

THE IMPACT OF CHRONIC RESTRAINT STRESS ON THE ESTROUS
CYCLE IN NMRI FEMALE MICEUTICAJ HRONIČNOG IMOBILIZACIONOG STRESA NA ESTRUSNI
CIKLUS KOD ŽENKI MIŠEVA SOJA NMRIJelena Ristić¹, Damir Bogdan², Pavle Banović^{3,4}¹ Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Novi Sad, Srbija² Univerzitet u Novom Sadu, Filozofski fakultet, Departman za psihologiju, Novi Sad, Srbija³ Pasterov zavod Novi Sad, Novi Sad, Srbija⁴ Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Katedra za mikrobiologiju sa parazitologijom i imunologijom, Novi Sad, Srbija**Correspondence:** pavle.banovic@mf.uns.ac.rs**Abstract**

Introduction: Stress represents a set of reactions in the organism activated by external factors. In order to maintain homeostasis and protect the organism, numerous mechanisms for adaptation to stress evolved. Stressors that act in short-term period cause acute stress reaction with generally positive effect on organism. When the stressor persists, and the organism fails to respond to the challenge, chronic stress develops, leading to pathological conditions, such as women's menstrual cycle disorders.

Aim: To examine the impact of chronic restraint stress on the estrous cycle in NMRI female mice.

Material and methods: A number of 12 mature female NMRI mice were randomly divided into control (n = 6) and experimental (n = 6) group. The induction of stress was performed for the experimental group by using restrain chambers 2 hours daily in 14 days. From the beginning of the experiment, vaginal lavages were taken from all mice for making smears that were analyzed to determine estrous cycle stages. For analysis of chronic stress effect, the frequency of estrus stages alternation observed in experimental group compared to control was examined.

Results: The estrous cycle was observed and divided into proestrus, estrus, metestrus and diestrus. During the adaptation period, prolonged diestrus was dominantly present in both groups. When stress was induced, in the experimental group animals the absence of diestrus stage and oscillation to other stages was observed, in contrast to the control group, where the diestrus stage was frequently observed. Frequency of diestrus stage deviation in stressed animals was shown to be statistically significant ($p < 0.01$) when compared to control.

Conclusion: The induction of chronic restraint stress in female NMRI mice leads to the alternation of the estrous cycle. Considering the fact that NMRI female mice share the similar hormonal regulation of the estrous cycle with women's menstrual cycle, they could present a solid model for studying women's reproductive disorders.

Keywords:stress,
estrous cycle,
mouse,
NMRI

Sažetak

Uvod: Stres je skup reakcija organizma koje nastaju usled dejstva faktora spoljašnje sredine. Da bi se održala homeostaza i zaštitio organizam, uključuju se brojni adaptacioni mehanizmi. Stresori koji deluju trenutno ili kratkoročno izazivaju akutni stres koji ima protektivni efekat. Kada stresor deluje duže, a organizam ne uspeva da odgovori na izazov, javlja se hronični stres koji vodi u patološko stanje. Hronični stres je, kao etiološki faktor, doveden u vezu sa poremećajima menstrualnog ciklusa žena.

Cilj: Cilj je ispitati dejstvo hroničnog imobilizacionog stresa na estrusni ciklus kod ženki miševa NMRI soja.

Materijal i metode: Dvanaest polno zrelih ženki miševa NMRI soja nasumično je podeljeno u kontrolnu ($n = 6$) i eksperimentalnu grupu ($n = 6$). Eksperimentalnoj grupi je indukovano hronični stres ubacivanjem u imobilizacione komore 2 sata dnevno u periodu od 14 dana. Svakodnevno je svim životinjama uziman vaginalni ispirak od koga je pravljen razmaz radi ispitivanja pod svetlosnim mikroskopom. Analiza preparata je obuhvatala određivanje faza estrusnog ciklusa. Za analizu efekta stresa statistički je ispitana učestalost smenjivanja estrusnih faza u eksperimentalnoj grupi naspram kontrolne.

