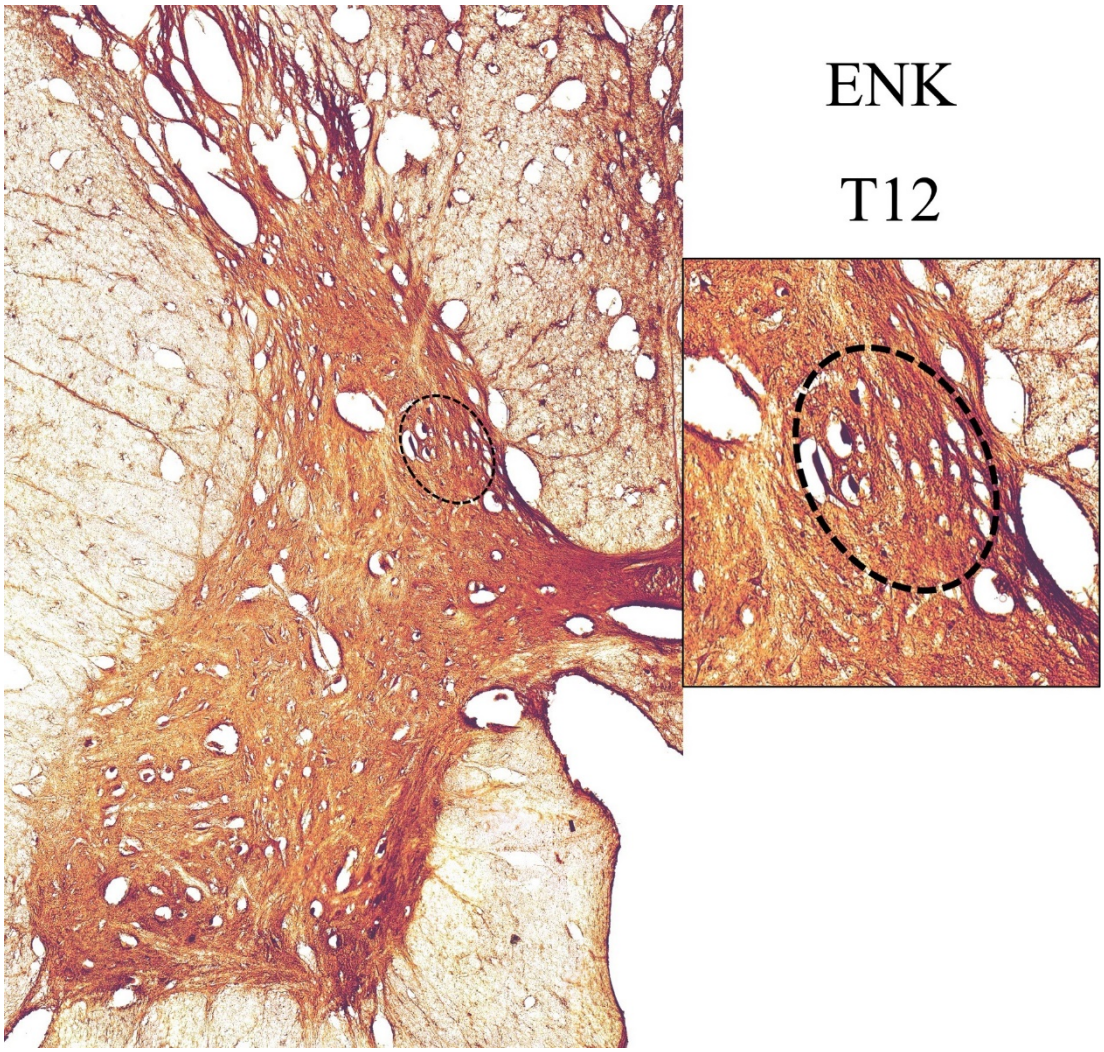
Şekil 27: T8 segmentinde NeuN immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



Şekil 28: T12 segmentinde SP immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



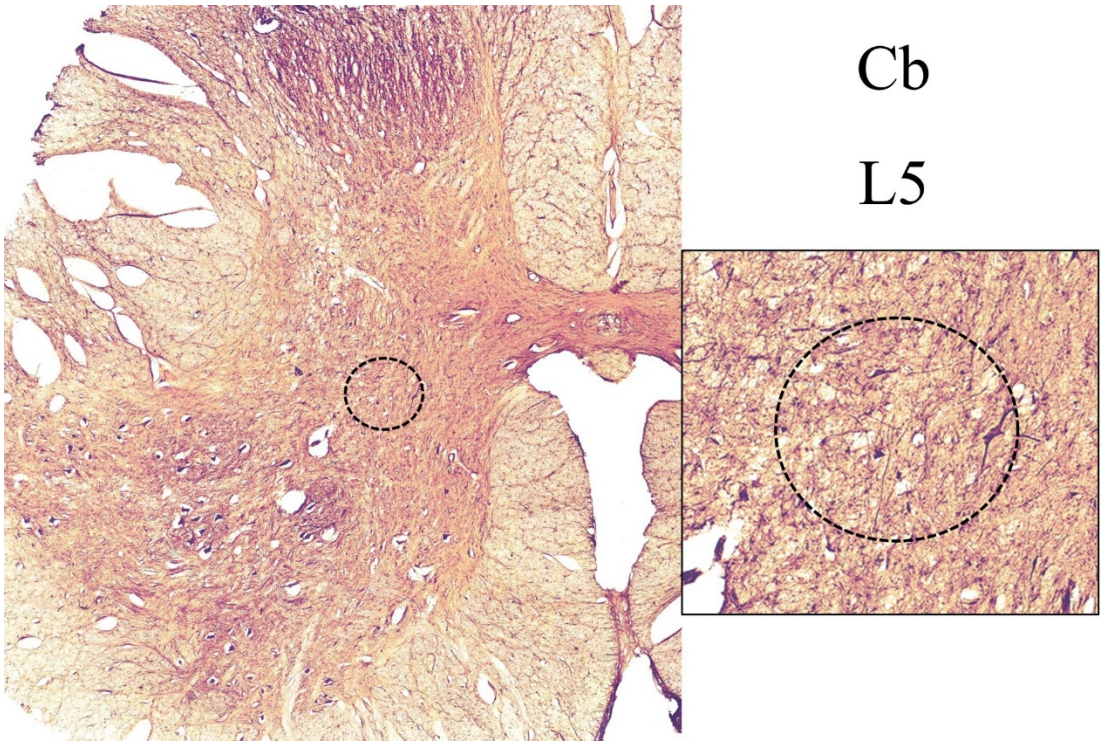
Şekil 29: T8 segmentinde 5-HT immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



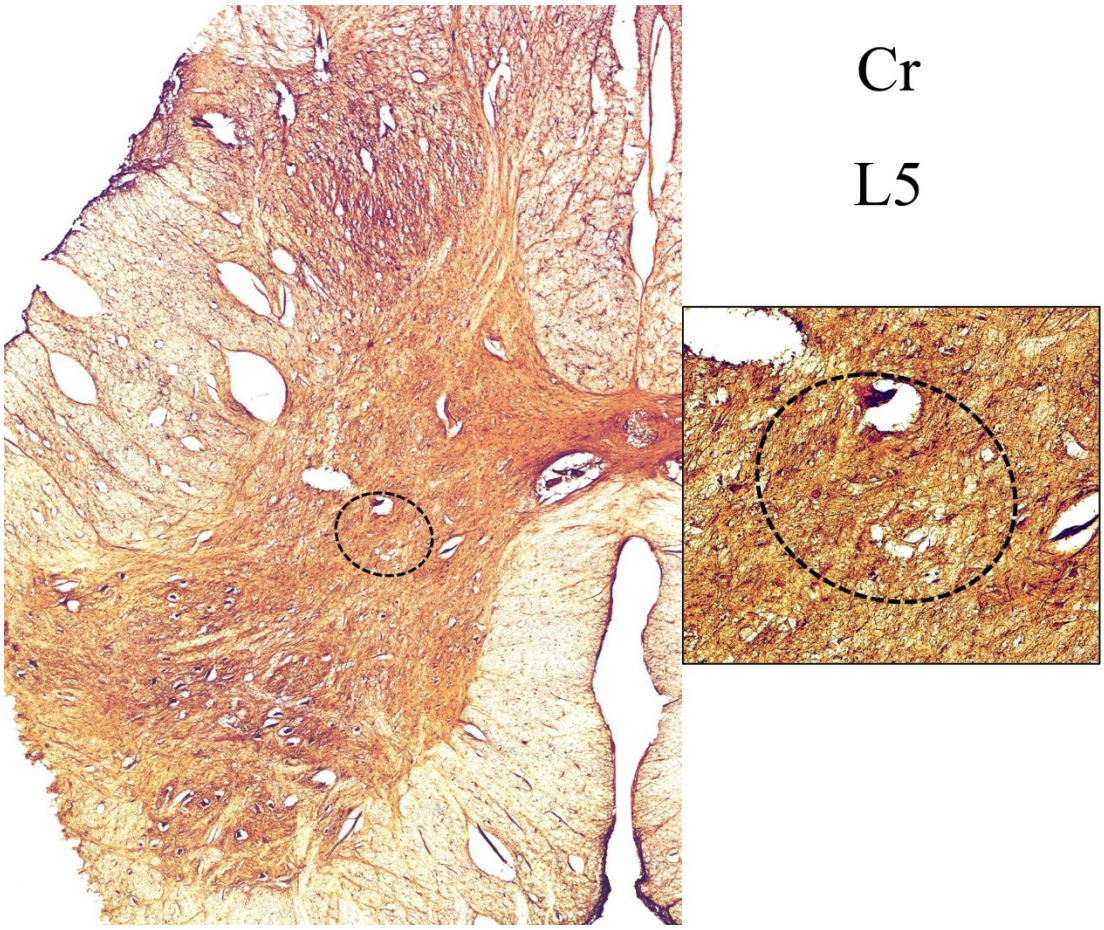
Şekil 30: T12 segmentinde ENK immunoreaktivitesi gösteren D'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.

4.2.2. Nucleus Lumbaris Precerebellaris'in Nörokimyasal İçeriği

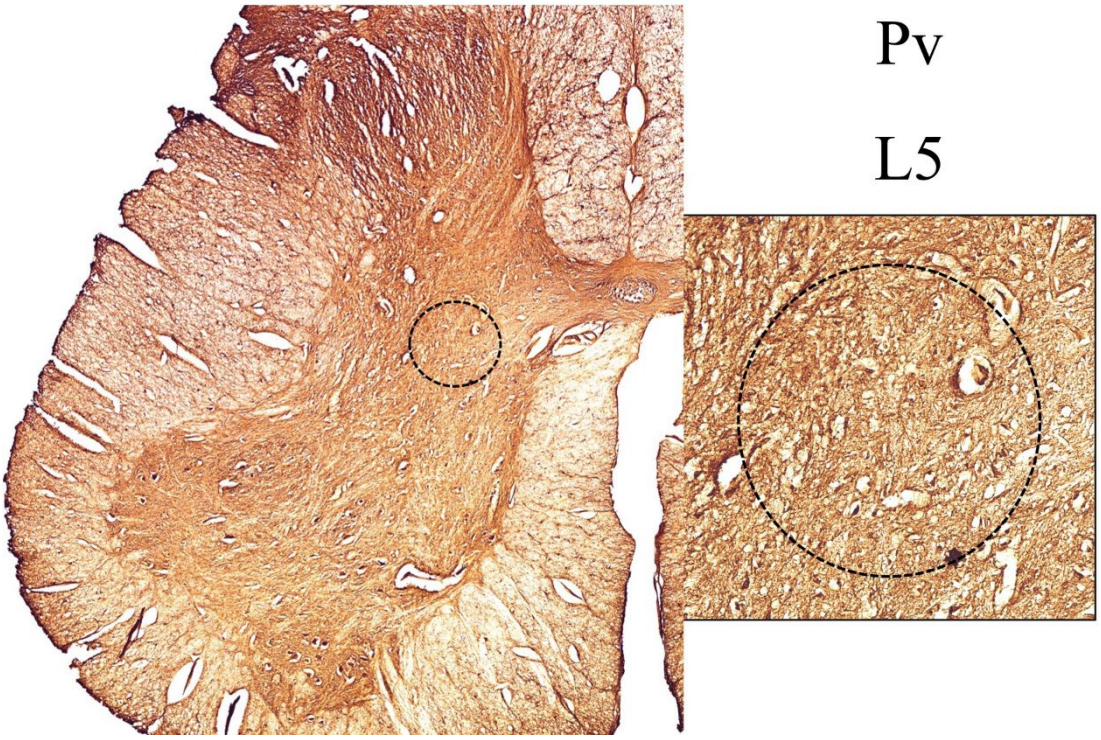
Cb (**Şekil 31**), Cr (**Şekil 32**), Pv (**Şekil 33**), ChAT (**Şekil 34**), CART (**Şekil 35**), GAD 65/67 (**Şekil 36**), NeuN (**Şekil 37**), SP (**Şekil 38**), 5-HT (**Şekil 39**), ENK (**Şekil 40**) immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronlar tespit edildi.



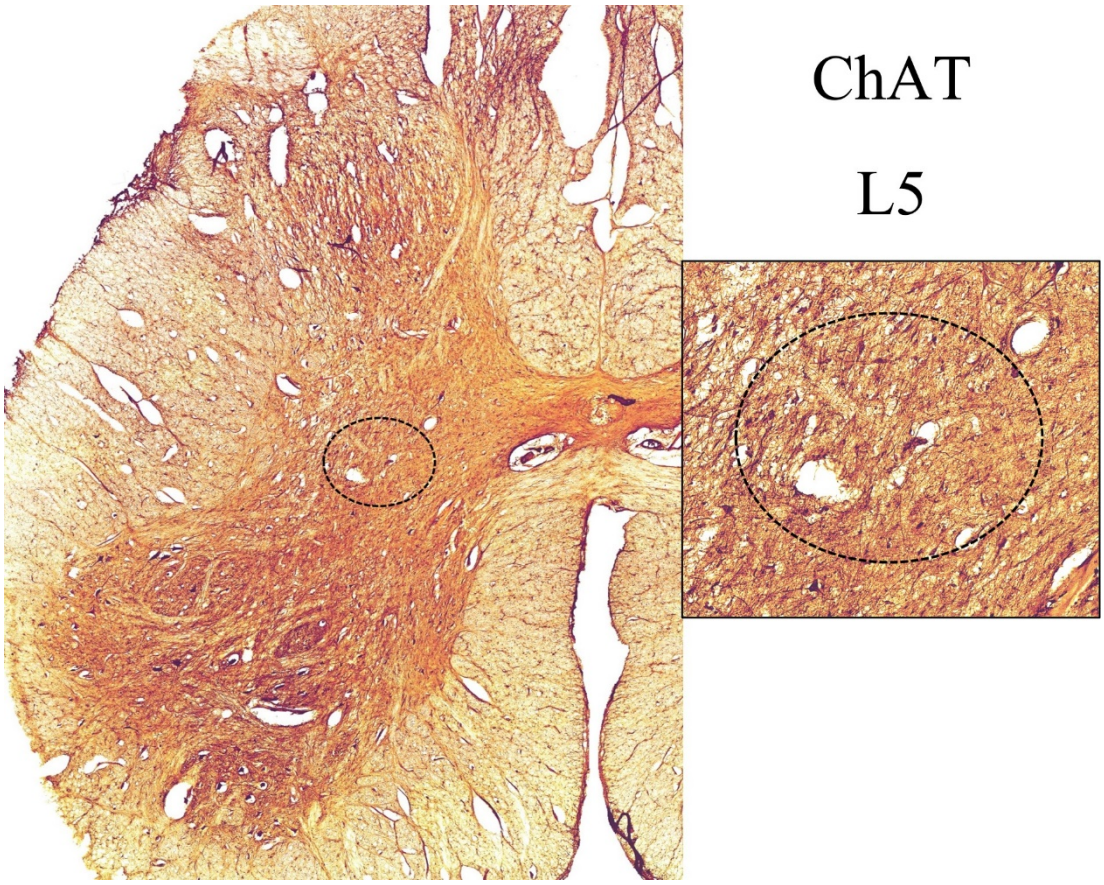
Şekil 31: L5 segmentinde Cb immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



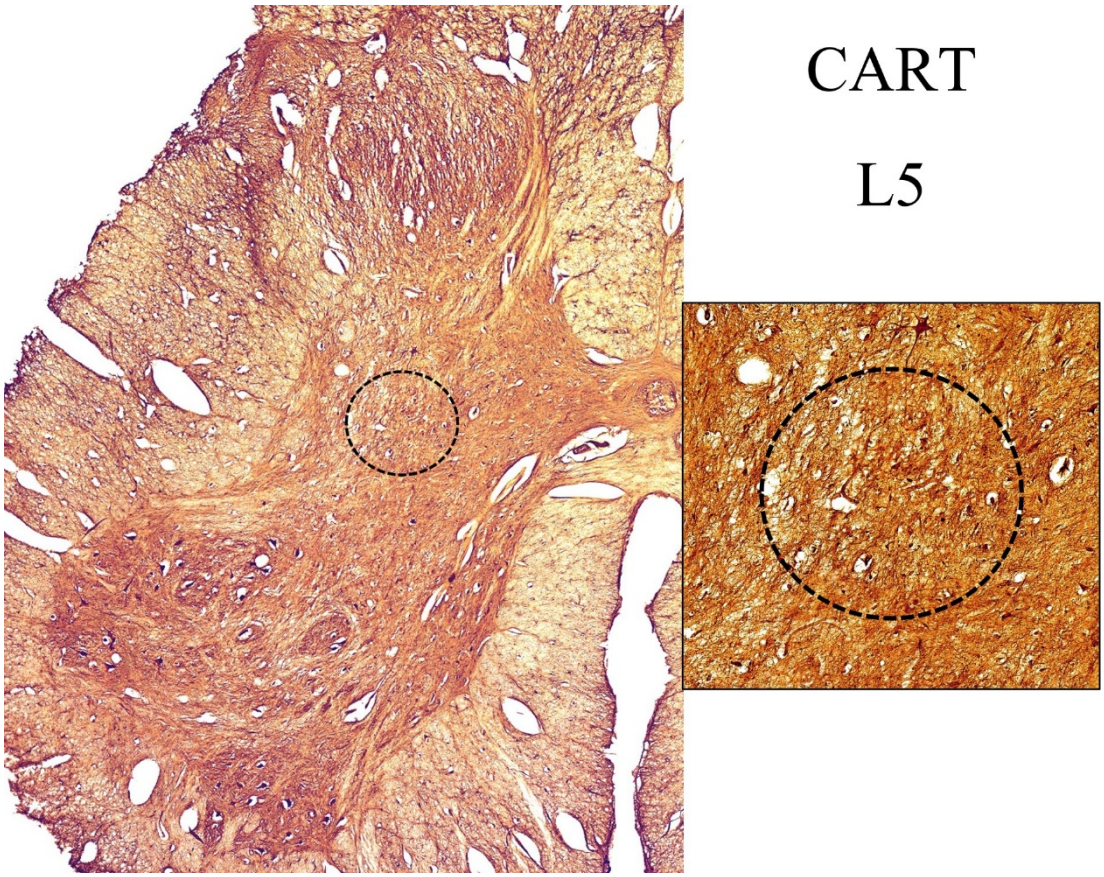
Şekil 32: L5 segmentinde Cr immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



