

Farede östrus siklusu tayininde hızlı, kolay ve etkin bir yöntem

Zehra Dilşad Çoban (*), Şefik Güran (*), Ertan Altaylı (*), Hakan Kayır (**), Barış Baykal (***)

ÖZET

Östrus siklusu kemirgen (rodent) dışında üreme hormon değişikliği ile tekrarlanan fizyolojik libido değişiklikleridir. Bu dönem fare gibi kemirgenlerde kısadır. Sadece 4 veya 5 gün sürer. Farede östrus siklusunun belirlenmesi farenin çiftleşme dönemini belirler. Gebeliğin başlangıcının tayininde önemlidir. Bu dönemin kısa olması üreme ile ilgili çalışmalarda kemirgenlerin kullanılmasını avantajlı hale getirmektedir. Ancak farelerde bu dönemin tespiti zor olduğu için çalışmalarda çoğunlukla ratlar tercih edilmiştir. Son yıllarda genetiği değiştirilmiş farelerin tıp alanındaki araştırmalarda kullanımı hızla artmaktadır. Bu nedenle farelerde östrus siklusunun tayini önem kazanmıştır. Bu yöntemde vajinal örnek alma ve örnekten yapılan vajinal yaymada hücre tipinin mikroskop altında belirlenmesi esastır. Bu konuda literatürde birçok farklı çalışma vardır. Bu yöntemin ilk aşaması için vajinal sürüntü alma metodları önerilmektedir. Vajinal yayma aşamasında hücre tipinin mikroskopta tayininde boyama yapmadan değerlendiren metodlar vardır. Bazı metodlarda boya olarak farklı kimyasallar önerilmektedir. Biz laboratuvarımızda fare üreme döngüsü tayininde hızlı, uygulaması kolay ve etkin bir yöntem geliştirdik. Fare vajinal yaymada sürüntü alma yerine vajinal yıkama yaptık. Vajinal hücrelerden yapılan yaymada oldukça basit bir boyama yöntemi olan toluidin mavisi kullandık. Değerlendirmeyi ışık mikroskobu altında yaptık. Bu yöntemle hamilelik oranları istatistiksel olarak artmış, hamilelik zamanı tam olarak bilindiğinden istenilen dönem oosit ve embriyo eldesi mümkün olmuştur. Buradan çıkarımla fare östrus siklusunun saptanmasında modifiye ederek kullandığımız bu yöntem diğer yöntemlere göre daha hızlı, kolay ve değerlendirme aşamasında daha etkindir.

Anahtar sözcükler: Östrus siklusu, fare, vajinal yayma, toluidin mavisi

SUMMARY

An easy and effective methodology in defining the estrous cycle in mice
Estrous cycle is a recurring physiologic change in libido, which is induced by reproductive hormones in rodents. This cycle is very short in rodents including mice. It persists for 4 or 5 days. Defining the estrous cycle is important for specifying the exact time of the mating period. It represents the beginning of the pregnancy in mice. Having short time period in estrous cycle makes the rodents in advantage in reproductive studies. Because of the difficulties in uses of this technique in mice, generally rats are preferred. The uses of genetically engineered mice increase in recent medical research studies. So, it makes important the determining of estrus cycle in mice. The main steps of the procedures are the obtaining of vaginal samples for having vaginal smear and the determination of the cell types in vaginal smear under the microscope. There are many different studies about this topic in the literature. Vaginal swap methodologies are favorable for the first step of these procedures. In the determination of the cell types from vaginal smears, some methodologies prefer the analyses of cell types under microscope without any staining. In other methodologies, some chemicals prefer for the staining of the cells obtained from vaginal smears. In our lab, a rapid, simple and effective methodology was established in the determination of estrous cycle in mice. Vaginal washing methodology was applied in first step instead of vaginal swap methodology. In the preparation of mouse vaginal smear, toluidine blue was used for staining. In the evaluation of cell types, light microscope was used. By this methodology, the pregnancy ratios were increased statistically and it is possible to obtain the oocyte and embryo of desired date by knowing the exact time of pregnancy. These findings represented that our modified methodology is more rapid and easier in the application and more effective in the evaluation than other methodologies in defining the estrous cycle in mice.

Key words: Estrous cycle, mouse, vaginal smear, toluidine blue

*Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Biyoloji AD.