Rezultati: Kod ženki miševa je uočen estrusni ciklus koji se sastoji iz četiri faze: proestrusa, estrusa, metestrusa i diestrusa. U adaptacionom periodu je zapažen prolongirani diestrus, dominantno prisutan u obe grupe. Kod stresiranih jedinki je uočen izlazak iz diestrusa i pojava drugih estrusnih faza, za razliku od kontrolnih kod kojih je diesterus bio znatno učestaliji. Zapažene su neregularnosti u trajanju i smenjivanju faza kod jedinki eksperimentalne grupe, gde se učestalost odstupanja od diestrusa pokazala kao statistički značajna ($p < 0,01$).

Zaključak: Indukovanje imobilizacionog stresa dovodi do izlaska životinja iz diestrusa i velikih varijacija u trajanju i smenjivanju faza estrusnog ciklusa ženki miševa soja NMRI. S obzirom na to da je hormonski mehanizam regulacije estrusnog ciklusa kod ženki miševa soja NMRI sličan mehanizmu regulacije menstrualnog ciklusa kod žena, mogu poslužiti kao dobar model za proučavanje reproduktivnih poremećaja kod žena.

Ključne reči:

imobilizacijski stres,
estrusni ciklus,
ženke miševa,
soj NMRI

Uvod

Stres je skup nespecifičnih reakcija organizma koje nastaju usled dejstva brojnih faktora spoljašnje sredine. Da bi se održala homeostaza u organizmu, uključuju se brojni adaptacioni mehanizmi kako bi se organizam zaštitio od štetnih dejstava stresora (1). Stresori koji deluju trenutno ili kratkoročno izazivaju akutni stres, koji ima protektivni efekat (1, 2, 3). Ako se organizam izlaže nepredvidivim stresogenim izazovima manjeg intenziteta u budućnosti će moći bolje da se nosi sa istim izazovima većeg intenziteta. U slučaju da u dužem vremenskom periodu postoji ponavljajući neuspeli odgovor na izazov on se karakteriše kao hronični stres i najčešće vodi u patološko stanje (1, 2).

Stres je sve češći etiološki faktor u nastanku bolesti kao što su anksioznost, depresija, hronični bol i autoimune bolesti sa povećanom prevalencijom kod žena (4). Pored toga, rezultati istraživanja sprovedenog u zatvorenom kolektivu, poput kazneno-popravnog zavoda, pokazuju povezanost stresa sa reproduktivnim zdravljem žena. Uočena je povećana učestalost poremećaja menstrualnog ciklusa i amenoreje (5).

Studije na životinjskim modelima su pokazale da su ženke, u poređenju sa mužjacima, osetljivije na stres (6, 7). U rezultatima jedne od studija kod ženki uočena je promena strukture neurona hipokampusa koja se ogleda u smanjenju gustine dendričnih spina, pa samim tim i broja postsinaptičkih mesta (6). Druga studija pokazuje

da nakon izlaganja hroničnom stresu mužjaci mnogo lakše prevazilaze efekte stresa individualno, dok su ženkama značajno pogodniji grupni smeštaji (7).

Poznato je da hronični stres dovodi do preterane aktivacije primordijalnih folikula preko hipotalamohipofizno adrenalne (HHA) osovine, stimulacijom lučenja faktora koji oslobađa kortikotropni hormon (engl. *corticotropin releasing factor*, CRF) iz hipofize (8). Rezultati drugih studija, međutim, pokazuju da jak hronični stres, delujući preko HHA osovine, suzbija razvoj folikula putem inhibicije hipotalamohipofizno gonadne (HHG) osovine i supresije ekspresije intraovarijalnog faktora rasta i diferencijacije 9 (engl. *growth and differentiation factor 9*, GDF9) (9, 10).

Neka istraživanja su, proučavajući uticaj stresa na ženkama, nailazila na poteškoće pronalaska validnog modela za socijalni hronični stres (11). Model imobilizacionog stresa se smatra široko primenjivanim, te se koristi se za ispitivanje različitih sistema u stresogenim okolnostima, poput endokrinog, imunog i nervnog (12, 13, 14).