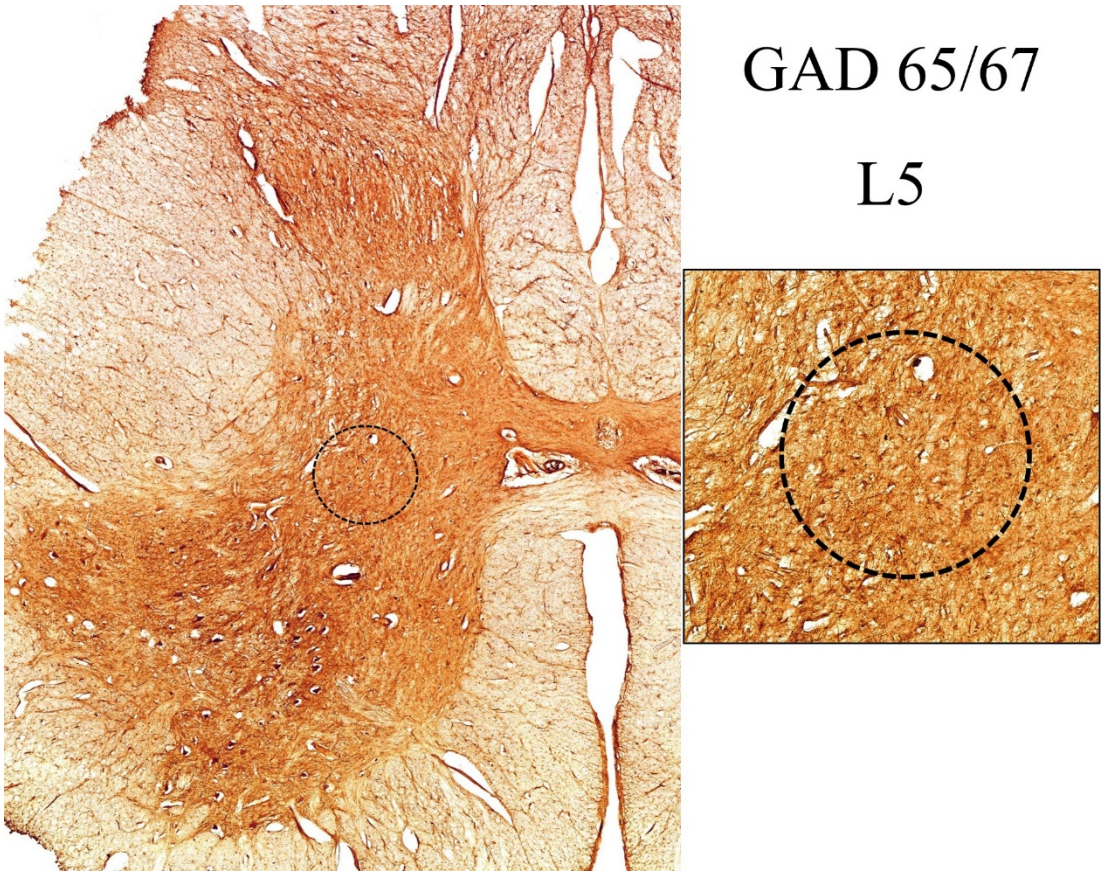
Şekil 33: L5 segmentinde Pv immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



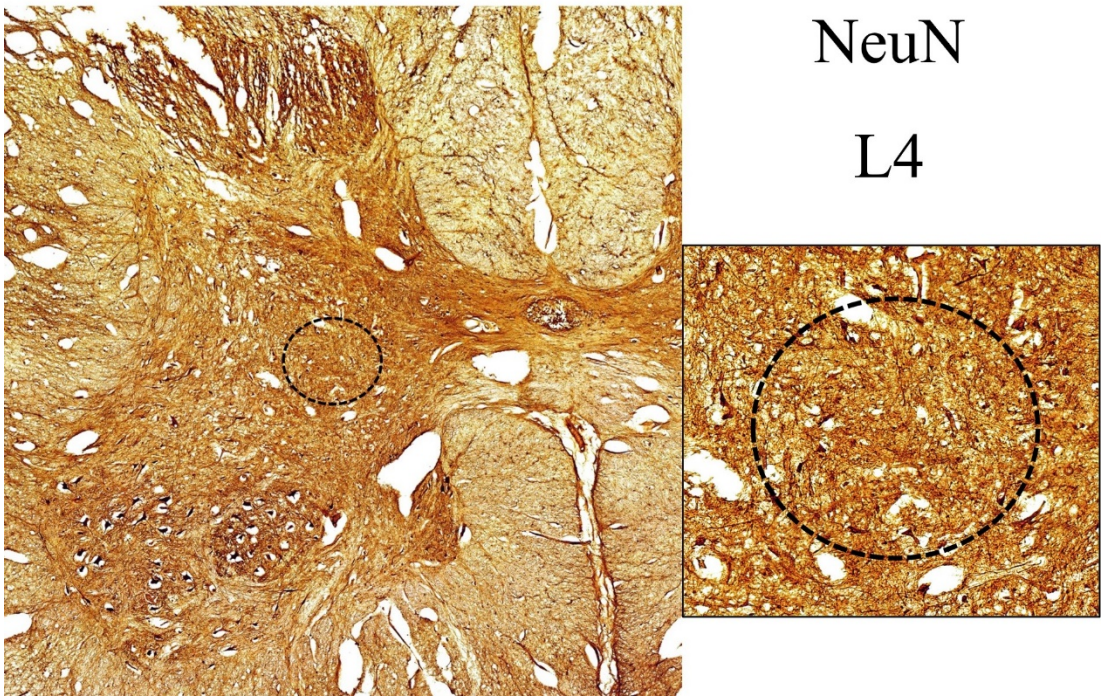
Şekil 34: L5 segmentinde ChAT immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



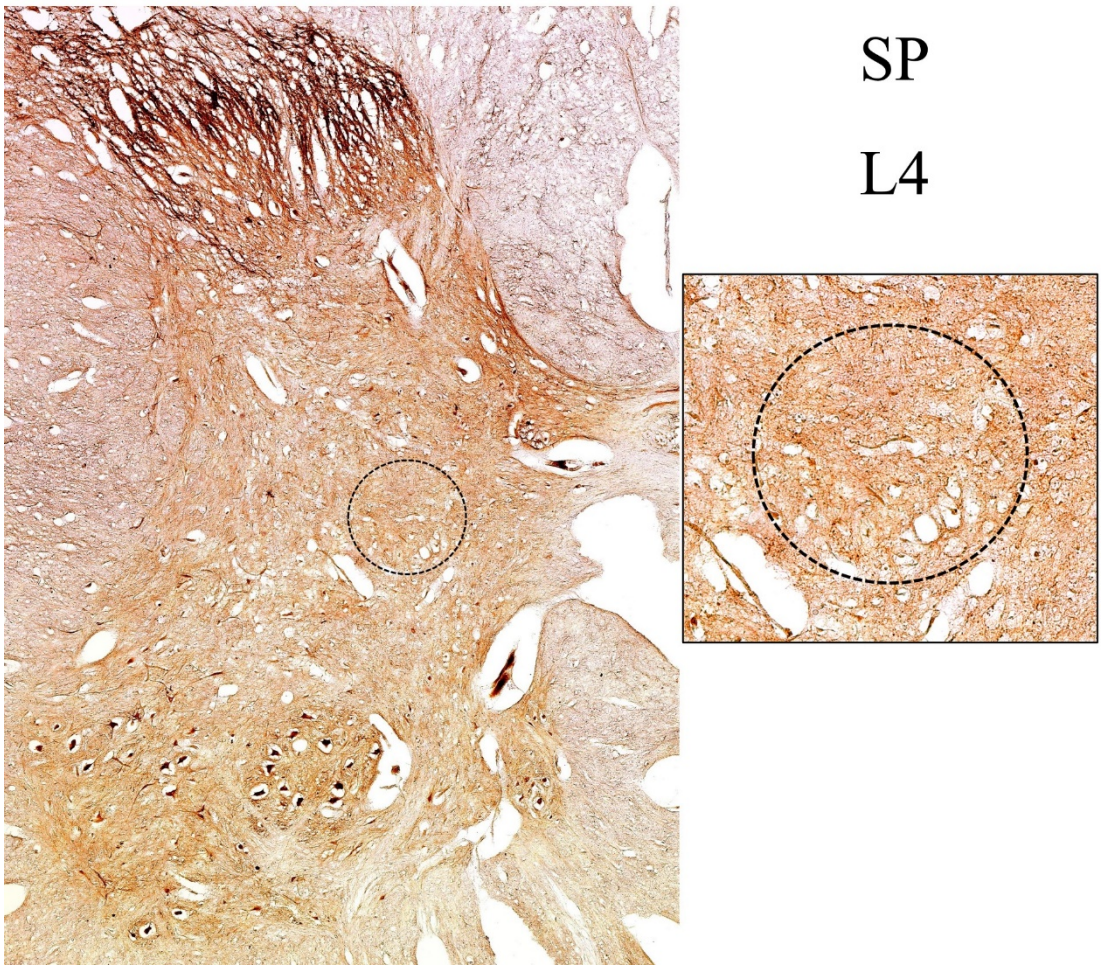
Şekil 35: L5 segmentinde CART immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



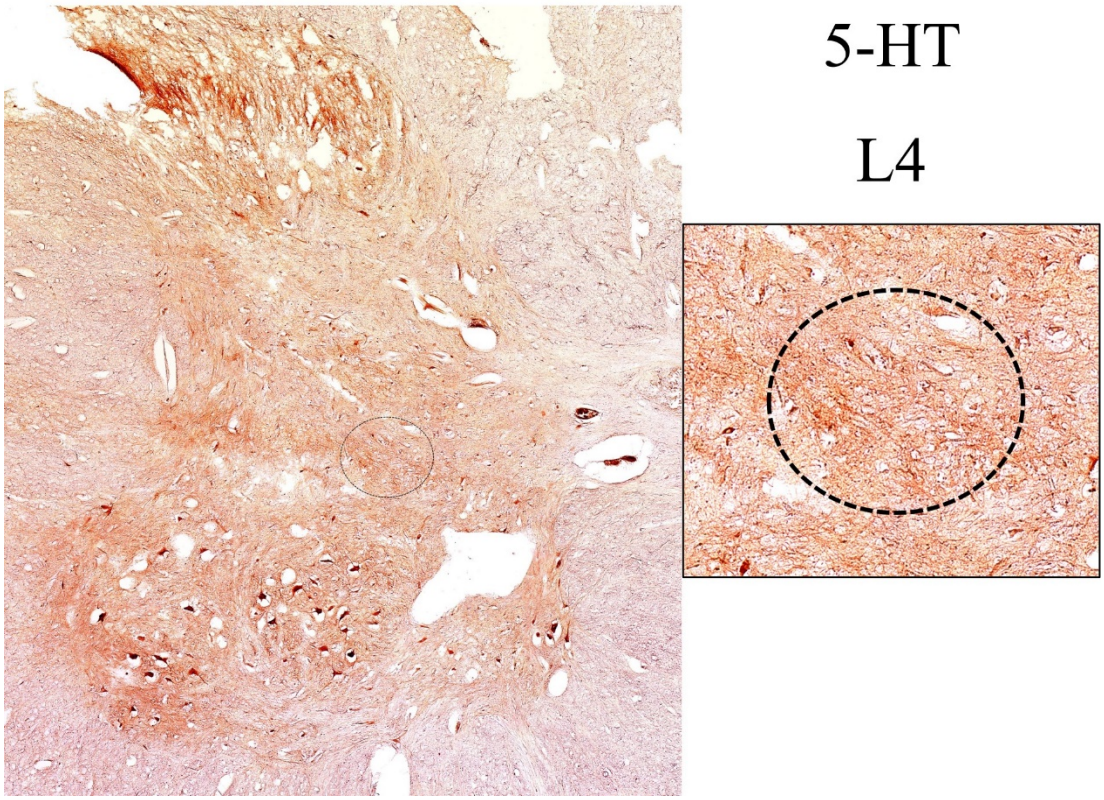
Şekil 36: L5 segmentinde GAD 65/67 immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



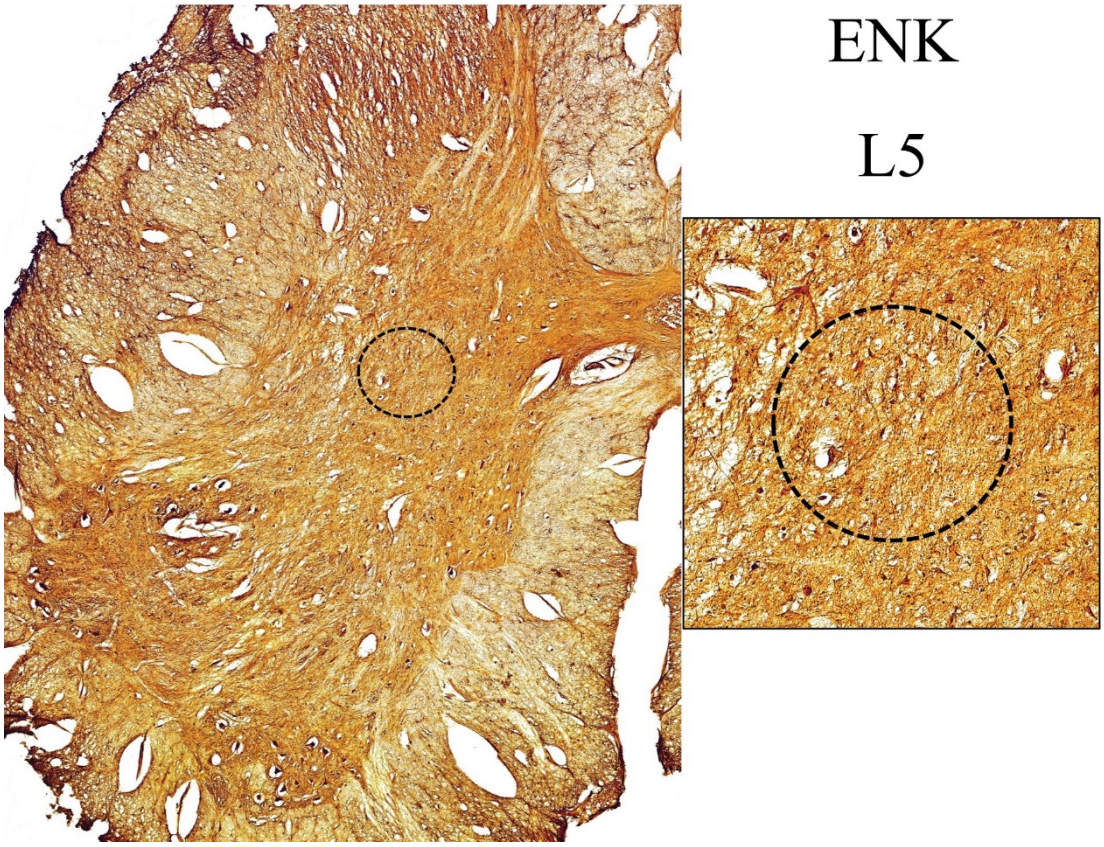
Şekil 37: L4 segmentinde NeuN immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



Şekil 38: L4 segmentinde SP immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



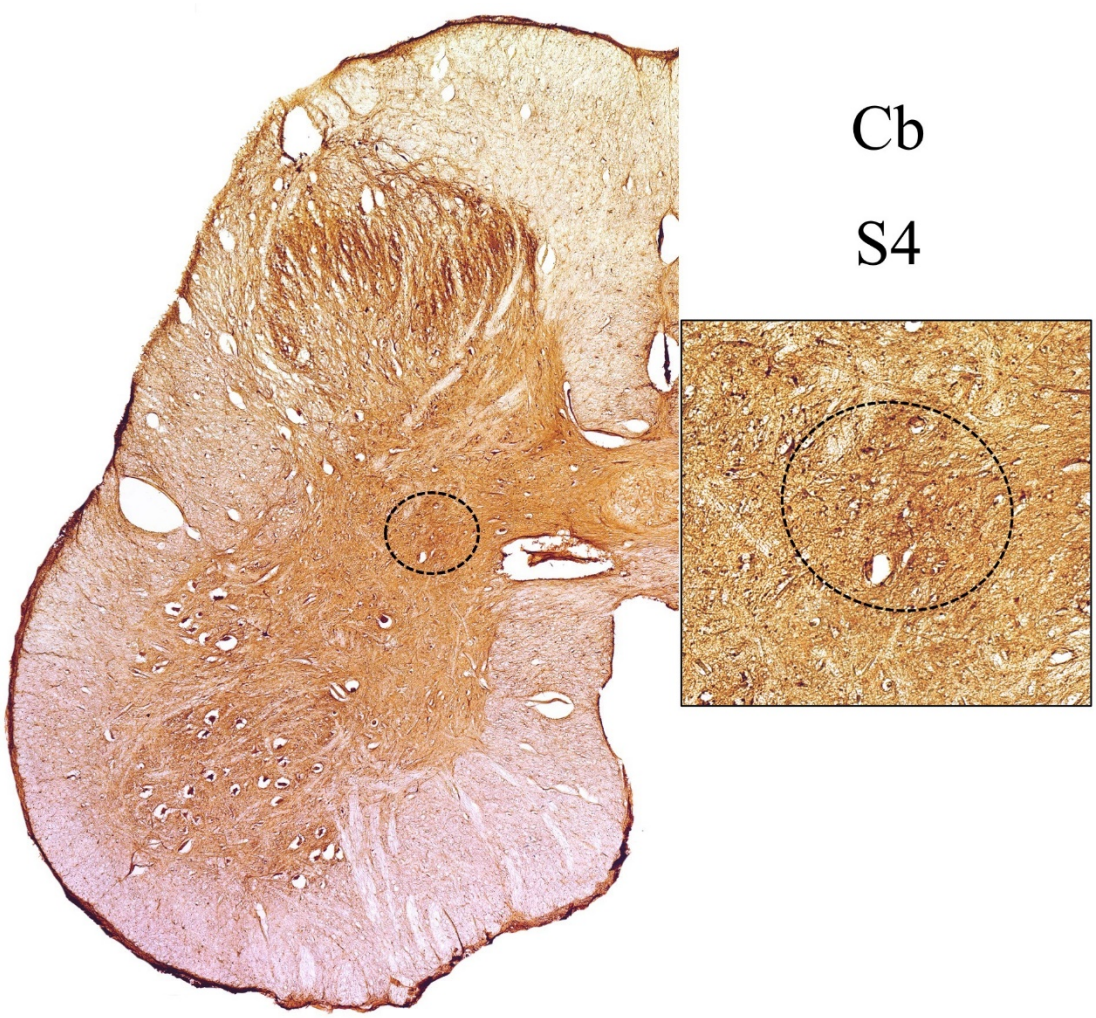
Şekil 39: L4 segmentinde 5-HT immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



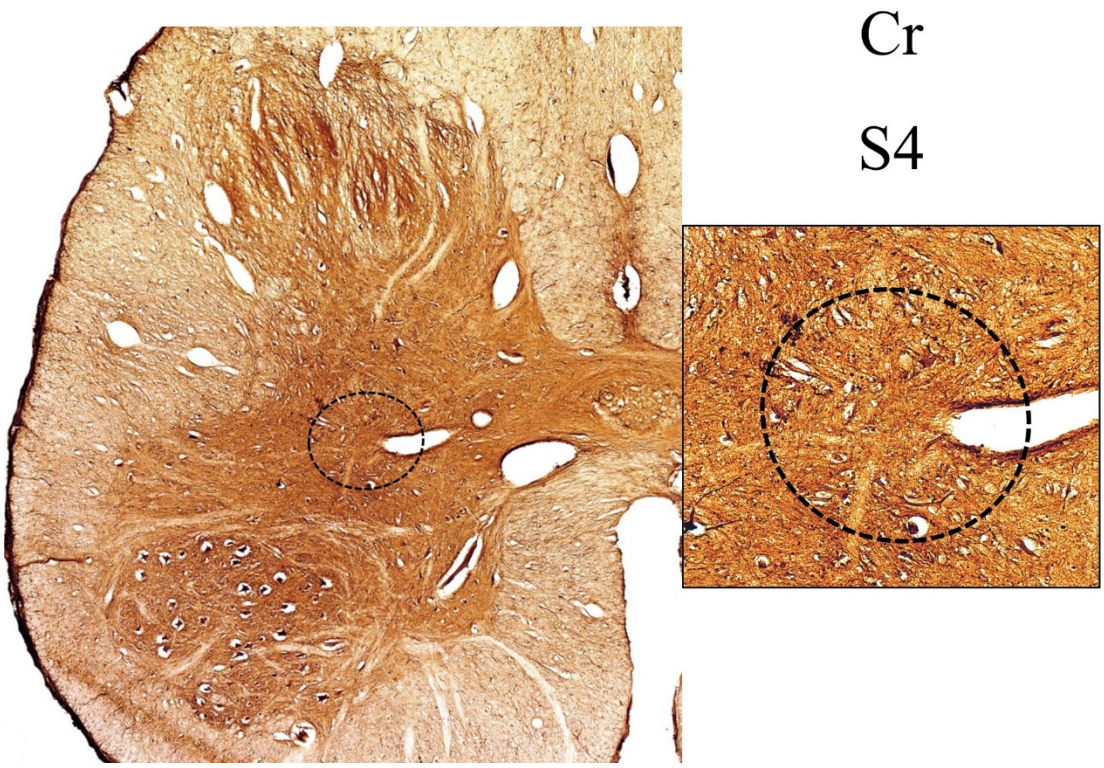
Şekil 40: L5 segmentinde ENK immunoreaktivitesi gösteren LPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.