**Tıbbi Farmakoloji ve Toksikoloji AD.

***Histoloji ve Embriyoloji AD. Etik-Ankara.

Reprint request: Zehra Dilsad Coban
GATA Tıbbi Biyoloji AD.
(dilsadyilmaz_dr@hotmail.com)

Makalenin Geliş Tarihi: Apr 19, 2014 • Kabul Tarihi: Oct 13, 2014 • Çevrim İçi Basım Tarihi: 18 Mart 2016

Giriş

Östrus siklusu fare gibi kemirgenlerin (Rodentia) dişilerinde üreme hormon değişikliklerine bağlı olarak cinsel aktivitelerinin arttığı döneme verilen addır (1). Genel olarak kemirgenlerde bu dönem kısadır. Farelerde 4 veya 5 gün sürer. Tüm memelilerde üremenin başarısı hipotalamo-hipofizer aksın fonksiyonuna bağlıdır. Bu da hipotalamus, hipofiz ve overlerden salgılanan hormonlar ile oositin aktive edilmesi sonucunda olur (2). Bu değişiklikler vajinal bölgedeki hücre morfolojisini etkiler (3).

Dişi farenin yumurtalıklarında bulunan oositler foliküller içinde birinci mayozun profazındadır. Ovülasyon hipofiz hormonları tarafından tetiklendiğinde oosit profazdan kurtulur, birinci mayotik metafaza (MI) geçer (İlk kutup cisminin atılması). Çiftleşme sonrası oosit aktive olarak MII fazına geçer. Daha sonra spermin döllenmesi ile oosit zigot haline gelir (İkinci kutup cismi atılması). Farede çiftleşmenin tayininde en etkin yol MII faz oosit bakılmasıdır (4). Kemiricilerde üreme siklusunun kısa olması üreme döngüsüne ait çalışmalarda sıklıkla kullanılmasına yol açmıştır. Çalışma kolaylığı açısından en fazla ratlar tercih edilmiştir (5). Ancak günümüzde hastalık modeli oluşturulmuş fareler (genetically engineered mice) tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hayvanların deneysel çalışmalarda yaygın kullanımı farelerde üreme döngüsünün tayinini önemli hale getirmiştir (6). Farelerde çiftleşme ancak östrus döneminde olur. Östrus siklusun takibinde vajinal smear (yayma) sitolojik incelemesi kullanılır. Vajinal yaymada epitelyal hücreler, kornifiye epitel hücreler ve lökositlere bakarak üreme döngüsü zamanı belirlenir (7). Faredeki östrus siklusu birbirini takip eden 4 dönemde incelenir. Birinci dönemde (proöstrus) çekirdekli epitelyal hücre yoğunluğu vardır. Bu hücreler bir arada ya da ayrı ayrı görülebilir. Bazı bölgelerde kornifiye hücreler görülebilir (8). İkinci dönem (östrus) kornifiye skuamoz epitelyal hücrelerle karakterizedir. Hücreler çoğunlukla kümeler halinde görülür. Üçüncü dönemde (metöstrus) genellikle lökositler baskındır. Birkaç çekirdekli epitel ile kornifiye hücreler topluluğu görülür. Dördüncü dönemde (diöstrus) artmış lökosit vardır (9). Östrus siklusu tayininde vajinal yaymada bu hücrelerin gözlenmesi esastır.

Halen literatürde vajinal yayma alınmasında yıkama yerine sürüntü alınması yöntemi önerilmektedir (10, 11). Hücre boyamasında farklı boyalarla çok zaman alan boyama yöntemleri bulunmaktadır (12,13). Ancak halen herkes tarafından kabul edilmiş kolay, hızlı ve etkin bir yöntem bulunmamaktadır.

Bu amaçla farede üreme döngüsünün tayininde daha önce tanımlanan bir yöntem bizim tarafımızdan modifiye edilerek uygulanmış ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntemde vajinal yıkama ile vajinal yayma yapılmış, vajinal yaymalar toluidin mavisi ile boyayıp analiz edilmiştir. Yazımızda faredeki östrus döngüsünün detayları, vajinal açıklığın tayini, vajinal sekresyonun alınma yöntemleri, toluidin mavisi ile boyandıktan sonra üreme döngüsünün aşamalarının tespiti detaylı olarak açıklanmıştır. Tanımlanan yöntem hızlı, uygulaması kolay ve sonuçları istatistiksel olarak anlamlıdır.

