



Fare ve Sıçanlarda Dişi Genital Kanalı Değerlendirmenin Kolay Bir Yolu: Vajinal Sitoloji

An Easy Way to Evaluate the Female Genital Canal in Mice and Rats: Vaginal Cytology

Zekiye Gülfem YURTGEZEN , Deniz ERÇETİN , Melike SAPMAZ METİN 

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

ORCID ID: Zekiye Gülfem Yurtgezen 0000-0003-0098-8437, Deniz Erçetin 0000-0001-9713-044X, Melike Sapmaz Metin 0000-0001-9623-4116

Bu makaleye yapılacak atıf: Yurtgezen ZG ve ark. Fare ve sıçanlarda dişi genital kanalı değerlendirmenin kolay bir yolu: Vajinal sitoloji. Med J West Black Sea. 2022;6(3):259-266.

Sorumlu Yazar

Zekiye Gülfem Yurtgezen

E-posta

gulfemyurtgezen@gmail.com

Geliş Tarihi

09.09.2022

Revizyon Tarihi

11.10.2022

Kabul Tarihi

19.10.2022

ÖZ

Dişi genital kanalın durumunu izlemek için kullanılan vajinal sitoloji yöntemi, zaman içinde farklı metodlar ortaya çıksa da, kolay ve pratik olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. 1917'de Stockard ve Papanicolaou'nun kobay vajinal lümen epitel hücrelerinin ovulasyon döngüsünün durumuna göre değişiklik gösterdiğini keşfetmelerinin ardından östrus siklusu takibi, dişi genital sistem çalışmalarının vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Vajinal sitolojiyi göstermek için smear örneklerinin alınma zamanı ve yöntemi, uygulayıcının tecrübesi gibi çeşitli faktörler, sonuçların doğruluğu üzerine etkilidir. Östrus siklusu, sıçan ve farelerde temel olarak dört faz gösterir: proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus. Her fazın hücre tipi ve yoğunluğu farklıdır.

Bu derlemede; fare ve sıçandan smear alma yöntemleri ve östrus siklus fazlarının özelliklerinin yanı sıra, elde edilen verilerin deneysel çalışmalarda kullanım alanlarına yönelik literatür bilgileri yer almaktadır. Ayrıca bu çalışma, dişi üreme sistemindeki dinamik değişikliklerin takibi, deneysel çalışmaların doğru planlanması ve sonuçların değerlendirilmesi yönünden dikkat edilmesi gereken noktaları belirtmesi ile dişi deneklerle çalışacak araştırmacılara kapsamlı bir bakış açısı sağlamayı hedeflemektedir.

Anahtar Sözcükler: Dişi genital sistem, Fare, Östrus siklusu, Sıçan, Vajinal sitoloji

ABSTRACT

Although different methods have emerged over time, the vaginal cytology method, which is used to monitor the condition of the female genital canal, is often preferred because it is easy and practical. In 1917, after Stockard and Papanicolaou discovered that guinea pig vaginal lumen epithelial cells change according to the state of the ovulation cycle, the oestrus cycle exhibiting has become an essential part of the female genital system studies. Various factors affect the accuracy of results, including timing, method of smear sample collection, and the practitioner's experience in demonstrating vaginal cytology. The oestrus cycle shows four basic phases: proestrus, oestrus, metestrus, and diestrus, in rats and mice. Each phase of the cycle has a different dominant cell type and density.

In this review; In addition to the methods of taking smears from mice and rats and the characteristics of the estrous cycle phases, there is information on the use of the data from experimental studies. Also, this study aims to provide a comprehensive perspective to researchers who will work with female subjects by emphasizing the points to be considered in terms of monitoring the dynamic changes in the female reproductive system and correct planning and evaluating the results of experimental studies.

Keywords: Female genital system, Mouse, Oestrous cycle, Rat, Vaginal cytology



Bu eser "Creative Commons Atıf-Gayri Ticari-4.0 Uluslararası Lisansı" ile lisanslanmıştır.

GİRİŞ

Vajen epitelindeki siklik değişikliklerin değerlendirilmesi; üreme döngüsünün durumunu belirlemek ve hipotalamus-hipofiz-over aksının işleyişini göstermek için uzun yıllardan beri yaygın kullanılan, non-invaziv bir yöntemdir (1). Östrus terimi ilk olarak 1900 yılında Heape tarafından kullanılmıştır. Yunanca oistros; at sineği, çılgınlık veya delilik anlamına gelmektedir (2).

Sıçanlarda ve farelerde östrus döngüsü ovulasyon zamanının tespit edilebildiği, ovaryumdan salgılanan östradiol ve progesteron seviyelerindeki değişiklikleri yansıtan, farklı hücre tiplerinin döngü boyunca dalgalar hâlinde belirginleştiği ve gerilediği dinamik bir süreçtir. Östrus döngüsü sıçanlarda ve farelerde hamilelik, yalancı gebelik veya anöstrus tarafından kesintiye uğratılmadığı sürece, her 4-5 günde bir tekrar eder ve başlıca dört aşamaya ayrılır: proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus (3,4).