4.2.3. Nucleus Sacralis Precerebellaris'in Nörokimyasal İçeriği

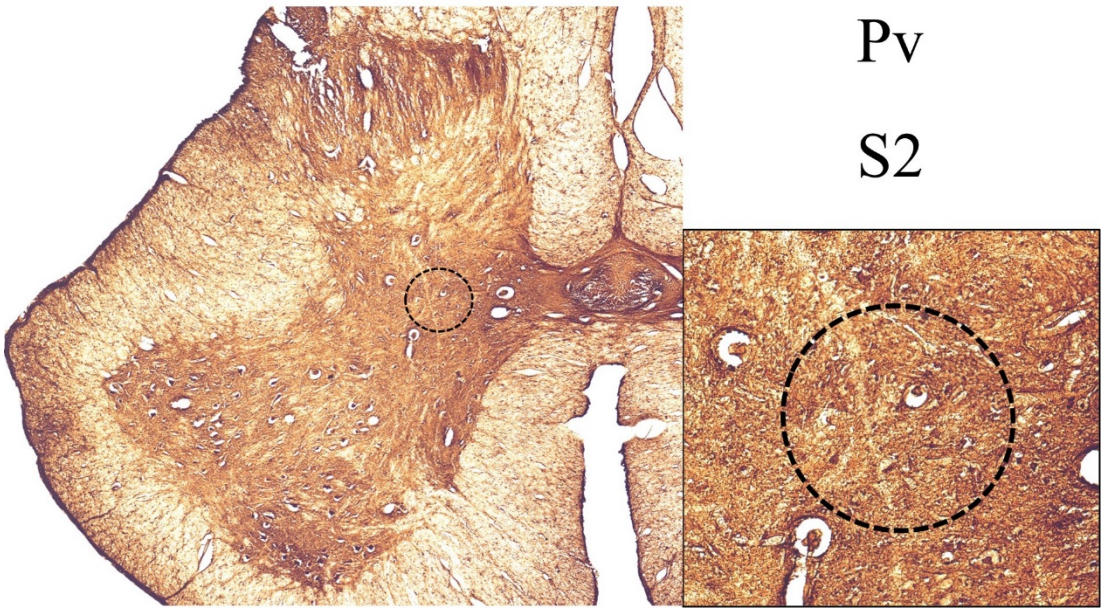
Cb (**Şekil 41**), Cr (**Şekil 42**), Pv (**Şekil 43**), ChAT (**Şekil 44**), CART (**Şekil 45**), GAD 65/67 (**Şekil 46**), NeuN (**Şekil 47, 48**), SP (**Şekil 49**), 5-HT (**Şekil 50**), ENK (**Şekil 51**) immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronlar tespit edildi.



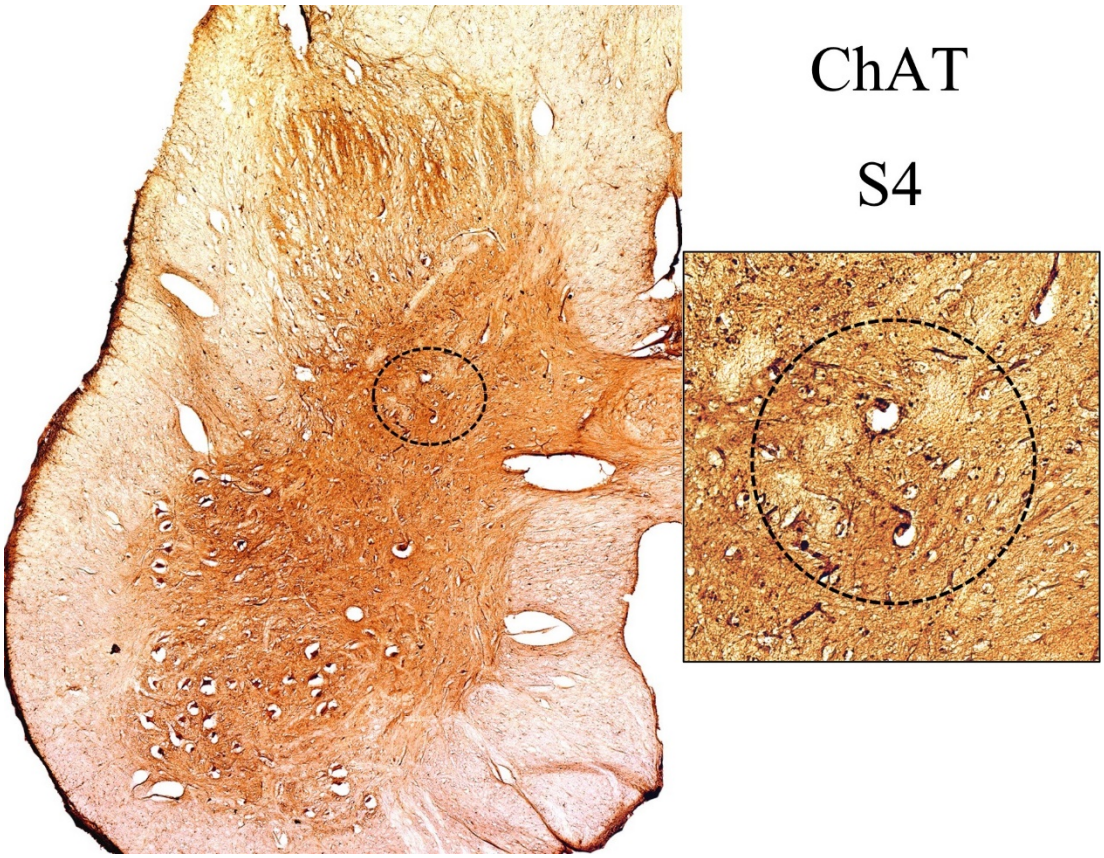
Şekil 41: S4 segmentinde Cb immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



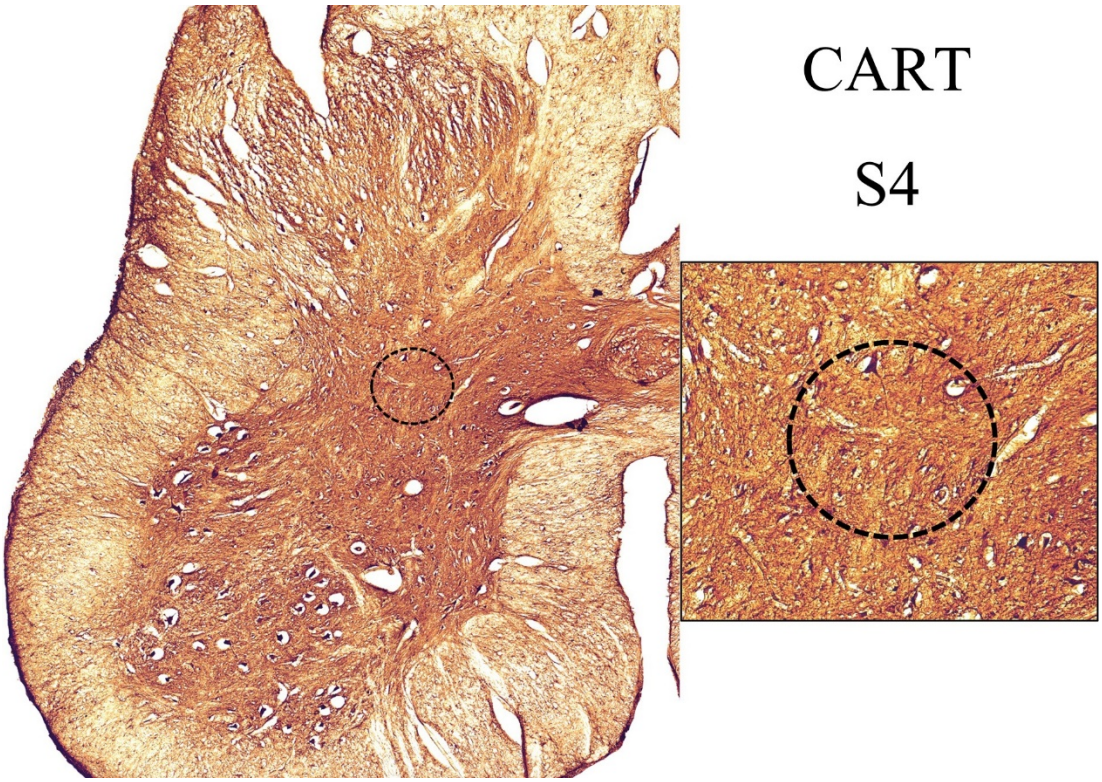
Şekil 42: S4 segmentinde Cr immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



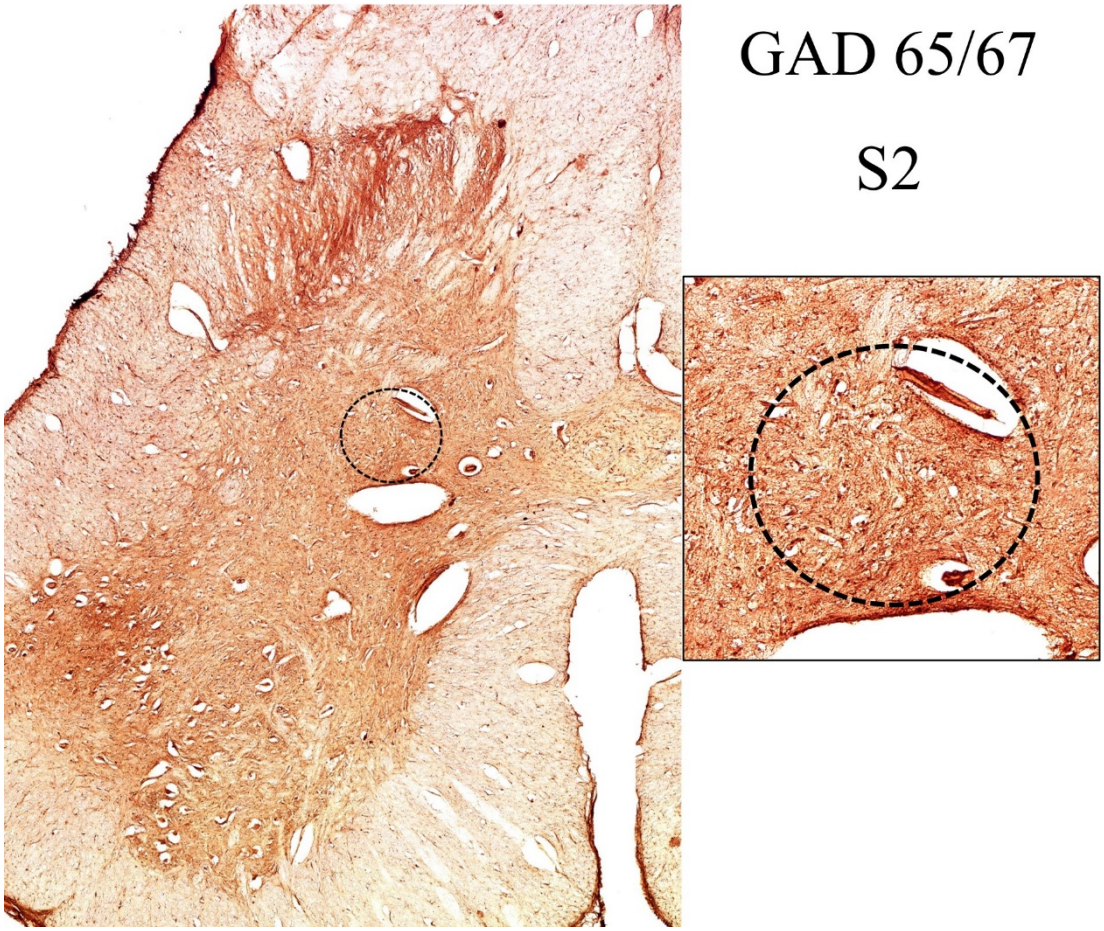
Şekil 43: S2 segmentinde Pv immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



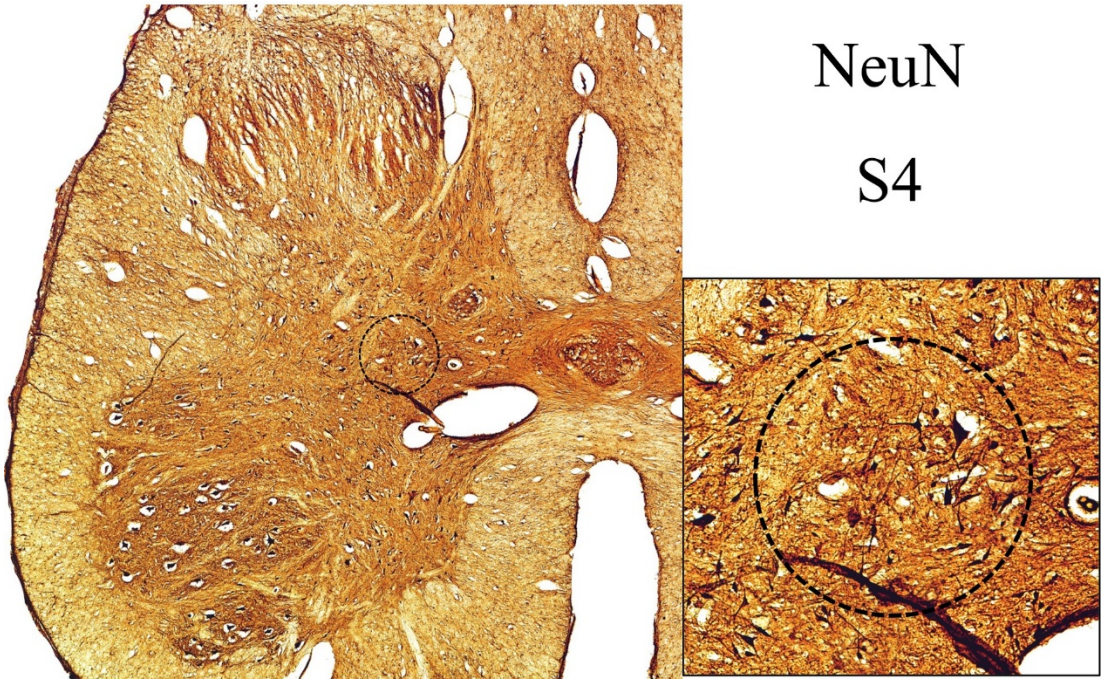
Şekil 44: S4 segmentinde ChAT immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



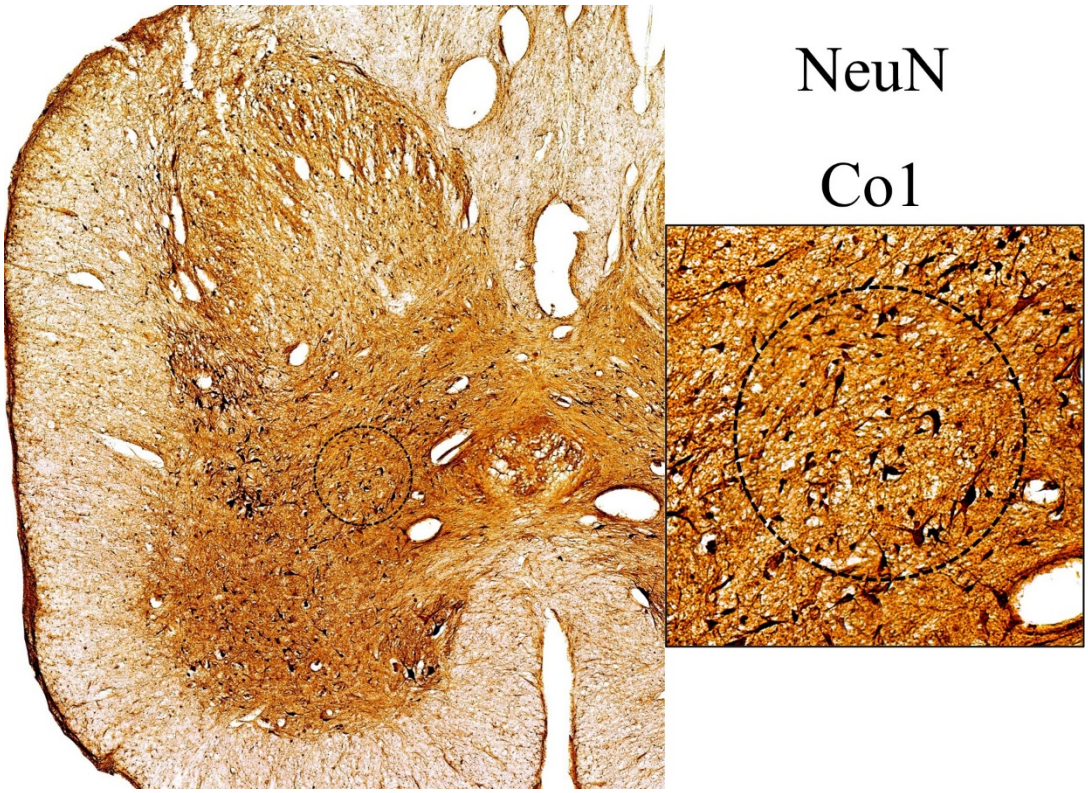
Şekil 45: S4 segmentinde CART immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



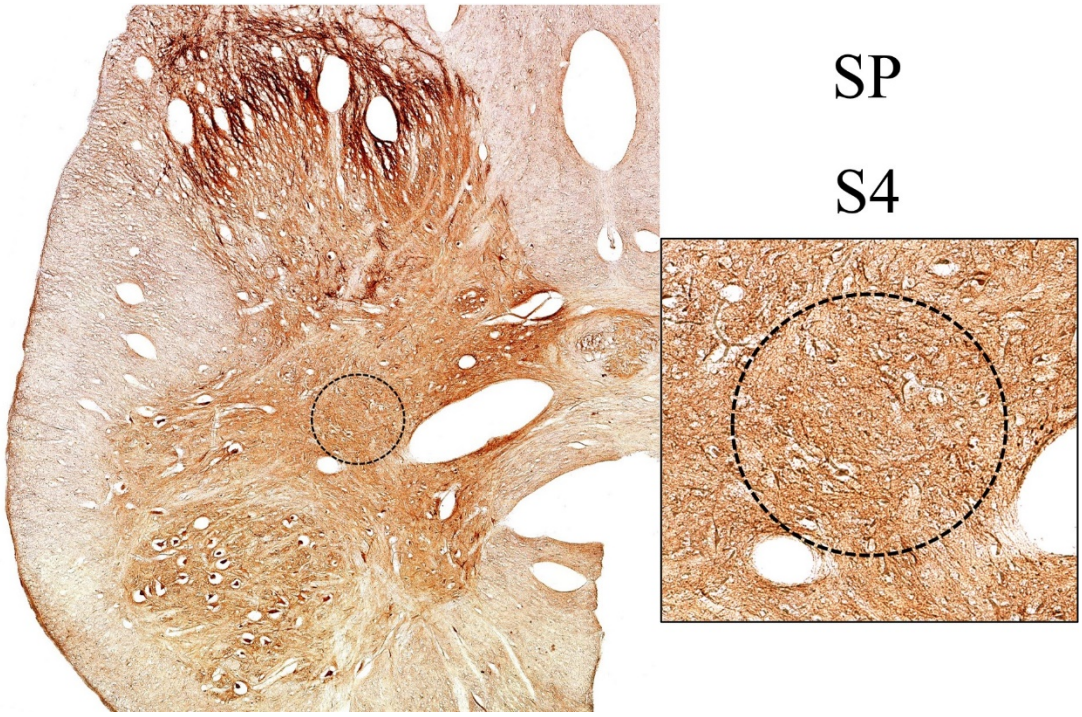
Şekil 46: S2 segmentinde GAD 65/67 immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



