

## Farede Vajinal Sürüntü Alınması Strese Sebep Olur

### Repeated Collection of Vaginal Smear Causes Stress in Mice

Aslıhan BAHADIR VAROL<sup>1</sup>, Emre Cem ESEN<sup>1</sup>, Emine EREN KOÇAK<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi, Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Psikiyatri Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

#### ÖZ

**Amaç:** Kadınlarda nöropsikiyatrik hastaların yanlış teşhis edilme olasılığı erkeklerle oranla daha fazladır. Bu farkın altında yatan olası sebeplerden biri, sinirbilim çalışmalarında erkek farelerin dişi farelere göre daha sık kullanılması olabilir. Nöropsikiyatrik hastalıkların temellerini anlamada bu yaklaşımın eksiklerinin giderek daha fazla farkına varılmasıyla, çalışmalara fon sağlayan birçok kuruluş çalışma desenine hem erkek hem kadın deneklerin dahil edilmesini zorunlu hale getirmiştir. Dişi farelerin davranışları, östrus döngüsünün farklı evrelerine bağlı olarak değişkenlik gösterdiğinden deneyin yapıldığı östrus döngüsünün dikkate alınması gerekmektedir. Östrus döngüsünün belirlenmesi için vajinal örnek toplanması yaygın olarak kullanılan bir prosedürdür. Çalışmamızda vajinal sürüntü alınmasının strese benzer etkilere sahip olup olmadığını test ettik.

**Yöntem:** Swiss albino dişi farelerden 10 gün boyunca günde iki kez vajinal sürüntü toplandı. Depresyon-benzeri davranışları test etmek için kuyruktan asma, sükröz tercihi ve sıçratma testleri yapıldı. Kısa ve uzun

dönemli belleği değerlendirmek için nesne/nesnenin yeri öğretildikten 1 saat ve 24 saat sonra yeni nesne tanıma ve yeni yer tanıma testleri yapıldı.

**Bulgular:** Vajinal sürüntüleri toplanan dişi farelerde davranışsal umutsuzluğun ve anhedoni-benzeri davranışın arttığı gözlemlendi. Vajinal yayma grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem kısa dönemli hem de uzun dönemli bellekte bozulma olduğu saptandı.

**Sonuç:** Vajinal sürüntü toplamanın farelerde depresyon-benzeri davranışların artmasına ve aynı zamanda kısa ve uzun dönemli belleğin bozulmasına yol açtığını gözlemledik. Vajinal sürüntü toplama prosedürünün stresli olması nedeniyle hayvan davranışını inceleyen çalışmalarda östrus döngüsünün başka yollarla değerlendirilmesini öneriyoruz.

**Anahtar Sözcükler:** Bellek, depresyon, östrus döngüsü, stres, vajinal sürüntü

#### ABSTRACT

**Introduction:** Women are more likely to be misdiagnosed in many neuropsychiatric disorders than men. One of the possible underlying reasons for this disparity may be more frequent use of male mice than female mice in neuroscience studies. With the increasing realization of the shortcomings of this approach in understanding the neurobiological basis of these disorders, many funding agencies mandate the inclusion of both male and female subjects in study design. As the behaviors vary with the stage of the estrous cycle, the collection of vaginal smears to identify the estrous stage becomes a widely used procedure. Here we tested whether vaginal smear causes similar effects to that of stress by evaluating an increase in depression-like behavior and impairment in memory.

**Method:** Vaginal smear was collected from Swiss albino mice twice a day for 10 days. In order to test depression-like behavior tail suspension,

sucrose preference and splash tests were conducted. Novel object recognition and novel object location tests were performed 1 hour and 24 hours after training to evaluate short- and long-term memory.

**Results:** The female mice whose vaginal smears were collected demonstrated increased behavioral despair and anhedonia. Vaginal smear group showed deficits in both short-term and long-term memory when compared to the control group.

**Conclusion:** Our results indicate that the collection of vaginal smear not only increased depression-like behaviors in mice, but also impaired short-term and long-term memory, indicating that the procedure of vaginal smear collection was stressful. We recommend considering other ways to determine the stage of the estrous cycle when studying behavior.

**Keywords:** Depression, estrous cycle, memory, stress, vaginal smear

**Cite this article as:** Bahadır Varol A, Esen EC, Eren Koçak E. Farede Vajinal Sürüntü Alınması Strese Sebep Olur. Arch Neuropsychiatry 2022; 59:325–329.