Materyal Metod

Çalışmamızda östrus siklusunun tespit edilmesi ile ilgili fare embriyosunun preimplantasyon dönemini inceleyen bir çalışma için alınan (GATA Araştırma projesi: AR-2013/46) 6 haftadan büyük 20 adet dişi fare kullanılmıştır (10 fare kontrol grubu, 10 fare çalışma grubu). Kontrol grubunda östrus siklus takibi yapılmayan ve hamile olmadığı bilinen 10 adet dişi fare kullanılmıştır. Çalışma grubunda hamile olmadığı bilinen dişi fare popülasyonundan aşağıda ayrıntıları açıklanan Mc Lean ve ark.'nın yöntemini modifiye edilerek uyguladığımız yöntem ile östros ve proöstrosta olduğu belirlenen 10 adet dişi fare alınmıştır (14). Fareler 4 gruba ayrılmıştır (14). Kontrol grubunda Grup 1 ve Grup 2 [Grup 1: Östrus siklusu tayini yapılmayıp MII oosit eldesi için sakrifiye edilen fareler, Grup 2: Östrus siklusu tayini yapılmayıp hamilelik takibi yapılan fareler], çalışma grubunda Grup 3 ve Grup 4 [Grup3: Östrus siklusu tayini yapıp MII oosit eldesi için sakrifiye edilen fareler ve Grup 4: Östrus siklusu tayini yapıp hamilelik takibi yapılan fareler] fareler yer almıştır.

Farelerde stres faktörünü ortadan kaldırmak, araştırmacıya farenin alışmasını sağlamak için çalışmalara 3 gün sonra başlanmıştır. Tüm dişi farelerde öncelikle ergenliğin tayini için vajinal açıklığa bakılmıştır. Her grupta her üç dişi fareye bir erkek fare olacak şekilde (haremsiz usulü) yalnızca bir gece erkek fareler ile bir araya getirilmiştir. Farelerin hamile olup olmadığı ertesi sabah vajinal tıkaç (vaginal plaque) tayini ile bakılmıştır.

Farede vajinal açıklığın belirlenmesi; Çalışma ve kontrol grubundaki farelerde ergenliğin başladığının göstergesi olarak vajinal açıklık oluşur (9). Farelerde vajinal kornifikasyondan ve ilk östrus siklusundan yaklaşık on gün önce vajinal açıklık meydana gelir (10). Vajinal açıklık tayinine fare 24 günlük olduktan sonra başlanabilir ve 30 günlük oluncaya kadar devam edilir. Açıklık tayini genellikle vulvanın gözlemlenmesi ile yapılır. Bu amaçla çalışmadaki her fare günde 3-4 kez olmak üzere kuyruğunun dibinden tutularak dikkatli bir şekilde kaldırılmıştır. Vulva diğer el ile açılmıştır. Vajen ağzında herhangi bir sekresyonun olmaması önemlidir. Eğer sekresyon var ise vajen açıklığı görülemeyeceğinden temiz bir swap ile vulva ve vajen temizlenmiştir. Her bir tespit fotoğraflanmıştır (Şekil 1, Şekil 2). Kontrol grubundaki fareler haremsiz usulü ile erkek farelerle doğrudan çiftleştirilmiştir. Çalışma grubunda yer alan farelerde ise östrus siklus tayini yapılarak preöstrus ve östrus aşamasına geldiklerinde erkek farelerle çiftleştirilmiştir.



Şekil 1. Farede kapalı vajen görüntüsü



Şekil 2. Farede açık vajen görüntüsü

Vajinal yıkama ile vajinal yayma yapılması; Literatürde farklı yollar tanımlanmakla birlikte biz çalışmamızda Yener T ve ark. larının kullandığı yöntem takip edilmiştir (14). Östrus siklusunun bazı aşamaları kısa olduğundan (metöstro gibi) materyaller her gün aynı saatte alınmalıdır (çalışmada örnekler genelde sabah 9'da alınmıştır). Genel olarak östrus siklusuna bağımlı yapılacak çalışmalarda ard arda iki siklus takibi yapılır (6). Seçilen fare kuyruğunun dibinden tutularak sabitlenmiştir. Pipet 150 µl distile su (dH₂O) ile doldurulmuştur. Vulva ve vajen bu su ile dikkatle 2-3 kez aynı suyun tamamı pipette geri çekilerek yıkanmıştır. Pipetteki su vulva ve vajendeki hücreleri içerdiğinden dikkat ile toplanmıştır. Pipet içeriği dikkatle lam üzerine boşaltılıp, kendi haline bırakılarak kurutulmuştur (air-dry). Literatürde vajinal yıkama ile ilgili servikal ve çevre yapılardan olan kontaminasyon riski ilgili literatür verileri ışığında minimize edilmeye çalışılmış, bu konu ile ilgili (işeme ve dışkılama) sorunları en aza indirmek için vulva ve çevresinin vajinal yayma alınırken temiz olmasına dikkat edilmiştir (14).

