

## BEITRÄGE ZUR ZYTOLOGISCHEN DIFFERENZIERUNG DER PHASEN DES GESCHLECHTSZYKLUS DER WEIßEN MAUS

MAGDOLNA MÖDLINGER—ODORFER

(Eingegangen am 9. April 1956)

Aus dem mikroskopischen Bild des Vaginalabstriches vermochten zuerst STOCKARD und PAPANICOLAOU [17] beim Meerschweinchen auf die einzelnen Phasen des Geschlechtszyklus zu folgern, obwohl den Vaginalrhythmus als erster LATASTE [13] beobachtet hatte, dessen Untersuchung jedoch in Vergessenheit geriet. Die Methode von STOCKARD und PAPANICOLAOU [17] wandten mehrere Forscher bald zur Untersuchung des Geschlechtszyklus der weiblichen weißen Maus an (ALLEN [1, 2], ZONDEK und ASCHHEIM [21], LOEVE [14], LAQUEUR, HART, DE JONGH und WIJSENBEEK [12], EISLER [9], PARKES [15] sowie BORST, DÖDERLEIN und GOSTIMIROVIC [6]).

Laut der bisherigen Kenntnisse können im Geschlechtszyklus der weiblichen weißen Maus vier Phasen unterschieden werden. In jeder Phase finden charakteristische Veränderungen in der Struktur des Ovariums, des Uterus und der Vagina statt, und auch die mikroskopische Untersuchung des Vaginalsekrets ergibt ein kennzeichnendes Bild. Im Östrus, der den Höhepunkt des Geschlechtszyklus bildet und in welche Phase bei der Maus die Ovulation fällt, finden sich verhornte, kernlose Epithelzellen, sogenannte Schollen, im Vaginalabstrich. Sodann folgt der Metöstrus, die Abbauperiode, für die das Auftreten der Leukozyten charakteristisch ist; außerdem beobachteten die meisten Autoren Schollen in dieser Phase (TSCHERNE [18], Sós und S. LÖDI [16], ALLEN und DOISY [3], VERZÁR [19]), einige auch kernige Epithelzellen (TSCHERNE [18], ALLEN und DOISY [3]), ja, letztere sogar Schleim. Noch stärker unterscheiden sich die Ansichten hinsichtlich der Beschreibung des den Diöstrus, d. h. die Ruhezeit, kennzeichnenden Vaginalabstrichs. Laut BOMSKOV'S Handbuch [5] und BEZNÁKS Lehrbuch [4] sind viele Leukozyten und wenige kernige Epithelzellen vorhanden, VERZÁR [19], ferner ZONDEK und ASCHHEIM [21] beobachteten außer diesen Schleim, TSCHERNE [18] sowie Sós und S. LÖDI [16] hingegen erwähnen nur Schleim und Leukozyten. Bezüglich des dem Östrus vorangehenden Proöstrus, d. h. der Proliferationsphase, sind darüber die Autoren im allgemeinen einig, daß er durch die alleinige Anwesenheit von kernigen Epithelzellen gekennzeichnet wird; lediglich die Lehrbücher BEZNÁKS [4] und VERZÁRS [19] weisen darauf hin, daß in dieser Phase Leukozyten ebenfalls vorkommen.

Einerseits gab die aus den Literaturangaben feststellbare Unsicherheit Anlaß zur Durchführung gründlicher und tiefgreifender Untersuchungen, andererseits konnte man aus vorläufigen Versuchen darauf schließen, daß innerhalb der aus dem Schrifttum bekannten vier Phasen des normalen Geschlechtszyklus der weiblichen weißen Maus schon allein durch die eingehendere Untersuchung des Vaginalabstrichs eine weitere Gliederung möglich ist. Es schien daher notwendig, an einem größeren Tiermaterial gründliche Vaginalabstrichuntersuchungen vorzunehmen.

