

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Periferik Sinirlerin Histomorfometrik Analizinde TT-MMS Programının Güvenilirliğinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi

Pınar AYRAN FİDAN

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Deneyisel çalışmalarda periferik sinirin akson çapı, miyelinli sinir lifi çapı ve miyelinli sinir için iç çap/dış çap oranı (g-ratio), demiyelinizasyon, remiyelinizasyon ve sinir onarımının değerlendirilmesinde görüntü analiz programlarından yararlanılmaktadır. Bu nedenle, morfolometrik değerlendirmeye sıklıkla gereksinim duyulan periferik sinir çalışmaları hedeflenerek, laboratuvarımızda yarı otomatik bir görüntü analiz programı geliştirilmiştir. Çalışmamızda, geliştirdiğimiz görüntü analiz yazılımının performansının, serbest erişimli çok amaçlı diğer bir yazılım ile güvenilirlik yönünden karşılaştırılması amaçlanmıştır. Farelerin genel anestezi altında siyatik sinirlerinden alınan doku örnekleri gluteraldehit solüsyonuna alınmıştır. Rutin elektron mikroskop takip yöntemlerinden geçirilerek epoksi resin (epoxy resin) gömülen dokulardan yarı ince kesitler alınmış ve toluidin mavisi ile boyanmıştır. Kesitler dijital kameralı ışık mikroskopta incelenmiş ve X100'lük objektifte fotoğraflanmıştır. Mikrograflar laboratuvarımızda geliştirilen Tantuna Morfolometrik Ölçüm Sistemi (TanTuna Morphometric Measuring System; TT-MMS) yazılımı ile analiz edilmiştir. Seçilen iki adet ışık mikrograftan rastgele seçilen 200 adet miyelinli akson kesitinin ölçümleri program kullanılarak yapılmıştır. Aynı ölçümler ImageJ programı ile tekrarlanmış ve her iki programla elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Ek bir donanıma ihtiyaç duymadan her iki yazılımın da güvenilir olduğu ve birbirleriyle uyumlu ölçümler yaptıkları saptanmıştır ($p<0.001$). Ayrıca her iki programın artı ve eksi yönleri belirlenerek ayrıntılı olarak açıklanmıştır. TT-MMS'nin kullanıcı dostu bir yazılım olduğu ve ölçümler için gereken süreyi de önemli ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır. Bu programın bir diğer önemli özelliği de kullanıcıların ihtiyaçlarına göre geliştirilmeye açık olmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Akson çapı, g-ratio, ImageJ, Periferik sinir, TT-MMS.

Comparative Analysis of the Reliability of TT-MMS Program in Peripheral Nerves Histomorphometric Measurements

ABSTRACT

Image analysing programs are used in peripheral nerve studies to measure axon diameter, myelinated nerve diameter and the ratio of inner axonal diameter to outer diameter (g-ratio), demyelination, remyelination and nerve repair. So, a semi-automatic, image analysis program was developed in our laboratory by targeting peripheral nerve studies which morphometric evaluation is frequently required. It is aimed to compare the performance and reliability of this program with another free access multipurpose software. Tissue samples from sciatic nerves of mice were taken into gluteraldehyde solution under general anesthesia. After routine electron microscopic processing method, semi-thin sections were taken from epoxy resin embedded blocks and stained with toluidine blue. Sections were examined and photographed under the light microscope at X100 magnification. Micrographs were analyzed using the Tantuna Morphometric Measuring System (TT-MMS) software developed in our laboratory. Measurements of the randomly selected 200 myelinated axon sections from two selected light micrograph were performed using the program. The measurements were repeated with ImageJ program and data obtained using both programs were compared statistically. We determined that both softwares are reliable and measurements compatible with each other ($p<0.001$) without a need for an additional hardware. In addition, the pros and cons of both programs were noticed and explained in detail. We concluded that TT-MMS is a user-friendly software which also significantly reduces the time required for measurements. Another important feature of this program is being open to further development according to the needs of users.

Keywords: Axon diameter, g-ratio, ImageJ, Peripheral nerve, TT-MMS.