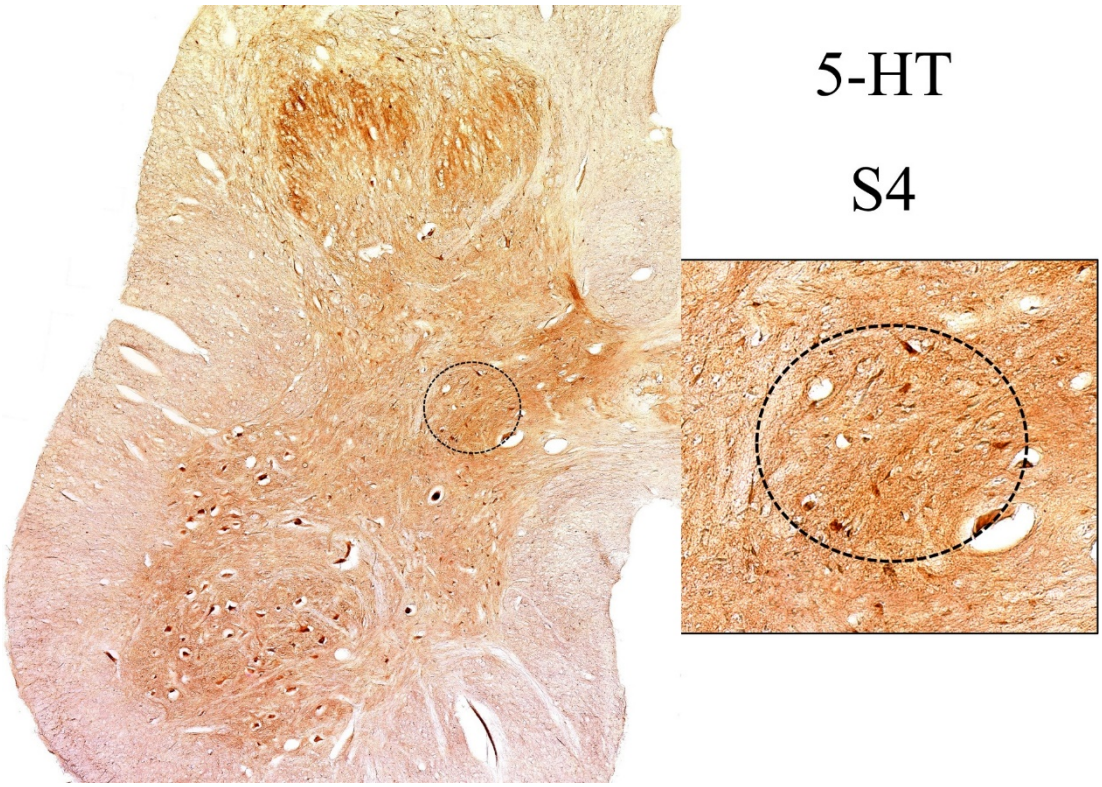
Şekil 47: S4 segmentinde NeuN immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



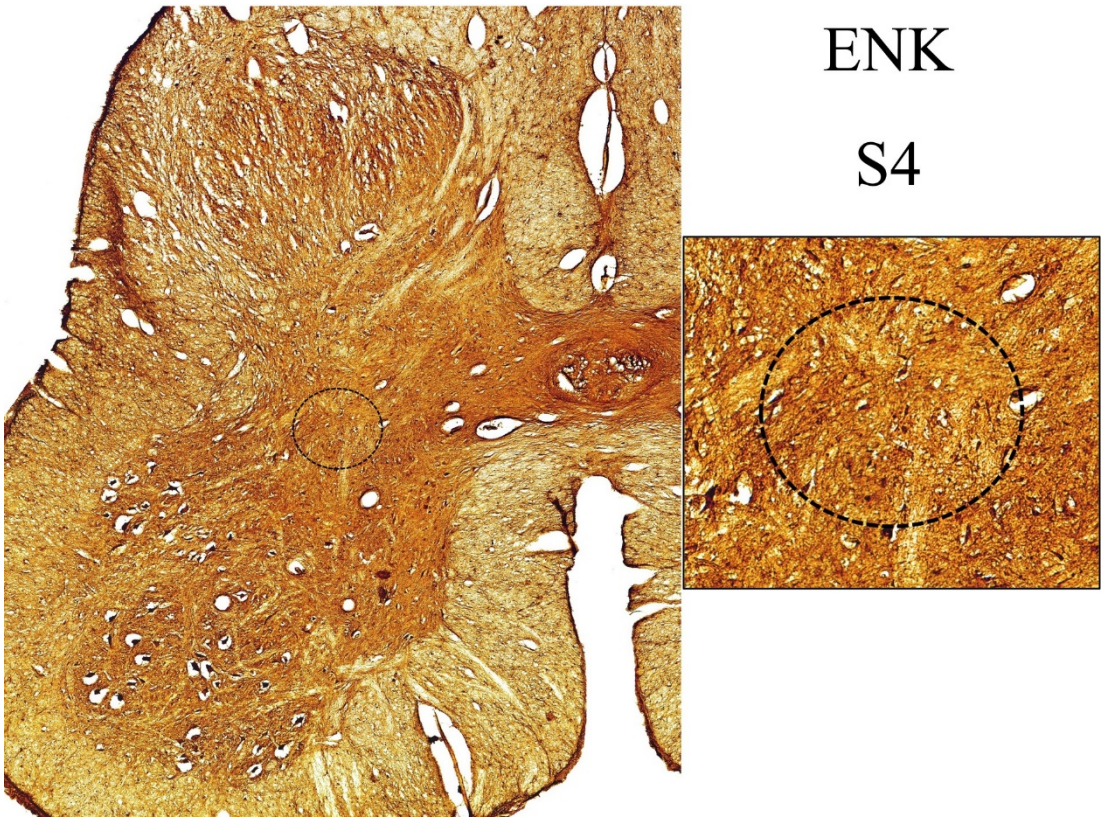
Şekil 48: Co1 segmentinde NeuN immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



Şekil 49: S4 segmentinde SP immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



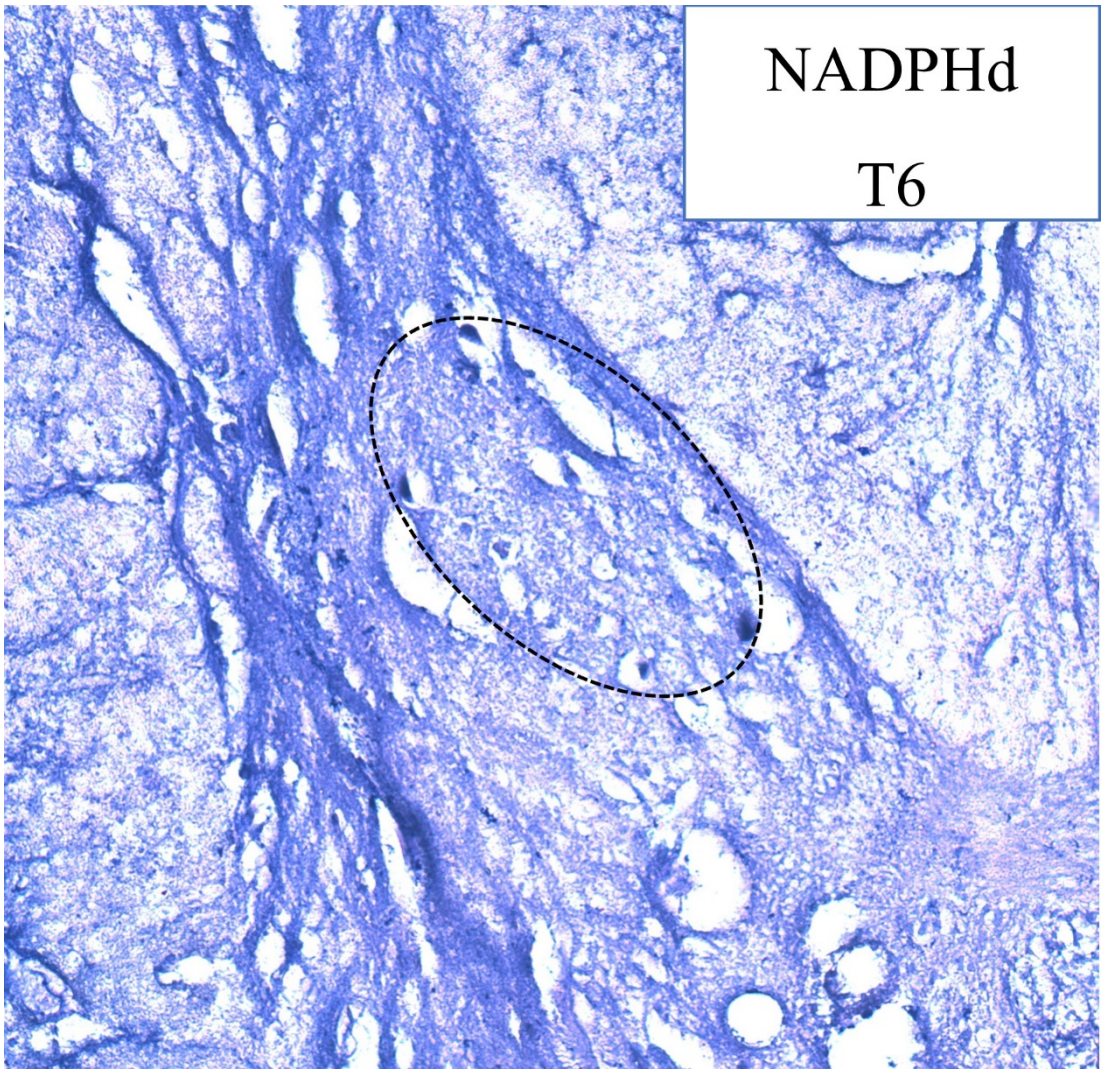
Şekil 50: S4 segmentinde 5-HT immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.



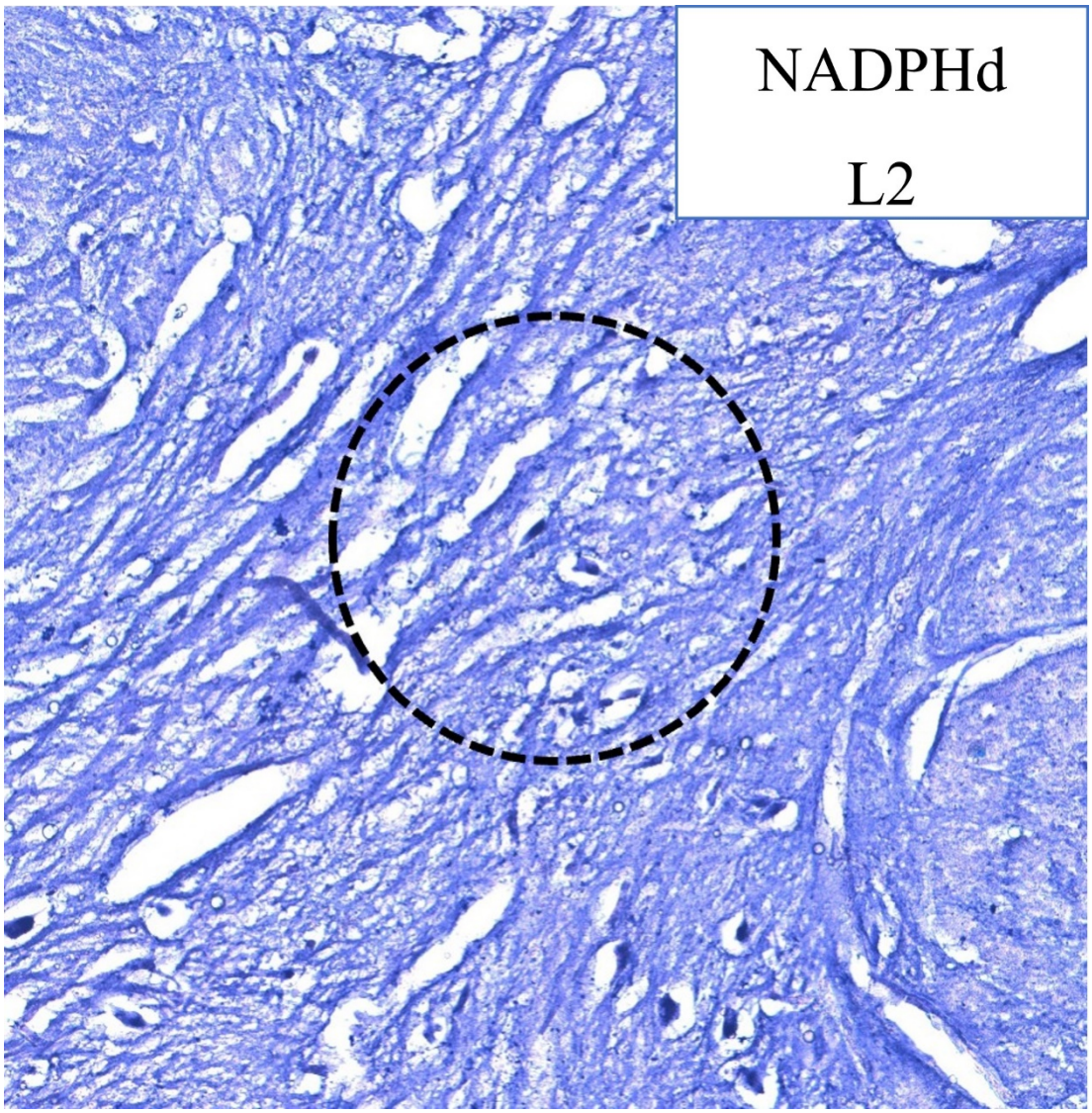
Şekil 51: S4 segmentinde ENK immunoreaktivitesi gösteren SPrCb'ye ait nöronların yakın plan görüntüsü.

4.3. D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin NOS İçeriği

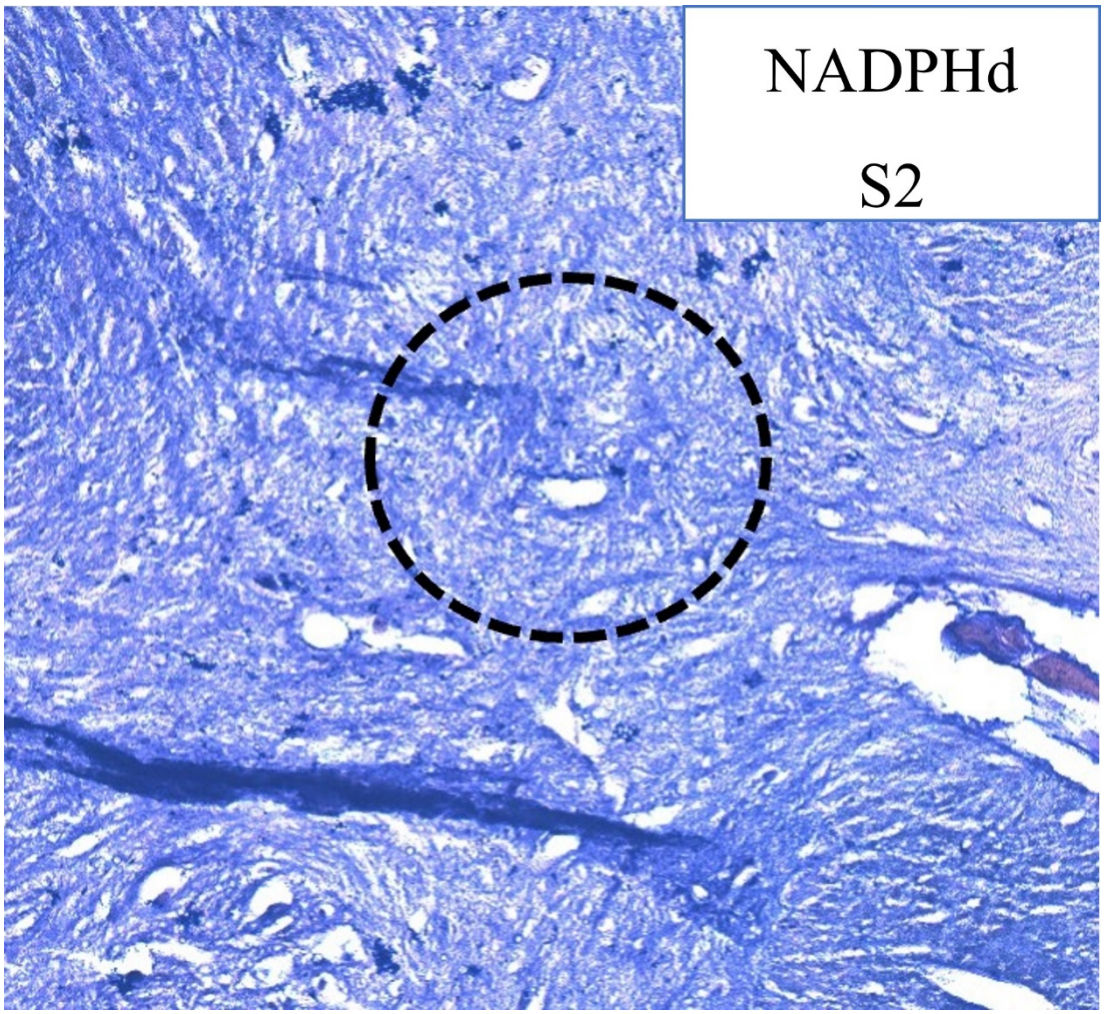
D'de (**Şekil 52**), LPrCb'de (**Şekil 53**) ve SPrCb'de (**Şekil 54**) NOS içeriği tespit edildi.



Şekil 52: T6 segmentinde NADPHd histokimyasal boyaması sonrasında D'nin lokalizasyonu ve yakın plan görüntüsü.



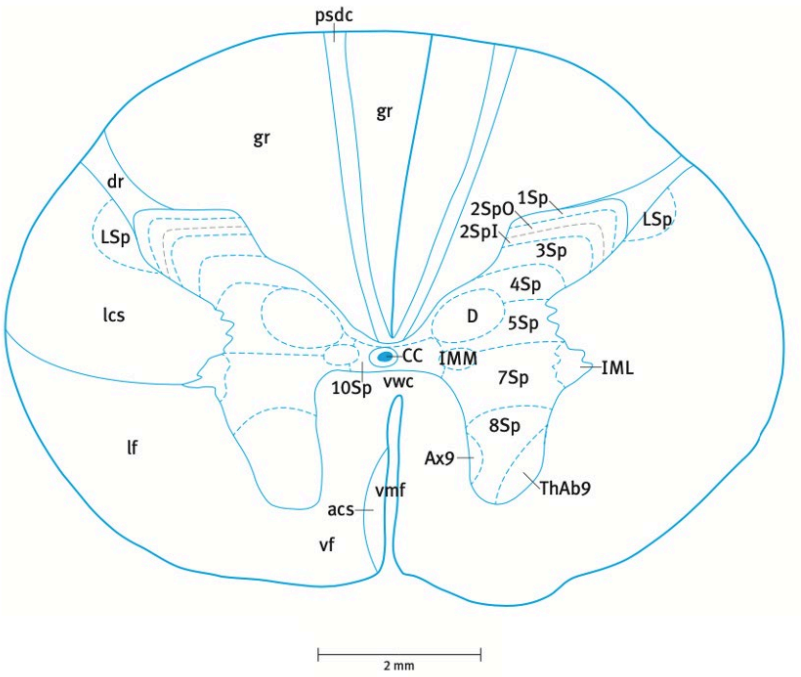
Şekil 53: L2 segmentinde NADPHd histokimyasal boyaması sonrasında LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan görüntüsü.