#### GİRİŞ

Laboratuvar hayvanlarıyla yapılan deneyler sinirbilim araştırmalarının temellerinden biridir ve beynin nasıl çalıştığını anlamamızda çok önemli katkıları olmuştur (1, 2). Ancak, temel sinirbilim çalışmalarının kliniğe aktarılma başarısı beklenenden daha düşük olmuştur (3-5). Bunun nedenlerinden birinin de araştırmalarda sadece erkek deney hayvanların kullanılması olduğu düşünülmektedir. Beery ve Zucker'in (2010) on biyolojik alanda kullanılan deney hayvanlarının cinsiyetlerini incelediği

araştırmalarında, sinirbilim çalışmalarında erkek hayvanların dişilerden ~6 kat daha sık kullanıldığı ve bu yönde en fazla yanlılığı olan alan olduğu bulunmuştur (6).

Erkek ve kadın davranışlarında niteliksel farklılıklar olduğu giderek daha fazla kabul görmektedir. Erkek ve kadınların, öğrenmede, karar vermede, tehdide tepki vermede ve uzaysal navigasyonda farklı

## Öne Çıkan Noktalar

- Çalışma desenlerine hem erkek hem de kadın deneklerin dahil edilmesi gereklidir.
- Östrus döngüsünün evresine göre davranışlar değişiklik gösterebilir.
- Östrus döngüsünün belirlenmesi için vajinal sürüntü örneği toplanır.
- Vajinal sürüntü alınması depresyon benzeri davranışı artırır, belleği bozar.
- Östrus döngüsünün belirlenmesinde vajinanın görsel olarak incelenmesi önerilir.

stratejiler benimsediği gösterilmiştir (Ayrıntılı bir inceleme için lütfen 7. referansa bakınız). Bu nedenle, laboratuvar deneylerinde sadece erkek hayvanlardan davranışsal veriler elde etmenin ve dişileri dışarıda bırakmanın yol açabileceği riskler araştırmacılar ve araştırmaları fonlayan kuruluşlar için açık hale gelmiştir. Bunun sonucunda, Avrupa, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde bilimsel çalışmalara fon sağlayan birçok kuruluş ve bilimsel dergiler, laboratuvar çalışmalarında erkek hayvanların sonuçlarını her iki cinsiyete genellemek yerine, her iki cinsiyetin de araştırma desenine dahil edilmesini zorunlu kılmaya başlamışlardır (6-8).

Majör depresif bozukluk ve anksiyete bozuklukları gibi psikiyatrik bozuklukların yaygınlığının kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğu göz önüne alındığında, psikiyatrik bozuklukların nörobiyolojik temelini araştırmayı amaçlayan çalışmalara dişi hayvanların dahil edilmesinin önemi açıktır (9, 10). Dişilerin davranışları, östrus döngüsünün farklı evrelerine bağlı olarak değişiklik gösterebildiğinden, araştırma sonuçlarının yorumlanmasında deneyin yapıldığı östrus döngüsü dikkate alınmalıdır (11, 12). Son yirmi yılda östrus döngüsünün davranışsal etkilerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Araştırmalar, koşulsuz korku tepkisi, sosyal tercih ve öğrenme stratejisi gibi davranışın farklı yönlerinin östrus döngüsü boyunca etkilendiğini göstermektedir (11-13).

Dişi farelerde östrus döngüsünün evresini belirlemek ve takip edebilmek için; dış genital organların görünümünü gözlemleme, vajinal sitoloji ve idrarın biyokimyasal analizi yöntemleri kullanılmaktadır (14-19). Bu yöntemlerin yanı sıra literatürde yer alan vajinal epitel hücrelerinin elektriksel empedansının ölçülmesi yöntemi tartışmalıdır (14). Dış genital organların gözlemlenmesi herhangi bir ekipman kullanımı gerektirmeyen, girişimsel olmayan, en hızlı ve en ucuz yöntem olduğu halde proöstrus veya östrus evrelerinin belirlenmesinde sınırlılıkları vardır ve yöntemin güvenilirliği gözlemcinin deneyiminden etkilenmektedir. Östrus döngüsünün tüm evrelerinin tanımlanmasının gerekli olduğu durumlarda önerilen yöntem ise vajinal sitolojidir (16).

Farelerde tam bir östrus döngüsü genellikle dört ila beş gün sürer (20). Farelerde östrus döngüsü uzunluğunun sabit olup olmadığını tespit edebilmek için vajinal sitolojinin en az iki ardışık döngü boyunca günde iki kez incelenmesi önerilmektedir (11, 21, 22). Araştırma desenine göre, vajinal sürüntü 10-21 gün arasında değişen farklı süreler boyunca toplanmaktadır (11, 23-25). Çalışmamızda farelerde iki östrus döngüsüne karşılık gelen 10 gün boyunca, günde iki kez vajinal sürüntü örneği alınmasının depresyon-benzeri davranışları artırdığını ve hem kısa hem de uzun dönemli bellek performanslarında bozulmaya neden olduğunu gösterdik. Bu bulgular, vajinal sürüntü örneği alınan dişi farelerde stres etkilerine benzer davranış değişikliklerine yol açabileceğini ve deneyler desenlenirken bu durumun dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