20. yüzyılın başlarında, ilk kez Stockard ve Papanicolaou, dönüm noktası niteliğindeki çalışmalarında, östrus döngüsü sırasında kobay vajinal lümen epitel hücrelerinin görünümündeki döngüsel değişiklikleri hem makroskopik hem de mikroskopik olarak kapsamlı bir şekilde göstermiştir. Stockard ve Papanicolaou'nun öncü çalışması, östrus döngüsü sırasında vajinal kanal, ovaryum ve uterusu meydana gelen değişikliklerin incelenmesine yönelik çalışmalara da kaynak olmuştur (5). Bu çalışmadan birkaç yıl sonra Long ve Evans, sıçan östrus döngüsünü karakterize eden çalışmalarını yayınlamışlardır (6,7). O zamandan itibaren, spontan ovulasyon döngüsüne sahip laboratuvar hayvanlarının vajinal epitel hücre yapısındaki siklik değişikliklerin değerlendirilmesi, hem üreme döngüsünün kalitatif bir göstergesi olarak hem de üreme toksikolojisi alanındaki çalışmaların yardımcı bir bileşeni olarak kullanılmıştır (1).

Vajinal sitolojinin değerlendirilme yöntemlerinin keşfi sonrası, Papanicolaou tarafından geliştirilen ve serviks kanseri için bir tarama testi olarak kullanılan Pap smear testi, 20. yüzyılda kanser kontrolünde en önemli gelişme olarak kabul edilmektedir (5). Üreme fizyolojisinin önemli isimlerinden Long ve ark., Long-Evans cinsi sıçanlarda, ön hipofiz hormonlarının (luteinize edici hormon ve folikül uyarıcı hormon gibi) etkilerini ortaya koyarak hipofiz, ovaryum ve uterus arasındaki etkileşimleri tanımlamışlardır (6).

Bu çalışmada amacımız, güncel yöntemleri bir araya getirerek dişi üreme sistemindeki dinamik değişikliklerin takibi, dişi deneklerle yapılacak çalışmaların doğru planlanması ve sonuçların değerlendirilmesi açısından araştırmacılara genel bir bakış açısı sağlamaktır.

ÖSTRUS SIKLUS TAKİBİNDE DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN UNSURLAR

Siklus Başlangıcı ve Süre

Vajinal açılma; non-invaziv olarak gözlenebilen, ergenlik başlangıcı indeksi olarak da kullanılan, hormonal olarak tetiklenmiş apoptoz aracılı bir olaydır. Normal gelişimde artan östradiol salgısının bir sonucu olarak ortaya çıkarken, immatür fare ve sıçanlarda ekzojen östradiol enjeksiyonu ile de sağlanabilir (8). Sıçanlarda tipik olarak, doğum sonrası, 32 ve 36. günler arasında, vajinal açıklık görüldükten hemen sonra östrus döngüsü başlar. Sıçanlarda vajinal açılma, genellikle ilk ovulasyon ile aynı zamanda meydana gelirken, farelerde östrus döngüsü vajinal açılmadan 10 gün sonrasına kadar başlayabilir (9). Başlangıçta bazı düzensizlikler ve asiklik döngüler görülebilir.

Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD)'nin 2014'te yayınladığı histopatoloji rehberinde; süre belirtmeksizin bir siklus boyunca ardışık günlerde alınan smearlerin döngü içindeki safhaları göstermede yeterli olduğu bildirilmiştir (10). Cooper ve Goldman' a göre ardışık 14 gün vajinal sitoloji örneklerinin toplanması düzenli siklus olup olmadığının takibi ve ovulasyonun zamanının belirlenmesi için idealdir (1). Standart bir süre olmayıp döngü düzeninin gösterimi için bazı çalışmalarda 10 gün smear takibinin yeterli olduğu görülmüştür (11). Sürüntüde bir fazın ilk kez gözlenmesi ile ikinci kez gözlenmesi arasındaki süre, bir siklus süresi olarak belirlenmiştir (12).

Örneklerin Alım Zamanı

Bir östrus siklusunda, karakteristik hücre popülasyonlarına sahip dört temel faz izlenir; proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus. Bunlardan proöstrus ve östrus östrojenik, metöstrus ve diöstrus progesteratif fazlardır. Spontan ovulasyon, siklusun ortasında östrus fazında gerçekleşir (13). Döngü içindeki dört aşamanın uzunluğuna bağlı olarak, bir siklus 6 ila 72 saat arasında değişir. Bu nedenle günün çok erken veya geç saatlerinde smear alındığında bazı kısa aşamalar kaçırılabilir. Örneğin, sıçanlarda proöstrus ortalama 12-14 saat sürerken, östrus 25-27 saat, metöstrus 6-8 saat, diöstrus 55-57 saat sürer (7,14,15). Birçok dişide proöstrus sabahın geç saatlerine kadar başlamaz, bu nedenle sabah erken numune alımı durumunda bu faz kaçırılabilir. Fazların zamanlamasını doğru göstermek için numune alımının sabahın geç saatlerinde veya öğleden sonra yapılması idealdir ve her gün aynı saatte yapılması önerilir (1,4).

