

Sıçanlarda Vajinal Yayma Örneklerinin Sitolojik Değerlendirilmesi

Ayşe KÖYLÜ^{1a*} Suna ÖMEROĞLU^{1b} Saadet Özen AKARCA DİZAKAR^{1c}
Mürşide Ayşe DEMİREL^{2d}

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Ankara, TÜRKİYE

²Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı Ankara, TÜRKİYE

^a<https://orcid.org/0000-0001-8344-814X> ^b<https://orcid.org/0000-0002-9918-4254>

^c<https://orcid.org/0000-0002-4358-6510> ^d<https://orcid.org/0000-0002-7082-8976>

*Sorumlu yazar: ayskoylu@gmail.com

ÖZET

Deney hayvanının östrüs siklus evresi bazı klinik öncesi çalışmalarda gerek araştırma sonuçlarının geçerliliğini gerekse de güvenilirliğini artırmak amacıyla önceden bilinmelidir. Sıçanların östrüs siklus döngülerinin 4-5 gün gibi kısa sürmesi araştırmacılara birçok yönden avantaj sağlar ve bu nedenle siklus dönem tayinlerinin belirlenmesini önemli kılar. Düzenli östrüs siklusu gösteren sıçanlarda, endokrin değişimle birlikte vajinal epitelde meydana gelen morfolojik değişiklikler sonucu her bir evreye özgü hücre tipleri bulunmaktadır. Bu çalışmada, sıçan östrüs siklus dönemlerinin ayrıntılı sitolojik bulgularının ortaya konulması amaçlandı. Çalışmamızda, 28 adet Sprague Dawley türü dişi sıçanların her birinden düzenli aralıklarla vajinal sürüntü örnekleri alındı ve lamlara yayıldı. Vajinal yayma preparatları hızlı sonuç veren Giemsa boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında hücrelerin sitolojik görüntülenmesi ve tanımlanması yapıldı. Hazırlanan preparatlarda görüntülenen bazal-parabazal, intermediyer, süperfisiyal, keratinize süperfisiyal hücreler ve nötrofil lökositlerin yorumlanmasıyla sıçan östrüs siklus dönemleri belirlendi. Sıçanlarda östrüs siklus dönemlerine ait hücrelerin Giemsa kullanılarak boyanmalarının ardından bu hücreler sitolojik olarak mikroskop altında kolaylıkla ve kısa bir süre içerisinde değerlendirilebilir.

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş : 26.01.2021

Kabul: 20.04.2021

Anahtar kelimeler:

Giemsa, Sitoloji,

Sıçan, Vajinal sürüntü

Cytological Evaluation of Vaginal Smear Samples in Rats

ABSTRACT

In order to increase the validity and reliability of the research results in some preclinical studies the estrus cycle phase of the experimental animal should be known in advance. Rats' estrus cycle lasting as short as 4-5 days provides many advantages to the researchers and therefore it is important to assign the cycle period determinations. In rats with a regular estrus cycle, as a result of morphological changes occurring in the vaginal epithelium along with endocrine change there are cell types specific to each stage. In our study, it was aimed to introduce detailed cytological findings of rat estrus cycle periods. In this regard, from each of 28 Sprague Dawley female rat, vaginal smear samples were regularly taken and spread on slides. After the vaginal smear preparations were stained with Giemsa stain which gives rapid result, cytological imaging and identification of the cells were performed under the light microscope. The rat estrus cycles were determined with an interpret of basal-parabasal, intermediate, superficial, keratinized superficial cells and neutrophil leukocytes displayed in prepared preparations. After staining the cells of estrus cycle periods using Giemsa in rats, these cells can be evaluated cytological under the microscope easily and in a short time.