Geliş Tarihi: 22.Kasım.2022

Kabul Tarihi: 29.Aralık.2022

Dr. Pınar AYRAN FİDAN
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Bağlıca Kampüsü,
Tıp Fakültesi Binası A/106.
Etimesgut/ANKARA
Tel.: 0312 246 66 66 Dahili: 1626
E-posta: pinarayran@hotmail.com

Yazarın ORCID Bilgisi

Pınar AYRAN FİDAN: 0000-0003-3047-0305

Merkezi ve periferik sinir sisteminde miyelin kılıfı aksiyon potansiyeli iletiminde oldukça önemli bir role sahiptir. Multiple skleroz, inme/felç, Alzheimer hastalığı gibi birçok nörolojik hastalıkta değişen düzeylerde demiyelinizasyon görülebilmektedir. Ayrıca çeşitli yaralanmalar sonucunda veya iyatrojenik olarak cerrahi işlem sırasında periferik sinir yaralanmaları da oluşabilmektedir. Merkezi ve periferik sinir sisteminin primer hastalıkları yanı sıra diyabet, hipertansiyon gibi bazı sistemik hastalıklarda da polinöropatiler, sinir dejenerasyonu görülebilmek-

tedir¹⁻⁶. Tüm bu hastalıkların fizyopatolojisi ve tedavisini araştırmak için çalışmalar yapılmakta ve histolojik kesitler incelenmektedir. Histolojik değerlendirmeler araştırmacı çeşitliliğine dayanan bağımlı veriler sunabilir. Bunun etkisini en aza indirmek için çift kör incelemeler yapılmakta, histolojik boyanmalar kendi içinde derecelendirilmektedir. Histolojik kesitlerde yapısal değerlendirmeye ek olarak morfometrik inceleme de yapılması araştırmaların doğruluğu ve güvenilirliği açısından oldukça önemlidir. Özellikle periferik sinir çalışmalarında demiyelinizasyon, remiyelinizasyon ve sinir onarımının değerlendirilmesinde görüntü analiz programlarından yararlanılmaktadır^{3-5,7-10}. Bu konudaki ticari ya da açık erişimli yazılımların araştırmacıyı zorlayıcı bazı yönleri bulunmaktadır. Bazı yazılımlar araştırmacıların temel gereksinimleri haricindeki özel isteklerine yanıt verememektedir. Karmaşık kullanıcı ara yüzleri, ölçümler için çok uzun süreler harcanması gibi olumsuzluklarla da karşılaşabilmektedir¹¹⁻¹³. Ayrıca ticari yazılımlar araştırmaya ek maddi yük oluşturabilmektedir. Bu nedenle, morfometrik değerlendirmenin sıklıkla gereksinim duyulduğu periferik sinir çalışmaları hedeflenerek, laboratuvarlarımızda özel bir görüntü analiz programı geliştirilmiştir. Çalışmamızda, geliştirdiğimiz yarı otomatik görüntü analiz yazılım performansını, serbest erişimli diğer bir yazılım programı olan ImageJ ile karşılaştırmalı olarak inceledik.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:DA22/26) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Çalışmamızda 28 günlük, 16 gram, 2 adet Balb/c cinsi, erkek fareye intraperitoneal 10mg/kg Xylazine (kas gevşetici) ve 60 mg/kg ketamin (anestezi) enjekte edilmiştir. Genel anestezi oluşunca farelerin siyatik sinirlerinden yaklaşık 5 mm'lik doku örnekleri %2'lik glüteraldehit solüsyonuna alınmıştır. Siyatik sinirler alındıktan sonra farelere derin anestezi altındayken servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanmıştır. Siyatik sinirler glüteraldehitte 1 gün tespit edildikten sonra rutin elektron mikroskop takip yöntemlerinden geçirilmiş ve plastiğe (epoksi resin) gömülmüştür. Plastik bloklardan ultramikrotomda 1500 nanometre kalınlığında yarı ince kesitler alınarak %2 toluidin mavisi ile boyanmıştır¹⁴. Kesitler ışık mikroskopta (Leica DM 3000, Germany) X100'lük büyütmede incelenmiş ve dijital kamera (Leica DFC 500, Germany) ile fotoğraflanmıştır.