VAJİNAL SİTOLOJİDE YÖNTEM

Makroskopi

Proöstrus fazındaki farelerin vajinal açıklığı şişmiş, nemli, pembe doku ile karakterizedir. Açıklık geniştir ve genellikle vajenin dorsal ve ventral kenarlarında kıvrımlar ve çizgiler görülür. Fareler östrusa girerken vajinal açıklık daha az pembe, daha az nemli ve daha az şişkin hâle gelir. Çizgiler

daha belirgindir. Metöstrus; açık olmayan, soluk, kuru ve şişmemiş (ödemli olmayan) bir vajen ağzı ile karakterizedir. Diöstrusta vajinal açıklık küçük ve kapalıdır, salgı izlenebilir, beyaz hücre kalıntıları vajen duvarında görülür (3,16).

Mikroskopi

Döngünün gösterilmesi için temel olarak 2 non-invaziv yöntem kullanılmıştır:

1- Vajinal Lavaj: Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS), izotonik serum %0.9 (0.15M) veya distile su kullanılarak bir pipetle vajen içine sıvının birkaç kez verilir ve çekilerek yıkama yapılması sonucu elde edilen örneğin bir lam üzerinde kurutulması incelenmesi prensibine dayanır (Şekil 1). Hipotonik su kullanımının, epitel hücre morfolojisinin bozulmasına ve nötrofillerin parçalanmasına sebep olabileceği, bu durumun da vajinal sitolojilerin değerlendirilmesinde karışıklığa veya yanlışlıklara yol açabileceği düşünülmektedir. Yaklaşık 0.1 veya 0.2 ml sıvı ile ve pipet ucu fazla derine itilmeden yapılması gerekir, aksi durumda uzun süreli takiplerde fazla stimülasyon yalancı gebeliğe sebep olabilir (1,4,10,17) .

2- Vajinal sürüntü: Distile su veya izotonik su ile ıslatılan pamuk uçlu bir çubuğun vajen içinde döndürülerek, vajen duvarından nazikçe sürüntü alınması prensibine dayanır (18) (Şekil 2). Elde edilen sürüntü bir lam üzerinde doğrusal hatlar boyunca sürülür ve havada kurumaya bırakılır. Bu yöntem oldukça ucuz ve hızlıdır ancak uygun şekilde yapılmazsa yalancı gebeliği tetikleme ihtimali bulunmaktadır (3,10).

Her örnek, denek numarası ve tarih yazılı bir lam üzerine alınmalıdır.

Boyama

Smear örneklerinde fazın gösterilmesi için boyama yapılması şart değildir. Özellikle ıslak yaymaların ışık mikroskobu altında, 10x ya da 40x büyütmede hücre tiplerinin karakterizasyonu mümkündür. Yaymaların izlenmesinde en sık kullanılan boyalar ise Romanowsky tipi boyalar (örn. Modifiye Wright's, Wright's Giemsa), Toluidin mavisi, Metilen mavisi, Papanicolaou boyası, Kristal violet, Hematoksilin+Eozin gibi su bazlı ve leke bırakmayan boyalardır (1,4,17,19,20).



Şekil 1: Balb/c fare (A) ve Sprague Dawley sıçanda (B) vajinal lavaj yöntemi uygulaması (Melike Sapmaz Metin izniyle kendi arşivinden alınmıştır.)



Şekil 2: Balb/c fare (A) ve Sprague Dawley sıçanda (B) vajinal sürüntü yöntemi uygulaması (Melike Sapmaz Metin izniyle kendi arşivinden alınmıştır.)

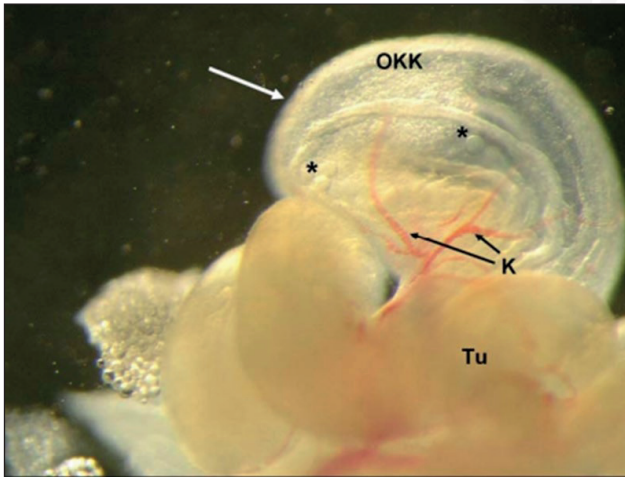
2018'de Mohammed ve ark. çalışmalarında Papanicolaou boyası, Wright-Giemsa, Metilen mavisi veya Toluidin mavisi ile boyamanın birbirine önemli üstünlükleri olmadığını ve her bir boyanın östrus döngüsünün evrelerini göstermede kullanılabileceğini belirtmişlerdir (18). Sugiyama ve ark. östrus fazı öncesi dönemden elde edilen smear örneklerinde, vajen epitelinin yüzeyini kaplayan mukus hücrelerine odaklanarak, bu hücrelerin PAS ve Alcian blue ile boyandığını göstermişlerdir. Optimum çiftleşme zamanı için Alcian blue ve PAS ile boyalı preparatların, Giemsa boyasına göre daha doğru sonuçlar verdiğini iddia etmişlerdir (21). Spontan ovulasyonla elde edilen oositleri değerlendiren bir çalışmada, Toluidin mavisi kullanarak, smearde geniş kornifiye epitelin gözleendiği aşamada denekleri sakrifiye edip tuba uterinanın ampulla bölgesinden oosit elde ettiklerini belirtmişlerdir (13) (Şekil 3).