ARTICLE INFO

Research article

Received: 26.01.2021

Accepted: 20.04.2021

Keywords:

Cytology, Giemsa, Rat,
Vaginal smear

GİRİŞ

Dişi sıçanlarda postnatal ovaryum gelişimi 4 dönemden oluşur. Doğumdan sonraki ilk 7 gün gonadotropin hormon salgısının artışı ile başlayan neonatal dönem; 8-21. günler arası follükül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH) salgılanması ile follüküllerin gelişim gösterdiği infantil dönem; 22-30. günler arası follüküllerden östrojen hormon salgılanmasının başladığı juvenil (prepubertal) dönem ve juvenil dönem sonrasındaki 3 gün peripubertal dönem olarak isimlendirilir (Yiğit ve ark. 2019). Luteinleştirici hormonun da etkisiyle postnatal hayatın yaklaşık 30. gününde dişi sıçan puberte dönemine girer (Westwood 2008). Östrüs siklus döngüsü vajinal açıklığın belirlendiği 32. ve 36. günleri arasında başlar (Goldman ve ark. 2007). Sıçanlar, mevsime bağlı olmayan ve 4-5 günde bir siklik aktivite gösterdiği bilinen poliöstrik hayvanlardır. Östrüs siklusu, proöstrüs (12-14 saat), östrüs (25-27 saat), metöstrüs (6-8 saat) ve diöstrüs (55-58 saat) olmak üzere 4 dönemden oluşur (Westwood 2008). Proöstrüste, LH salınımı ile birlikte östradiol seviyesi pik yapar ancak östrüs dönemine geçişte azalmaya başlar. Ovulasyon, proöstrüs ile östrüs dönemleri arasında LH'nin yüksek seviyede olmasıyla gerçekleşir. Ovulasyon sonrası, metöstrüs ve diöstrüs dönemlerinde östradiol ve progesteron hormon seviyeleri düşerek bazal seviyelerine iner (Ekizceli ve ark. 2015; Emanuele ve ark. 2002). Siklus dönemlerinin endokrin dalgalanmalarına göre vajinal epitel tabakalarında da bazı değişiklikler gözlenir ve bu durum sitolojiye yansır. Sıçan vajinal epiteli, steroid hormonların seviyelerine bağlı olarak morfolojik değişkenlik gösteren çok katlı yassı hücre tabakasından oluşur. Epitelin bazalinde kübik hücrelerden oluşan stratum granulozum, orta kısımda düzensiz şekilli kübik/oval hücrelerden oluşan stratum germinativum, lümene bakan yüzeyde ise yassı hücrelerin oluşturduğu stratum musifikasyon katmanı bulunur. Proöstrüs döneminin başlaması ile stratum granulozumda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında keratohyalin granülleri birikmeye başlar. Epitelin lümene bakan tarafında bulunan ve sitoplazmik vakuollerinde mukus ihtiva eden kübik/oval şekilli hücrelerin mukus salgılaması sonucu bir mukozal tabaka oluşumu başlar. Mukozal tabakanın hemen altında yer alan yassılaştırmış epitelyal hücrelerin keratinizasyon sürecini başlatmasıyla en dışta yer alan mukuslu tabaka olan stratum musifikasyon'un hemen altında bir stratum korneum tabakası oluşmaya başlar. Böylece, epitelin tabakaları yeniden şekillenerek apikalden bazale doğru stratum musifikasyon, stratum korneum, stratum granulozum ve stratum germinativum olarak sıralanır. Östrüs döneminde, yüzeysel mukozal tabakası (stratum musifikasyon) ile keratinize tabakalarda (stratum korneum) ilerleyici bir dökülme yaşanır ve sonuçta vajinal lümeninde bu dökülmelerin ürünü olan çekirdeği olmayan keratinize epitelyal hücreler görülmeye başlar. Östrüs dönemi ilerledikçe stratum korneum iyice çözülür ve altındaki tabaka olan stratum granulozum ortaya çıkarak lümen ile komşu olur. Bunun sonucunda vajinal lümen çok miktarda kornifiye epitelyal hücreler dökülmeye başlar. Vajinal epitel dökülmeleri nedeniyle yüksekliğini kaybeder. Metöstrüs döneminde, stratum korneum tamamıyla vajinal epitelten ayrılmıştır ve lümeninde az sayıda kornifiye epitel hücresi bulunmaktadır. Bu dönem epitel kalınlığının en az olduğu dönemdir; stratum granulozum bulunmaz, ancak; stratum germinativum varlığını devam ettirir. Süperfişiyel epitel tabakada yoğun bir nötrofil infiltrasyonu yaşanır, ayrıca vajinal lümeninde de nötrofil lökositlere rastlamak mümkündür. Diöstrüs döneminin başında, epitel kalınlığı 3-7 sıra iken epitel hücrelerin proliferasyonu ile bu kalınlık 8-10 hücre tabakasına kadar çıkar. Stratum germinativum tabakasının üst katmanında bulunan epitelyal hücreler şekil değiştirerek daha poligonel bir şekil alır ve görevleri olan mukus salgılamak için hazır hale gelir. Diöstrüs döneminin başında stratum granulozum bulunmaz fakat dönem sonu ile proöstrüs başlangıcında stratum granulozum oluşmaya başlar. Bu farkın bilinmesiyle iki dönem birbirinden ayırt edilebilmektedir (Cora ve ark. 2015; Westwood 2008).