Vajinal yaymanın Toluidin Mavisi ile boyanıp, östrus siklusunun değerlendirilmesi; Alınan örnekler tamamen kuruduktan hemen sonra beklenmeden toluidin mavisinin

(%1 lik) içine konulmuştur. Boyama için 5-7dakika arasında beklenmiştir. Toluidin mavisinden çıkarılan örnek yıkanarak havada kurumaya (air dry) bırakılmıştır. Örneklerde yer alan hücre morfolojilerindeki değişiklikler havada kurutmaya (air dry) bağlı olabilir.

Östrus siklusunun değerlendirilmesi; Faredeki östrus siklusu 4 veya 5 gün sürer. Her aşamada alınan vajinal yıkama solüsyonu yayma haline getirilerek boyanmış ve ışık mikroskobu (Olympus BX50) altında değerlendirilmiştir. Işık mikroskobunda 10X büyütmede hücrelerin birbirlerine oranlarına bakılmıştır. Daha sonra 40X büyütmede hücre morfolojileri incelenmiştir. Evreler belirlenip not edilmiştir. Takip sonucunda proöstrus ve östrus dönemlerinde olduğu tespit edilen dişi fareler çalışma grubu olarak alınmıştır. Östrus siklusu belirlenen çalışma grubundaki bu fareler her üç dişi fareye bir erkek fare olacak şekilde erkek fareler ile bir gece bir araya getirilmiştir. Ertesi sabah hamilelik tayini için vajinal tıkaç bakılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Farede vajinal tıkaç (Vaginal plaque) görüntüsü

MII oosit toplanması; MII oosit kontrol grubunda Grup 1, çalışma grubunda Grup 3' de yer alan farelerde MII oosit toplanmıştır. Çiftleştiği belirlenen dişi fareler servikal dislokasyon yolu ile sakrifiye edilmiştir. Çalışmamızda intraperitoneal anestezi ve analjezik madde vererek ötenazi işlemi gerçekleştirildiği takdirde farelerde oosit ya da embriyoların bu maddelerden etkilenebileceği düşünüldüğünden servikal dislokasyon yöntemini özellikle seçilmiştir. Ötenazisi

tamamlanan fare sırt üstü yatırılıp sabitlenerek karın bölgesi açılmıştır. Hayvanın iç organları narin bir şekilde kaldırılarak uterusların kornularına ulaşılmıştır. Uteruslar serviks kadar ovaryumlar ile birlikte diseksiyon edilerek karın içinde çıkarılıp medya içine alınmıştır. Bu aşamadan sonraki her işlem stereomikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Mikroskop altında sırasıyla ovaryumlar, fallop tüpleri ve uterus kornuları ayrıntılı olarak incelenmiştir. Oositler de embriyolar da her türlü sıkıştırma ve ezilmeye karşı dirençlidirler ancak ortamda birçok hücre olduğundan gözden kaçma ihtimalleri yüksektir. Bu nedenle her bir doku incelikte diseksiyon edilerek nazik biçimde parçalanmıştır. MII oositler ampulla bölgesinde bulunmuştur. Ovaryumlar parçalanarak da immatur oositler bulunmuştur. Uterus kornuları her aşamada oosit içerebileceğinden mutlaka gözlemlenmiştir (7).

İstatistiksel analiz sonuçları; İstatistiksel olarak anlamlılığın tayininde (p değeri) Ki-kare testi uygulanmıştır.