Uticaj stresa na ženke pacova i miševa može se pratiti analizom estrusnog ciklusa, koji je pod direktnim uticajem hormona hipotalamohipofizno gonadne osovine. On se sastoji iz četiri faze jedinstvenog citološkog izgleda: proestrusa, estrusa, metestrusa i diestrusa. Citološki izgled svake faze je odraz funkcije hipotalamohipofizno gonadnog sistema, odnosno dominacije lučenja određenih hormona. U proestrusu se povećano luče:

luteinizirajući hormon (LH), folikulostimulišući hormon (FSH) i 17 beta estradiol. Kada FSH dostigne pik počinje estrus, u kome LH i 17 beta estradiol padaju, a prolaktin dostiže pik. Sledeća faza, metestrus, karakteriše se postepenim rastom progesterona, a pik progesterona označava početak diestrusa. Propadanjem žutog tela pada i nivo progesterona i ciklus kreće iz početka (15, 16).

Rezultati istraživanja na životinjskim modelima pokazuju različitu osetljivost ženki na imobilizacioni stres u odnosu na fazu estrusnog ciklusa, u kojoj se nalaze za vreme indukovanja stresa, gde je najveća osetljivost uočena u fazi estrusa (17).

Na mužjacima soja NMRI ispitivan je uticaj hroničnog stresa, gde su utvrđeni gubitak telesne mase, povećan unos tečnosti i povišen nivo kortikosterona (18). Ispitivanje uticaja hroničnog stresa kod ženki soja NMRI nije poznat. Stoga je cilj našeg istraživanja da se ispita dejstvo hroničnog imobilizacionog stresa na estrusni ciklus kod ženki miševa NMRI soja.

Materijal i metode

Životinje

U eksperimentu su korišćene polno zrele ženke miševa soja NMRI (n = 12), starosti 8-10 nedelja, telesne mase 24,7-34,1 g, čiji su potomci uvezeni iz Centralnog instituta za laboratorijsko uzgajanje životinja (nem. *Zentralinstitut für Versuchstierzucht*) (Hanover, Nemačka). Životinje su čuvane u vivarijumu pod kontrolisanim uslovima – na temperaturi u rasponu 25 ± 2 °C i cikličnim periodima od 12h svetlosti i 12h mraka, uz slobodan pristup hrani i vodi. Izuzetak pristupa hrani i vodi bio je u dvočasovnom periodu indukovanja stresa eksperimentalnoj grupi. Sve procedure vezane za tretiranje životinja bile su u skladu sa etičkim normama i standardnim operativnim procedurama Pasterovog zavoda, tj. eksperiment je odobren od strane Etičke komisije Pasterovog zavoda pod delovodnim brojem 01-35/2019.

Eksperimentalni dizajn

Nasumičnim odabirom životinje su podeljene u dve grupe: kontrolnu (K, n = 6) i eksperimentalnu (E, n = 6) i smeštene u grupne kaveze. Kavezi su bili odvojeni u dve prostorije kako bi se onemogućila bilo kakva komunikacija i indirektna indukcija stresa kod miševa kontrolne grupe. Životinje su ostavljene 7 dana radi adaptacije na nove uslove. Nakon perioda adaptacije, životinje eksperimentalne grupe su izlagane hroničnom imobilizacionom stresu 2 sata dnevno tokom 14 dana. Imobilizacioni stres je izazvan ubacivanjem životinja u imobilizacione komore 3 cm širine i 11 cm dužine i onemogućeno im je pomeranje repa, ekstremiteta, tela i glave. Frontalni deo komore je difuzno perforiran kako bi se omogućio protok vazduha za normalno disanje životinja (13, 14).

Uzimanje i obrada materijala

Životinjama su od prvog dana eksperimenta svakodnevno u prepodnevnim časovima uzorkovani vaginalni ispirci minimalno invazivnom metodom sa 0,9% natrijum-hlorida (NaCl) uz pomoć automatske pipete, u cilju detektovanja faze estrusnog ciklusa. Od ispirka je napravljen razmaz koji je nakon toga fiksiran metanolom, bojen po Gimzi i ispitivan pod svetlosnim mikroskopom (uveličanja x 200 i x 400). Određivanje faza estrusnog ciklusa sprovedeno je na osnovu dominantnog prisustva ćelija u vaginalnom ispirku, karakterističnog morfološkog izgleda, po ključu Kore Mišel (*Cora Michelle*) i sar. (16).