Bu çalışmanın amacı, sıçanların östrüs siklusu dönemlerine ait hücrelerin yapısal karakterlerinin vajinal sitoloji yöntemi ile ortaya konulmasıdır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından izin alınarak yapıldı (G.Ü.ET- 19.015). Araştırmamızda 8-10 haftalık (180-200 g) ve daha önce doğum yapmamış 28 adet Sprague Dawley türü dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 12 saat gece/gündüz periyodunda, 21-24 °C derece sıcaklık ve %45-55 nem şartları olan hayvan barınma yerlerinde, standart sıçan yemi ve musluk suyuyla beslendi. Sıçanlarda yapılan tüm işlemler ve deneklerin izlenmesi Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Ünitesinde gerçekleştirildi.

Bu çalışmada, östrüs siklusu dönemleri vajinal sitoloji yöntemi ile proöstrüs (oval çekirdekli epitel hücre), östrüs (düzensiz sitoplazmalı kornifiye skuamöz epitel hücre), metöstrüs (azalan kornifiye epitel hücreler ve yoğun nötrofil lökositler) ve diöstrüs (çekirdekli epitel hücreler ve azalan nötrofil lökositler) olarak sınıflandırıldı (Cora ve ark. 2015).

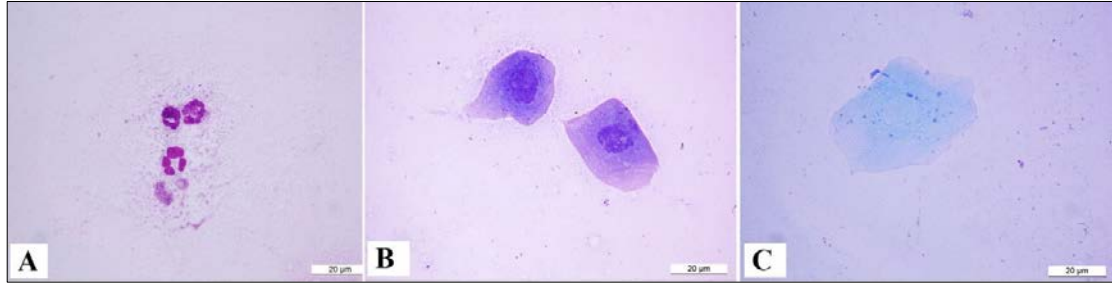
Vajinal yayma örneklerinin elde edilmesi

Vajinal yayma örnekleri alınırken sıçanlar kuyruk ve kuyruk kökünden tespit edilip kaldırılarak kafası aşağıya gelecek şekilde tutuldu. Steril koşullar altında, nemlendirilmiş bir svap çubuğu vajinaya yerleştirildi ve tam tur döndürülerek lümen ile duvarında bulunan hücreler alındı. Svap üzerinde bulunan hücreler temiz ve önceden etiketlenmiş bir lama yayıldı. Vajinal bölgeden toplanan hücreler havada kurutularak lam üzerine tespit edilmeleri sağlandı. Lamalar damlalık kullanılarak Giemsa boyası ile her bölgeye eşit dağılacak şekilde tamamen kaplandı. Daha sonra lamalar hızlıca akarsuyun altında yıkandı ve fazla olan boyalarından arındırıldı. Giemsa ile boyaması yapılan vajinal yayma preparatlarının havada kuruması (fiksasyon) sağlandıktan sonra ışık mikroskobu (Leica DM4000B, Germany) altında

incelendi. Hücreler lamel ile kapatma yapılmadan 10'luk ve 40'luk büyütmede değerlendirildi. Siklus dönemlerine ait her bir hücre kamera ataçmanlı ışık mikroskopunda fotoğraflandı (Leica DM4000B, Germany).