VAJİNAL SİTOLOJİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Östrus döngüsünün dört aşamasında dört temel hücre tipi karşımıza çıkmaktadır: nötrofiller, nükleuslu, küçük epitel hücreleri, nükleuslu, büyük epitel hücreleri ve nükleussuz kornifiye hücreler. Döngünün aşamaları bu dört temel hücre tipinin varlığı-yokluğu, hücre yoğunluğu ve hücrelerin lam üzerindeki düzeni (kümelenme, dağınık yerleşim vb.) ile tespit edilir (1,4,22).

Proöstrus

Sıçanlarda ortalama 14 saat, farelerde ise 24 saatten kısa sürer. Bu aşamanın baskın özelliği, nispeten tek tip görünüm ve boyutta küçük, yuvarlak, nükleuslu epitel hücrelerinin varlığıdır. Genellikle sıkı kümeler veya şeritler hâlinde görülürler. Hiç nötrofil görülmemesi bu faz için tipiktir (Şekil 4A). Bununla birlikte, diöstrustan proöstrusa geçiş aşama-



Şekil 3: Balb/c farede, östrus fazında, içerisinde oosit-kümülüs kompleksi bulunan tuba uterinanın ampulla bölgesi (beyaz ok). **OKK:** Oosit-kümülüs kompleksi, *****: Oosit, **Tu:** Tuba uterina, **K:** Kan damarı. (X16) (Sapmaz M. 2008) (13)

sında (erken proöstrusta), nadir de olsa nötrofiller görülebilir. Döngü östrusa yaklaştıkça, keratinize hücreler daha bol hâle gelecektir (1,23)

Östrus

Sıçanlarda 24-48 saat ve farelerde 12-48 saat arasında değişir (7,14,15,24-26). Nükleussuz keratinize epitel hücrelerinin varlığı ile karakterizedir. Epitel hücreleri kümeleşme eğilimi gösterir. Erken östrusta kornifiye hücreler daha küçük boyutlu, daha eozinofilik ve tek tek dağılım gösterirken, ovulasyondaki dişilerde kümelenme gösteren büyük, bazofilik, kornifiye hücreler hâkimdir (12) (Şekil 4B). Geç östrusta nadir de olsa nötrofil gözlenebilir (1,10,27). Young ve ark. sıçanlarda geç östrusun büyük oval nükleuslu epitel hücrelerini "kaldırım taşı hücreleri" olarak adlandırmış ve bu hücrelerin, metöstrusun hızla yaklaştığının bir göstergesi olduğunu bildirmiştir (28).

Metöstrus

Sıçanlarda metöstrusun 6-8 saatlik kısa bir evre olduğu bildirilmiştir (7, 14, 15). Farelerde ise 8-24 saat sürebildiği gösterilmiştir (24-26). Metöstrus, nükleussuz keratinize epitel hücreleri, geniş çaplı vakuollü ve nükleuslu epitel hücreleri ile nötrofillerin bir kombinasyonu şeklinde karakterize edilir. Erken metöstrusta nötrofiller daha az ve serpiştirilmiş bir görünüme sahipken, geç metöstrusta epitel hücrelerinden 10 kat daha fazla yoğunluğa sahip olduğu bildirilmiştir (29) (Şekil 4C).

Diöstrus

Metöstrusun bitişi ile diöstrusun başlangıcı arasındaki ayrım keskin sınırlara sahip değildir, görünüş olarak çok benzerdir ve aynı hücre tipleri gözlenebilir (1). Diöstrus, hem farelerde hem de sıçanlarda ortalama 48-72 saat süren, östrus döngüsünün en uzun aşamasıdır (7,14,15,24,25). Nötrofiller, nükleuslu küçük ve büyük epitel hücreleri ve az sayıda nükleussuz keratinize hücreler gözlenebilir. Hücre yoğunluğunun orta-düşük arasında olduğu sakin bir fazdır (1,10,19) (Şekil 4D).

Diöstrus indeksi

Diöstrus frekansında artışın gözleendiği deneysel çalışmalarda hormonal değişiklikleri değerlendirmede yardımcı olarak "(deney süresince gözlenen diöstrus gün sayısı/toplam deney süresi (gün)) x 100" formülüyle kullanılan bir indekstir (26, 30).