#### Material und Methode

Die Entnahme des Vaginalabstrichs erfolgte täglich in den Morgenstunden mit wenig auf dem Kopf einer Stecknadel gewickelter Watte; die Abstriche wurden mit dem Gemisch gleicher Teile von 96%-igem Äthylalkohol und Äther fixiert. Zur Färbung bewährten sich am besten die WEIGERTSche Eisenhämatoxylin-Eosin-, die PAPPENHEIMSche doppelte und die von AYRE modifizierte PAPANICOLAOUSche Färbung. Die Bewertung der etwa 7000 Abstriche wurde auf Grund ihrer Untersuchung in ganzem Ausmaß vorgenommen.

#### Ergebnis der Vaginalabstrichuntersuchungen

Aus der eingehenden Untersuchung der Abstriche ging hervor, daß im Verlauf des *Östrus* das Bild nicht einheitlich ist, sondern anfangs winzige, deformierte, sich gut färbende (Abb. 1), später kleine, schließlich mittelgroße und große Schollen gemeinsam erscheinen (Abb. 2). Sowohl die Größe der Schollen als auch ihre Färbung wechselt, die winzigen und kleinen Schollen färben sich mit Eosin gut, die mittelgroßen und großen hingegen kaum oder überhaupt nicht, doch sind diese mit Lichtgrün klar nachweisbar.

Laut der Untersuchungen kennzeichnen den *Metöstrus* von den zellulären Elementen lediglich die Schollen und Leukozyten, der Auftritt der Epithelzellen weist bereits auf den Beginn des *Diöstrus* hin, Schleim dagegen ist schon gewöhnlich im *Metöstrus* vorhanden.

Der *Diöstrus* ist anscheinend keineswegs eine Ruhezeit, wie oft angenommen wird, und das zeigt auch das mannigfaltige Bild des Vaginalabstrichs. Auch der Schleim ist unterschiedlich; zu Beginn des *Diöstrus*, ähnlich dem *Metöstrus*, ist er in kleiner Menge vorhanden, zieht sich fadenartig beim Ausstrich auf den Objektträger, oder ist der Schleim körnig, oft homogen, glasig, später tritt er in großer Menge auf und wird viskös, sodann, am Ende der Phase, vermindert sich wieder seine Quantität und wird körnig. Der wechselnden Menge und Qualität des Schleims entsprechend kommen auch die zelligen Elemente einmal in dünner, manchmal in dicker Schicht auf dem Objektträger vor. Auch die Größe der Epithelzellen ändert sich im *Diöstrus*; anfangs sind große Epithelzellen sichtbar mit sich schlecht färbendem Zytoplasma und Zellkern, danach treten außer diesen kleine Epithelzellen mit sich gut färbendem Plasma und pyknotischem Kern in wachsender Menge auf, die sodann im *Proöstrus* allein-