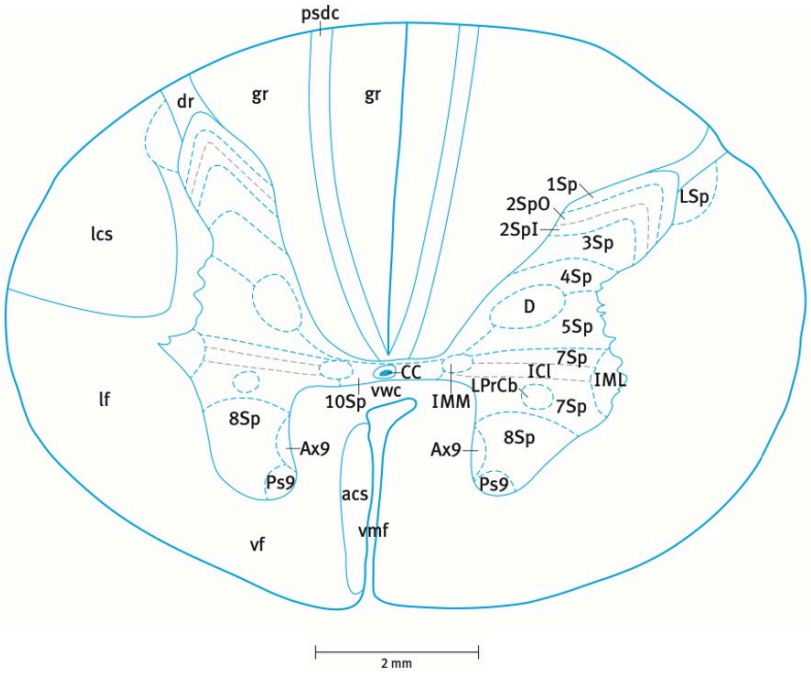
Şekil 54: S2 segmentinde NADPHd histokimyasal boyaması sonrasında LPrCb'nin lokalizasyonu ve yakın plan görüntüsü.

5. Tartışma

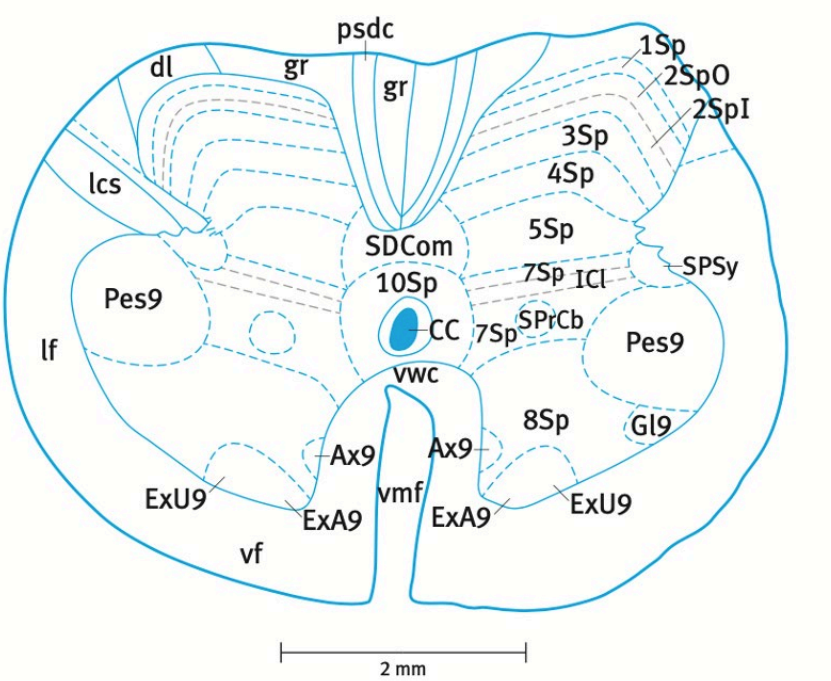
İnsan omuriliğinde nucleus dorsalis T1(2)-L2(3) segmentleri arasında, nucleus lumbaris precerebellaris L1-L5 segmentleri arasında ve nucleus sacralis precerebellaris S1-Co1 segmentleri arasında yer alan ve transvers kesitlerde yuvarlak/oval şekilli çekirdeklerdir (Erzurumlu ve ark., 2019; Sengul ve ark., 2013). Sengul ve ark. (2013) ve Watson ve ark. (2022) tarafından fare, sıçan, marmoset maymunu, rhesus maymunu ve insan omuriliğine yönelik hazırlanan haritalamalar bu nucleus'ların lokalizasyonlarının belirlenmesinde temel referans görevi görür **(Şekil 55, 56, 57)**. Ayrıca Sengul ve ark. (2012) tarafından postnatal dördüncü gün farede yapılan hücresel mimari haritalaması da bu nucleus'ların lokalizasyonlarına dair önemli bilgiler sunar **(Şekil 58**). Loewy (1970) D'yi kedi omuriliğinde A, B ve C olmak üzere üç farklı morfoloji içeren hücre sınıfına ayırdı. En küçük hücrelerin oluşturduğu A tipindeki hücrelerin değişken dendritik dallanma paternleri sergilediğini ve orta büyüklükteki hücrelerin oluşturduğu B tipindeki hücrelerin ise multipolar ve fusiform hücrelerden meydana geldiğini bildirdi. Çoğu multipolar hücrenin dendritlerinin radyal bir şekilde uzandığını ve fusiform nöronların uzun eksenlerinin ise dikey olarak uzandığını gösterdi. Büyük hücrelerin oluşturduğu C tipindeki hücrelerin dendritlerinin ise kraniokaudal yönde uzandığını bildirdi. Ayrıca üç hücre tipindeki hücrelerin dendritlerinin laminae V, VI, VII ve X'a doğru uzandığını ve böylece nucleus'un sınırlarını geçtiğini ve son olarak D'deki toplam nöron popülasyonunu, en çok A tipindeki ve en az B tipindeki hücrelerin oluşturduğunu kaydetti. Kuno, Muñoz-Martinez ve Randić (1973) kedide tr. spinocerebellaris posterior'daki kas ve kutanöz nöron gruplarının kaynağının D olduğunu ifade ettiler. Ardından Rivero-Melián (1996) sıçanda D'nin medialinde arka bacağın distal kaslarını innerve eden sinirlerin işaretlenmiş terminallerinin, lateralinde proksimal kasları innerve eden sinirlerin işaretlenmiş terminallerinin bulunduğunu bildirerek D'nin somatotopik organizasyonunu gösterdi.



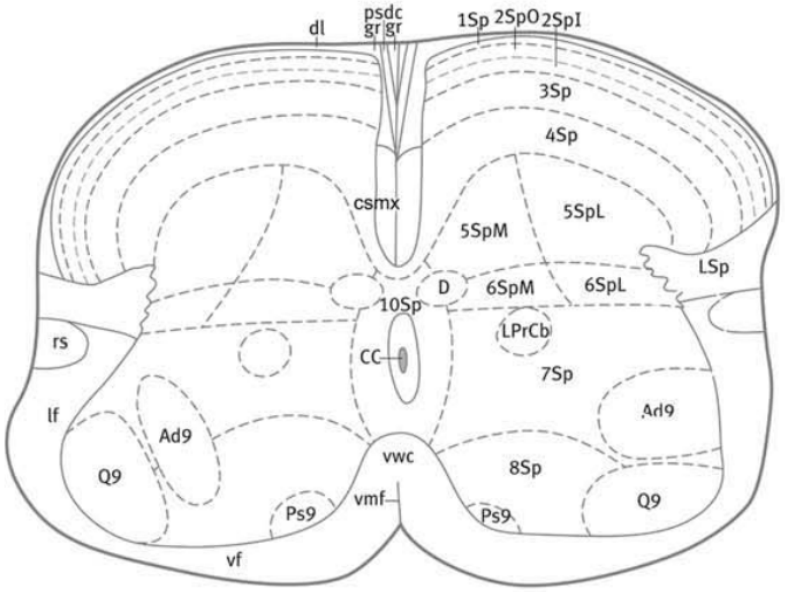
Şekil 55: İnsan T12 omurilik segmentinin laminar organizasyonu ve D'nin lokalizasyonu (Sengul ve ark., 2013).



Şekil 56: İnsan L2 omurilik segmentinin laminar organizasyonu ve LPrCb'nin lokalizasyonu (Sengul ve ark., 2013).



Şekil 57: İnsan S2 omurilik segmentinin laminar organizasyonu ve SPrCb'nin lokalizasyonu (Sengul ve ark., 2013).

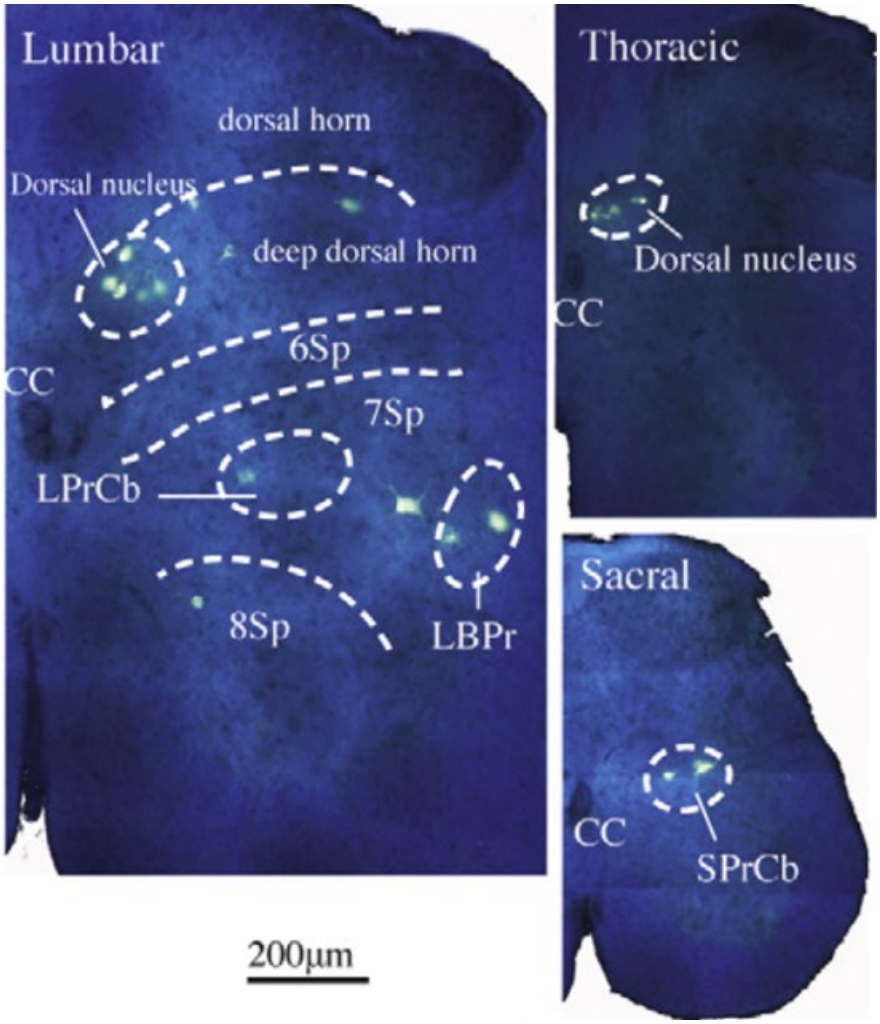


Şekil 58: Postnatal 4. gün farenin L3 omurilik segmentinin laminar organizasyonu, D'nin ve LPrCb'nin lokalizasyonu (Sengul ve ark., 2012).

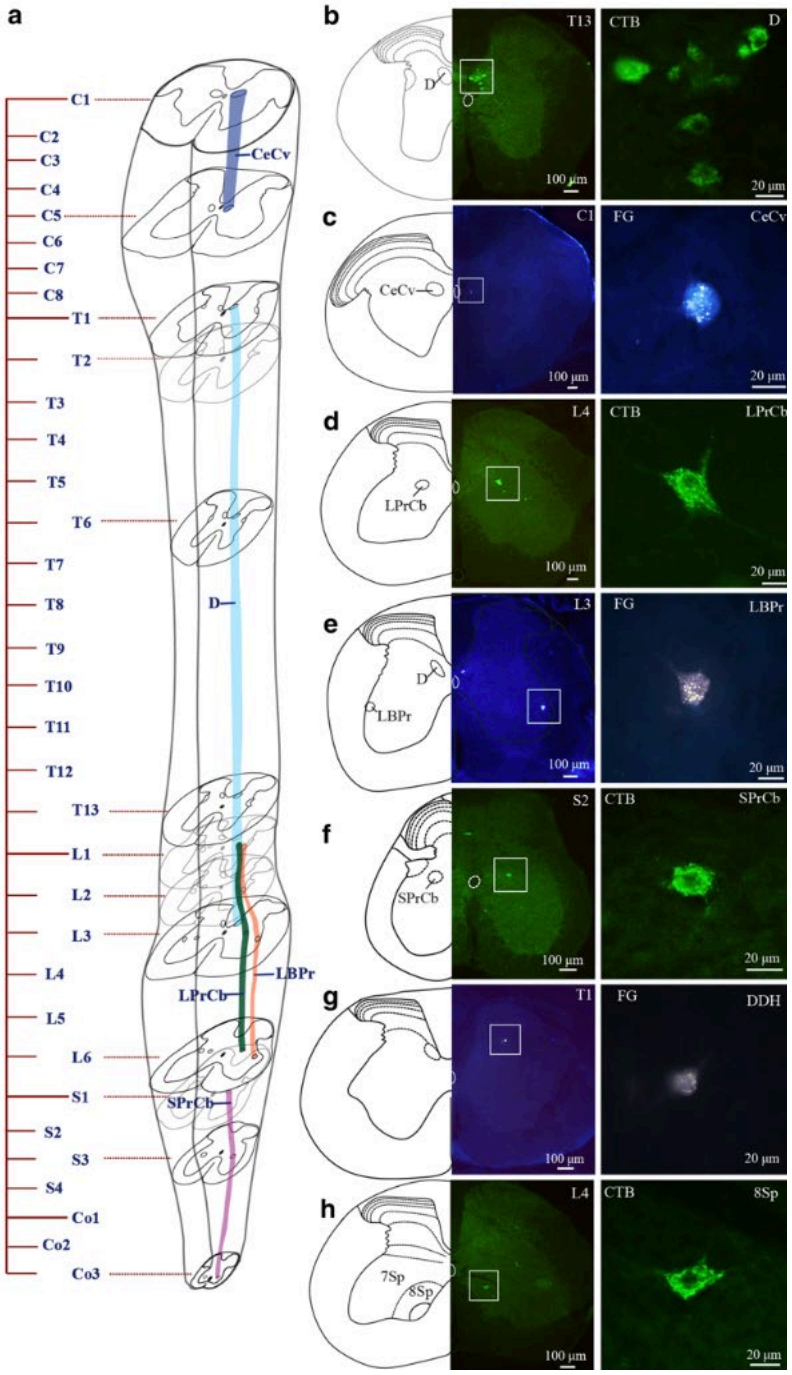
Snyder ve ark. (1978) kedideki D'ye ait olan hücresel mimari bulgularının (Loewy, 1970), boyut ve şekil açısından farklılıklar barındırmasına rağmen sincap maymunundaki hücresel mimari sonuçlara benzer olduğunu bildirdi. Ancak sıçan D'sinin, kedi ve maymununkine göre daha dorsoventral olarak yassı olduğunu ve hücrelerinin daha küçük ve daha fusiform şekilde olduğunu not etti. Ayrıca uzantılarının D'dekiler kadar olmasa da longitudinal olarak uzandığını belirttiği SPrCb'nin, sıçanda ve sincap maymununda bulunduğunu gösterdi.

Snyder ve ark. (1978) D'nin ipsilateral cerebellum'a, SPrCb'nin ise kontralateral cerebellum'a projekte olduğunu bildirdi. Edgley ve Grant (1991) SPrCb'deki nöronların grup I kas afferentlerinden monosinaptik olarak uyarıldığını belirterek bu nucleus'un D'ye ve CeCv'ye benzerliğine vurgu yaptı. Luo ve ark. (2020) faredeki cerebellum'un SPrCb'den kuyruğun propriyosepsiyon duyusunu aldığını gösterdi. Fu ve ark. (2012), farenin cerebellum'una Fluoro-Gold retrograd nöronal işaretleyici enjekte ederek ve Cb, Cr, Pv ve SMI-32'nin immunoreaktivitelerini değerlendirerek omurilikteki spinocerebellar hücre gruplarının konumlarını lokalize ettiler **(Şekil 59, 61**). Bu hücre gruplarının, CeCv, D, LPrCb, SPrCb ve lumbar sınır preserebellar nucleus'u oluşturduğunu ve en yüksek nöron popülasyonunun ise D'de bulunduğunu bildirdiler. Bununla birlikte D'deki nöronların çoğunluğunun iğsi olması haricinde nucleus'lardaki nöronların genellikle oval, piriform veya multipolar şekilli olduğunu ve Fluoro-Gold işaretli nöronların boyutlarının 14.0-39.5 µm arasında olduğunu tespit ettiler. Sengul ve ark. (2015) cortex cerebelli'ye Fluoro-Gold ve kolera toksin B enjeksiyonu yaparak farede spinocerebellar projeksiyonlar için ayrıntılı bir topografik harita oluşturdular **(Şekil 60**).

SPrCb'ye yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik gösteren LPrCb (Watson ve ark., 2022) fare (Fu ve ark., 2012), sıçan, rhesus maymunu, marmoset maymunu ve insan omuriliğinde (Sengul ve ark., 2013) haritalanarak gösterildi. Ancak D, LPrCb ve SPrCb'nin insan omuriliğindeki hücresel mimarisi net olarak ortaya konmamıştı. İnsan omuriliğine ait dokular üzerinde gerçekleştirdiğimiz bu ilk niteliği taşıyan araştırmamızda, her üç nucleus'a ait hücrelerin morfolojilerinin multipolar, ovoid, fusiform ve triangular şekilde karakterize olduğunu gözlemledik. Ayrıca D'ye ait nöronların uzun çapını 7,05-81,54 µm arasında, LPrCb'ye ait nöronların uzun çaplarını 9,45-44,33 µm arasında ve SPrCb'ye ait nöronların uzun çaplarını 8,1-40,8 µm arasında olduğunu tespit ettik.



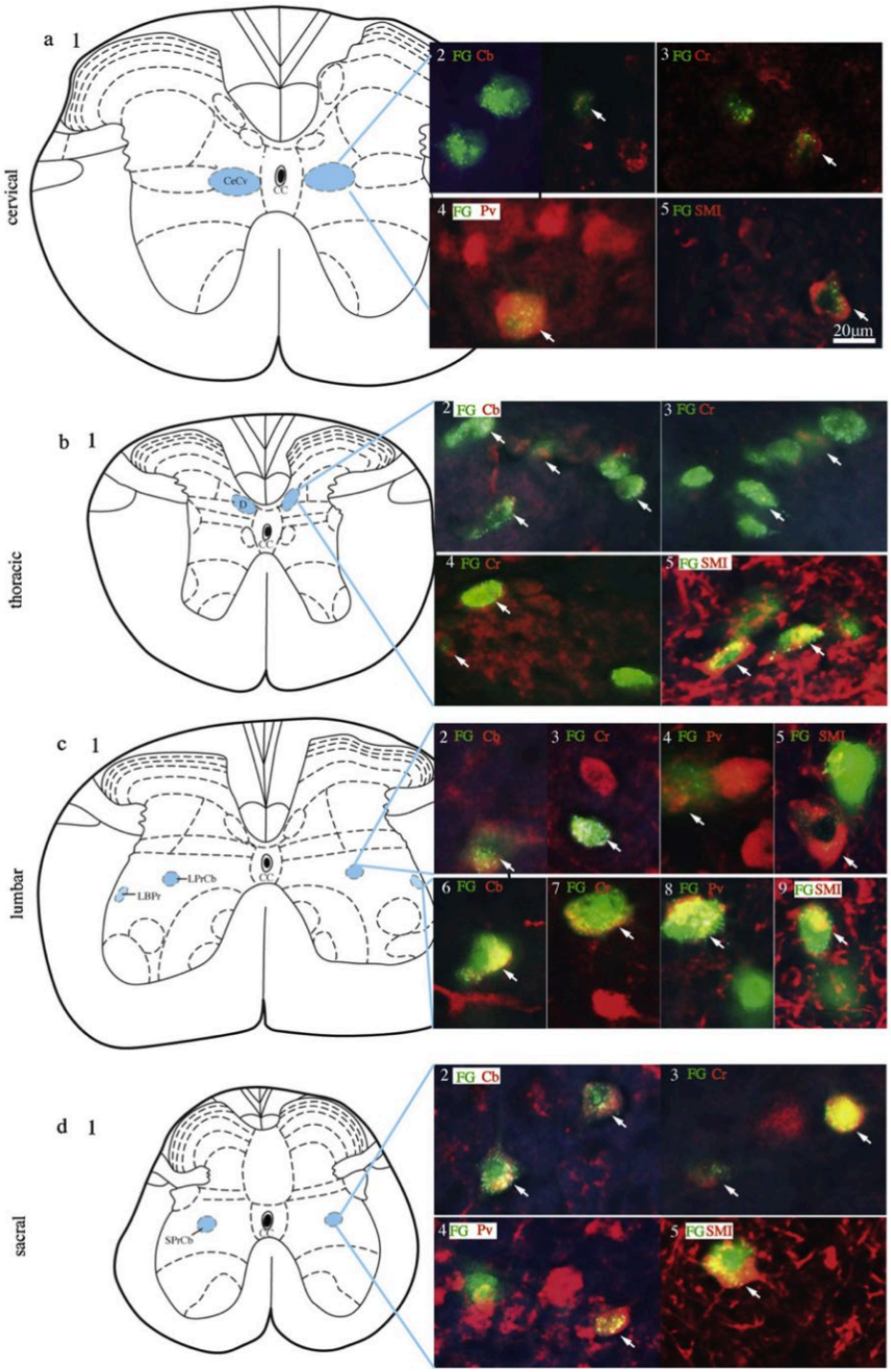
Şekil 59: Fluoro-Gold işaretleyici sonrasında faredeki D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin lokalizasyonu (Fu ve ark., 2012).