Hemikalije i histološke boje

0,9% NaCl (Hemofarm, Srbija); metanol (Zorka Pharma, Srbija); radni rastvor za bojenje po Gimzi (*Bio Optica*, Italija).

Statistička analiza

Za statističku analizu podataka dobijenih očitavanjem faza estrusnog ciklusa kod životinja i obrađenih kao nominalne varijable korišćen je *hi*-kvadrat test. Razlika se smatrala statistički značajnom ako je $p < 0,05$.

Rezultati

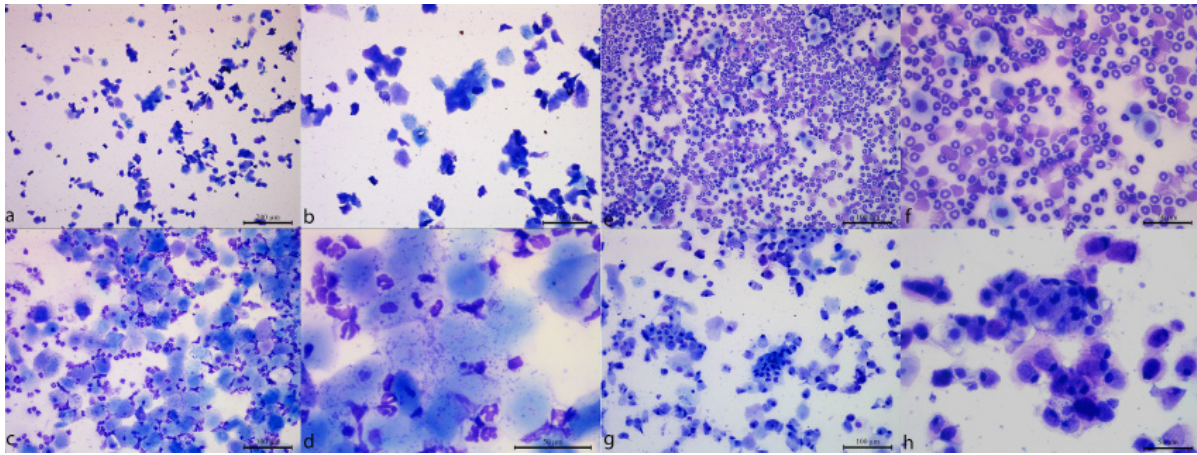
Kod ženki miševa uočen je estrusni ciklus koji se sastoji iz četiri faze: proestrusa, estrusa, metestrusa i diestrusa. U proestrusu su dominantno prisutne epitelne ćelije sa jedrom, dok su u estrusu orožale (bezjedarne) epitelne ćelije. Treću fazu, metestrus, čini kombinacija orožalih epitelne ćelije i neutrofilnih granulocita. Diestrus čini kombinacija neutrofilnih granulocita i epitelne ćelije sa jedrom (**slika 1**).