BULGULAR

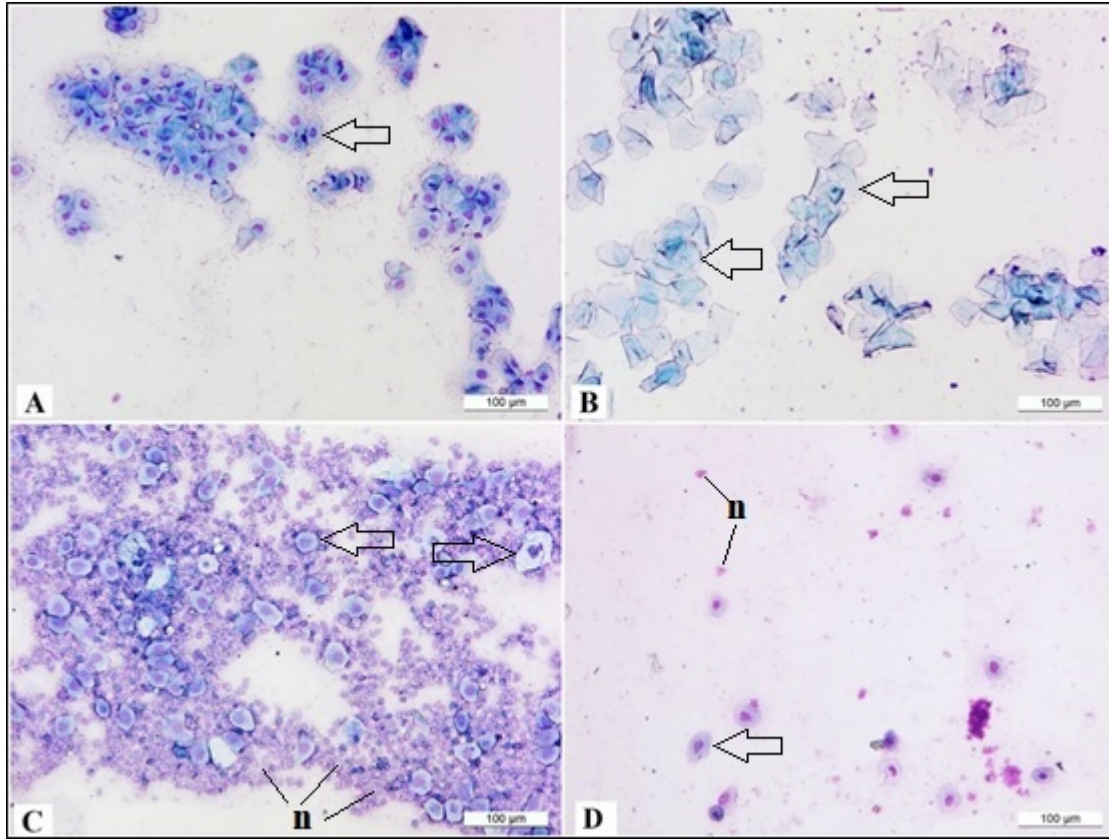
Deney prosedürü kapsamında alınan vajinal yayma örneklerinde hücreler bazal-parabazal, intermediyer, süperfisiyal, keratinize süperfisiyal hücreler ve nötrofil lökositler olmak üzere sınıflandırıldı (Şekil 1) (Cora ve ark. 2015). Yuvarlak veya oval şekilli, büyük çekirdekli küçük epitel hücreler bazal-parabazal hücreler, değişken şekil ve boyutlarda parabazal hücrelere göre daha büyük ve çekirdekleri daha küçük epitel hücreler intermediyer hücreler, düzensiz ve yassı kenarlı, piknotik çekirdeği olan ve tüm hücreler arasında en büyük boyuta sahip olan hücreler süperfisiyal hücreler, çekirdeksiz ve sitoplazmik katlanmalar görülen süperfisiyal hücreler ise kornifiye veya keratinize süperfisiyal hücreler olarak değerlendirildi. Ayrıca, genellikle çok çekirdekli, oval ya da yuvarlak, koyu boya almış ve sitoplazmik sınırlarının düzgün, birbirlerinden ayrı ya da gruplaşmış/kümeleşmiş şekilde olan en küçük hücreler nötrofil lökositler olarak belirlendi. Östrüs siklus dönemleri tanımlanan bu hücrelerin varlığı/yokluğu ve oranlarına göre belirlendi (Şekil 2).