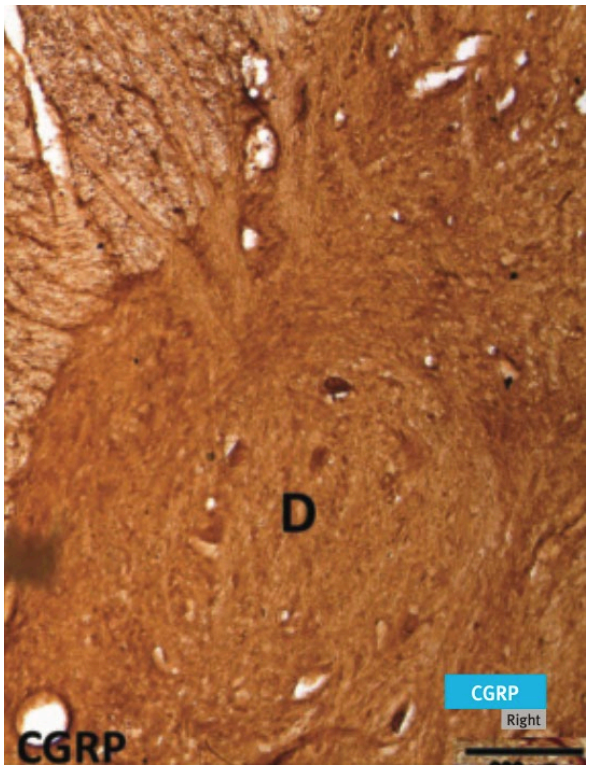
Şekil 60: Fare omuriliğinde D, LPrCb ve SPrCb nöronal kolonları (sol taraf), Fluoro-Gold ve kolera toksin B enjeksiyonu sonrasında nucleus'ların lokalizasyonları (sağ taraf) (Sengul ve ark., 2015).

Çoklu sistem atrofisi (multipl sistem atrofisi, MSA) akinezi, rijidite ve postural instabilitenin görüldüğü nörodejeneratif bir hastalıktır (Ubhi, Low ve Masliah, 2011). Erişkin başlangıçlı ve ilerleyici bir hastalık olan MSA'da, morfolojik olarak alfa-sinüklein (α-syn) birikimi sadece nöronlarda değil, oligodendrositlerde de olur ve α-syn'den oluşan glial sitoplazmik inklüzyonlar ise hastalığın önemli bir mikroskobik özelliğini oluşturur (Jellinge ve Lantos, 2010; Jellinger, 2014; Monzio Compagnoni ve di Fonzo, 2019; Papp ve Lantos, 1994; Papp, Kahn ve Lantos, 1989). Braak, Rüb ve Del Tredici (2003) MSA'da nuclei precerebellaris'te nöronal hücre kaybını bildirmiştir. Bu nedenle D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin nörokimyasal özelliklerinin anlaşılması önem kazanmıştır. D'nin nörokimyasal içeriğine dair daha önce yapılan araştırmalar insanda; SP, ENK (de Lanerolle ve LaMotte, 1982), benzodiazepin (Faull ve Villiger, 1986), adrenalin (Smith, Schambra, Wilson, Page ve Schwinn, 1999), glutamat (Aronica, Catania, Geurts, Yankaya ve Troost, 2001), CGRP, NeuN, ChAT ve NOS (Sengul ve ark., 2013) (**Şekil 62, 63, 64**) immunoreaktivitesi gösterilmiştir. Farede D'de, LPrCb'de ve SPrCb'de ise Cb, Cr, Pv ve SMI-32 immunoreaktivitesi (Fu ve ark., 2012) **(Şekil 61**) kedide ise Cr immunoreaktivitesi bildirilmiştir (Veshchitskii ve ark., 2021).

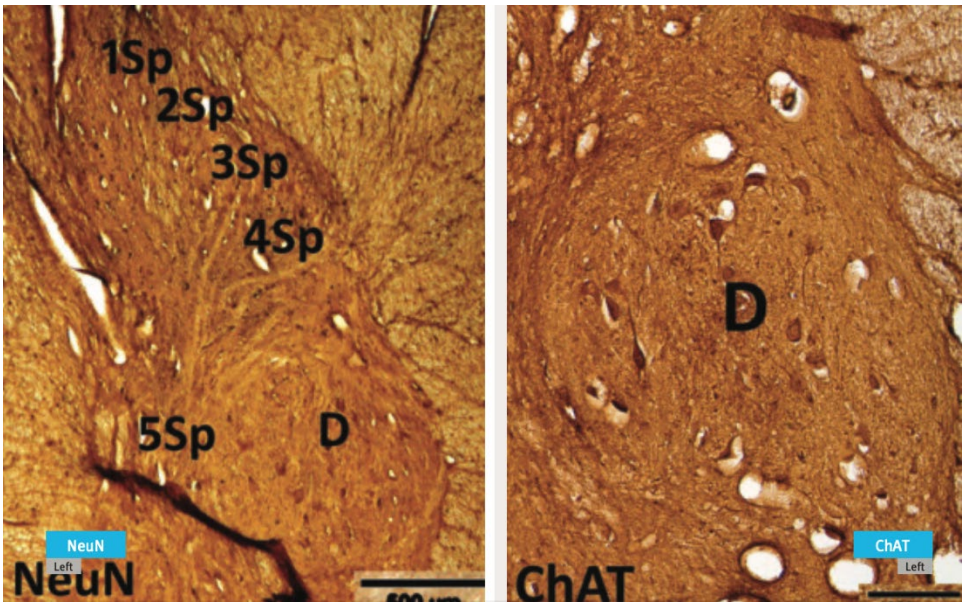
Bu tez araştırmamızla insan omuriliğinde D'deki, LPrCb'deki ve SPrCb'deki nöronların ilk kez geniş bir panelde detaylı nörokimyasal içerik taraması ile Cb, Cr, Pv, ChAT, CART, GAD 65/67, NeuN, SP, 5-HT, ENK ve NOS immunoreaktivitesi gösterdiğini bildiriyoruz.



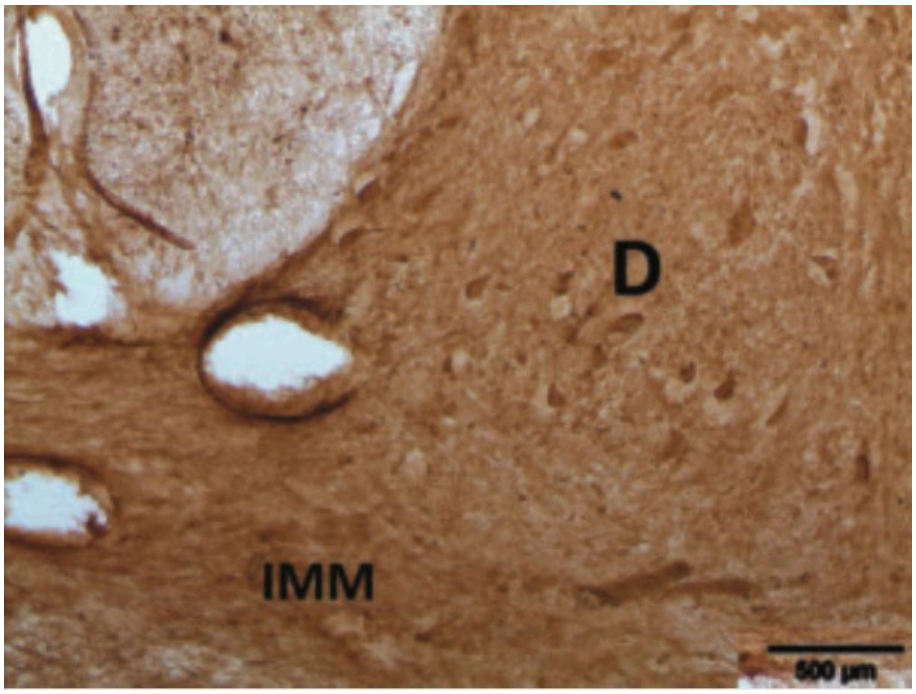
Şekil 61: Faredeki D'de, LPrCb'de ve SPrCb'de Cb, Cr, Pv ve SMI-32 immunoreaktivitesi (Fu ve ark., 2012).



Şekil 62: İnsan omuriliğinin L3 segmentinde D'nin CGRP immunoreaktivitesi (Sengul ve ark., 2013).



Şekil 63: İnsan omuriliğinin L2 segmentinde D'nin NeuN ve ChAT immunoreaktivitesi (Sengul ve ark., 2013).



Şekil 64: İnsan omuriliğinin T12 segmentinde D'nin NOS immunoreaktivitesi (Sengul ve ark., 2013).

6. Sonuç ve Öneriler

Omuriliğin mikroskobik anatomisinde tanımlanmış olan nucleus'ların, hücresel mimarilerinin ve nörokimyasal özelliklerinin ortaya çıkarılması, diğer türlerle olan farklılıkların belirlenmesini ve bu hücre gruplarının fonksiyonlarına dair bilgilerin elde edilmesini sağlar.

Bu araştırmamız omurilikteki nuclei precerebellaris'e ait olan D'nin, LPrCb'nin ve SPrCb'nin hücresel mimarisini ayrıntılı olarak ortaya koydu. Bu nucleus'ların; Cb, Cr, Pv, ChAT, CART, GAD 65/67, NeuN, SP, 5-HT, ENK ve NOS nörokimyasal içeriklerine sahip olduklarının gözlenmesi neticesinde nucleus'ların pek çok farklı nörokimyasal nörotransmittere sahip olduğu anlaşılmış ve bu anatomik ve fonksiyonel çeşitliliğin cerebellum üzerinde yapacağı etkilere dair ipuçları elde edilmiştir.

Araştırmamızın neticesinde elde edilen bulguların ve gözlemlerin insan omuriliğinde detaylı ilk araştırma olması açısından, insan omuriliğinin mikroskobik anatomisine ve ilgili nucleus'ların fonksiyonlarına dair literatüre ciddi bir katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

7. Kaynaklar

Ahmadian-Moghadam, H., Sadat-Shirazi, M. S. ve Zarrindast, M. R. (2018). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide. *Peptides*, *110*, (s. 56–77). doi: 10.1016/j.peptides.2018.10.008

Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M. ve Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, *89*(1), (s. 73–120). doi: 10.1152/physrev.00015.2008

Anelli, R. ve Heckman, C. J. (2005). The calcium binding proteins calbindin, parvalbumin, and calretinin have specific patterns of expression in the gray matter of cat spinal cord. *Journal of Neurocytology*, *34*(6), (s. 369–385). doi: 10.1007/s11068-006-8724-2

Antal, M., Polgár, E., Chalmers, J., Minson, J. B., Llewellyn-Smith, I., Heizmann, C. W. ve Somogyi, P. (1991). Different populations of parvalbumin- and calbindin-D28k-immunoreactive neurons contain GABA and accumulate 3H-D-aspartate in the dorsal horn of the rat spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, *314*(1), (s. 114–124). doi: 10.1002/cne.903140111

Aquilonius, S. M., Eckernäs, S. Å. ve Gillberg, P. G. (1981). Topographical localization of choline acetyltransferase within the human spinal cord and a comparison with some other species. *Brain Research*, *211*(2), (s. 329–340). doi: 10.1016/0006-8993(81)90705-8

Arevalo, R., Sanchez, F., Alonso, J. R., Rubio, M., Aijon, J. ve Vazquez, R. (1993). Calretinin immunoreactivity in the magnocellular neurosecretory nuclei of the rat hypothalamus. *Acta Histochemica*, *95*(2), (s. 177–184). doi: 10.1016/S0065-1281(11)80257-6

Arıncı, K. ve Elhan, A. (2014). *Anatomi 2. Cilt (5. Baskı)*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.

Arnold, S. E. ve Trojanowski, J. Q. (1996). Human fetal hippocampal development: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neuronal morphologic features. *The Journal of Comparative Neurology*, *367*(2), (s. 274–292). doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960401)367:2<274::AID-CNE9>3.0.CO;2-2

Aronica, E., Catania, M. V., Geurts, J., Yankaya, B. ve Troost, D. (2001). Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes. *Neuroscience*, *105*(2), (s. 509–520). doi: 10.1016/s0306-4522(01)00181-6

Aronin, N., DiFiglia, M., Liotta, A. S. ve Martin, J. B. (1981). Ultrastructural localization and biochemical features of immunoreactive LEU-enkephalin in monkey dorsal horn. *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *1*(6), (s. 561–577). doi:10.1523/JNEUROSCI.01-06-00561.1981

Barber, R. P., Phelps, P. E., Houser, C. R., Crawford, G. D., Salvaterra, P. M. ve Vaughn, J. E. (1984). The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *The Journal of Comparative Neurology*, *229*(3), (s. 329–346). doi: 10.1002/cne.902290305

Baron, E. M. (2016). Spinal cord and spinal nerves: gross anatomy. S. Standring (Ed.), *Gray's Anatomy: the anatomical basis of clinical practice (41. Baskı)* içinde (s. 762-773). Elsevier.

Barson, A. J. (1970). The vertebral level of termination of the spinal cord during normal and abnormal development. *Journal of Anatomy*, *106*(Pt 3), (s. 489-497).

Barson, A. J. ve Sands, J. (1977). Regional and segmental characteristics of the human adult spinal cord. *Journal of Anatomy*, *123*(Pt 3), (s. 797-803).

Battaglia, G. ve Rustioni, A. (1992). Substance P innervation of the rat and cat thalamus. II. Cells of origin in the spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, *315*(4), (s. 473–486). doi: 10.1002/cne.903150409

Behring, E. A. ve Kitasato, S. (1890). Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Deutschen Medinischen Wochenschrift*, *49*, (s. 1113–1114). doi: 10.1055/S-0029-1207589

Berg, E. M., Bertuzzi, M. ve Ampatzis, K. (2018). Complementary expression of calcium binding proteins delineates the functional organization of the locomotor network. *Brain Structure & Function*, *223*(5), (s. 2181–2196). doi:10.1007/S00429-018-1622-4

Berridge, M. J., Lipp, P. ve Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *1*(1), (s. 11–21). doi:10.1038/35036035

Bhattacharyya, K. B. (2011). *Eminent Neuroscientists Their Lives and Works*. Kolkata: Association of Neuroscientists of Eastern India and Academic Publishers.

Bjarkam, C. R., Glud, A. N., Orlowski, D., Sørensen, J. C. H. ve Palomero-Gallagher, N. (2017). The telencephalon of the Göttingen minipig, cytoarchitecture and cortical

surface anatomy. *Brain Structure & Function*, *222*(5), (s. 2093–2114). doi:10.1007/S00429-016-1327-5

Bleazard, L., Hill, R. G. ve Morris, R. (1994). The correlation between the distribution of the NK1 receptor and the actions of tachykinin agonists in the dorsal horn of the rat indicates that substance P does not have a functional role on substantia gelatinosa (lamina II) neurons. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *14*(12), (s. 7655–7664). doi:10.1523/JNEUROSCI.14-12-07655.1994

Borges, L. F. ve Iversen, S. D. (1986). Topography of choline acetyltransferase immunoreactive neurons and fibers in the rat spinal cord. *Brain Research*, *362*(1), (s. 140–148). doi:10.1016/0006-8993(86)91407-1

Bowker, R. M., Westlund, K. N. ve Coulter, J. D. (1981). Origins of serotonergic projections to the spinal cord in rat: an immunocytochemical-retrograde transport study. *Brain Research*, *226*(1–2), (s. 187–199). doi:10.1016/0006-8993(81)91092-1

Braak, H., Rüb, U. ve Del Tredici, K. (2003). Involvement of precerebellar nuclei in multiple system atrophy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *29*(1), (s. 60–76). doi: 10.1046/j.1365-2990.2003.00432.x

Bredt, D. S., Hwang, P. M. ve Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, *347*(6295), (s. 768–770). doi: 10.1038/347768a0

Burnett, R., Guichard, Y. ve Barale, E. (1997). Immunohistochemistry for light microscopy in safety evaluation of therapeutic agents: an overview. *Toxicology*, *119*(1), (s. 83–93). doi: 10.1016/s0300-483x(96)03600-1

Calka, J., Zalecki, M., Wasowicz, K., Arciszewski, M. B. ve Lakomy, M. (2008). A comparison of the distribution and morphology of ChAT-, VAChT-immunoreactive and AChE-positive neurons in the thoracolumbar and sacral spinal cord of the pig. *Veterinarni Medicina*, *53*(8), (s. 434–444). doi:10.17221/1925-VETMED

Carter, M. ve Shieh, J. (2015). *Guide to Research Techniques in Neuroscience (İkinci Baskı)*. United States of America: Elsevier Academic Press.

Chang, H. T. (1951). Caudal extension of Clarke's nucleus in the spider monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, *95*(1), (s. 43–51). doi:10.1002/cne.900950104

Chang, M. M. ve Leeman, S. E. (1970). Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *The Journal of Biological Chemistry*, *245*(18), (s. 4784–4790).

Childs, G. V. (2014). History of Immunohistochemistry. L. M. McManus ve R. N. Mitchell (Ed.), *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms* içinde (s. 3775-3796). Elsevier Science Publishers.