## YÖNTEM

### Hayvanlar

Deneylerde 30-35 gram (n=21) ağırlığında dişi Swiss albino fareler kullanıldı. Hayvanlar, 22±3°C'de 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldu ve ad libitum beslendi. Tüm davranış deneyleri aydınlık döngü sırasında yapıldı. Çalışma grubundaki dişi farelerden 10 gün (n=14) boyunca günde iki kez vajinal sürüntü örneği alındı ve kontrol grubundaki dişi fareler (n=7) kafeslerinde rahatsız edilmeden bırakıldı. Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 23/10/2019 tarihinde 2019/11-01 numarası ile onaylanmıştır.

### Vajinal Sürüntü Örneği Toplanması

Yuvarlak başlı bir toplu iğne, farelerin vajinasına ~1,7 mm sokularak vajinal sürüntü örnekleri toplandı ve lam üzerine yayıldı (26-28). Dişi farelerde östrus döngüsü dört evreden (sırasıyla; proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus) oluşur ve genellikle 4-5 gün sürer (25). Östrus döngü uzunluğunun sabit olup olmadığını tespit edilmesi için minimum iki ardışık döngünün evrendirilmesi tavsiye edilmektedir (11, 21). Ayrıca proöstrus ve östrus evrelerinin birbirinden mikroskobik olarak zor ayırt edilmesi sebebiyle günde bir kez vajinal sürüntü değerlendirmesi yanlıtıcı olabilmektedir (25, 29). Bu nedenlerle, ardışık iki döngüye karşılık gelen zaman penceresi olan 10 gün boyunca günde iki kez vajinal sürüntü örneği alındı. İlk bulgularımız vajinal sürüntü örneği toplamaya başladıktan beş gün sonra depresyone etkilerin başladığını gösterdiği için davranış deneylerine beşinci günde başlamaya karar verdik.

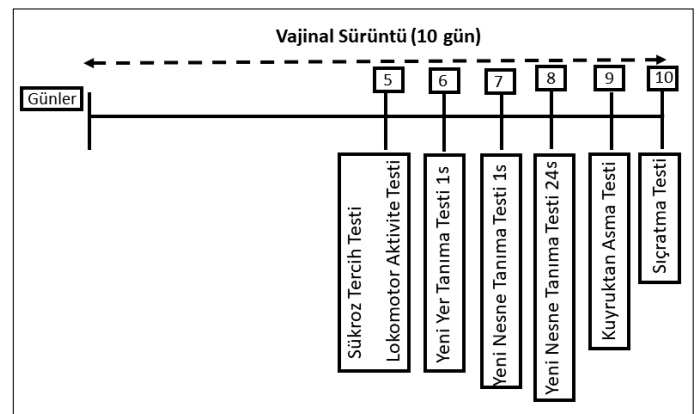
### Davranış Deneyleri

Davranış deneylerine vajinal sürüntü örneği toplamaya başladıktan beş gün sonra başlandı ve günlük olarak artan stres sırasına göre yapıldı (Şekil 1).

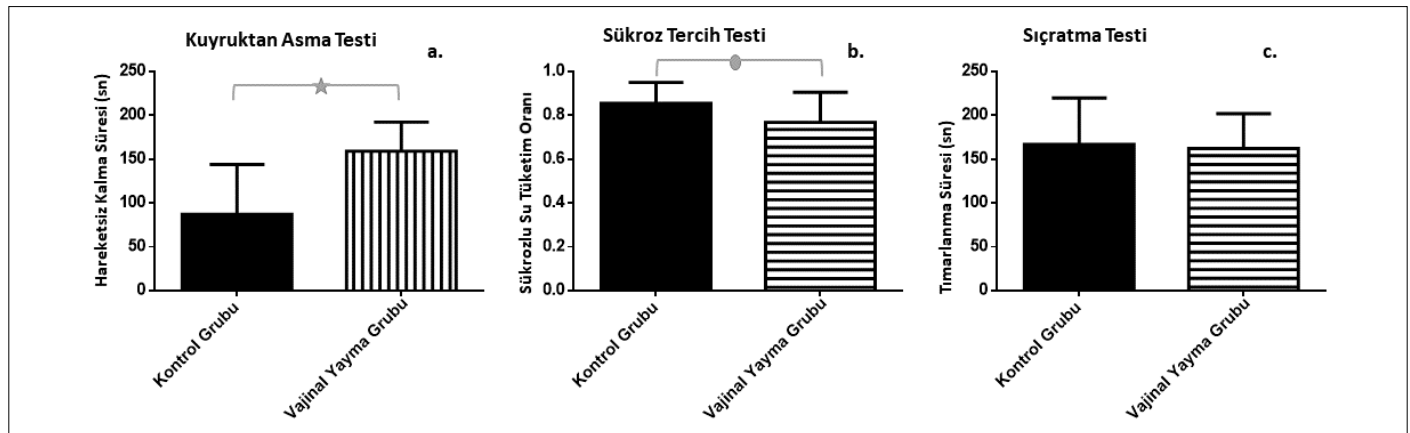
### Sükroz Tercih Testi

Deney hayvanlarında hedonik davranışın ölçümü için sıklıkla sükroz tercih testi kullanılır. Toplam tüketilen sıvı içinde sükrozlu su tercihindeki azalma, anhedoninin bir ölçüsü olarak kullanılır (30).