Şekil 1. Östrüs siklus dönemlerinde karakteristik olan 3 farklı hücre çeşidinin mikroskopik görüntüleri. Nötrofil lökositlerinin parçalı/loblu çekirdek yapısı (A), koyu çekirdekli süperfisiyal hücreler (B), çekirdeğini kaybetmiş kornifiye veya keratinize süperfisiyal hücrenin bozulmuş sitoplazmik sınırı görülmekte (C) (Giemsa boyama, x1000)

Nötrofil Lökositler

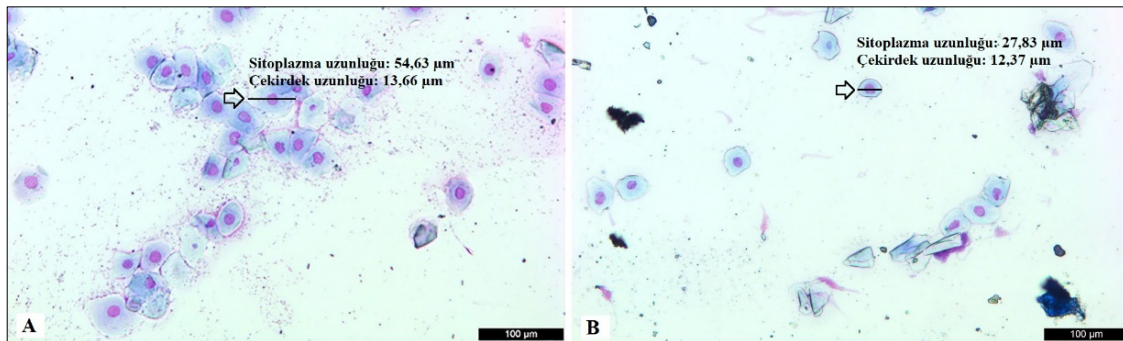
Vajinal yayma preparatlarında görülen en küçük hücreler nötrofil lökositler olarak belirlendi. Nötrofil lökositler, genellikle çok çekirdekli, oval ya da yuvarlak hücreler olup koyu boya aldıkları ve sitoplazmik sınırlarının düzgün, birbirlerinden ayrı ya da gruplaşmış/kümeleşmiş şekilde olduğu görüldü (Şekil 1-A).



Şekil 2. Sıçan östrüs siklus dönemleri ve her bir döneme ait hücrelerin mikroskopik görüntüleri. (A) Proöstrus dönemi; baskın hücreler oval çekirdekli intermediyer hücreler (ok), (B) Östrus dönemi; baskın hücreler henüz çekirdeğini kaybetmemiş veya çekirdeği olmayan kornifiye süperfisiyal hücreler (ok), (C) Metöstrus dönemi; büyük ve küçük intermediyer hücreler (ok) ile birlikte yoğun nötrofil lökositleri (n) (D) Diöstrus dönemi; grup halinde nötrofil lökositleri (n) ile birlikte sayıca az intermediyer hücreler (ok) görülebilir (Giemsa boyama, x200)