Clarke, J. A. L. (1851). XXVI. Researches into the structure of the spinal chord. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *141*, (s. 607–621). doi:10.1098/RSTL.1851.0029

Cliffer, K. D., Urca, G., Elde, R. P. ve Giesler, G. J. (1988). Studies of peptidergic input to the lateral spinal nucleus. *Brain Research*, *460*(2), (s. 356–360). doi:10.1016/0006-8993(88)90381-2

Coons, A. H., Creech, H. J. ve Jones, R. N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *47*(2), (s. 200–202). doi: 10.3181/00379727-47-13084P

Dawson, T. M., Bredt, D. S., Fotuhi, M., Hwang, P. M. ve Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(17), (s. 7797–7801). doi: 10.1073/pnas.88.17.7797

de Góis Morais, P. L. A., de Lima, R. R. M., Ríos-Flórez, J. A., Melo, T. F. V., Clascá, F., de Souza Cavalcante, J., … Nascimento Junior, E. S. (2020). Cytoarchitecture and myeloarchitecture of the entorhinal cortex of the common marmoset monkey (Callithrix jacchus). *The Journal of Comparative Neurology*, *528*(8), (s. 1307–1320). doi: 10.1002/cne.24814

de Lanerolle, N. C. ve LaMotte, C. C. (1982). The human spinal cord: substance P and methionine-enkephalin immunoreactivity. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *2*(10), (s. 1369–1386). doi:10.1523/JNEUROSCI.02-10-01369.1982

Demircubuk, I., Candar, E. ve Sengul, G. (2022). The seminal contributions of Benedict Stilling (1810-1879) to neuroanatomy. *Child's Nervous System: ChNS :official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. doi:10.1007/S00381-022-05512-9

Deng, P., Cuenca, N., Doerr, T., Pow, D. V., Miller, R. ve Kolb, H. (2001). Localization of neurotransmitters and calcium binding proteins to neurons of salamander and mudpuppy retinas. *Vision Research*, *41*(14), (s. 1771–1783). doi: 10.1016/s0042-6989(01)00060-8

DiFiglia, M. ve Aronin, N. (1984). Immunoreactive leu-enkephalin in the monkey hypothalamus including observations on its ultrastructural localization in the paraventricular nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, *225*(3), (s. 313–326). doi: 10.1002/cne.902250302

Douglass, J., McKinzie, A. A. ve Couceyro, P. (1995). PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *15*(3 Pt 2), (s. 2471–2481). doi:10.1523/JNEUROSCI.15-03-02471.1995

Dun, N. J., Dun, S. L., Wu, S. Y., Förstermann, U., Schmidt, H. H. ve Tseng, L. F. (1993). Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat and squirrel monkey spinal cord. *Neuroscience*, *54*(4), (s. 845–857). doi:10.1016/0306-4522(93)90579-5

Edgley, S. A. ve Grant, G. M. (1991). Inputs to spinocerebellar tract neurones located in stilling's nucleus in the sacral segments of the rat spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, *305*(1), (s. 130–138). doi: 10.1002/cne.903050112

Ehrlich, P. (1891). Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II. Ueber Abrin. *Deutsche Medicinischen Wochenscrift*, 17 (*44)*, (s. 1218–1219). doi: 10.1055/s-0029-1206825

Elias, C. F., Lee, C. E., Kelly, J. F., Ahima, R. S., Kuhar, M., Saper, C. B. ve Elmquist, J. K. (2001). Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, *432*(1), (s. 1–19). doi: 10.1002/cne.1085

Elphick, M. R. (1997). Localization of nitric oxide synthase using NADPH diaphorase histochemistry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *72*, (s. 153–158). doi:10.1385/0-89603-394-5:153

Erzurumlu, R., Şengül, G. ve Ulupınar, E. (2019). *Nöroanatomi*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.

Faull, R. L. ve Villiger, J. W. (1986). Benzodiazepine receptors in the human spinal cord: a detailed anatomical and pharmacological study. *Neuroscience*, *17*(3), 791–802. doi: 10.1016/0306-4522(86)90045-x

Flace, P., Lorusso, L., Laiso, G., Rizzi, A., Cagiano, R., Nico, B., … Benagiano, V. (2014). Calbindin-D28K immunoreactivity in the human cerebellar cortex. *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)*, *297*(7), (s. 1306–1315). doi: 10.1002/ar.22921

Fu, Y. H., Sengul, G., Paxinos, G. ve Watson, C. (2012). The spinal precerebellar nuclei: calcium binding proteins and gene expression profile in the mouse. *Neuroscience Letters*, *518*(2), (s. 161–166). doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.002

Fu, Y., Tvrdik, P., Makki, N., Paxinos, G. ve Watson, C. (2011). Precerebellar cell groups in the hindbrain of the mouse defined by retrograde tracing and correlated with cumulative Wnt1-cre genetic labeling. *Cerebellum (London, England)*, *10*(3), (s. 570–584). doi: 10.1007/s12311-011-0266-1

García-Cabezas, M. Á, John, Y. J., Barbas, H. ve Zikopoulos, B. (2016). Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Frontiers in Neuroanatomy*, *10*, 107. doi: 10.3389/fnana.2016.00107

Gautam, M., Prasoon, P., Kumar, R., Reeta, K. H., Kaler, S. ve Ray, S. B. (2016). Role of neurokinin type 1 receptor in nociception at the periphery and the spinal level in the rat. *Spinal Cord*, *54*(3), (s. 172–182). doi: 10.1038/sc.2015.206

Gibson, S. J., Polak, J. M., Bloom, S. R. ve Wall, P. D. (1981). The distribution of nine peptides in rat spinal cord with special emphasis on the substantia gelatinosa and on the area around the central canal (lamina X). *The Journal of Comparative Neurology*, *201*(1), (s. 65–79). doi: 10.1002/cne.902010106

Giesler, G. J. ve Elde, R. P. (1985). Immunocytochemical studies of the peptidergic content of fibers and terminals within the lateral spinal and lateral cervical nuclei. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *5*(7), (s. 1833–1841). doi:10.1523/JNEUROSCI.05-07-01833.1985

Gilabert, J. A. (2012). Cytoplasmic calcium buffering. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *740*, (s. 483–498). doi:10.1007/978-94-007-2888-2_20

Gillberg, P. G. ve Aquilonius, S. M. (1985). Cholinergic, opioid and glycine receptor binding sites localized in human spinal cord by in vitro autoradiography. Changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, *72*(3), (s. 299–306). doi: 10.1111/j.1600-0404.1985.tb00874.x

Gillberg, P. G., d'Argy, R. ve Aquilonius, S. M. (1988). Autoradiographic distribution of [3H]acetylcholine binding sites in the cervical spinal cord of man and some other

species. *Neuroscience Letters*, *90*(1–2), (s. 197–202). doi:10.1016/0304-3940(88)90811-7

Gioia, M., Rodella, L., Petruccioli, M. G. ve Bianchi, R. (2000). The cytoarchitecture of the adult human parabrachial nucleus: a Nissl and Golgi study. *Archives of Histology and Cytology*, *63*(5), (s. 411–424). doi: 10.1679/aohc.63.411

Gioia, M. ve Bianchi, R. (1987). The cytoarchitecture of the nucleus cuneiformis. A Nissl and Golgi study. *Journal of Anatomy*, *155*, (s. 165-176).

Glazer, E. J. ve Basbaum, A. I. (1981). Immunohistochemical localization of leucine-enkephalin in the spinal cord of the cat: enkephalin-containing marginal neurons and pain modulation. *The Journal of Comparative Neurology*, *196*(3), (s. 377–389). doi: 10.1002/cne.901960303

Goodchild, A. K., Llewellyn-Smith, I. J., Sun, Q. J., Chalmers, J., Cunningham, A. M. ve Pilowsky, P. M. (2000). Calbindin-immunoreactive neurons in the reticular formation of the rat brainstem: catecholamine content and spinal projections. *The Journal of Comparative Neurology*, *424*(3), (s. 547–562). doi: 10.1002/1096-9861(20000828)424:3<547::aid-cne11>3.0.co;2-o

Groenewegen, H. J., Ahlenius, S., Haber, S. N., Kowall, N. W. ve Nauta, W. J. (1986). Cytoarchitecture, fiber connections, and some histochemical aspects of the interpeduncular nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *249*(1), (s. 65–102). doi: 10.1002/cne.902490107

Grossman, A. ve Clement-Jones, V. (1983). Opiate receptors: enkephalins and endorphins. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, *12*(1), (s. 31–56). doi: 10.1016/s0300-595x(83)80028-0

Gusel'nikova, V. V. ve Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, *7*(2), (s. 42–47).

Haberberger, R. V., Barry, C., Dominguez, N. ve Matusica, D. (2019). Human Dorsal Root Ganglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*, 271. doi: 10.3389/fncel.2019.00271

Henriksen, G. ve Willoch, F. (2008). Imaging of opioid receptors in the central nervous system. *Brain: a Journal of Neurology*, *131*(Pt 5), (s. 1171–1196). doi: 10.1093/brain/awm255

Hinova-Palova, D. V., Edelstein, L., Landzhov, B., Minkov, M., Malinova, L., Hristov, S., … Ovtscharoff, W. (2014). Topographical distribution and morphology of NADPH-

diaphorase-stained neurons in the human claustrum. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *8*, 96. doi: 10.3389/fnsys.2014.00096

Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M. ve Vincent, S. R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(7), (s. 2811–2814). doi: 10.1073/pnas.88.7.2811

Hornung, J. P. (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *26*(4), (s. 331–343). doi: 10.1016/j.jchemneu.2003.10.002

Houser, C. R., Crawford, G. D., Barber, R. P., Salvaterra, P. M. ve Vaughn, J. E. (1983). Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Research*, *266*(1), (s. 97–119). doi:10.1016/0006-8993(83)91312-4

Hughes, J. (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Research*, *88*(2), (s. 295–308). doi: 10.1016/0006-8993(75)90391-1

Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A. ve Morris, H. R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, *258*(5536), (s. 577–580). doi: 10.1038/258577a0

Hughes, J., Smith, T., Morgan, B. ve Fothergill, L. (1975). Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sciences*, *16*(12), (s. 1753–1758). doi:10.1016/0024-3205(75)90268-4

Hunt, S. P., Kelly, J. S., Emson, P. C., Kimmel, J. R., Miller, R. J. ve Wu, J. Y. (1981). An immunohistochemical study of neuronal populations containing neuropeptides or gamma-aminobutyrate within the superficial layers of the rat dorsal horn. *Neuroscience*, *6*(10), (s. 1883–1898). doi:10.1016/0306-4522(81)90029-4

Hurd, Y. L. ve Fagergren, P. (2000). Human cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) mRNA is highly expressed in limbic- and sensory-related brain regions. *The Journal of Comparative Neurology*, *425*(4), (s. 583–598). doi: 10.1002/1096-9861(20001002)425:4<583::aid-cne8>3.0.co;2-#

Ikeda, M., Houtani, T., Nakagawa, H., Baba, K., Kondoh, A., Ueyama, T., … Sugimoto, T. (1995). Enkephalin-immunoreactive fastigial neurons in the rat cerebellum project to upper cervical cord segments. *Brain Research*, *690*(2), (s. 225–230). doi:10.1016/0006-8993(95)00557-7

Jellinger, K. A. ve Lantos, P. L. (2010). Papp-Lantos inclusions and the pathogenesis of multiple system atrophy: an update. *Acta Neuropathologica*, *119*(6), (s. 657–667). doi:10.1007/S00401-010-0672-3

Jellinger, K. A. (2014). Neuropathology of multiple system atrophy: new thoughts about pathogenesis. *Movement Disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *29*(14), (s. 1720–1741). doi: 10.1002/mds.26052

Kádár, A., Wittmann, G., Liposits, Z. ve Fekete, C. (2009). Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *Journal of Neuroscience Methods*, *184*(1), (s. 115–118). doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.07.010

Karten, H. J. ve Brecha, N. (1980). Localisation of substance P immunoreactivity in amacrine cells of the retina. *Nature*, *283*(5742), (s. 87–88). doi: 10.1038/283087a0

Kayalıoğlu, G., Gövsa, F. ve Ertürk, M. (1999). NADPH–Diaphorase–Reactive Neurons in Rat Basal Ganglia. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *29*(4), (s. 379–383).

Kim, S. W., Roh, J. ve Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, *50*(6), (s. 411-418). doi: 10.4132/jptm.2016.08.08

Ko, H. Y., Park, J. H., Shin, Y. B. ve Baek, S. Y. (2004). Gross quantitative measurements of spinal cord segments in human. *Spinal Cord*, *42*(1), (s. 35–40). doi: 10.1038/sj.sc.3101538

Koelliker, R. A. (1896). *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*. Leipzig: Wilhelm Engelmann.

Koylu, E. O., Couceyro, P. R., Lambert, P. D. ve Kuhar, M. J. (1998). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *391*(1), (s. 115–132).

Koylu, E. O., Couceyro, P. R., Lambert, P. D., Ling, N. C., DeSouza, E. B. ve Kuhar, M. J. (1997). Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *Journal of Neuroendocrinology*, *9*(11), (s. 823–833). doi: 10.1046/j.1365-2826.1997.00651.x

Kraus, R. (1897). Uber spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera, Typhus and Pestbouillonkulturen, erzeugt durch homologues Serum. *Wiener klinische Wochenschrift*, *10*, (s. 736–738).

Kulesza, R. J. (2007). Cytoarchitecture of the human superior olivary complex: medial and lateral superior olive. *Hearing Research*, *225*(1–2), (s. 80–90). doi: 10.1016/j.heares.2006.12.006

Kuno, M., Muñoz-Martinez, E. J. ve Randić, M. (1973). Sensory inputs to neurones in Clarke's column from muscle, cutaneous and joint receptors. *The Journal of Physiology*, *228*(2), (s. 327–342). doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010089

Lamotte, C. C. (1988). Lamina X of primate spinal cord: distribution of five neuropeptides and serotonin. *Neuroscience*, *25*(2), (s. 639–658). doi:10.1016/0306-4522(88)90265-5

Lamotte, C. C. ve de Lanerolle, N. C. (1981). Human spinal neurons: innervation by both substance P and enkephalin. *Neuroscience*, *6*(4), (s. 713–723). doi: 10.1016/0306-4522(81)90155-x

Leigh, P. N., Connick, J. H. ve Stone, T. W. (1990). Distribution of NADPH-diaphorase positive cells in the rat brain. *Comparative biochemistry and physiology. Comparative Pharmacology and Toxicology*, *97*(2), (s. 259–264). doi: 10.1016/0742-8413(90)90138-y

Li, K. ve Xu, E. (2008). The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development. *Neuroscience Bulletin*, *24*(3), (s. 195–200). doi:10.1007/S12264-008-0109-3

Lindenmann, J. (1984). Origin of the terms "antibody" and "antigen." *Scandinavian Journal of Immunology*, *19*(4), (s. 281–285). doi: 10.1111/j.1365-3083.1984.tb00931.x

Littlewood, N. K., Todd, A. J., Spike, R. C., Watt, C. ve Shehab, S. A. (1995). The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. *Neuroscience*, *66*(3), (s. 597–608). doi: 10.1016/0306-4522(95)00039-l

Llewelyn, M. B., Hawkins, R. E. ve Russell, S. J. (1992). Discovery of antibodies. *British Medical journal*, *305*(6864), (s. 1269–1272). doi: 10.1136/bmj.305.6864.1269

Loewy, A. D. (1970). A study of neuronal types in Clarke's column in the adult cat. *Journal of Comparative Neurology*, *139*(1), (s. 53–79). doi: 10.1002/cne.901390104

Luo, Y., Onozato, T., Wu, X., Sasamura, K., Sakimura, K. ve Sugihara, I. (2020). Dense projection of Stilling's nucleus spinocerebellar axons that convey tail proprioception to the midline area in lobule VIII of the mouse cerebellum. *Brain Structure & Function*, *225*(2), (s. 621–389. doi: 10.1007/s00429-020-02025-6

Machelska, H. ve Celik, M. Ö. (2020). Opioid Receptors in Immune and Glial Cells-Implications for Pain Control. *Frontiers in Immunology*, *11*, 300. doi: 10.3389/fimmu.2020.00300

Mackie, M., Hughes, D. I., Maxwell, D. J., Tillakaratne, N. J. K. ve Todd, A. J. (2003). Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience*, *119*(2), (s. 461–472). doi: 10.1016/s0306-4522(03)00174-x

Mantyh, P. W., DeMaster, E., Malhotra, A., Ghilardi, J. R., Rogers, S. D., Mantyh, C. R., … Simone, D. A. (1995). Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science*, *268*(5217), (s. 1629–1632). doi: 10.1126/science.7539937

Marlier, L., Sandillon, F., Poulat, P., Rajaofetra, N., Geffard, M. ve Privat, A. (1991). Serotonergic innervation of the dorsal horn of rat spinal cord: light and electron microscopic immunocytochemical study. *Journal of Neurocytology*, *20*(4), (s. 310–322). doi:10.1007/BF01235548

Marshall, G. E., Shehab, S. A., Spike, R. C. ve Todd, A. J. (1996). Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat. *Neuroscience*, *72*(1), (s. 255–263). doi:10.1016/0306-4522(95)00558-7

Matsumoto, M., Xie, W., Inoue, M. ve Ueda, H. (2007). Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary afferents. *Molecular Pain*, *3, 41*. doi:10.1186/1744-8069-3-41

McCotter, R. E. (1916). Regarding the length and extent of the human medulla spinalis. *The Anatomical Record*, *10*(9), (s. 559–564).

Molander, C., Xu, Q. ve Grant, G. (1984). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *The Journal of Comparative Neurology*, *230*(1), (s. 133–141). doi: 10.1002/cne.902300112

Molander, C., Xu, Q., Rivero-Melian, C. ve Grant, G. (1989). Cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat: II. The cervical and upper thoracic cord. *The Journal of Comparative Neurology*, *289*(3), (s. 375–385). doi: 10.1002/cne.902890303

Monzio Compagnoni, G. ve di Fonzo, A. (2019). Understanding the pathogenesis of multiple system atrophy: state of the art and future perspectives. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 113. doi: 10.1186/s40478-019-0730-6

Morona, R., López, J. M. ve González, A. (2006). Calbindin-D28k and calretinin immunoreactivity in the spinal cord of the lizard Gekko gecko: Colocalization with choline acetyltransferase and nitric oxide synthase. *Brain Research Bulletin*, *69*(5), (s. 519–534). doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.02.022

Mullen, R. J., Buck, C. R. ve Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, *116*(1), (s. 201–211). doi: 10.1242/dev.116.1.201

Nissl, F. (1894a). *Über die sogenannten Granula der Nervenzellen*. Leipzig: Veit & Comp.

Nissl, F. (1894b). *Ueber eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans zur Feststellung der Localisation der Nervenzellen*. Coblenz: W. Groos.

Oda, Y. (1999). Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathology international*, *49*(11), (s. 921–937). doi: 10.1046/j.1440-1827.1999.00977.x

Papp, M. I. ve Lantos, P. L. (1994). The distribution of oligodendroglial inclusions in multiple system atrophy and its relevance to clinical symptomatology. *Brain : a Journal of Neurology*, *117 (Pt 2)*, (s. 235–243). doi: 10.1093/brain/117.2.235

Papp, M. I., Kahn, J. E. ve Lantos, P. L. (1989). Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *Journal of the Neurological Sciences*, *94*(1–3), (s. 79–100). doi: 10.1016/0022-510x(89)90219-0

Pathan, H. ve Williams, J. (2012). Basic opioid pharmacology: an update. *British Journal of Pain*, *6*(1), (s. 11–16). doi:10.1177/2049463712438493

Pearce, J. (1990). A note on Jacob Augustus Lockhart Clarke. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *53*(8), (s. 674).

Petras, J. M. (1977). Spinocerebellar neurons in the rhesus monkey. *Brain Research*, *130*(1), (s. 146–151). doi: 10.1016/0006-8993(77)90850-2

Pfitzner, W. (1884). Über Wachstumsbeziehungen zwischen Rückenmark und Wirbelkanal. *Morphologisches Jahrbuch*, *9*, (s. 99–116).