Deneyin ilk gününde gece boyunca 12 saat süreyle kafeslerin her iki tarafına, %1 sükroz solüsyonu içeren iki şişe yerleştirilerek fareler sükroz solüsyonu tüketmeye alıştırıldı. Test günlerinde (2. ve 4. günler) biri çeşme suyu, diğeri %1 sükroz solüsyonu ile doldurulmuş iki özdeş şişe kafeslerin her iki yanına yerleştirildi. Yön tercih tarafılığını kontrol etmek için sükroz solüsyonu içeren şişe hayvanların yarısında sağ tarafa, diğeri yarısında ise sol tarafa yerleştirildi. İkinci test gününde (4. gün) çeşme suyu ve sükroz içeren şişelerin tarafları değiştirildi. Tüm şişeler, 12 saatlik test süresinden önce ve sonra tartıldı ve her şişenin ilk ve son test ağırlıkları arasındaki fark, tüketilen su veya sükroz çözeltisinin bir ölçüsü olarak kullanıldı. Tercih indeksi şu formülle hesaplandı:  $100 \times (\text{tüketilen sükroz solüsyonu} /$



Şekil 1. Deney deseninin şematik diyagramı  
s: saat



**Şekil 2.** Kuyruktan asma, sükröz tercihi ve sıçratma testlerinin sonuçları (a). Vajinal sürüntü alınan grubun kuyruktan asma testinde hareketsiz kalma süresi daha fazlaydı (b). Vajinal sürüntü alınan grubun sükröz tercih indeksi kontrollere göre daha düşük olma eğilimindeydi (c). Sıçratma testinde gruplar arasında kendini tımarlama süresinde fark bulunmadı. Siyah kolon kontrol grubunu (n=7), çizgili kolon vajinal sürüntü alınan grubu (n=14) göstermektedir. \*p=0,029; \*p=0,132; sn: saniye.

tüketilen toplam sıvı). Sükröz çözeltisine sürekli ulaşabilir olmanın sükröz çözeltisinin hedonik değerinde yol açabileceği azalmanın önüne geçmek için testin yapıldığı günler arasında bir gün ara verildi.

#### Lokomotor Aktivite Testi

Fareler, kare bir kutuya (genişlik x yükseklik: 22,5 x 30 cm) ayrı ayrı konularak hareketleri 10 dakika boyunca Ethovision XT-8 yazılımı ile izlendi. Farelerin kat ettikleri toplam mesafe, lokomotor aktivitenin bir ölçüsü olarak hesaplandı.

#### Yeni Nesne Tanıma ve Yeni Yer Tanıma Testleri

Yeni nesne tanıma testi (YNTT) beynin entorinal fonksiyonların değerlendirilmesinde daha seçici iken yeni yer tanıma testi (YYTT) hipokampal fonksiyonların değerlendirilmesinde daha seçicidir (31). YNTT ve YYTT, lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi için kullanılan kutuda gerçekleştirildi. Kutunun karşılıklı iki köşesinden 6 cm uzağa iki özdeş nesne yerleştirildi ve farelerin nesnelere 10 dakika keşfetmesine izin verildi (eğitim). Kısa dönemli belleğin değerlendirilmesi amacıyla, eğitimden 1 saat (1 sa) sonra nesnelere biri belirgin şekilde farklı bir şekle sahip olan ve farklı bir malzemedir yapılmış yeni bir nesneyle değiştirildi (YNTT-1sa) ve 5 dakika boyunca farelerin tanıdığı nesneyi ve yeni nesneyi keşfetmek için harcadığı zaman Ethovision XT-8 tarafından izlendi ve analiz edildi. Yeni nesneyi keşfetmek için harcanan zamanın/her iki nesneyi keşfetmek için harcanan zamana oranı, kısa dönemli belleğin bir ölçüsü olarak kullanıldı. Uzun dönemli belleğin değerlendirilmesi amacıyla, eğitimden yirmi dört saat sonra, YNTT-1sa'da kullanılan yeni nesne çıkarılarak önceki iki nesneden şekil ve malzeme bakımından farklı yeni bir nesneyle değiştirildi (YNTT-24sa) ve farelerin nesnelere 5 dakika boyunca keşfetmelerine izin verildi. Yeni nesneyi keşfetmek için harcanan zamanın her iki nesneyi keşfetmek için harcanan zamana oranı, uzun dönemli hafızanın bir ölçüsü olarak kullanıldı. YYTT-1sa'da, YNTT-1sa'dan farklı olarak bir nesnenin çıkarılıp yeni bir nesne konulması yerine eş nesnelere birinin konumu değiştirildi ve kutunun karşı köşesine taşındı. Yeri değişen nesneyi keşfetmek için harcanan zamanın her iki nesneyi keşfetmek için harcanan zamana oranı, hipokampal kısa dönemli belleğin bir ölçüsü olarak kullanıldı.