Kesit görüntüleri laboratuvarlarımızda geliştirilen TT-MMS isimli yazılım ile analiz edilmiştir. Akademik kullanım amacıyla Microsoft® Windows ortamı için

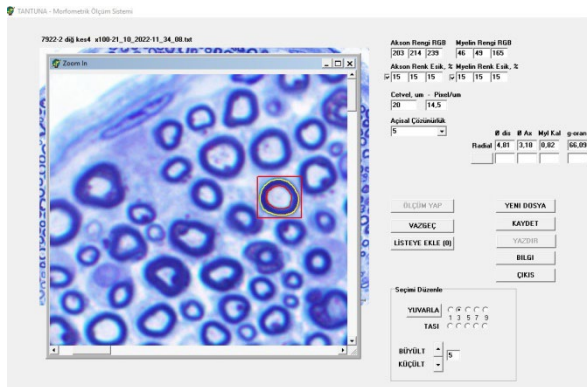
geliştirilen yazılım, saha tarama algoritmaları, fonksiyonları ve prosedürlerini kullanarak ilgilenilen alanda (Region of Interest; ROI) yer alan akson ve myelin kılıfın bölütlemesini (segmentasyon) gerçekleştirmektedir. Renk tanımlamaları ve eşik değer seçimlerini dikkate alarak gerçekleştirilen yarı-otomatik bölütleme "radyal haritalama" algoritmasını kullanmaktadır. Program ayrıca, ilgilenilen alanda vertikal ve horizontal alan taramaları yaparak ikinci bir yöntemle de bölütleme seçeneği sunmaktadır. Çalışmada ihtiyaç duyulması halinde bu seçenek de kullanılarak veriler elde edilebilmektedir. Yazılım, olası ölçüm hataları ve irregüler yapılar için el-ile çizim ve hata düzeltme seçenekleri de sunmaktadır. Gerçekleştirilen analizler, sinir liflerine ait akson çapı, myelin kalınlığı, myelinli akson için iç çap/dış çap oranı (g-ratio) hesaplanarak metin dosyası olarak saklanmaktadır. Geliştirdiğimiz yazılım ile yapılan analizler, farklı bir serbest erişimli yazılımla (ImageJ) aynı görüntüler üzerinde tekrarlanarak karşılaştırılmıştır. Her iki programla elde edilen veriler istatistiksel açıdan Pearson Korelasyon Katsayısının Anlamlılık testi, Concordance Korelasyon katsayısı testi ile değerlendirilmiştir. Programların uyum iyiliğini incelemek için ise Bland-Altman testi kullanılmıştır (p<0,001).

Bulgular

Toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitlerden, X100'lük objektifte elde edilen ışık mikrograflar incelenmiş, iki adet ışık mikrografta rastgele seçilen 200 adet miyelinli sinir lifinin akson çapı, miyelin dış çapı ve miyelinli akson için iç çap/dış çap oranı (g-ratio oranları) her iki programla karşılaştırmalı olarak ölçülmüştür. Laboratuvarımızda geliştirilen TT-MMS isimli programda "Jpeg" formatında kaydedilmiş fotoğraflarda ölçüm yapıldı. İncelenen mikrograftaki bar üzerinden ölçüm yapılarak piksel değerleri (kalibrasyon) belirlendi. Ölçülmesi istenen miyelinli sinir lifinde akson üzerine tıklanarak akson renginin RGB (red-green-blue) eşik değerleri belirlendi. Daha sonra "Ctrl" tuşuyla birlikte miyelin kılıf üzerine tıklandı ve miyelin kılıf rengi için RGB eşik değerleri belirlendi ve programa "Ölçüm Yap" komutu verildi. Program renk eşik değerine bağlı olarak akson alanını kırmızı noktalar ile çevrelerken, miyelin kılıf alanını da sarı noktalarla çevreler (Şekil 1). İstenilen miyelinli sinir lifinin ölçümü bu şekilde tamamlanmıştır. Ölçülen parametreler, ölçüm ekranının sağ tarafında her biri ayrı metin kutusunda olmak üzere ayrı kutucuklarda belirtilmektedir. Mouse ile sağ tıkladığında bilgisayar ekranına ölçüm yapılan sinir lifinin büyük görüntüsü gelir. Görsel olarak da incelenen otomatik bölütleme ve ölçümler operatör tarafından uygun bulunursa arayüzde yer alan "Listeye ekle" seçeneğine tıklanır; ölçüm sonuçları ve saati "notepad" metin dosyası olarak kayıt altına alınır. Sonraki değerlendirmeleri kolaylaştırması ve