İntermediyer Hücreler

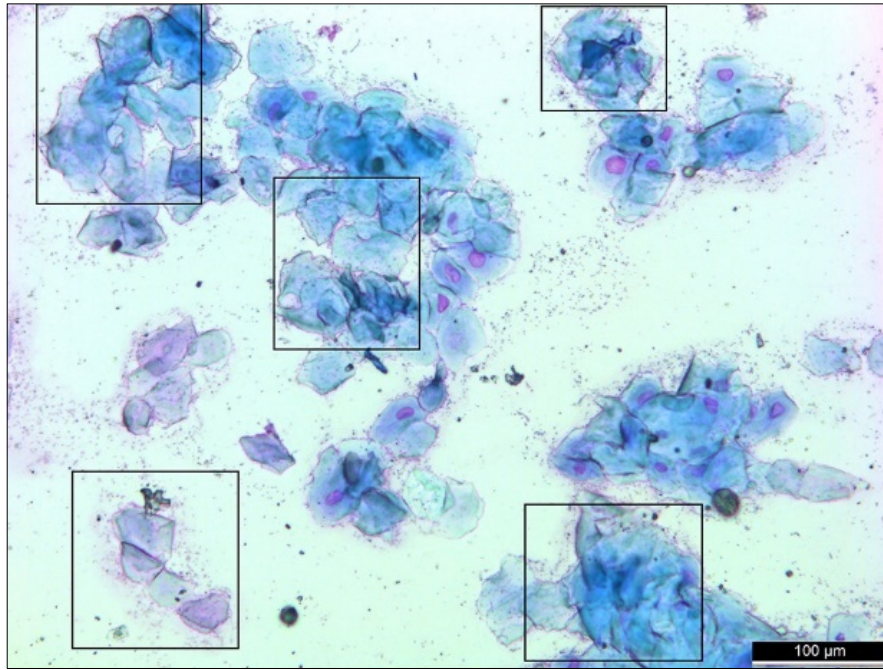
Bu hücrelerin sitoplazmaları genellikle poligonol veya oval şekilli olarak görüldü. Büyük intermediyer hücrelerde çekirdek/sitoplazma oranının küçük intermediyer hücrelere nazaran daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 3-A). Küçük intermediyer hücreler çoğunlukla yuvarlak veya oval, küçük boyutlarda ve keratinize olmayan hücreler olarak saptandı. Büyük intermediyer hücrelerden ayırt etmek amacıyla çekirdek/sitoplazma oranı değerlendirildi. Küçük intermediyer hücrelerde çekirdek/sitoplazma oranının büyük intermediyer hücrelere nazaran daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 3-B).



Şekil 3. Büyük intermediyer (A) ve küçük intermediyer (B) hücre karşılaştırması (oklar) (Giemsa boyama, x200)

Kornifiye veya Keratinize Süperfisiyal Hücreler

Yaşlanmış hücreler olarak da bilinen çekirdeksiz keratinize süperfisiyal hücrelerin büyük boyutlarda olduğu saptandı. Çekirdeğini kaybeden hücrelerin çoğunda sitoplazmik katlantılar dikkati çekti. Bazı hücrelerde ise çekirdeğin olması gereken yerde bir çöküntü veya sınırları belli bir alana rastlandı (Şekil 4).



Şekil 4. Kornifiye süperfisiyal hücre toplulukları (kareler) (Giemsa boyama, x200)

TARTIŞMA

Siçanlarda hem reproduktif performansı artırma amaçlı hem de jinekolojik deney modeli sürecinde östrus siklusu dönemlerinin saptanması için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu amaçla tercih edilen yöntemler arasında, dişi siçanların davranışsal değişimlerinin gözlenmesi, vaginal sürüntü örneğinin sitolojik değerlendirilmesi ve vaginanın elektriksel iletkenliğinin ölçülmesi yer almaktadır. Bu yöntemler arasında, vaginal sitoloji östrus siklusu dönemlerinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan hızlı, pratik ve ucuz bir yöntemdir Dişi laboratuvar hayvanlarında yapılan birçok üreme sistemi çalışmasında önce veya prosedür süresince vajinal yayma örneklerinin alınması gerekmektedir. Bu nedenle, deney hayvanlarından alınan vajinal yayma örneklerinin sitolojik analizleri, hangi hücrelerin hangi dönemlerde yoğunluk kazandığı ve morfolojik özelliklerinin araştırmacılar tarafından bilinmesi ve ayırt edilmesi sonuçların güvenilirliği ve geçerliliği için önem arz etmektedir (Ajayi ve Akhigbe 2020; Srinivasan ve ark. 2017).