#### Sıçratma Testi

Sıçratma testi farelerde motivasyonel ve öz bakım davranışının bir indeksi olarak kullanılmaktadır (32). Farelerin sırtlarına %10 sükröz çözeltisi püskürtülerek 5 dakika boyunca kendi kendini temizleme (tımarlama) davranış süreleri ölçüldü.

#### Kuyruktan Asma Testi

Kuyruktan asma testi sırasında hareketsiz geçirilen sürenin uzunluğu

davranışsal umutsuzluğun bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır (33). Fareler, zeminden 80 cm yukarıda yapışkan bir elektrik bandı yardımıyla kuyruklarından asılarak hareketleri 6 dakika boyunca kaydedildi. Kaydın ilk iki dakikası teste alışma olarak kabul edildi ve kaydın son 4 dakikasında toplam hareketsiz geçirilen süre hesaplandı.

#### İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler için SPSS sürüm 23 yazılımı (SPSS, Inc., Chicago, IL) kullanıldı. Verilerin normal dağılımını test etmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Grupların ortalama sükröz tercih indeksi, ortalama yeni nesne tanıma ve yeni yer tanıma indeksleri, lokomotor aktivite testinde kat edilen toplam mesafe, sıçratma testinde tımarlanma için harcanan ortalama süre ve kuyruktan asma testinde ortalama hareketsiz kalma süresi açısından karşılaştırılması için Student-t testi kullanıldı.

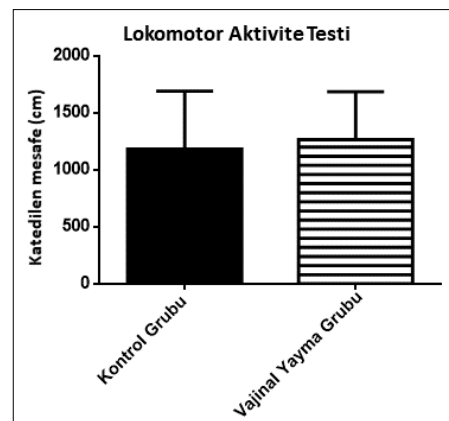
## BULGULAR

#### Depresyon Benzeri Davranış

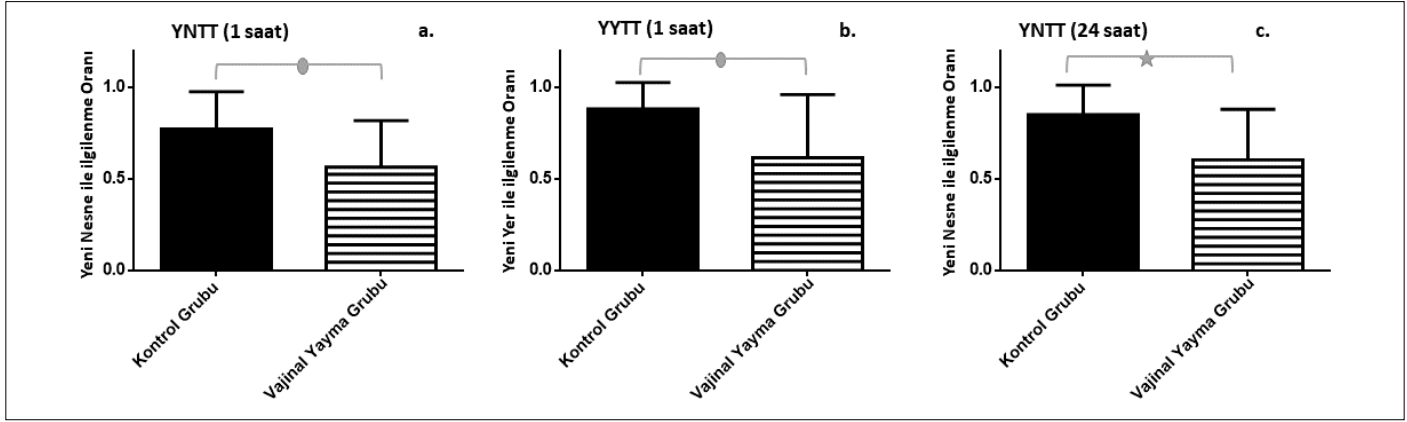
Kuyruktan asma testindeki toplam hareketsizlik süresi, vajinal yayma grubunda kontrol grubuna göre ~1,7 kat daha yüksekti (p=0,029) (Şekil 2a). Vajinal yayma grubunda sükröz tercih indeksi %75 iken kontrol grubunda %85 idi ve istatistiksel anlamlılığa eğilim vardı (p=0,132) (Şekil 2b). Sırtlarına sükröz solüsyonu püskürtüldükten sonra her iki grubun tımarlanma süreleri benzerdi (p=0,839) (Şekil 2c).