Faze estrusnog ciklusa unutar adaptacionog perioda

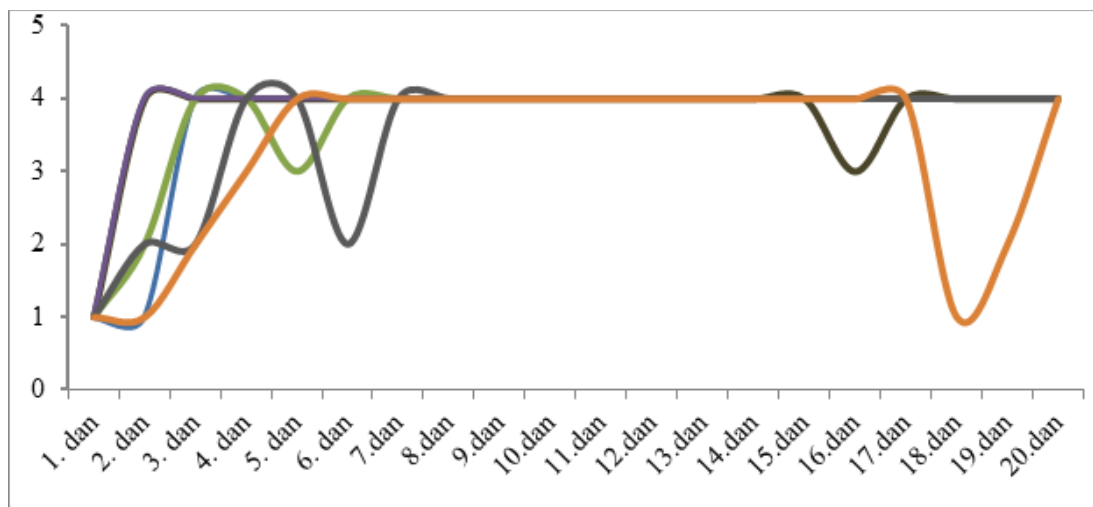
Tokom perioda adaptacije zapažen je duži iregularni estrusni ciklus sa prolongiranim diestrusom, dominantno prisutan u obe grupe (**grafikon 1 i 2**). To je fenomen koji se javlja kod grupisanih polno zrelih ženki miševa u odsustvu mužjaka i naziva se Li-Butov (*Lee-Boot*) efekat (19).

Indukcija hroničnog imobilizacionog stresa

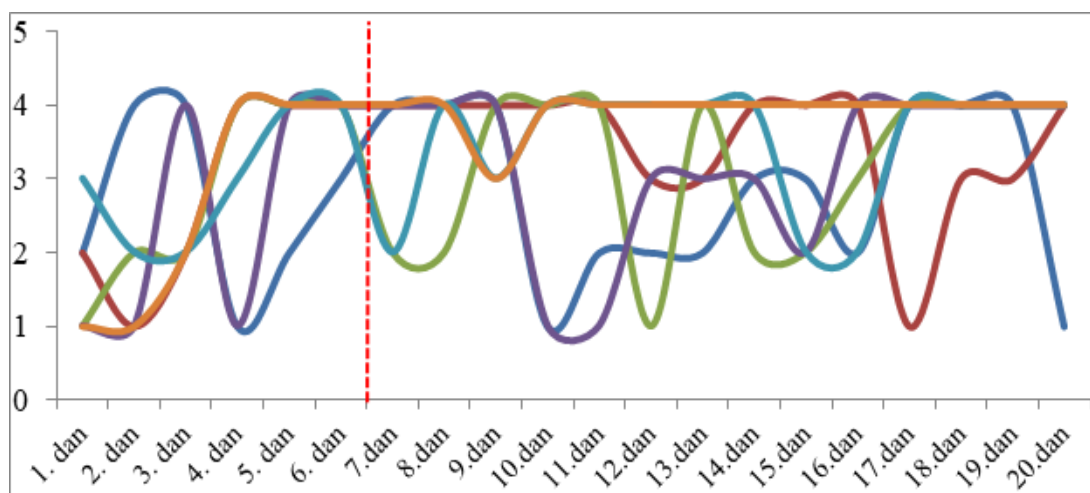
Kod kontrolne grupe je uočena učestalost prolongiranog estrusnog ciklusa u diestrusnoj fazi, sa nekoliko izuzetaka (**grafikon 1**). Kod eksperimentalne grupe, nakon imobilizacionog stresa uočen je izlazak iz diestrusa i pojava drugih estrusnih faza. Zapažene su iregularnosti u trajanju i smenjivanju faza kod jedinke eksperimentalne grupe, gde se učestalost odstupanja od diestrusa pokazala kao statistički značajna ($p < 0,01$). Izuzetak je odstupanje kod jedinke označene narandžastom bojom (**grafikon 2**).



Slika 1. Reprezentativni prikaz faza estrusnog ciklusa. a, b) Proestrus - uočava se dominantno prisustvo epitelnih ćelija sa jedrom (Gimza, x 200, x 400); c, d) Estrus - uočava se prisustvo orožalih (bezjedarnih) ćelija (Gimza, x 200, x 400); e, f) Metestrus - uočava se prisustvo neutrofilnih granulocita i orožalih (bezjedarnih) ćelija (Gimza, x 200, x 400) g, h) Diestrus - uočava se prisustvo neutrofilnih granulocita i epitelnih ćelija sa jedrom (Gimza, x 200, x 400).