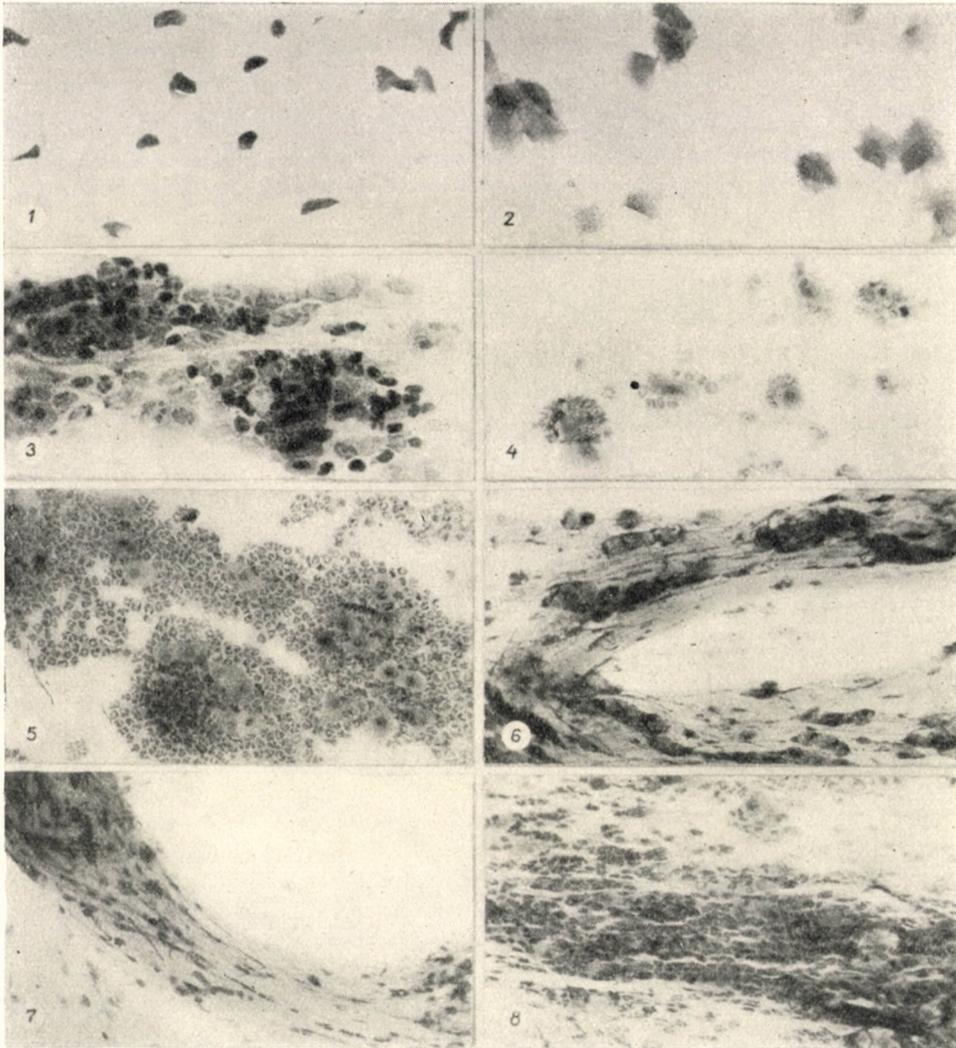


Abb. 1. Frühstadium des Östrus. Vaginalabstrich. Fixierung mit Alkohol und Äther. WEIGERTSches Eisenhämatoxylin-Eosin. Okular: 7×, Objektiv: 20×

Abb. 2. Spätstadium des Östrus. 140×

Abb. 3. Leukozyten mit sich blaß und stark färbendem Kern im Diöstrus. Okular: 7×, Objektiv: 40×

Abb. 4. Erstes Stadium des Diöstrus. Winziges Zellmosaik. 140×

Abb. 5. Zweites Stadium des Diöstrus. Großes Zellmosaik. 140×

Abb. 6. Drittes Stadium des Diöstrus. 140×

Abb. 7. Drittes Stadium des Diöstrus. Leukozyten infolge des Ausstreichens mit sich in die Länge ziehendem Kern. 140×

Abb. 8. Viertes Stadium des Diöstrus. 140×

herrschend werden. Interessant ist auch das morphologische Verhalten der Leukozyten, das sicherlich als die Manifestation noch ungeklärter physiologischer Veränderungen anzusehen ist. Die im Vaginalabstrich erscheinenden Leukozyten gehören zu den Granulozyten (Monozyten kommen nur hie und da vor), doch scheint ihr Zytoplasma völlig ausgelaugt, und nach den bisherigen Kenntnissen konnten darin keine Granula nachgewiesen werden. Der Zellkern der im Metöstrus plötzlich auftretenden und auch zu Beginn des Diöstrus vorkommenden Leukozyten ist charakteristisch segmentiert, in dem Abschnitt des Diöstrus jedoch, wo der Schleim viskös wird, bewahren die Leukozyten ihre Form beim Bereiten des Ausstriches nicht, sonder ziehen sich in die Länge derart, daß der Zellkern spindelförmig erscheint und die Segmentierung nur bei stärkerer Vergrößerung zu beobachten ist. Während der Zellkern der Leukozyten im Metöstrus und zu Beginn des Diöstrus aufgetrieben ist und sich blaß färbt, finden sich gegen Ende des Diöstrus außer diesen hie und da Leukozyten mit gut erhaltenem und sich stark färbendem Kern (Abb. 3). Es ist nicht ausgeschlossen, daß diese Zellen mit den lebenden Leukozyten identisch sind, die GUTTMACHER [10] im Vaginalabstrich der Ratte ebenfalls in der Spätperiode des Diöstrus antreffen konnte, während im übrigen laut seiner Untersuchungen vor allem tote Leukozyten vorkamen. Daß diese Leukozyten mit intaktem Kern ebenfalls keine sich färbenden Granula in ihrem Zytoplasma enthalten, schließt noch nicht aus, daß sie leben, da, vaginale Schnitte untersuchend, das Plasma der zwischen den Epithelzellen wandernden Leukozyten anscheinend gleichfalls granulumfrei war. Es ist anzunehmen, daß die Substanz der Granula vielleicht eben bei der Auflockerung der Epithelschichten eine Rolle spielt.