ÖSTRUS DÖNGÜSÜNDE ÇEVRESEL ETKENLER

Sıcaklık, beslenme, stres ve sosyal ilişkiler başta olmak üzere, birçok faktör döngü süresini ve sitolojik düzenini etkiler (1,6,9,23,27,31,32).

Rodentlerin östrus döngüsü, aydınlık-karanlık süresine oldukça hassastır. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık dön-

güsü çoğu laboratuvar için standartken, bu saatler 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olarak değiştirildiğinde östrus döngüsü değişiklik göstermektedir (10). Uzun süreli ışık maruziyeti düzensiz ve uzamış döngüsel değişikliklere neden olurken, sürekli ışığa maruziyetin, döngünün östrus fazında durmasına sebep olduğu gösterilmiştir (3).

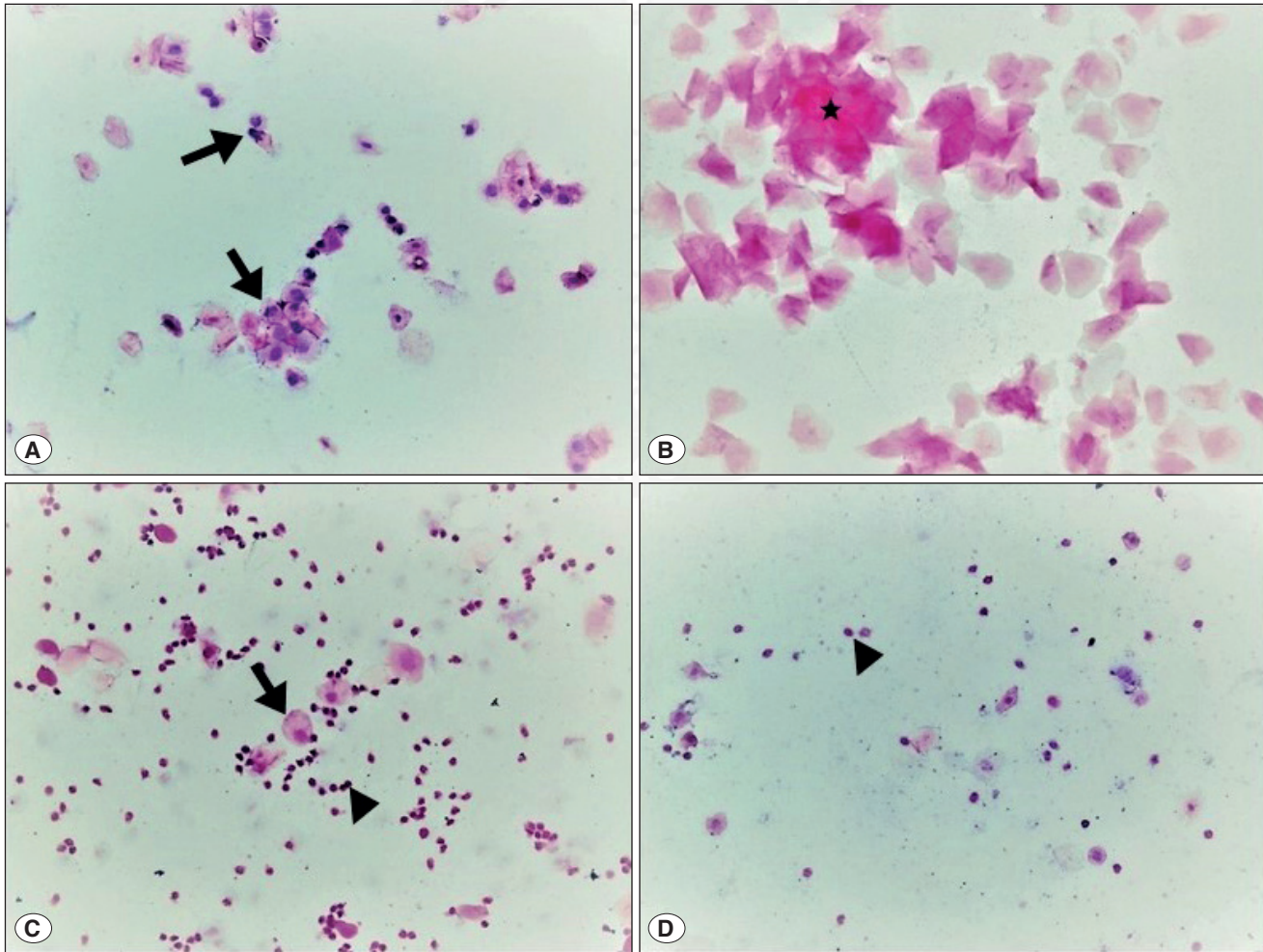
Akut ya da kronik stres maruziyetlerinin östrus siklusu düzeninde değişikliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (33,34). Stres, hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) ekseninin ve hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) eksenin aktivasyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. Kronik öngörülemeyen hafif stresin uygulandığı dişi sıçanların kullandığı bir araştırmada, stresin, esas olarak uzun süreli diöstrusa neden olduğu, östrus döngüsünü 6-7 güne kadar uzattığı belirtilmiştir (35).