Grafikon 1. Prikaz faza estrusnog ciklusa kontrolne grupe. Svaka mišica je označena linijom drugačije boje. Na ordinati su brojevima prikazane faze (1 - proestrus, 2 - estrus, 3 - metestrus, 4 - diestrus). Na apscisi su prikazani dani. Prvih 6 dana je period adaptacije. Dominantno se uočava neregularni estrusni ciklus sa prolongiranim diestrusom (Li-Butov efekat) koji traje tokom čitavog eksperimenta. Uočeno je odstupanje 16. dana kod jedinke označene crnom linijom i 19. dana kod jedinke označene narandžastom linijom.



Grafikon 2. Prikaz faza estrusnog ciklusa eksperimentalne grupe. Svaka mišica je označena linijom drugačije boje. Na ordinati su brojevima prikazane faze (1 - proestrus, 2 - estrus, 3 - metestrus, 4 - diestrus). Na apscisi su prikazani dani. Prvih 6 dana je period adaptacije. Uočava se neregularni estrusni ciklus sa prolongiranim diestrusom (Li-Butov efekat). Od 7. dana se indukuje hronični imobilizacioni stres, prikazan crvenom isprekidanom linijom. Tokom perioda indukovanja imobilizacionog stresa uočava se velika varijacija u fazama gde iz diestrusa ulaze u druge faze. Izlazak iz diestrusa se dešava u različitim danima: životinja označena svetloplavom bojom - 7. dana, narandžastom 8. dana, tamnoplavom i ljubičastom 10. dana, crvenom i zelenom 12. dana. Izuzetak je jedinka označena narandžastom linijom, koja je od 11. dana konstantno u diestrusu.

Diskusija

Efekat stresa na menstrualni ciklus ne može se ispitati na kulturi ćelija i srodnim in vitro metodama već se koriste životinjski modeli, gde paradigma menstrualnog ciklusa žena predstavlja estrusni ciklus ženki miševa.

Neka od istraživanja na životinjskim modelima primenjivala su procedure: „hronični blagi stres“ (engl. *chronic mild stress*, CMS) i „stres socijalne nestabilnosti“ (engl. *social instability stress*) na oba pola. Nijedan od njih, međutim, nije indukovao konstantan bihevioralni i psihološki odgovor kod ženki kao što je kod mužjaka, tako da ovi modeli nisu dovoljno adekvatni za simulaciju socijalnog hroničnog stresa kod ženki (11). Moguće objašnjenje za različit odgovor mužjaka i ženki je to što ženke imaju jači adrenalni fenotip koji utiče na povećanu ekspresiju adrenalnih gena, koji će stimulisati proizvodnju steroida (20).

U našem istraživanju je upotrebljen model hroničnog imobilizacionog stresa koji se široko primenjuje pri ispitivanju stresogenih promena u endokrinom sistemu (12). Estrusni ciklus je pod direktnim uticajem hormona hipotalamohipofizno gonadne osovine, tako da se njegovim ispitivanjem može pratiti uticaj stresa.

Pre početka indukovanja stresa ženke miševa obe grupe prošle su period adaptacije, gde su ustalile prolongirani diestrus, tzv. Li-Butov efekat. On nastaje indukovanjem LH i porasta progesterona koji dovodi do pojave pseudotrudnoće. Važno je naglasiti da ovaj fenomen nije doveo do promena na jajnicima i materici, kao i da se ženke vrlo brzo pri ponovnom kontaktu sa mužjacima ili nakon izlaganja njihovom urinu vraćaju u uobičajeni ciklus (19).