Bulgular

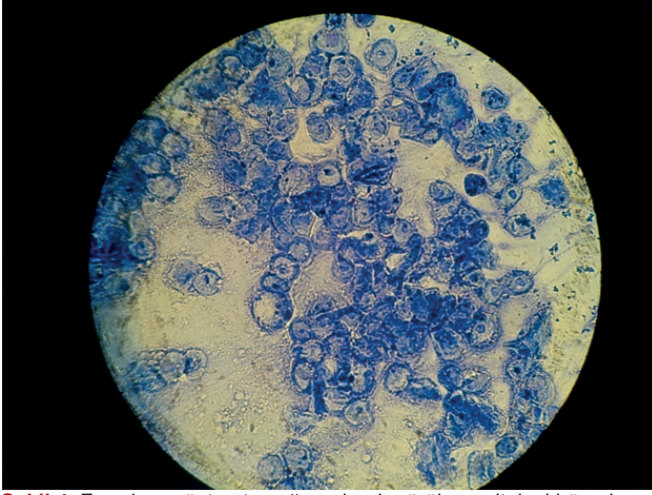
Değerlendirmelerimize göre kontrol grubunda yer alan Grup 1 ve Grup 2' deki 10 dişi adet farede sadece vajinal açıklık tayini yapılmıştır (Şekil 1, Şekil 2). Bu gruptaki dişi fareler östrus siklus takibi yapılmadan bir gece erkek fare ile karşılaştırmıştır. Ertesi sabah yapılan vajinal plak takibine göre 10 fareden yalnızca birinin hamile kaldığı saptanmıştır (Tablo). Grup 1' de yer alan 5 fareden hiçbirinde vajinal tıkaç görülmemiştir. Çiftleşmenin gösterilmesi amacı ile beş fare sakrifiye edilmiş MII oosit bulunamamıştır. Grup 2' deki beş adet fareden birinde vajinal tıkaç tespit edilmiştir. Bu farelerin hamilelik takibinde yalnızca vajinal tıkaç tespit edilen bir adet farenin hamile olduğu tespit edilmiştir (Tablo).

Çalışma grubunda yer alan Grup 3 ve Grup 4 teki 10 adet farede vajinal açıklık tayini yapılarak erişkin olduğu belirlenmiştir. Bu grupta çiftleşme öncesi östrus siklus takibi yapılmıştır. Sadece proöstrus ve östrus aşamasında olan fareler çiftleşmeye alınmıştır (Şekil 3, Şekil 4). Proöstrus aşamasındaki vajinal yaymada bir arada ve ayrı ayrı çekirdekli epitelyal hücre yoğunluğu vardır (Şekil 3). Bazı bölgelerde kornifiye hücreler görülmüştür. Östrus aşamasında kornifiye skuamoz epitelyal hücreler (çoğunlukla kümeler halinde) saptanmıştır. Hücre çekirdekleri bu aşamada görülmemektedir (Şekil 4). Bazı olgularda yayma bulgusu olarak granüler yapıda sitoplazma görülmüştür. Metöstrus aşamasında genellikle lökositlerin baskın olduğu birkaç çekirdekli epitelyal kornifiye hücreler topluluğu görülmüştür. Bu aşamadaki

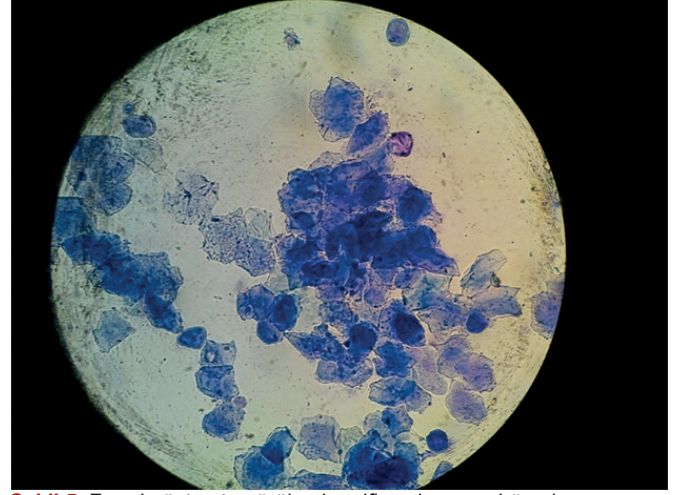
Tablo: Kontrol grupları ile çalışma gruplarına göre MII evresinde oosit elde edilen fare sayıları ve hamile fare sayıları

	Kontrol Grubu	Çalışma Grubu		P değeri
	Grup 1 (n=5)	Grup 2 (n=5)	Grup 3 (n=5)	Grup 4 (n=5)
M2 evresinde oosit elde edilen fare sayısı	0		3	
Hamile fare sayısı		1		5

Grup 1: Östrus siklusu tayini yapılmayıp MII oosit eldesi için sakrifiye edilen fareler
 Grup 2: Östrus siklusu tayini yapılmayıp hamilelik takibi yapılan fareler
 Grup 3: Östrus siklusu tayini yapıp MII oosit eldesi için sakrifiye edilen fareler
 Grup 4: Östrus siklusu tayini yapıp hamilelik takibi yapılan fareler