Kendi laboratuvarımızda dişi sıçanlar ile yaptığımız çalışmamızda, deneklere 8 hafta boyunca, günde 1 saat uygulanan kronik immobilizan stresin östrus döngüsünde düzensizlik-

lere neden olduğunu belirledik. Bu düzensizliği, stres grubundaki deneklerde, progesterin faz sürelerinin uzamasıyla ilişkilendirdik. Kontrol grubu ile kıyaslandığında kronik stres grubunda hesaplanan diöstrus indeksinin anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit ettik. Ayrıca stres grubuna ait smarlarda, proöstrus fazında nükleuslu epitel hücrelerine ek olarak, salgı yapan musinöz hücreler ve nötrofiller dikkati çekerken, metöstrus ve diöstrus fazlarında kontrol grubuna kıyasla nötrofil sayısında artış olduğunu saptadık (20).

Ardışık 30 gün boyunca, soğuk suyla kaplı bir tank içerisinde, 15 dk süre ile başlarını su seviyesinin üzerinde tutarak dik pozisyonda bırakılan dişi sıçanlarda ise düzensiz ve uzamış östrus siklusu gözlenmiştir (36).

Çevresel etkenlerden bir diğeri de beslenme düzenidir. Yüksek yağlı beslenme, dişi sıçanlarda gonadal hormon düzeyini olumsuz yönde etkilemektedir. Dişi sıçanların, uzun süreli yüksek yağlı besin alımında, proöstrus ve östrus fazlarında



Şekil 4: Sprague Dawley sıçanlarda, her bir östrus siklusu fazına ait vajinal smear mikrografları, **A)** Proöstrus, **B)** Östrus, **C)** Metöstrus, **D)** Diöstrus. (Siyah ok: nükleuslu epitel hücresi, yıldız: kümelenmiş kornifiye epitel hücreleri, ok başı: nötrofil) Hematoksilen+Eozin, (X200) (Melike Sapmaz Metin izniyle kendi arşivinden alınmıştır.)

kaygı ve anksiyete benzeri bir profil sergiledikleri tespit edilmiştir. Aynı sıçanlar (lezzetli yiyecekleri taklit etmek amaçlı) sakkaroz tükettiklerinde kaygı davranışlarını azalttıkları gözlenmiştir (37).

Feromonlar, üreme fizyolojisinde önemli etkenlerden biridir. Erkeklerle aynı odada barındırılan dişi farelerin daha düzenli döngüler gösterme eğiliminde olduğu, tamamı dişilerden oluşan ortamlarda ise haftalarca sürebilen anöstrus dönemleri gösterilmiştir (10, 26). Farelerde, eğer erkek feromon ortamda yoksa, ilk östrusun görülme zamanı vajinal açılmadan 20 gün sonrasına kadar gecikebilir (17). Sıçanlar farelere göre daha az hassas olsa da aynı durum her iki kemirici türü için de kabul görmüştür.

2010 yılında yayınlanan, kafesleme koşullarının östrus siklusu üzerine etkilerini araştırdığımız çalışmamızda, bir kafeste iki (Set I, n=40) ya da sekiz fare (Set II, n=40) olacak şekilde gruplara ayrılan dişi deneklerin 15 gün boyunca östrus siklus takibi yapıldı. İki dişi/kafes grubunda ortalama 4-5 günlük düzenli sikluslar gözlenirken, 8 dişi/kafes grubunda uzayan sikluslar tespit edildi (26).

TARTIŞMA

Nörohormonal sistemde, memeli üreme aksı üç temel doku ve bölümün birleşmesiyle düzenlenir; bunlar hipotalamus, hipofiz ve gonadlardır. Dişilerde, hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın temel fizyolojik fonksiyonu; dinamik sirkülasyon gösteren reproduktif faaliyetler için gerekli hormonların salgılanmasını, ovumun elde edilmesini, gebeliğin oluşumunu ve sağlıklı gebeliğin devamını sağlamaktır. Laboratuvar kemirgenlerinde vajinal sitolojinin değerlendirilmesi; hipotalamo-hipofizer-ovaryan aks bütünlüğünün değerli bir göstergesidir. Östrus siklusu takibiyle; toplam siklus sayısı, siklusun düzenli olup olmadığı, faz süreleri, döstrus indeksi gibi veriler elde edilir. Bu veriler dişi genital sistemin işleyişi, ovulasyon zamanının tespiti, başarılı çiftleşme ve gebelik oluşumunun yanı sıra dişi metabolizmasındaki sistemik değişikliklerin değerlendirilmesine katkı sağlar. Ayrıca davranış testleri, toksikoloji çalışmaları, ksenoöstrojenik ajanlara dokuların cevabı, endokrin düzensizlikler, tedavi edici ajanların etkisinin değerlendirilmesi gibi birçok çalışma konularında östrus siklusu takibi önemli rol oynar (38-42).