#### Lokomotor Aktivite

Gruplar arasında lokomotor aktivite testi sırasında kat edilen toplam mesafe açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p=0,499) (Şekil 3).



**Şekil 3.** Gruplar arasında lokomotor aktivite testinde fark gözlenmedi. Siyah kolon kontrol grubunu (n=7), çizgili kolon vajinal sürüntü alınan grubu (n=14) göstermektedir.



**Şekil 4.** Kısa ve uzun dönemli bellek performansları. Nesnelere veya yerleri öğretildikten 1 saat sonra yapılan testlerde (a). Yeni nesne tanıma indeksi ve (b). Yeni yer tanıma indeksi vajinal sürüntü alınan grupta kontrol grubuna göre daha düşüktü (c). Nesnelere öğretildikten 24 saat sonra yapılan testlerde yeni nesne tanıma indeksi vajinal sürüntü alınan grupta kontrol grubuna göre daha düşüktü. Siyah kolon kontrol grubunu (n=7), çizgili kolon vajinal sürüntü alınan grubu (n=14) göstermektedir. \*p=0,025; \*\*p≤0,06.

### Kısa ve Uzun Dönemli Bellek

Vajinal yayma grubundaki fareler, eğitimden 1 saat sonra yeni nesneyi veya yeri değiştirilen nesneyi keşfetmeye sırasıyla %21 ve %24 daha az zaman harcadı (sırasıyla p=0,061; 0,069) (Şekil 4a, 4b). Bu bulgular vajinal yayma yapmanın kısa dönemli bellek performansında azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir. Vajinal yayma grubu, eğitimden 24 saat sonra yeni nesneyi keşfetmeye %25 daha az zaman harcadı (p=0,025) (Şekil 4c), bu da uzun dönemli bellek performansında bozulmaya işaret etmektedir.

### TARTIŞMA

Dişi farelerden 10 gün boyunca günde iki kez vajinal sürüntü örneği alınarak, kuyruktan asma testinde hareketsiz kalma süresini arttırdığını ve sükröz tercihi indeksinde azalmaya neden olduğunu gösterdik. Bu iki bulgu da depresyon benzeri davranışta bir artış olduğuna işaret etmektedir. Farelerin davranışlarında anhedoni-benzeri özellikler vajinal sürüntü örneği toplanmasının beşinci günü gibi erken bir tarihte belirginleşmeye başladı. Lokomotor testte iki grup arasında fark olmaması, kuyruktan asma testinde gruplar arasındaki hareketsizlik süresindeki farkın, lokomotor aktivite değişikliğinden değil, davranışsal umutsuzluktaki artıştan kaynaklandığını göstermektedir. Literatürde farklı stresörlerin hem davranışsal umutsuzluğu hem de anhedoniyi arttırdığı gösterilmiştir (26, 34). Çalışmamızın sonuçları, tekrarlayan vajinal sürüntü örneği toplama prosedürünün farelerde strese neden olduğunu düşündürmektedir. Dişi farelerde kendi kendini tımarlama davranışında gruplar arasında fark gözlemlenmedi, laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz diğer çalışmalarda kronik orta derecede strese maruz bırakılan dişi farelerin kendi kendini tımarlamasında herhangi bir fark saptanmamış olmamız (yayınlanmamış veriler) bu bulguyu desteklemektedir.

Deney hayvanlarında kronik strese maruz kalmanın bellek işlevleri üzerindeki bozucu etkilerini gösteren çok sayıda çalışma vardır (27, 28). Tekrarlayan şekilde vajinal yayma alınmasının hem kısa dönemli hem de uzun dönemli bellekte bozulmaya yol açması, farelerde vajinal sürüntü alma prosedürünün stresli olduğu hipotezimizi desteklemektedir. Kısa ve uzun dönemli belleğin oluşumu farklı nöral mekanizmalar aracılığıyla olmaktadır. Özetle kısa dönemli bellek oluşumu için kinaz vb. proteinlerdeki biyokimyasal değişiklikler sonucu kolayca salınabilen nörotransmitter havuzundaki vezikül sayısının artması veya postsinaptik membrandaki AMPA reseptörlerinin sayısının artması gereklidir. Uzun dönemli bellek oluşumu için ise yeni protein sentezi ve yeni sinaptik bağlantıların oluşumu gereklidir (35, 36). Sonuçlarımız, 10 gün boyunca tekrarlanan vajinal sürüntü alınmasının, sadece kısa dönemli değil, aynı zamanda uzun dönemli bellek mekanizmalarına da müdahale edecek kadar şiddetli strese neden olduğunu göstermektedir.