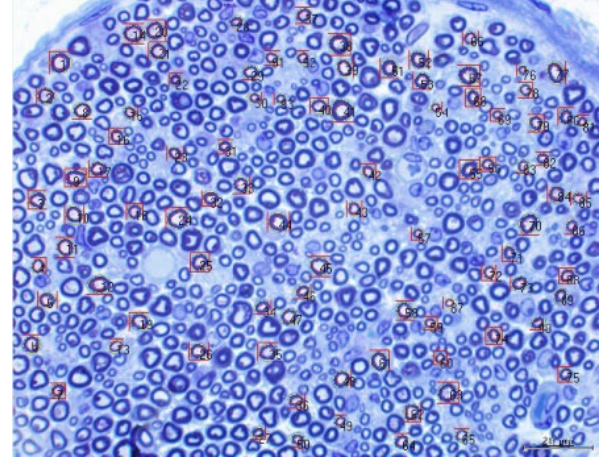
Periferik Sinir Ölçümleri için TT-MMS Programı

karışıklıkları önlemesi açısından, mikrografta ölçüm yapılan her sinir lifi ardışık sıra numarası ile otomatik olarak etiketlenir (Şekil 2). Mikrograftaki periferik sinirlerin RGB değerleri yakınsa, tekrar akson-miyelin RGB tanımlamaya gerek kalmadan sıradaki periferik sinirin merkezine tek tıklayıp, ölçme komutu verilebilir. Böylece çok sayıda periferik sinir ölçümü kısa sürede yapılabilir. Ancak bu tarz ölçümlerde, bazı noktalarda renk kodlarının birbirine yakınlığı o bölgede hatalı bölütlemeye neden olabilmektedir (Şekil 3a). Bu durumda büyük ekran görüntüsünde belirlenen noktalar mouse yardımıyla istenen alana taşınarak veya programın “seçimi düzenle” sekmesi kullanılarak akson/miyelin kılıfın sınırlarını belirleyen noktaları “taşı/yuvarla” komutlarıyla ölçümün daha doğru olarak yeniden yapılması sağlanabilir (Şekil 3b). Ölçüm yapılan tüm değerler listeye eklenip, kaydedildikten sonra programdan çıkış yapılır. ImageJ yine serbest erişimli ve uzun yıllardır araştırmacıların faydalandığı ve geliştirdiği bir yazılımdır. Jpeg formatındaki mikrograftaki bar üzerinden ölçüm yapılarak piksel değerleri belirlenir. Sonra programdaki “wand tool” seçilerek tolerans ayarlaması yapılır. Tüm ölçüm yapılmadan önce tolerans değeri belirlemek tüm mikrografta yakın ölçümler yapmanızı sağlayacaktır. Bu nedenle, biz ölçümlerimizde akson ölçümü için tolerans değerini 70, miyelin kılıf ölçümü için ise 40 olarak belirledik. Sonrasında TT-MMS programı ile ölçtüğümüz 200 adet periferik siniri aynı sırayla ImageJ programında da ölçtük. ImageJ programında alan ölçümü yaptığı için basit bir formülle alandan çap ve g-ratio oranı hesaplama yaptık. Sonuçlar Pearson Korelasyon Katsayısının Anlamlılık testi, Concordance Korelasyon katsayısı testiyle ve uyum oranını incelemek için Bland-Altman testleri ile değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen analizler sonucunda programlar arasında çok yüksek korelasyon ve uyum elde edilmiştir (Tablo 1-3, şekil 4-6). Ayrıca iki programla yapılan ölçümler arasındaki uyumun %98,4 oranında olduğu görülmektedir.



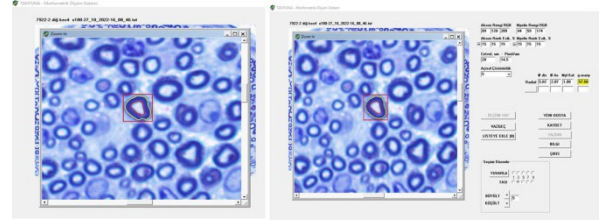
Şekil 1:

TT-MMS programının kullanıcı arayüzü. Programın akson alanını kırmızı noktalar ile miyelin kılıf alanını sarı noktalarla çevrelediği görülmektedir.



Şekil 2:

TT-MMS programında ardışık ölçümler. Programın mikrografta ölçüm yapılan her sinir lifini ardışık sıra numarası ile etiketlediği izlenmektedir.