Phul, R. K., Shaw, P. J., Ince, P. G. ve Smith, M. E. (2000). Expression of nitric oxide synthase isoforms in spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders: official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, *1*(4), (s. 259–267). doi:10.1080/14660820050515089

Polgár, E., Thomson, S., Maxwell, D. J., Al-Khater, K. ve Todd, A. J. (2007). A population of large neurons in laminae III and IV of the rat spinal cord that have long dorsal dendrites and lack the neurokinin 1 receptor. *The European Journal of Neuroscience*, *26*(6), (s. 1587–1598). doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05793.x

Ren, K. ve Ruda, M. A. (1994). A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *19*(2), (s. 163–179). doi:10.1016/0165-0173(94)90010-8

Résibois, A. ve Rogers, J. H. (1992). Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, *46*(1), 101–134. doi: 10.1016/0306-4522(92)90012-q

Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, *96*(3), (s. 414–495). doi: 10.1002/cne.900960303

Rexed, B. (1954). A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *The Journal of Comparative Neurology*, *100*(2), (s. 297–379). doi: 10.1002/cne.901000205

Ribeiro-da-Silva, A., Pioro, E. P. ve Cuello, A. C. (1991). Substance P- and enkephalin-like immunoreactivities are colocalized in certain neurons of the substantia gelatinosa of the rat spinal cord: an ultrastructural double-labeling study. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *11*(4), (s. 1068–1080). doi:10.1523/JNEUROSCI.11-04-01068.1991

Rivero-Melián, C. (1996). Organization of hindlimb nerve projections to the rat spinal cord: a choleragenoid horseradish peroxidase study. *The Journal of Comparative Neurology*, *364*(4), (s. 651–663). doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960122)364:4<651::AID-CNE4>3.0.CO;2-2

Romagnano, M. A., Braiman, J., Loomis, M. ve Hamill, R. W. (1987). Enkephalin fibers in autonomic nuclear regions: intraspinal vs. supraspinal origin. *The Journal of Comparative Neurology*, *266*(3), (s. 319–331). doi: 10.1002/cne.902660303

Ruda, M. A., Coffield, J. ve Steinbusch, H. W. (1982). Immunocytochemical analysis of serotonergic axons in laminae I and II of the lumbar spinal cord of the cat. *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *2*(11), (s. 1660–1671). doi:10.1523/JNEUROSCI.02-11-01660.1982

Sar, M., Stumpf, W. E., Miller, R. J., Chang, K. J. ve Cuatrecasas, P. (1978). Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, *182*(1), (s. 17–37). doi: 10.1002/cne.901820103

Scatton, B., Dubois, A., Javoy-Agid, F. ve Camus, A. (1984). Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptors at various segmental levels of the human spinal cord. *Neuroscience Letters*, *49*(3), (s. 239–245). doi:10.1016/0304-3940(84)90296-9

Scatton, B., Dennis, T., L'Heureux, R., Monfort, J. C., Duyckaerts, C. ve Javoy-Agid, F. (1986). Degeneration of noradrenergic and serotonergic but not dopaminergic neurones in the lumbar spinal cord of parkinsonian patients. *Brain Research*, *380*(1), (s. 181–185). doi:10.1016/0006-8993(86)91446-0

Schank, J. R. ve Heilig, M. (2017). Substance P and the Neurokinin-1 Receptor: The New CRF. *International Review of Neurobiology*, *136*, (s. 151–175). doi: 10.1016/bs.irn.2017.06.008

Scherer-Singler, U., Vincent, S. R., Kimura, H. ve McGeer, E. G. (1983). Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *Journal of Neuroscience Methods*, *9*(3), (s. 229–234). doi:10.1016/0165-0270(83)90085-7

Schoenen, J. ve Faull, R. (2004). Spinal Cord: Cyto- and Chemoarchitecture. G. Paxinos ve J. Mai (Ed.), *The Human Nervous System (İkinci Baskı)* içinde (s. 190-232). Elsevier Academic Press.

Schoenen, J., Lotstra, F., Vierendeels, G., Reznik, M. ve Vanderhaeghen, J. J. (1985). Substance P, enkephalins, somatostatin, cholecystokinin, oxytocin, and vasopressin in human spinal cord. *Neurology*, *35*(6), (s. 881–890). doi: 10.1212/wnl.35.6.881

Schwaller, B. (2010). Cytosolic Ca2+ buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(11). doi: 10.1101/cshperspect.a004051

Sengul, G. ve Watson, C. (2011). Spinal Cord: Regional Anatomy, Cytoarchitecture and Chemoarchitecture. J. Mai ve G. Paxinos (Ed.), *The Human Nervous System (Üçüncü Baskı)* içinde (s. 186–232). Elsevier.

Sengul, G., Watson, C., Tanaka, I. ve Paxinos, G. (2013). *Atlas of the spinal cord of the rat, mouse, marmoset, rhesus, and human*. London: Elsevier Academic Press.

Sengul, G., Fu, Y. H., Yu, Y. ve Paxinos, G. (2015). Spinal cord projections to the cerebellum in the mouse. *Brain Structure & Function*, *220*(5), (s. 2997–3009). doi:10.1007/S00429-014-0840-7

Sengul, G., Liang, H., Furlong, T. M. ve Paxinos, G. (2020). Dorsal Horn of Mouse Lumbar Spinal Cord Imaged with CLARITY. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2020/3689380

Sengul, G., Puchalski, R. B. ve Watson, C. (2012). Cytoarchitecture of the spinal cord of the postnatal (P4) mouse. *Anatomical Record*, *295*(5), (s. 837–845). doi: 10.1002/ar.22450

Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S. ve Erspamer, V. (2002). The tachykinin peptide family. *Pharmacological Reviews*, *54*(2), (s. 285–322). doi: 10.1124/pr.54.2.285

Sidman, R. L., Angevine, J. B. ve Pierce, E. T. (1971). *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*. Cambridge: Harvard University Press.

Simantov, R., Kuhar, M. J., Uhi, G. R. ve Snyder, S. H. (1977). Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(5), (s. 2167–2171). doi: 10.1073/pnas.74.5.2167

Skagerberg, G. ve Björklund, A. (1985). Topographic principles in the spinal projections of serotonergic and non-serotonergic brainstem neurons in the rat. *Neuroscience*, *15*(2), (s. 445–480). doi:10.1016/0306-4522(85)90225-8

Smith, M. S., Schambra, U. B., Wilson, K. H., Page, S. O. ve Schwinn, D. A. (1999). Alpha1-adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding alpha1-adrenergic receptor subtypes at four distinct levels. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *63*(2), (s. 254–261). doi: 10.1016/s0169-328x(98)00287-3

Snyder, R. L., Faull, R. L. ve Mehler, W. R. (1978). A comparative study of the neurons of origin of the spinocerebellar afferents in the rat, cat and squirrel monkey based on the retrograde transport of horseradish peroxidase. *The Journal of Comparative Neurology*, *181*(4), (s. 833–852). doi:10.1002/cne.901810409

Sobczak, M., Sałaga, M., Storr, M. A. ve Fichna, J. (2014). Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives. *Journal of Gastroenterology*, *49*(1), (s. 24–45). doi: 10.1007/s00535-013-0753-x

Spalteholz, W. (1909). *Handatlas der Anatomie Des Menschen (Üçüncü Cilt)*. Leipzig: S. Hirzel.

Spiess, J., Villarreal, J. ve Vale, W. (1981). Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry*, *20*(7), (s. 1982–1988). doi: 10.1021/bi00510a038

Stilling, B. (1859). *Neue Untersuchungen ueber den Bau des Rückenmarks*. Cassel: Heinrich Hotop.

Stojilkovic, S. S., Tomić, M., Koshimizu, T. ve van Goor, F. (2000). Calcium Ions as Intracellular Messengers. P. M. Conn ve A. R. Means (Ed.), *Principles of Molecular Regulation* içinde (s. 149-185). Humana Totowa.

Subhedar, N. K., Nakhate, K. T., Upadhya, M. A. ve Kokare, D. M. (2014). CART in the brain of vertebrates: circuits, functions and evolution. *Peptides*, *54*, (s. 108–130). doi: 10.1016/j.peptides.2014.01.004

Takeuchi, Y., Kimura, H. ve Sano, Y. (1982). Immunohistochemical demonstration of the distribution of serotonin neurons in the brainstem of the rat and cat. *Cell and Tissue Research*, *224*(2), (s. 247–267). doi:10.1007/BF00216872

Tavazzani, E., Tritto, S., Spaiardi, P., Botta, L., Manca, M., Prigioni, I., … Russo, G. (2014). Glutamic acid decarboxylase 67 expression by a distinct population of mouse vestibular supporting cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 428. doi: 10.3389/fncel.2014.00428

Terenius, L. ve Wahlstrom, A. (1974). Inhibitor (s) of narcotic receptor-binding in brain extracts and cerebrospinal-fluid. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, *35*, (s. 55).

Terenius, L. ve Wahlström, A. (1975). Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. *Acta Physiologica Scandinavica*, *94*, (s. 74–81).

Thomson, A. (1894). Fifth Annual Report of the Committee of Collective Investigation of the Anatomical Society of Great Britain and Ireland for the Year 1893-94. *Journal of Anatomy and Physiology*, *29*(Pt 1), (s. 35–60).

Todd, A. J., McGill, M. M. ve Shehab, S. A. (2000). Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem. *The European Journal of Neuroscience*, *12*(2), (s. 689–700). doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00950.x

Ubhi, K., Low, P. ve Masliah, E. (2011). Multiple System Atrophy: A Clinical and Neuropathological Perspective. *Trends in neurosciences*, *34*(11), (s. 581-590). doi: 10.1016/j.tins.2011.08.003

Veshchitskii, A. A., Musienko, P. E. ve Merkulyeva, N. (2021). Distribution of Calretinin-Immunopositive Neurons in the Cat Lumbar Spinal Cord. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, *57*(4), (s. 817–834).

Vints, K., Vandael, D., Baatsen, P., Pavie, B., Vernaillen, F., Corthout, N., … Gounko, N. V. (2019). Modernization of Golgi staining techniques for high-resolution, 3-dimensional imaging of individual neurons. *Scientific Reports*, *9*(1), 130. doi: 10.1038/s41598-018-37377-x

Waldeyer-Hartz, H. W. G. (1889). *Das Gorilla-Rückenmark*. Berlin: Königl.

Watson, C. ve Kayalioglu, G. (2009). The organization of the spinal cord. C. Watson, G. Paxinos ve G. Kayalioglu (Ed.), *The Spinal Cord: A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas* içinde (s. 1–7). San Diego: Elsevier Academic Press.

Watson, C., Kirkcaldie, M. ve Paxinos, G. (2010). *The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy*. Elsevier Academic Press.

Watson, C., Sengul, G. ve Paxinos, G. (2022). *The Mammalian Spinal Cord*. Elsevier.

Wierzba-Bobrowicz, T., Lewandowska, E., Stępień, T. ve Szpak, G. M. (2011). Differential expression of calbindin D28k, calretinin and parvalbumin in the cerebellum of pups of ethanol-treated female rats. *Folia Neuropathologica*, *49*(1), (s. 47–55).

Yáñez, M., Gil-Longo, J. ve Campos-Toimil, M. (2012). Calcium binding proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *740*, (s. 461–482.) doi:10.1007/978-94-007-2888-2_19

Zhang, M. (2016). Normal Distribution and Plasticity of Serotonin Receptors after Spinal Cord Injury and Their Impacts on Motor Outputs. H. Fuller ve M. Gates (Ed.), *Recovery of Motor Function Following Spinal Cord Injury* içinde (s. 95-135). IntechOpen.

Zhang, M. D., Tortoriello, G., Hsueh, B., Tomer, R., Ye, L., Mitsios, N., … Hökfelt, T. G. M. (2014). Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(12), (s. E1149-E1158). doi: 10.1073/pnas.1402318111

Zhou, L. ve Zhu, D. Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide: Biology and Chemistry*, *20*(4), (s. 223–230). doi: 10.1016/j.niox.2009.03.001

Ekler

Ek 1: Etik Kurul Onay Belgesi

Ege Unv. Evrak Tarih ve Sayısı: 17.09.2021-E.322962

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-99166796-050.06.04-322962-901
Konu : Onay Kararı21-9T/7

Prof. Dr. Gülgün Şengül
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız **"Nucleus dorsalis, nucleus lumbaris precerebellaris ve nucleus sacralis precerebellaris: hücresel mimari ve nörokimyasal içerikleri"** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmaktadır.

Başvuru dosyası kapsamında, araştırma giderlerinin **Bilimsel Araştırma Proje Fonu (BAP)** tarafından karşılanacağına ilişkin sunulmuş bulunan belge doğrultusunda, araştırmanızın desteklendiğine dair belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir

Varsa **Biyolojik Materyal Transfer Formu'nun** imzaları tamamlanarak Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir. 10.04.2016 tarih ve 29680 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmeliğin 34. maddesinde **"yurtdışına tetkik amaçlı numune gönderme yetkisi sadece ruhsatlı tıbbi laboratuvarlara aittir"** ifadesi yer almakta olup bu madde Klinik Araştırmalar için de yürürlüğe girmiştir. Gönderilen insan kaynaklı biyolojik materyal klinik araştırma için gönderilse bile ruhsatlı bir tıbbi laboratuvar aracılığı ile http://numunetransfer.saglik.gov.tr adresindeki numune transfer yazılımı kullanılarak gönderilmesi konusuna dikkat edilmelidir.

Yazımızın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Güzide AKSU
Kurul Başkanı

Ek:İlgili Etik Kurul Karar. (1 Adet aslı gibidir örneği elden gönderilecektir)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu :BSFRRBYH8Z Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/ege-universitesi-ebys
Adres:Ege Üniversitesi Rektörlüğü Gençlik Cad. No:12 35040 Bornova/İzmir
Telefon:+90 (232) 311 21 10 Faks:+90 (232) 339 90 90
Web:www.ege.edu.tr
Kep Adresi:egeuniversitesi@egeuniversitesi.hs03.kep.tr
Bilgi için: Halide TATAR
Unvanı: Şef

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel : 0 232 390 2134 e-mail: egetaek@gmail.com

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

Microsoft Teams Programı ile Teletoplantı gerçekleştirilmiştir.

BAŞVURU BİLGİLERİ		
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nucleus dorsalis, nucleus lumbaris precerebellaris ve nucleus sacralis precerebellaris: hücresel mimari ve nörokimyasal içerikleri
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Gülgün ŞENGÜL
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Yüksek lisans öğrencisi İbrahim DEMİRÇUBUK Doktora öğrencisi Esra CANDAR
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ	Aliye Üster Vakfı / Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	-
	BİLGİLENDİRME FORMU	-
	VERİ İZLEME FORMU/ ANKET	☐
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒
	DİĞER	☐
KARAR BİLGİLERİ	**Karar Nu: 21-9T/7**	**Tarih: 09.09.2021**
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, **araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda** araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna toplantıya katılan etik kurul üyelerince oy birliği ile karar verilmiştir.	

EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Güzide AKSU

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Güzide AKSU **Başkan**	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Doç. Dr. Tolga AKŞİT **(Başkan Yardımcısı)**	Antrenörlük Eğitimi - Hareket ve Antrenman Bilimleri	Ege Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Hareket ve Antrenman Bilimleri AD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Dr. Öğr. Üyesi Aysun EKSİOĞLU **Üye (Raportör)**	Ebelik A.D.	Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Anabilim Dalı	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Prof. Dr. Zeliha KERRY Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	YILLIK İZİNLİ
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Üye	Halk Sağlığı A.D.	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı olan Kurul Üyesi sorumlu araştırmacı olduğunda, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik Madde 8/c bendi gereğince araştırma ile ilişki bulunmayan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı dosyanın değerlendirilmesi için Kurul tarafından atanmıştır.
Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik Madde 7/ç bendi gereğince görüş alınmak üzere kadın hastalıkları ve doğum uzmanı bir hekim, dosyanın değerlendirilmesi için Kurul tarafından atanmıştır.

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel: 0 232 390 2134 e-mail: egetaek@gmail.com

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nucleus dorsalis, nucleus lumbaris precerebellaris ve nucleus sacralis precerebellaris: hücresel mimari ve nörokimyasal içerikleri

KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 21-9T/7					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ceyda KABAROĞLU **Üye**	Klinik Biyokimya	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D. Klinik Biyokimya B.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Prof. Dr. Çağdaş EKER **Üye**	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Prof. Dr. H. Oya TÜRKOĞLU **Üye**	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Prof. Dr. Meltem SEZİŞ DEMIRCI **Üye**	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Prof. Dr. Şafak DAĞHAN **Üye**	Halk Sağlığı Hemşireliği A.D.	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Doç. Dr. Ahmet ÖZGÜR YENİEL **Üye**	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Doç. Dr. Banu Sarsık KUMBARACI	Patoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Doç. Dr. Mustafa Nuri DENİZ	Anestezi	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI
Doç. Dr. Tahir ATİK **Üye**	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	ONLİNE KATILDI

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı olan Kurul Üyesi sorumlu araştırmacı olduğunda, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik Madde 8/c bendi gereğince araştırma ile ilişiği bulunmayan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı dosyanın değerlendirilmesi için Kurul tarafından atanmıştır.
Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik Madde 7/ç bendi gereğince görüş alınmak üzere kadın hastalıkları ve doğum uzmanı bir hekim, dosyanın değerlendirilmesi için Kurul tarafından atanmıştır.

Ek 2: Olgu Rapor Formu

OLGU RAPOR FORMU

Araştırma adı: Nucleus dorsalis, nucleus lumbaris precerebellaris ve nucleus sacralis precerebellaris: hücresel mimari ve nörokimyasal içerikleri

Olgu No: Tarih:	Nöron boyutu (Minimum ve maksimum çap)	Cb	Cr	Pv	ChAT	CART	NeuN	GAD 65/67	Substans P	Serotonin	Enkefalin	NOS

Teşekkür

Her şeyin gerçekleşmesini mümkün kılan değerli annem Sayın Nuran DEMİRÇUBUK'a,

Engin akademik tecrübesiyle çalışmanın her aşamasının yönetilmesini, yönlendirmesini sağlayan ve diğer akademik çalışmalarımda yol gösteren, düzelten ve teşvik eden akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Gülgün ŞENGÜL'e,

Makroskobi laboratuvarında zamanını ayırarak disseksiyon tecrübesini bana aktaran Sayın Prof. Dr. Okan BİLGE'ye,

Yüksek lisans eğitimim süresince eğitimime destek olan Prof. Dr. Mete ERTÜRK'e, Prof. Dr. Figen GÖVSA GÖKMEN'e, Prof. Dr. Z. Aslı AKTAN İKİZ'e, Prof. Dr. Mehmet Asım ÖZER'e, Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK'e, Prof Dr. Yelda PINAR'a, Prof. Dr. Hülya ÜÇERLER'e, Prof. Dr. Canan YURTTAŞ'a ve Doç, Dr. Servet ÇELİK'e,

Lisans eğitimimin başından itibaren desteğini ve zamanını esirgemeyen SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı ve Anatomi Ana Bilim Başkanı Sayın Prof. Dr. Salih Murat AKKIN'a,

Araştırma kapsamında deney prosedürlerinin uygulanmasında ve görüntülerin düzenlenmesinde birlikte çalıştığım Sayın Biyomühendis ve Sinirbilim doktora öğrencisi Esra CANDAR'a,

Saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 27.07.2022 İbrahim DEMİRÇUBUK

Özgeçmiş

İBRAHİM DEMİRÇUBUK

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anatomi ABD, Bornova, İzmir

Eğitim:

2020 – 2022 **Ege Üniversitesi Anatomi ABD Yüksek Lisans Programı**
Akademik Danışman: Prof. Dr. Gülgün Şengül

2016 – 2020 **SANKO Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi**
Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Lisans Programı

Proje:

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu **(TÜBİTAK-1002)** Projesi **(120S734)** Nucleus Centralis Cervicalis - Nörokimyasal İçeriği ve Ağrı ile İlişkisinin Araştırılması, 2020

Akademik Yayın:

Demircubuk, I., Candar, E. ve Sengul, G. (2022). The seminal contributions of Benedict Stilling (1810-1879) to neuroanatomy. Child's nervous system: ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery. doi:10.1007/S00381-022-05512-9

Uluslararası Sunumlar:

Candar E, **Demircubuk I**, Sengul G. "Human central cervical nucleus - chemoarchitecture and involvement in pain processing", Society for Neuroscience (SfN) Virtual Neuroscience 2021 - 50th Annual Meeting, 8 – 11 November 2021. *Poster presentation*

Candar E, **Demircubuk I,** Sengul G. 2021. "Use of lamprey in spinal cord research: historical perspective", Society for Neuroscience (SfN) Virtual Neuroscience 2021 - 50th Annual Meeting, 8 – 11 November 2021. *Poster presentation*

Demircubuk I, Candar E, Sengul G. "Description of Rexed's laminae in various animal species: historical perspective", Society for Neuroscience (SfN) Virtual Neuroscience 2021 - 50th Annual Meeting, 8 – 11 November 2021. *Poster presentation*

Candar E, **Demircubuk I,** Sengul G. "Bror Rexed (1914-2002): a unique life dedicated to neuroanatomy". The 16th Congress of the European Association of Clinical Anatomy (EACA) and XII Meeting of the International Symposium of Clinical and Applied Anatomy (ISCAA), 14-16 September 2021 (Online), Italy. *Poster presentation*

Demircubuk I, Candar E, Sengul G. "Benedict Stilling (1810-1879) - A New Era on Spinal Cord Research Beyond Surgery". The 16th Congress of the European Association of Clinical Anatomy (EACA) and XII Meeting of the International Symposium of Clinical and Applied Anatomy (ISCAA), 14-16 September 2021 (Online), Italy. *Poster presentation*

Üyelikler:

- International Brain Research Organization (IBRO)
- Federation of European Neuroscience Societies (FENS)
- Neuroscience Society of Turkey (NST)
- International Society for the History of the Neurosciences (ISHN)