Özetlemek gerekirse, bulgularımızı farelerde östrus döngüsünün evresini belirlemeye yönelik bir prosedür olan vajinal sürüntü toplamanın, depresyon-benzeri davranış ve bellek performansı üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, çalışma deseni imkan veriyorsa östrus döngüsünün evresini belirlemek için dış genital organların görsel muayenesinin kullanımını öneriyoruz (16, 17). Gözlemlerimize göre deneyimsiz bir araştırmacı bile vajina görünümünü gözlemleyerek östrus döngüsünün aşamalarını %80 doğrulukla belirleyebilmektedir.

Bu çalışmadaki davranışsal etkiler ardışık iki östrus döngüsünün 5. ve 10. günleri arasında gösterilmiştir. On günden uzun süre ile vajinal sürüntü örneği toplanması durumunda farelerin bu işleme uyum sağlama olasılığı olabilir. Bu olasılığın dışlanabilmesi için gelecekteki çalışmalarda 10 günden daha uzun süre ile vajinal sürüntü toplanmasının davranışsal etkilerinin incelenmesi gereklidir. Bir başka olası deney deseni ise bu çalışmada bildirilen davranışsal etkilerin yatışması için 2 -3 östrus döngüsü boyunca vajinal sürüntü örneği alındıktan sonra bir süre beklemek şeklinde olabilir. Ancak bu desende beklenen süre içinde östrus döngüsünde öngörülemez değişiklikler olabileceğinden, östrus evresini belirleme aracı olarak dış genital organların görsel muayenesinin kullanılması daha güvenilir bir yöntem olabilir.

**Teşekkür:** Doç. Dr. İlknur Pir Yağcı'ya Aslıhan Bahadır Varol'a verdiği farelerden vajinal örnek toplama ve değerlendirme eğitimi için teşekkür ederiz.

**Etik Komite Onayı:** Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 23/10/2019 tarihinde 2019/11-01 numarası ile onaylanmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış Bağlımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir- EEK; Tasarım- EEK, ABV, ECE; Denetleme- EEK; Kaynaklar- EEK; Malzemeler- EEK, ABV, ECE; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- EEK, ABV, ECE; Analiz ve/veya Yorum- EEK, ABV, ECE; Literatür Taraması- EEK, ABV, ECE; Yazıyı Yazan- EEK, ABV, ECE; Eleştirel İnceleme- EEK, ABV, ECE.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için herhangi bir fon almamıştır.

### KAYNAKLAR

1. Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009.
2. Hoffman KL, editor. *Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals*, 1st ed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing; 2015.
3. Harlow HF, Gluck JP, Suomi SJ. Generalization of behavioral data between nonhuman and human animals. *Am Psychol*. 1972;27(8), 709–716. [Crossref]
4. Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med*. 2009;4:2. [Crossref]