Şekil 3:

TT-MMS programında hatalı seçim ve düzeltme. 3a) Renk kodlarının birbirine yakınlığı nedeniyle miyelinli sinir lifi sınırını TT-MMS programının hatalı çizdiği görülmektedir. 3b) Fare yardımıyla veya programın “seçimi düzenle” sekmesi kullanılarak akson/miyelin kılıfın sınırlarını belirleyen noktaların taşındığı izlenmektedir.

Tablo I. Korelasyon Matrisi

		M_TTMMP	Aks_TTMMP	G_TTMMP
M_ImageJ	r	0.985		
	p	< .001		
AKS_ImageJ	r	0.905	0.990	
	p	< .001	< .001	
G_ImageJ	r	0.331	0.646	0.914
	p	< .001	< .001	< .001

Pearson Korelasyon Katsayısının Anlamlılık testi. M; Miyelinli sinir lifi çapı, AKS: Akson çapı, G; G-ratio

Tablo II. Tanımlayıcı İstatistikler

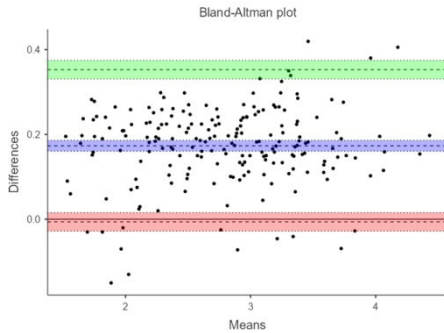
	N	Ortalama	SS	Medyan	Minimum	Maksimum
M_TTMMP	200	4,65	0,841	4,67	2,9	6,79
M_ImageJ	200	4,61	0,846	4,59	2,81	6,74
Aks_TTMMP	200	2,87	0,642	2,88	1,58	4,53
AKS_ImageJ	200	2,7	0,632	2,78	1,42	4,33
G_TTMMP	200	61,38	5,87	61,81	47,31	75,52
G_ImageJ	200	58,18	6,23	58,07	41,19	74,07

Tanımlayıcı istatistikler. M;Miyelinli sinir lifi çapı, AKS: Akson çapı, G; G-ratio, N: ölçülen sinir lifi sayısı, SS: Standart sapma

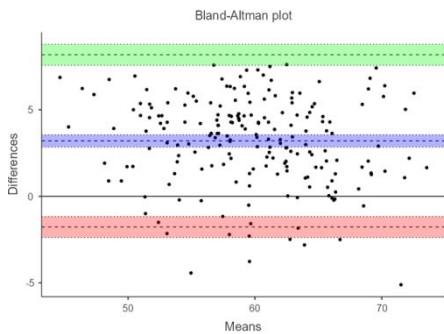
Tablo III. İki ölçüm yolu arasındaki uyum.

Miyelin Kılıf	Beklenen değer	Güven aralığı alt sınırı	Güven aralığı üst sınırı
Concordance Korelasyon Katsayısı			
CCC	0,984	0,979	0,988
Bland-Altman Uyum Sınırları			
Ortalama sapma	0,043	0,023	0,063
Uyum alt sınırı	-0,242	-0,265	-0,219
Uyum üst sınırı	0,329	0,306	0,352
Akson			
Concordance Korelasyon Katsayısı			
CCC	0,954	0,943	0,963
Bland-Altman Uyum Sınırları			
Ortalama sapma	0,173	0,160	0,186
Uyum alt sınırı	-0,006	-0,020	0,008
Uyum üst sınırı	0,352	0,338	0,367
G-ratio			
Concordance Korelasyon Katsayısı			
CCC	0,799	0,754	0,837
Bland-Altman Uyum Sınırları			
Ortalama sapma	3,2	2,85	3,6
Uyum alt sınırı	-1,77	-2,17	-1,37
Uyum üst sınırı	8,18	7,78	8,58

İki ölçüm yolu arasındaki uyum. TTMMMP ve ImageJ programları arasındaki ölçüm değerlerine ait uyum analizleri

**Şekil 5:**

Akson kılıf için ölçüm yöntemleri uyumunu gösteren Bland-Altman grafiği.

**Şekil 6:**

G-ratio için ölçüm yöntemleri uyumunu gösteren Bland-Altman grafiği.