Konuyla ilgili ulusal derlemelerden farklı olarak, kendi tecrübelerimiz ve literatür bilgisine dayanarak ortaya koyduğumuz aşağıdaki temel maddelere dikkat edilmesi araştırmacılara kolaylık sağlayacaktır:

1- Vajinal smear örneklerinin doğru teknik ve doğru materyalle elde edilmediği durumlarda, döngü düzeninin bozulmasının yanı sıra (yalancı gebelik, asiklik döngüler gibi), değerlendirmede tutarsız ve güvenilir olmayan veriler ortaya çıkabilir (Ör. dışkı ya da idrarla kontamine yaymalarda bakteri kolonizasyonlarının görülmesi gibi). Bu sebeple

uygulamanın ehil ellerde ve standart kriterlere uygun olarak yapılması önemlidir.

2- Çalışmacılar ısı, stres faktörleri, beslenme, feromon ve kafes popülasyon yoğunluğu gibi etkenlerin östrus siklus düzenini değiştirebileceğini unutmamalı ve deneklerin bulunduğu ortam koşullarını optimize etmelidir.

3- Dişi denekler üzerine yapılan çalışmalarda, östrus siklus takibi yapılmamış olsa bile, denegin sakrifiye edildiği güne ait faz bilgisinin elde edilmiş olması (progestatif ya da östrojenik fazda olup olmaması), endokrin durumun göstergesi olarak, sistemik düzeyde meydana gelen değişikliklerin yorumlanmasına katkı sağlayacaktır.

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamız, östrus döngüsü dinamiklerinin sadece üremeyle ilgili değil, tüm dişi fizyolojisini ilgilendiren sistemik etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, araştırmalarda siklusun fazıyla korele endokrin etkilerin göz önünde bulundurulması gerektiğine dikkati çekerek, zaman ve enerji kaybını engelleyerek araştırmacılara yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Teşekkür

Derlememizin akışına yönelik yol gösterici katkılarından dolayı Prof. Dr. Yeter Topçu Tarladaçalışır' a teşekkür ederiz.

Yazar Katkı Beyanı

Fikir: **Melike Sapmaz Metin**, Tasarım: **Melike Sapmaz Metin, Zekiye Gülfem Yurtgezen**, Literatür Taraması: **Zekiye Gülfem Yurtgezen, Deniz Erçetin**, Yazım: **Melike Sapmaz Metin, Zekiye Gülfem Yurtgezen, Deniz Erçetin**.

Çıkar Çatışması

Yazarların herhangi bir çıkarı dayalı ilişkisi yoktur.

Finansal Destek

Finansal destek yoktur.

Etik Kurul Onayı

Derleme niteliğinde yazı olduğundan etik kurul onayı gerekmemektedir.

Hakemlik Süreci

Kör hakemlik süreci sonrası yayınlanmaya uygun bulunmuş ve kabul edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2007;80(2):84-97.
2. Heape W. Memoirs: The sexual season of mammals and the relation of the pro-œstrum" to menstruation. Journal of Cell Science 1900;2(173):1-70.

3. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* 2012;7(4):e35538.
4. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: Review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology* 2015;43(6):776-793.
5. Vilos GA. The history of the papanicolaou smear and the odyssey of george and andromache papanicolaou. *Obstetrics & Gynecology* 1998;91(3):479-483.
6. Li S, Davis B. Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007;80(3):246-252.
7. Long J, Evans HM, Evans HM. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memoirs of the University of California*. University of California Press, Berkeley, California; 1922.
8. Rodriguez I, Araki K, Khatib K, Martinou JC, Vassalli P. Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. *Dev Biol* 1997;184(1):115-121.
9. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 1982;27(2):327-339.
10. (OECD) *OfEC-0aD*. Part 5: Preparation, reading and reporting of vaginal smears 2014 [Available from: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/40581357.pdf>].
11. Carvalho MC, Genaro K, Leite-Panissi CRA, Lovick TA. Influence of estrous cycle stage on acquisition and expression of fear conditioning in female rats. *Physiol Behav* 2021;234:113372.
12. Sapmaz-Metin M, Topcu-Tarladacalisir Y, Kurt-Omurlu I, Weller BK, Unsal-Atan S. A morphological study of uterine alterations in mice due to exposure to cadmium. *Biotechnic & Histochemistry* 2017;92(4):264-273.
13. Sapmaz M. Normal ve süperovule farelerde iyonizan radyasyonun ovaryum morfolojisi, östrus siklusu ve ovulasyon oranı üzerine etkilerinin incelenmesi. *TÜ Histoloji ve Embriyoloji doktora programı: Doktora Tezi*; 2008.
14. Astwood EB. Changes in the weight and water content of the uterus of the normal adult rat. *Am J Physiol* 1939;126(1):162-170.
15. Mandl AM. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology* 1951;28(4):576-584.
16. Champlin AK, Dorr DL, Gates AH. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod* 1973;8(4):491-494.
17. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* 2009;Appendix 4:Appendix 4I.
18. Mohammed S, Sundaram V. Comparative study of metachromatic staining methods in assessing the exfoliative cell types during oestrous cycle in sprague-dawley laboratory rats. *International Journal of Morphology* 2018;36(3):962-968.
19. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp* 2012(67):e4389.
20. Muratoğlu D. Kronik fizyolojik stres uygulamasının sıçan ovaryumlarında foliküler gelişim ve oosit rezervi üzerine etkileri: IGF1, AMH ve BCL-2'nin rolü. 2017 (Yüksek Lisans Tezi).
21. Sugiyama M, Yasunaga A, Kobayashi R, Fukasawa H, Hashimoto O, Kurusu S, Sasada H, Yoshioka K. Improvement in identification of pro-estrous mice by using a novel method of detecting vaginal mucous cells. *Cell Tissue Res* 2021;383(3):1183-1190.
22. Bakhshalizadeh S, Rabiee F, Shirazi R, Ghaedi K, Amidi F, Nasr-Esfahani MH. Assessment of PGC1 α -FNDC5 axis in granulosa cells of PCOS mouse model. *J Reprod Infertil* 2018;19(2):89-94.
23. Whitten WK. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J Endocrinol* 1956;13(4):399-404.
24. Allen E. The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy* 1922;30(3):297.
25. Grasso P, Rozhavskaia M, Reichert LE Jr. In vivo effects of human follicle-stimulating hormone-related synthetic peptide hFSH-beta-(81-95) and its subdomain hFSH-beta-(90-95) on the mouse estrous cycle. *Biol Reprod* 1998;58(3):821-825.
26. Kanter M, Metin MS, Kurt Ömürlü İ. Balb/C Türü dişi farelerde uniseksüel gruplamanın östrus siklusu üzerine etkileri. *Yeni Tıp Dergisi* 2010;27(4):235-239.
27. Campbell CS, Schwartz NB. The impact of constant light on the estrous-cycle of the rat. *Endocrinology* 1980;106(4):1230-1238.
28. Young WC, Boling JL, Blandau RJ. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *Anatomical Record* 1941;80(1):37-45.
29. Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem* 2005;80(2):79-87.
30. Rao RP, Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind Health* 2002;40(3):237-244.
31. Nelson JF, Felicio LS, Osterburg HH, Finch CE. Altered profiles of estradiol and progesterone associated with prolonged estrous cycles and persistent vaginal cornification in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod* 1981;24(4):784-794.
32. Campbell CS, Ryan KD, Schwartz NB. Estrous cycles in the mouse: relative influence of continuous light and the presence of a male. *Biol Reprod* 1976;14(3):292-299.
33. Yang CX, Wang Y, Lu Q, Lian YN, Anto EO, Zhang Y, Wang W. Chronic stress influences nociceptive sensitivity of female rats in an estrous cycle-dependent manner. *Stress* 2020;23(4):386-392.
34. Barsom SH, Mansfield PK, Koch PB, Gierach G, West SG. Association between psychological stress and menstrual cycle characteristics in perimenopausal women. *Women Health Iss* 2004;14(6):235-241.
35. Valsamakis G, Chrousos G, Mastorakos G. Stress, female reproduction and pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 2019;100:48-57.
36. Casillas F, Betancourt M, Juárez-Rojas L, Ducolomb Y, López A, Ávila-Quintero A, Zamora J, Ommati MM, Retana-Márquez S. Chronic Stress Detrimentally Affects In Vivo Maturation in Rat Oocytes and Oocyte Viability at All Phases of the Estrous Cycle. *Animals (Basel)* 2021;11(9):2478.

37. Silva SP, Beserra-Filho JIA, Kubota MC, Cardoso GN, Freitas FRS, Gonçalves BSM, Vicente-Silva W, Silva-Martins S, Custódio-Silva AC, Soares-Silva B, Maria-Macêdo A, Santos JR, Estadella D, Ribeiro AM. Palatable high-fat diet intake influences mnemonic and emotional aspects in female rats in an estrous cycle-dependent manner. *Metab Brain Dis* 2021;36(7):1717-1727.
38. Guillen-Ruiz G, Cueto-Escobedo J, Hernandez-Lopez F, Rivera-Aburto LE, Herrera-Huerta EV, Rodriguez-Landa JF. Estrous cycle modulates the anxiogenic effects of caffeine in the elevated plus maze and light/dark box in female rats. *Behav Brain Res* 2021;413:113469.
39. Martinez EM, Swartz WJ. Effects of methoxychlor on the reproductive system of the adult female mouse. 1. Gross and histologic observations. *Reprod Toxicol* 1991;5(2):139-147.
40. Ronchetti SA, Novack GV, Bianchi MS, Crocco MC, Duvilanski BH, Cabilla JP. In vivo xenoestrogenic actions of cadmium and arsenic in anterior pituitary and uterus. *Reproduction* 2016;152(1):1-10.
41. Singh KB, Mahajan DK, Tewari RP. Hormonal modulation of the vaginal bacterial flora in experimental polycystic ovarian disease. *J Clin Lab Anal* 1996;10(5):233-238.
42. Smail MA, Soles JL, Karwoski TE, Rubin RT, Rhodes ME. Sexually diergic hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to selective and non-selective muscarinic antagonists prior to cholinergic stimulation by physostigmine in rats. *Brain Res Bull* 2018;137:23-34.