Vajinal yayma örneklerinin boyanmasında Papanicolaou (Cora ve ark. 2015), Giemsa (Gal ve ark. 2014), Diff-Quick (Aguilar ve ark. 2006), Toluidine blue (Goldman ve ark. 2007) gibi birçok boyama yöntemi kullanılmaktadır. Oba ve arkadaşlarının (2001) siçanlarda yaptığı vajinal sitoloji sonuçlarına göre Papanicolaou ile boyanan preparatlarda Toluidine blue ile boyananlara göre daha detaylı çekirdek sitoplazma ayrımının yapıldığı ve hücre tiplerinin daha net seçildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, özellikle östrüs dönemine yaklaştıkça hücrelerde asidofiliğin, uzaklaştıkça da bazofiliğin artması Papanicolaou boyamanın sağlamış olduğu bir avantaj olarak bilinmektedir (Oba ve ark. 2001). Bir başka çalışma, vajinal yayma örneklerinin Toluidine blue ile 5-7 dakika gibi daha kısa sürede boyanmasının Papanicolaou yöntemine göre bir avantaj olduğunu savunmaktadır (Çoban ve ark. 2016). Mohammed ve Sundaram (2018) birbirinden farklı dört metakromatik boya (Papanicolaou, Giemsa, Toluidine blue ve Methylene blue) kullanarak siçan vajinal yayma sürüntülerini boyamışlardır. Amaçları, boyaların vajinal yaymadaki hücreleri (parabazal, süperfisiyal, intermediyer, nötrofil) detaylandırmadaki yeterliliklerini, uygulama sürelerini ve maliyetlerini göz önünde tutarak karşılaştırmaktır. Buna göre, çekirdeği olmayan kornifiye hücreler her dört boyamada da belirgin; parabazal hücreler ve nötrofiller en iyi methylene blue'da, süperfisiyal hücreler ise en iyi Giemsa'da ayırt edilmiştir. Ayrıca, hücre-çekirdek oranlarının ve sitoplazmik sınırların belirlenmesinde Giemsa boyasının oldukça başarılı olduğu gözlemlenmiştir (Mohammed ve Sundaram 2018). Bizde çalışmamızda Giemsa boyasını kullanarak çekirdek ve sitoplazma sınırlarını açıkça gözlemledik, hücreleri birbirinden kolaylıkla ayırt edebildik.

Papanicolaou ve Giemsa vajinal yayma örneklerinde sıkça kullanılan geleneksel boyama çeşitleridir. Her iki boyanın birbirine göre artı ve eksi yönleri vardır. Papanicolaou çekirdek yapısının detaylandırılmasında başarılı fakat uzun süren bir işlem iken, Giemsa sitoplazmanın detaylandırılmasında başarılı kısa bir işlemdir. Giemsa ile Papanicolaou arasındaki en büyük farklardan birisi fiksasyon şeklidir; Giemsa boyamalarda havada kurutma yapılabilirken Papanicolaou'de alkol ile fiksasyon gerçekleştirilir. Hava ile kurutma, hücre çekirdeğinin görünür boyutu ve şekli üzerinde çarpıcı bir etkiye sahiptir. Hücrelerin cam slayt üzerine yayılması, çekirdeğin hacmiyle orantılı olarak görünürlüğünü artıran bir uygulamadır. Giemsa ile boyanan preparatlarda havada kurutma yöntemi ile fiksasyon yapıldığından, Giemsa Papanicolaou'ye göre hücredeki çekirdek ve sitoplazmanın görünür hale gelmesinde daha başarılı bulunmuştur (Krafts ve Pambuccian 2011). Giemsa boyasının, hücre içerisindeki kromatin, çekirdek membranı

ve mast hücresi gibi bazı hücrelerin sitoplazmik granüllerini boyama özelliğinde olduğu bilinmektedir (Barcia 2007). Bu yöntem ile hücre çekirdeği mavi/mor, sitoplazma açık mavi, kollagenler soluk pembe, kas fibrilleri soluk pembe, eritrositler gri/pembe/sarı ve mast hücreleri koyu mavi boya alır. Biz de, sunulan verilere paralel olarak vajinal epitel hücrelerin çekirdek ve sitoplazma ayrımlarını net olarak gözlemledik ve kolaylıkla ayırt edebildik.