Tartışma ve Sonuç

Histolojik değerlendirmelerde kantitatif veriler olmadığı için istatistiksel açıdan karşılaştırma yapmak her zaman mümkün olmamaktadır. Objektif karşılaştırma yapabilmek için çift kör incelemeler yapılmakta, boyama yoğunlukları kendi içinde derecelendirilmektedir. Ancak yine de araştırmacıların deneyimlerinin değişkenliği farklı sonuçlara ulaşılmasına neden olabilir. Bu etkiyi en aza indirmek için özellikle periferik sinir çalışmalarında ölçüm programlarından faydalanılmaktadır. Periferik sinirlerin iyileşme durumunun değerlendirilmesi için miyelinli sinir lifi çapı (dış çap) ölçümü, akson çapı (iç çap) ölçümü ve miyelinli sinir lifi iç çap/dış çap oranı (g-ratio) ölçümü sıklıkla kullanılan değerlendirme ölçütleridir. Literatürde bu tarz ölçümler için kullanılmış çok sayıda program bulunmaktadır^{3-5,7-10}. Bu programlar arasında ücretli yazılımlar olduğu gibi serbest erişimli yazılımlar (Image J, myeltracer vb) da bulunmaktadır^{6,15-20}. Serbest erişimli yazılımlar arasında en yaygın bilinen ve kullanılan ImageJ olduğu için biz de çalışmamızda TT-MMS programını ile ImageJ programını kullanım ve ölçüm sonuçları açısından karşılaştırmalı olarak inceledik. ImageJ uzun zamandır kullanımda olduğu için amaca özel eklentileri (*plugin*) de olan bir yazılımdır¹¹⁻¹³. Periferik sinir ölçümleri için araştırmacılar tarafından web sitesine yüklenen (akson çapı, g-ratio ölçümü vb) eklentiler incelenmiş ancak kullanıcı dostu bulunmamıştır. O yüzden çalışmamızda ImageJ programı eklentisiz olarak kullanılmıştır. Her iki programda da mikrografın barı ile piksel değerleri belirlendiği için programların kalibrasyonları her mikrograf için tekrarlanmalıdır. Her iki program da 1 mikrometre karşılığı 14,50 piksel olarak ölçmüştür. Her iki program da yarı-otomatik olarak tasarlanmasına rağmen TT-MMS programının belirlenen RGB koduna göre periferik sinirlerde daha doğru sınırlar çizdiği dikkati çekmiştir. ImageJ programında ise “wand tool” toleransı önceden belirlenmiş olmasına rağmen mouse ile tıklanan alanın farklı olmasıyla programın çizdiği sınır değişmektedir. Bu da ImageJ programını deneyimli kullanıcıların kullanması gerekliliğini arttırmaktadır. ImageJ programında periferik sinirin farklı alanlarına (akson ve miyelin sınırı) farklı tolerans değerleri (sırasıyla 70, 40) girilmesi gerektiğinden bu durum ölçüm yaparken kullanıcıyı zaman açısından zorlamıştır. Bunun önüne geçebilmek için sırasıyla 200 adet akson ölçümü yapıldı ve kaydedilmiş, sonrasında aynı sırayla 200 adet miyelinli sinir lifi ölçümü yapılmıştır. TT-MMS programında ise akson ve miyelin kılıf için RGB değerlerini program ilk ölçümde kaydetmekte ve sonraki ölçümlerde sadece aksona tıkladığında bile program hem iç hem de dış çapı ölçüp listeye eklemektedir. TT-MMS