Naše istraživanje je pokazalo da indukovanje stresa može biti još jedan od načina da ženke izađu iz prolongiranog diestrusa. Ovo se može objasniti odgovorom hipotalamohipofizno adrenalne (HHA) osovine na akutni stres kod žena. Pokazano je da, ako se stres indukuje u folikularnoj fazi, kada je koncentracija progesterona najniža, dolazi do inhibicije HHA osovine (21). S obzirom na to da su naše životinje po indukovanju stresa bile u prolongiranom diestrusu, kad je progesteron najviši, pokazuje se da je akutni stres doveo do stimulacije HHA osovine i lučenja adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortizola. Koliki je značaj akutnog stresa pokazuju podaci da akutni stres u bilo kom trenutku menstrualnog ciklusa, pa čak i u amenoreji, tokom trudnoće i laktacije može indukovati ovulaciju kod žena (22).

Iako akutni odgovor HHA osovine predstavlja adaptacioni mehanizam i pomaže organizmu da se izbori sa stresorom, ipak dovodi i do poremećaja (21). Hipotalamohipofizno adrenalna osovina svojim uticajem na HHG osovinu dovodi do poremećaja menstrualnog ciklusa. Najčešće objašnjenje mehanizma dejstva je preko CRF koji menja aktivnost neurona zaduženih za lučenje hormona koji oslobađa gonadotropin (eng. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH). Kada dođe do supresije GnRH javlja se funkcionalna hipotalamusna amenoreja. Ona predstavlja sindrom koji čine: neaktivnost jajnika,

amenoreja i neplodnost (10, 23, 24, 25). Kod životinja eksperimentalne grupe dokazane su statistički značajne oscilacije u fazama estrusnog ciklusa u odnosu na kontrolnu grupu. Ove oscilacije se tumače kao jasan poremećaj ciklusa zbog hroničnog stresa.

Treba naglasiti da, teoretski, estrusni ciklus traje 4 dana, te da će svakog dana biti druga faza. U eksperimentu je, međutim, pokazano drugačije, što upućuje na to da se sa rezervom uzme redosled faza (proestrus, estrus, metestrus, diestrus) dobijenih u rezultatima. Razlog tome je što se trajanje faza može individualno razlikovati, pa tako estrus može da traje 12-48h, a diestrus čak 48-72h. Takođe, proestrus može trajati manje od 24h, te pri uzimanju briseva u ranim jutarnjim ili kasnim večernjim satima može ostati neregistrovan (16).

Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih u našem istraživanju može se zaključiti da u periodu adaptacije ženke, u odsustvu mužjaka, ispoljava Li-Butov efekat, koji se karakteriše prolongiranim diestrusom. Akutni stres, međutim (početak indukovanja imobilizacionog stresa), dovodi do izlaska životinja iz diestrusa, dok izlaganje ženki hroničnom imobilizacionom stresu dovodi do velikih varijacija u fazama estrusnog ciklusa.

Rezultati ove studije se mogu iskoristiti za buduća istraživanja uticaja stresa, s obzirom na to da do sada nisu bili dostupni podaci vezani za patologiju estrusnog ciklusa tokom indukcije hroničnog imobilizacionog stresa kod ženki miševa NMRI soja. U skladu s tim, daljim ispitivanjima treba da se utvrdi korelacija citološkog nalaza sa statusom imunološkog profila ispitivanih jedinki izlaganih stresu.

S obzirom na činjenicu da ženke miševa NMRI soja imaju sličan hormonski mehanizam regulacije estrusnog ciklusa kao menstrualni ciklus kod žena, mogu predstavljati dobar animalni model za proučavanje reproduktivnih poremećaja kod žena.

Literatura

1. Del Giudice M, Buck CL, Chaby LE, Gormally BM, Taff CC, Thawley CJ, et al. What Is Stress? A Systems Perspective. *Integr Comp Biol.* 2018;58(6):1019-32.
2. Ubaldi M, Ricciardelli E, Pasqualini L, Sannino G, Soverchia L, Ruggeri B, et al. Biomarkers of hippocampal gene expression in a mouse restraint chronic stress model. *Pharmacogenomics.* 2015;16(5):471-82.
3. Belanoff JK, Gross K, Yager A, Schatzberg AF. Corticosteroids and cognition. *J Psychiatr Res.* 2001;35(3):127-45.
4. Verma R, Balhara YP, Gupta CS. Gender differences in stress response: Role of developmental and biological determinants. *Ind Psychiatry J.* 2011;20(1):4-10.
5. Allsworth JE, Clarke J, Peipert JE, Hebert MR, Cooper A, Boardman LA. The influence of stress on the menstrual cycle among newly incarcerated women. *Womens Health Issues.* 2007;17(4):202-9.
6. Shors TJ, Chua C, Falduto J. Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female