SONUÇ

Sıçanlarda vajinal sitolojide hücrelerin değerlendirilebilmesi amacıyla ucuz, pratik ve kullanışlı olan Giemsa boyama yöntemi tercih edilebilir. Küçük veya büyük intermediyer hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarının ayırt edilebilirliği, çekirdeği olmayan keratinize süperfişiyal hücrelerin dağınık sitoplazma duvarı ve nötrofil lökositlerin loblu çekirdekleri ve diğer hücrelere nazaran boyutlarının küçük olması Giemsa boyası ile ortaya konulabilmektedir. Ayrıca, bu boyanın havada kurutma yolu ile fiksasyonunun yapılabilmesi bir avantajdır. Bu bilgiler ışığında, sıçanlarda östrüs siklusu dönemlerine ait hücrelerin Giemsa kullanılarak boyanmalarının ardından sitolojik olarak mikroskop altında kısa sürede ve kolaylıkla değerlendirilebileceği sonucuna varıldı.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

YAZAR KATKISI

Tüm yazarlar eşit katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Aguilar J, Hanks M, Shaw DJ, Else R, Watson E 2006. Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. *Theriogenology*. 66 (2): 423-430.
- Ajayi AF, Akhigbe RE 2020. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil. Res. and Pract.* 6 (1): 1-15
- Barcia JJ 2007. The Giemsa stain: its history and applications. *Int. J. Surg. Pathol.* 15 (3): 292-296.
- Cora MC, Kooistra L, Travlos G 2015. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol. Pathol.* 43 (6): 776-793.
- Çoban ZD, Güran Ş, Altaylı E, Kayır H, Baykal B 2016. Farede östrüs siklusu tayininde hızlı, kolay ve etkin bir yöntem. *Gülhane Tıp Derg.* 58: 82-87.
- Ekizceli G, Sevinç İ, Öktem G, Ece O, Özbilgin K 2015. Sıçanlarda Östrüs Döngüsü ile İlişkili Ovaryum ve Uterusların Histolojik Değerlendirmesi. *Uludağ Üniv. Tıp Fak. Derg.* 41 (2): 65-72.
- Emanuele MA, Wezeman F, Emanuele NV 2002. Alcohol's effects on female reproductive function. *Alcohol. Res. Health.* 26 (4): 274-281.
- Gal A, Lin PC, Barger AM, MacNeill AL, Ko C 2014. Vaginal fold histology reduces the variability introduced by vaginal exfoliative cytology in the classification of mouse estrous cycle stages. *Toxicol. Pathol.* 42 (8): 1212-1220.
- Goldman JM, Murr AS, Cooper RL 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 80 (2): 84-97.
- Krafts KP, Pambuccian S 2011. Romanowsky staining in cytopathology: history, advantages and limitations. *Biotech. Histochem.* 86 (2): 82-93.
- Mohammed S, Sundaram V 2018. Comparative study of metachromatic staining methods in assessing the exfoliative cell types during oestrous cycle in sprague-dawley laboratory rats. *Int. J. Morphol.* 36 (3): 962-968.
- Oba G, Aslan S, Kaymaz M 2001. Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vaginal sitolojinin kullanılması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 48: 51-57.
- Srinivasan MR, Sabarinathan A, Geetha A, Shalini K, Sowmiya MA 2017. Comparative Study on Staining Techniques for Vaginal Exfoliative Cytology of Rat. *J. Pharmacol. & Clin. Res.* 3(3): JPCR.MS.ID. 555615
- Westwood FR 2008. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol. Pathol.* 36 (3): 375-384.
- Yiğit AA, Büyük G, Kabakçı R 2019. Dişi Ratlarda Üreme Fizyolojisi. *Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg.* 12 (2): 163-167.