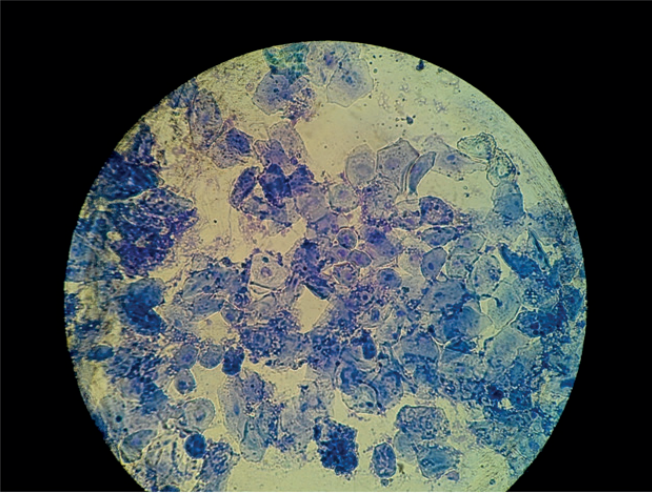


Şekil 4. Farede proöstrusta yoğun olarak görülen epitelyal hücreler



Şekil 5. Farede östrusta görülen kornifiye skuamoz hücreler

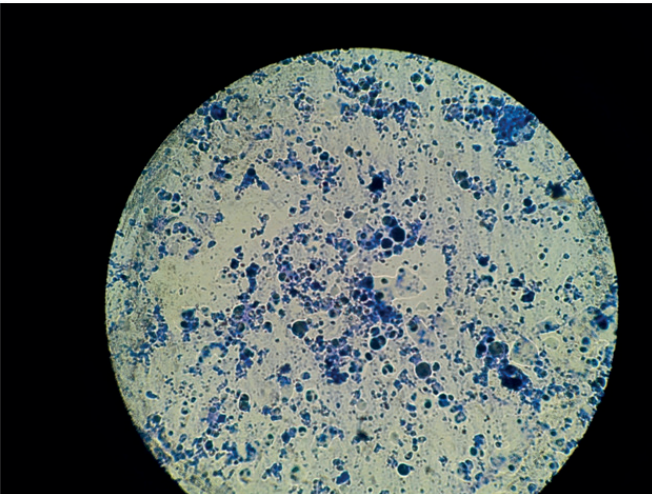
fareler çiftleşmeye alınmamıştır (Şekil 6). Diöstrus aşaması lökosit hakimiyetindedir. Bu aşamadaki fareler de çiftleşmeye alınmamıştır (Şekil 7).



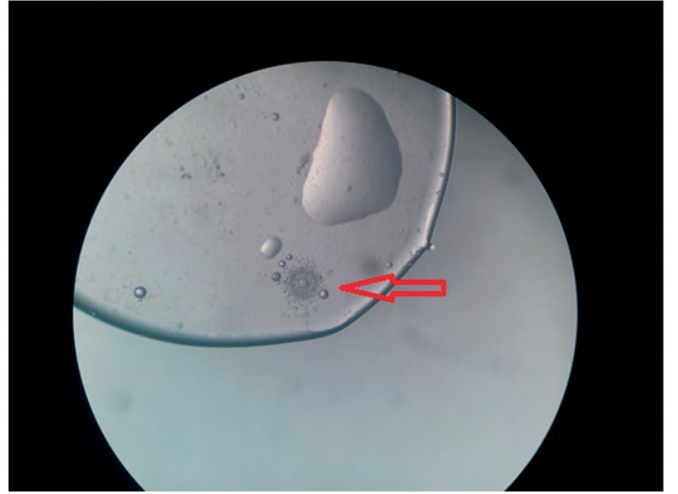
Şekil 6. Farede metöstrusta görülen karışık hücreler (epitelyal hücreler, kornifiye hücreler ve lökositler)

Çalışma grubumuzdaki östrus siklusu tayininde proöstrus ve östrus aşamasında olduğu bilinen on adet dişi farenin beşi (Grup 3) çiftleşmenin ertesi sabahı 3 adet farede vajinal tıkaç saptanmıştır. Bu fareler MII oosit eldesi için kurban edildiğinde, vajinal tıkaç saptanan üçünde MII oosit bulunmuştur (Tablo). Oositler genellikle kumulus hücreleri ile çevrili olduğundan mikroskop altında tüylü hücreler şeklinde gözlemlenmiştir. Bu aşamada oositler koyu renkli bir halo içinde zonasi parlayan hücreler şeklinde görüntülenmiştir ($\times 1,3$ büyütme ile görüntülenmiştir) (Şekil 8). Grup 4' te yer alan beş farenin tümünde ertesi günü sabah vajinal tıkaç saptanmıştır. Takip edilen farelerin tümünde hamilelik tespit edilmiştir (Tablo).