- hippocampus. *J Neurosci.* 2001;21(16):6292-7.
7. Westenbroek C, Den Boer JA, Veenhuis M, Ter Horst GJ. Chronic stress and social housing differentially affect neurogenesis in male and female rats. *Brain Res Bull.* 2004;64(4):303-8.
 8. Xu M, Sun J, Wang Q, Zhang Q, Wei C, Lai D. Chronic restraint stress induces excessive activation of primordial follicles in mice ovaries. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194894.
 9. Wu LM, Liu YS, Tong XH, Shen N, Jin RT, Han H, et al. Inhibition of Follicular Development Induced by Chronic Unpredictable Stress Is Associated with Growth and Differentiation Factor 9 and Gonadotropin in Mice. *Biol Reprod.* 2012;86(4):121:1-7.
 10. Ferin M. Clinical review 105: Stress and the reproductive cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(6):1768-74.
 11. Dadomo H, Gioiosa L, Cigalotti J, Ceresini G, Parmigiani S, Palanza P. What is stressful for females? Differential effects of unpredictable environmental or social stress in CD1 female mice. *Horm Behav.* 2018;98:22-32.
 12. Sutanto W, de Kloet ER. The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena. *Lab Anim.* 1994;28(4):293-306.
 13. Smieško G, Banović P, Gusman V, Simin V, Cimpean AM, Lalošević D. Molecular evaluation of chronic restraint stress in mice model of non metastatic fibrosarcoma. *J Mol Hist.* 2020;51:367– 74.
 14. Fedrigoli E, Bogdan D, Lalošević D, Banović P. Proposition of a simplified protocol and new parameter introduction In NMRI mice anhedonia induction. *Serbian J Exp Clin Res.* 2020. In press. <https://doi.org/10.2478/sjecz-2020-0021>.
 15. McLean A, Valenzuela N, Fai S, Bennett S. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *J Vis Exp.* 2012; (67): 4389.
 16. Cora MC, Kooista L, Travlos G. Vaginal Cytology of Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology.* 2015;43(6):776-93.
 17. Popovic M, Popovic N. *Int J Psychophysiol.* Estrus cycle and gastric lesions in individual- and group-stressed female rats. 1999;33(1):21-6.
 18. Mesa-Gresa P, Ramos-Campos M, Redolat R. Corticosterone levels and behavioral changes induced by simultaneous exposure to chronic social stress and enriched environments in NMRI male mice. *Physiol Behav.* 2016;158:6-17.
 19. Ryan KD, Schwartz NB. Grouped female mice: demonstration of pseudopregnancy. *Biol Reprod.* 1977;17(4):578-83.
 20. Engeland WC, Massman L, Miller L, Leng S, Pignatti E, et al. Sex Differences in Adrenal Bmal1 Deletion-Induced Augmentation of Glucocorticoid Responses to Stress and ACTH in Mice. *Endocrinology.* 2019;160(10):2215-29.
 21. Stephens MA, Mahon PB, McCaul ME, Wand GS. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute psychosocial stress: Effects of biological sex and circulating sex hormones. *Psychoneuroendocrinology.* 2016;66:47-55.
 22. Tarín JJ, Hamatani T, Cano A. Acute stress may induce ovulation in women. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:53:1-13.
 23. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress.* 2017;20(5):476-94.
 24. Prokai D, Berga SL. Neuroprotection via Reduction in Stress: Altered Menstrual Patterns as a Marker for Stress and Implications for Long-Term Neurologic Health in Women. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12):2147.
 25. Phumsatitpong C, Moenter SM. Estradiol-Dependent Stimulation and Suppression of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Firing Activity by Corticotropin-Releasing Hormone in Female Mice. *Endocrinology.* 2018;159(1):414-25.