Unter Berücksichtigung der morphologischen Eigenschaften der zelligen Elemente und der Qualität des Schleims zerfällt auf Grund der Untersuchungen der Diöstrus in folgende Stadien :

#### *Erstes Stadium des Diöstrus (D<sub>1</sub>)*

Der äußerst geringe Schleim ist fadenartig, körnig oder von glasiger Erscheinung; Leukozyten und sich blaß färbende große Epithelzellen kommen in kleiner Anzahl und in dünner Schicht ausgebreitet vor, die Leukozyten gruppieren sich um die Epithelzellen; diese Anordnung der zelligen Elemente erinnert an winzige Mosaik (Im weiteren : winziges Zellmosaik) (Abb. 4).

#### *Zweites Stadium des Diöstrus (D<sub>2</sub>)*

Das Bild des Vaginalabstrichs ist dem vorigen in jeder Beziehung ähnlich. Die Leukozyten und großen Epithelzellen treten bereits in größerer Anzahl auf, lagern sich aber noch immer in dünner Schicht, so daß ausgedehnte, zusammenhängende Zellmosaik entstehen. (Im weiteren : großes Zellmosaik) (Abb. 5.)

*Drittes Stadium des Diöstrus (D<sub>3</sub>)*

Nachdem sich die Mosaik auflösen, wird der Schleim stark viskös und entsteht in großer Menge. Im Abstrich kommen Leukozyten, große Epithelzellen und teilweise auch kleine, in Schleim gebettet, in dicker Schicht massenweise vor. In diesem Stadium können im viskosen Schleim Leukozyten beobachtet werden, deren Kern sich infolge des Ausstriches in die Länge zieht (Abb. 6 und 7).

*Viertes Stadium des Diöstrus (D<sub>4</sub>)*

In diesem Stadium vermindert sich die Menge des Schleimes, und der viskose Schleim wird allmählich von dem körnigen abgelöst. Neben den großen Epithelzellen erscheinen immer mehr kleine Epithelzellen mit sich gut färbendem Plasma und pyknotischem Kern. Charakteristisch für dieses Stadium ist, daß sich die großen Epithelzellen und die Leukozyten wieder mosaikähnlich anordnen, die Zellmosaik stark ausgedehnt sind, aber in bedeutend mehr Schleim gebettet eine dickere Schicht bilden als im Stadium D<sub>2</sub> (Abb. 8).

Im Übergangszustand vom Diöstrus in dem Proöstrus ist der Schleim körnig, seltener fadenartig, und von geringer Menge; die Zahl der großen Epithelzellen sowie der Leukozyten nimmt langsam ab, und die im obigen charakterisierten kleinen Epithelzellen kommen in stets größerer Quantität in Haufen vor.

Im *Proöstrus* kann der Vaginalabstrich noch ein wenig körnigen Schleim enthalten, doch sind die Leukozyten nicht mehr vorhanden. Das Zytoplasma der Epithelzellen färbt sich sehr oft auch gemeinsam mit Hämatoxylin und Eosin bzw. bei Anwendung der PAPANICOLAUSchen Färbung mit Bismarckbraun.