Periferik Sinir Ölçümleri için TT-MMS Programı

programında bu özellik kullanıcıya zaman kazandırması açısından önemli katkı sağlamıştır. Doku örneklerinde histolojik boyalarla çok net ton farklarının ortaya konamıyor olması nedeniyle her iki programda da otomatik seçimlerde başarı düzeyi düşük olabilmektedir. Her iki programın da yarı-otomatik olması seçimlerin kullanıcı tarafından düzeltilmesi nedeniyle kıymetlidir. ImageJ programında bu düzeltme işlemi ölçümlen istenen periferik sinirin farklı bir noktasına tıklanarak değiştirilebileceği gibi, “wand tool”ün tolerans ayarı değiştirilerek de yapılabilir. Ancak çalışmamızda ölçümlerde standardizasyonu sağlamak için tolerans ayarları sabit tutulmuş, düzeltmeler farklı alanlara tıklanarak en uygun seçim bulunmuştur. TT-MMS programında düzeltme işlemi yapılırken akson ve miyelinin renk eşik değerleri değiştirilebileceği gibi düzeltilmek istenen bölgedeki noktaların doğrudan taşınmasıyla da seçimin sınırları kesin olarak belirlenebilir. Düzeltilcek noktalardan isteğe bağlı olarak 1, 3, 5, 7 veya 9 adet nokta seçilerek taşı/yuvarla komutlarıyla düzeltme yapılabilir ya da büyült/küçült komutlarıyla da sınırlar otomatik olarak belirlenebilir. Yine çalışmamızda ölçümlerde standardizasyonu sağlamak için akson ve miyelinin renk eşik değerleri sabit tutulmuş, düzeltmeler nokta taşıma/yuvarlama komutlarıyla yapılmıştır. Düzeltme işlemlerinde TT-MMS programının daha kullanıcı dostu olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca TT-MMS programında ölçüm yapılan periferik sinirlere program otomatik sıra numarası yazmakta, bu da mikrografta çok sayıda ölçülen sinirin takibini kolaylaştırmakta ve tekrarı önlemektedir. Bu özelliğin olumsuz olabilecek tek yönü birbirine çok yakın sinirler ölçüleceği zaman programın otomatik olarak oluşturduğu çerçeveler ve verdiği sıra numarası nedeniyle çok yakın yerleşimli aksonların ölçümünde oluşabilecek hatalar manuel olarak düzeltilmektedir. Hataların oluşmasını tümüyle önleme amaçlı iyileştirme çalışmaları devam etmektedir. ImageJ programı alan ölçümü yaparken, TT-MMS programı çap ölçümü yapmaktadır. Ancak bu kullanıcıyı çok zorlayıcı bir özellik değildir, basit formüllerle her iki ölçüm bilgisi birbirine çevrilebilmektedir. Ayrıca ImageJ programı içinde çok fazla özellik barındıran, uzun yıllardır kullanılan bir program iken TT-MMS programı özellikle tıbbi görüntülerde (histolojik preparatlar, radyolojik kesit görüntüleri) ölçüm yapmak için tasarlanmış; gelişime, değişime açık bir programdır. Laboratuvarımızda geliştirilmiş üç boyutlu yazılım programı ile de segmentasyon gibi ortak özellikler içerdiğinden, araştırmacının ihtiyacına yönelik programlarda birleştirme, geliştirme yapılmasını mümkün kılmaktadır²¹.

Ölçüm programları histolojik çalışmalarda objektif veri sunması nedeniyle oldukça faydalıdır. Görüntü analiz yöntemleri ile incelemelerimizi destekleyecek kantitatif veriler ve objektif ölçümler çalışmalarımızın

bilimsel değerini artıracaktır. Çalışmamızda incelediğimiz her iki program da serbest erişimlidir. İstatistiksel açıdan karşılaştırıldığında programlar arasında çok yüksek korelasyon ve uyum saptanmıştır. Özellikle periferik sinir çalışmalarında TT-MMS programının kullanıcı ara yüzünün pratikliği nedeniyle araştırmacıya ölçümler sırasında zaman kazandıracağı ve kullanıcının uzman olması gerekliliğini azaltacağı tespit edilmiştir. Bu nedenle laboratuvarımızda geliştirdiğimiz bu yazılım akademik amaçla olmak şartıyla serbest erişimli olarak kullanıma sunulmaktadır. Kullanım kolaylığının yanı sıra sunulan yazılımın (TT-MMS) en belirgin avantajı ise kullanıcıların ihtiyaçlarına yönelik olarak her zaman geliştirilebilir ve değişime açık olmasıdır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Onay Tarihi: 03.10.2022

Karar No: 2022-22/24

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: P.A.F.; Veri toplama ve işleme: P.A.F.; Analiz ve verilerin yorumlanması: P.A.F.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: P.A.F.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu çalışma ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir (Proje no: DA22/26).