Kontrol grubu ile çalışma grubunda MII oosit eldesi açısından Grup 1, Grup 3 karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo). Kontrol grubu ile çalışma grubunda hamilelik açısından Grup 2 ile Grup 4 karşılaştırıldığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo).



Şekil 7. Farede diöstrusta görülen lökositler



Şekil 8. Farede MII oositin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

Tartışma

Östrus siklusunun belirlenmesi özellikle fare gibi rodentlerde çiftleşme döneminin belirlenmesi, hamile kalma oranlarının artırılmasında önemlidir. Bir diğer önemli yararı ise oluşan gebeliğin başlangıcının tayininin tam olarak belirlenmesinde önem taşır. Bu da embriyonal çalışmalara ışık tutar. Farelerde preimplantasyon döneminde olan değişikliklerin çalışılmasına olanak sağlar (10). Östrus siklus tayini ile proöstrus ve östrus evrelerinde erkek fare ile karşılaşan dişi farede hamilelik oranları artar. Bu aşamadaki farelerin belirlenmesi için vajinal yaymanın gözlemlenmesi en iyi yöntemdir (2,4) (Şekil 1-3). Burada farede preimplantasyon evresinde fare embriyosunda çalışmak üzere bizim tarafımızdan modifiye edilerek başarı ile denenen yeni bir yöntem sunulmaktadır.

Bilindiği gibi vajinal örnekleme ile östrus siklus tayini çok iyi bilinen ve uzun yıllardır araştırmacılar tarafından uygulanan bir yöntemdir. Östrus siklusunun tayini vajinal örnek alma, örnekten yapılan vajinal yaymada hücre tipinin mikroskop altında belirlenmesi esastır. Bu konuda literatürde birçok farklı çalışma vardır (11-16). Bu prosedürün ilk aşaması için vajinal sürüntü alma metodları önerilmektedir. Ancak fare küçük bir hayvan olduğundan sürüntü almada sorunlar yaşanmaktadır (12,13). Bu nedenle biz çalışmamızda vajinal yıkama yöntemini uyguladık. Ancak vajinal yıkamada servikal sekresyonlar ve çevre yapılardan olabilecek kontaminasyon riski mevcuttur. Literatürde vajinal yaymayı değerlendirmek için birçok görüntüleme yöntemi vardır. Bu yöntemlerden bazıları boyama olmaksızın direk mikroskopik olarak hücre çeperine bakmaya dayalı bir yöntemdir. Bu yöntem özellikle yapan kişinin konusunda ehil olmasını gerektirir ve boyanma olmadığı için değerlendirme aşamasında çok zorlukla karşılaşılır (6). Bir kısım yöntemde ise bu aşamada boyama yapılır. Bunlar içerisinde en sık kullanılan yöntemler "Papanicolaou" boyama ya da metilen mavisi ile boyamadır (14-16). Bu yöntemlerde hücreler daha iyi bir şekilde ayırt edilebilir ancak boyama yöntemleri daha zordur. Laboratuvarımızda vajinal hücrelerden yapılan yaymada oldukça basit bir boyama yöntemi olan toluidin mavisi kullanılmıştır. Toluidin mavisi yarı ince kesitlerin boyanmasında, H. Pylori' nin mide biyopsilerinde değerlendirilmesinde rutin kullanılan hızlı ve ekonomik bir yöntemdir (17). Ayrıca adli tıp uygulamalarında toluidin mavisi vajinal bölgedeki doku hasarının gösterilmesinde kullanılmaktadır (18). Alınan örnekler toluidin mavisi ile boyandıktan sonra değerlendirme aşamasında proöstrusta öncelikle bir arada ve ayrı ayrı çekirdekli epitelyal hücre yoğunluğu saptanmıştır. Bazı bölgelerde kornifiye hücreler görülmüştür. Östrus aşamasında çoğunlukla kümeler halinde olan kornifiye skuamöz epitelyal hücreler saptanmıştır (1,10). Işık mikroskobu altında değerlendirmede hayvanların proöstrus ve östrus dönemlerinin tespitinde bir sorun yaşanmamıştır.