5. Garner JP. The significance of meaning: why do over 90% of behavioral neuroscience results fail to translate to humans, and what can we do to fix it? *ILARJ*. 2014;55(3):438–456. [\[Crossref\]](#)
6. Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(3):565–572. [\[Crossref\]](#)
7. Clayton JA. Studying both sexes: a guiding principle for biomedicine. *FASEB J*. 2016;30(2):519–524. [\[Crossref\]](#)
8. Shansky RM. Sex differences in behavioral strategies: avoiding interpretational pitfalls. *Curr Opin Neurobiol*. 2018;49:95–98. [\[Crossref\]](#)
9. Piccinelli M, Wilkinson G. Gender differences in depression. Critical review. *Br J Psychiatry*. 2000;177:486–492. [\[Crossref\]](#)
10. McLean CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG. Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res*. 2011;45(8):1027–1035. [\[Crossref\]](#)
11. Chari T, Griswold S, Andrews NA, Fagioli M. The Stage of the Estrus Cycle Is Critical for Interpretation of Female Mouse Social Interaction Behavior. *Front Behav Neurosci*. 2020;14:113. [\[Crossref\]](#)
12. Lovick TA, Zangrossi H Jr. Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. *Front Psychiatry*. 2021;12:711065. [\[Crossref\]](#)
13. Korol DL, Malin EL, Borden KA, Busby RA, Couper-Leo J. Shifts in preferred learning strategy across the estrous cycle in female rats. *Horm Behav*. 2004;45(5):330–338. [\[Crossref\]](#)
14. Ajayi AF, Akhigbe RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res Pract*. 2020;6:5. [\[Crossref\]](#)
15. 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. *Toxicol Pathol*. 2015;43(6):776–793. [\[Crossref\]](#)
16. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*. 2012;7(4):e35538. [\[Crossref\]](#)
17. 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. [\[Crossref\]](#)
18. Ramos SD, Lee JM, Peuler JD. An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *J Appl Physiol*(1985). 2001;91(2):667–670. [\[Crossref\]](#)
19. Achiraman S, Archunan G, SankarGanesh D, Rajagopal T, Rengarajan RL, Kokilavani P, et al. Biochemical analysis of female mice urine with reference to endocrine function: a key tool for estrus detection. *Zoolog Sci*. 2011;28(8):600–605. [\[Crossref\]](#)
20. Allen E. The oestrous cycle in the mouse. *Am J Anat*. 1922;30:297–371. [\[Crossref\]](#)
21. Kopp C, Ressel V, Wigger E, Tobler I. Influence of estrus cycle and ageing on activity patterns in two inbred mouse strains. *Behav Brain Res*. 2006;167(1):165–174. [\[Crossref\]](#)
22. Wood GA, Fata JE, Watson KL, Khokha R. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*. 2007;133(5):1035–1044. [\[Crossref\]](#)
23. Wallace JG, Potts RH, Szamosi JC, Surette MG, Sloboda DM. The murine female intestinal microbiota does not shift throughout the estrous cycle. *PLoS One*. 2018;13(7):e0200729. [\[Crossref\]](#)
24. Caligioni CS, Franci CR. Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. *Life Sci*. 2002;71(24):2821–2831. [\[Crossref\]](#)
25. Yoshinaka K, Yamaguchi A, Matsumura R, Node K, Tokuda I, Akashi M. Effect of different light-dark schedules on estrous cycle in mice, and implications for mitigating the adverse impact of night work. *Genes Cells*. 2017;22(10):876–884. [\[Crossref\]](#)
26. Vassilev P, Pantoja-Urban AH, Giroux M, Nouel D, Hernandez G, Orsini T, et al. Unique effects of social defeat stress in adolescent male mice on the Netrin-1/DCC pathway, prefrontal cortex dopamine and cognition (Social stress in adolescent vs. adult male mice). *eNeuro*. 2021;8(2). [\[Crossref\]](#)
27. Tripathi SJ, Chakraborty S, Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS. Inactivation of basolateral amygdala prevents chronic immobilization stress-induced memory impairment and associated changes in corticosterone levels. *Neurobiol Learn Mem*. 2017;142(Pt B):218–229. [\[Crossref\]](#)
28. Elizabeth A, Adegbuyi A, Olusegun A, Benneth BA, Anthony E, Abayomi A, et al. Morin hydrate attenuates chronic stress-induced memory impairment and degeneration of hippocampal subfields in mice: The role of oxidative, nitric and neuroinflammatory pathways. *Metab Brain Dis*. 2020;35:1145–1156. [\[Crossref\]](#)
29. 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. [\[Crossref\]](#)
30. Strelakova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(11):2007–2017. [\[Crossref\]](#)
31. Cruz-Sanchez A, Dematagoda S, Ahmed R, Mohanathaas S, Odenwald N, Arruda-Carvalho M. Developmental onset distinguishes three types of spontaneous recognition memory in mice. *Sci Rep*. 2020;10:10612. [\[Crossref\]](#)
32. Barthas F, Humo M, Gilsbach R, Waltisperger E, Karatas M, Leman S, et al. Cingulate Overexpression of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 as a Key Factor for Depression. *Biol Psychiatry*. 2017;82(5):370–379. [\[Crossref\]](#)
33. Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(4-5):571–625. [\[Crossref\]](#)
34. Fang X, Jiang S, Wang J, Bai Y, Kim CS, Blake D, et al. Chronic unpredictable stress induces depression-related behaviors by suppressing AgRP neuron activity. *Mol Psychiatry*. 2021;26:2299–2315. [\[Crossref\]](#)
35. Schacter DL, Wagner AD. Learning and Memory. In: Kandel ER, Schwartz JH, Hudspeth AJ, Sigelbaum SA, Jessell TM. 5th ed. Principles of neural science. New York: McGraw-Hill; 2013. p. 1441–1460.
36. Eric R. Kandel ER, Siegelbaum SA. Cellular Mechanisms of Implicit Memory Storage and the Biological Basis of Individuality. In: Kandel ER, Schwartz JH, Hudspeth AJ, Sigelbaum SA, Jessell TM. 5th ed. Principles of neural science. New York: McGraw-Hill; 2013. p. 1461–1486.