Programın yazılımında ve ihtiyaca yönelik geliştirilmesinde katkılarını hiç eksik etmeyen Başkent Üniversitesi öğretim üyelerinden Biyofizik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Erhan Kızıltan ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Attila Dağdeviren'e teşekkür ederim. Ayrıca çalışmanın istatistiklerinde ve yorumlanmasında katkılarını sunan Dr. Uğur Toprak'a teşekkürlerimi sunarım.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Miller RH, Mi S. Dissecting demyelination. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1351-4.
2. Helvacıoğlu F, Dağdeviren A. Myelin ultrastructure terminology in disease and recovery processes. *Arch Ital Biol.* 2019;157(2-3):77-88.
3. Sanada LS, Tavares MR, Neubern MCM, Salgado HC, Fazan VPS. Can Wistar rats be used as the normotensive controls for nerve morphometry investigations in spontaneously hypertensive rats (SHR)? *Acta CirBras.* 2011;26(6):514-20.
4. Sanada LS, Kalil ALD, Tavares MR, Neubern MCM, Salgado HC, Fazan VPS. Sural nerve involvement in experimental hypertension: morphology and morphometry in male and female normotensive Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Bmc Neuroscience.* 2012;13:13-24.
5. Sanada LS, Tavares MR, Sato KL, et al. Association of chronic diabetes and hypertension in sural nerve morphometry: an experimental study. *Diabetol & Metab Syndr.* 2015;7:1-9.
6. Omi M, Hata M, Nakamura N, et al. Transplantation of dental pulp stem cells improves long-term diabetic polyneuropathy together with improvement of nerve morphometrical evaluation. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:279.
7. Arikan M, Togral G, Hasturk AE, et al. Histomorphometric and ultrastructural evaluation of long-term alpha lipoic acid and

- vitamin B12 use after experimental sciatic nerve injury in rats. *Turk Neurosurg.* 2016;26(6):944-52.
8. Fernandes A, Coelho T, Rodrigues A, et al. Clinicopathological correlations of sural nerve biopsies in TTR Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *Brain Commun.* 2019;1(1):1-13.
 9. Ozaki K, Hamano H, Matsuura T, Narama I. Effect of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension on diabetic peripheral neuropathy in alloxan-induced diabetic WBN/Kob rats. *J Toxicol Pathol.* 2016;29(1):1-6.
 10. Rodrigues AR, Ferreira RS, Salgado HC, Fazan VPS. Morphometric analysis of the phrenic nerve in male and female Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(6):583-91.
 11. Goebbels S, Oltrogge JH, Kemper R, et al. Elevated phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in glia triggers cell-autonomous membrane wrapping and myelination. *J Neurosci.* 2010;30(26):8953-64.
 12. Ineichen BV, Zhu KY, Carlstrom KE. Axonal mitochondria adjust in size depending on g-ratio of surrounding myelin during homeostasis and advanced remyelination. *J Neurosci Res.* 2021;99(3):793-805.
 13. National Institutes of Health. (Çevrimiçi erişim tarihi: Eylül 2022) <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/index.html>.
 14. Fidan PA, Dagdeviren A. Comparative analysis of trophoblasts and angiogenesis in human placental compartments. *Int J Morphol.* 2022;40(4):981-9.
 15. Barreiros VCP, Dias FJ, Iyomasa MM, et al. Morphological and morphometric analyses of crushed sciatic nerves after application of a purified protein from natural latex and hyaluronic acid hydrogel. *Growth Factors.* 2014;32(5):164-70.
 16. Kaiser T, Allen HM, Kwon O, et al. MyelTracer: A semi-automated software for myelin g-ratio quantification. *eNeuro.* 2021;8(4):1-9.
 17. Kumar P, Sharma S, Kaur C, et al. The ultrastructural study of human cochlear nerve at different ages. *Hear Res.* 2022;416:1-9.
 18. Moiseev D, Hu B, Li J. Morphometric analysis of peripheral myelinated nerve fibers through deep learning. *J Peripher Nerv Syst.* 2019;24(1):87-93.
 19. Orfahli LM, Rezaei M, Figueroa BA, et al. Histomorphometry in peripheral nerve regeneration: comparison of different axon counting methods. *J Surg Res.* 2021;268:354-62.
 20. Ziago EKM, Fazan VPS, Iyomasa MM, et al. Analysis of the variation in low-level laser energy density on the crushed sciatic nerves of rats: a morphological, quantitative, and morphometric study. *Lasers Med Sci.* 2017;32(2):369-78.
 21. Kiziltan E, Dağdeviren A. Three-dimensional reconstruction of anatomical structures: interactive software providing patient specific solutions. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2020;40(1):10-8.