Şekillerde de görüldüğü gibi çalışmamızda toluidin mavisi ile boyama aşamasına kadar bir sorun olmadığı için değerlendirme aşamasında sorun yaşanan bir fare olmamıştır (Şekil 4-7). Yöntemimiz, diğer yöntemlere göre ("Papanicolaou" boyama) daha kısa bir prosedür içerdiği için daha kısa sürede sonuç alınmıştır.

Grup 1 ve Grup 2'teki fareler kontrol grupları olarak alınmıştır. Bu gruplarda östrus siklus tayini yapılmadığından dişi farelerde östrus aşaması muhtemelen geçirilmiş olduğu için erkekle çiftleşme ve hamilelik mümkün olmamıştır (Tablo). Grup 3 ve Grup 4'teki fareler çalışma grupları olarak alınmıştır. Bu gruplardaki farelere ise östrus siklusunu tayini yapıldığından dişiler çiftleşmeye uygun ve istekli idiler. Bu farelerde hormonal değerler çiftleşmek ve hamilelik için uygun olduğundan bu gruplarda hamilelik açısından başarı elde edilmiştir (Tablo).

Sonuç olarak farede östrus siklus takibi yapılmayan kontrol grubundan Grup 1'de hiç MII oosite rastlanmamışken Grup 2'de sadece bir farede gebelik elde edilebilmiştir (Tablo). Östrus siklus tayini yapıp preöstrus ve östrus aşamasında olduğu belirlenerek erkek fareler ile bir araya getirilen çalışma grubundaki dişi farelerden Grup 3'deki beş fareden üçünde MII oosit toplanmış, Grup 4'deki farelerin tamamı hamile kalmıştır (Şekil 8). Elde edilen sonuç kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo).

Grup 4'te yer alan farelerdeki hamilelik durumunun Grup 2'de yer alan farelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artması uygulanan yöntemin hamilelik oranlarının artırılması yönündeki etkinliğini gösterir. Grup 3'te yer alan farelerden toplanan MII oositlerin varlığı, hamilelik başlangıcının tam olarak tayininde östrus siklusu tayininin yararını kanıtlar niteliktedir. Bu durum bizim tarafımızdan modifiye edilerek kullanılan yöntemin hamileliğin başlangıcının tespitindeki özgünlüğünü gösterir (14).

Sonuç olarak çalışma metodumuzun farelerin üreme mekanizmalarını içeren alanlarda yapılabilecek çalışmalar için bir temel olduğu görülmektedir. Rutinde farklı alanlarda kullanılan yöntemlerin biraraya getirilmesi ile tarafımızdan modifiye edilen bu yöntemin çalışmalarda hızlı sonuçlar alınması ve kolay uygulanabilir olması açısından rahatlıkla kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Van Cruchten S, Van den Broeck W, D'haeseleer M, Simoens P. Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrus cycle. *Theriogenology* 2004; 6: 631-641.
2. Sarkar DK, Chiappa SA, Fink G, Sherwood NM. Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature* 1976; 264: 461-463.
3. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle in the rat. In: E. Knobil and J.D. Neill (eds.) *The Physiology of Reproduction*, Vol 2. New York: Raven Press, 1994: 613-658
4. Voronina E, Wessel GM. The regulation of oocytematuration. In: G. Schatten (ed). *Current Topics in Developmental Biology*. Vol 58. Academic Press, 2003: 53-110.
5. Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudo pregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus

- luteum of pseudo pregnancy. *Endocrinology* 1975; 96: 219-226.
6. 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;71:2821–2831.
 7. Lee KY, Jeong JW, Tsai SY, Lydon JP, DeMayo FJ. Mouse models of implantation. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18:234-239.
 8. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62:609–614.
 9. Parkening TA, Collins TJ, Smith ER. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiol Aging* 1982; 3:31-35.
 10. Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinol.* 1992;131:1458–1466.
 11. 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; 27:327-339.
 12. Bertholet JY. Mating method to produce accurate timed pregnancies in rats. *Lab Anim Sci.* 1981; 31: 180.
 13. Schroder JD. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. *Can J CompMed.* 1971; 35: 345.
 14. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SAL. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp.* 2012; 67: e4389.
 15. Yener T, Turkkani Tunc A, Aslan H, Aytan H, Cantug Caliskan A. Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: how reliable? *Anat Histol Embryol.* 2007; 36:75-77.
 16. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* 2012; 7: e35538.
 17. Zhang C, Yamada N, Wu YL, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. Helicobacter pylori infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11(6): 791-796
 18. Sommers MS. Defining patterns of genital injury from sexual assault: a review. *Trauma, Violence Abuse* 2007; 8:270-80.