### Zusammenhang zwischen der Dauer des Geschlechtszyklus und den neuen Stadien

Bezüglich der Dauer des Geschlechtszyklus der weiblichen weißen Maus sind die Autoren nicht einig. ALLEN [2] fand 4tägige Zyklen, PARKES [15] dagegen 6,2tägige. Die mittlere Dauer der Zyklen der im vorliegenden Versuch geprüften Tiere betrug 6,3 Tage.

Besondere Beachtung verdienen die Feststellungen CLAUBERGS [8], der bei der weißen Maus 4—5- sowie 9—10tägige Zyklen beobachtete. Da laut seiner Untersuchungen im Zyklus der weißen Maus die Gelbkörperphase mindestens 5 Tage lang dauert, sieht er den kurzen Zyklus nicht als vollwertig an, denn in diesem Fall atretisieren die Follikel. Nach seiner Auffassung ist der längere, d. h. 9—10 Tage dauernde Zyklus mit Follikelsprung vollwertig. Eine ähnliche

Ansicht vertritt auch BUSSE [7] hinsichtlich der kurzen Zyklen. Die kurzen und langen Zyklen können beim selben Tier ebenfalls abwechselnd vorkommen (ZAMKOF und ROKHLINA [20], CLAUBERG [8]).

Der auf Grund der Untersuchung der Vaginalabstriche anscheinend ähnliche Verlauf der vollwertigen und der nicht vollwertigen Zyklen brachte einen Teil der Autoren, zum Beispiel CLAUBERG [8], BUSSE [7] und KIRCHHOFF [11] zu der Feststellung, daß mit Hilfe des Vaginalabstrichs lediglich die Phasen des Proöstrus und des Östrus zu bestimmen sind, das Bild des Metöstrus und Diöstrus hingegen nichts vom Geschehen der Ovulation und die Entstehung des Gelbkörpers aussagt, also keine Auskunft über die Vollständigkeit oder Unvollständigkeit des Zyklus bietet. Auch ALLEN [1] weist darauf hin, daß auf Grund des Vaginalabstrichs auch bei Fehlen des Gelbkörpers und bei Follikelatresie der aus den bekannten Phasen bestehende Zyklus festgestellt werden kann, was jedoch kein Bild von der Qualität des Zyklus gibt.

Während der vorliegenden Untersuchungen wurden gleichfalls kurze und lange Zyklen beim selben Tier beobachtet. Innerhalb der kurzen Zyklen entfielen gewöhnlich nur zwei-drei Tage auf den Diöstrus. In solchen Fällen waren lediglich die oben erwähnten Stadien  $D_1$  und  $D_2$ , d. h. die Bilder aus winzigen und großen Zellmosaiken, ersichtlich, die dann plötzlich vom Auftritt der kleinen Epithelzellen, also vom Proöstrus, abgelöst wurden. Demgegenüber konnten sämtliche, bereits beschriebenen Stadien des Diöstrus nur in den langen Zyklen wahrgenommen werden. Die obige neuartige Gliederung des Diöstrus bedeutet demnach die Verfeinerung der Untersuchung des Vaginalabstrichs, da mit ihrer Hilfe anscheinend auf die erfolgte Ovulation geschlossen werden kann. Um dies zu beweisen, ist natürlich die histologische Untersuchung des Ovariums der in der Östrusphase der kurzen und langen Zyklen getöteten Tiere unbedingt notwendig, die im vorliegenden Fall erst in der nächsten Zeit mikrotechnisch verarbeitet werden. Die obige Annahme wird gewissermaßen durch eine andere Beobachtung gestützt. Im Sommer vorigen Jahres sollten die Probleme der Trächtigkeit von ebenfalls weißen Mäusen untersucht werden; in dem auf Grund des Vaginalabstrichs festgestellten Östrus paarten sich die Tiere mit Zuchtmännchen, doch trat im überwiegenden Teil der Fälle keine Gravidität ein, obwohl die Zeichen der Paarung wahrzunehmen waren. Bei der nachträglichen Überprüfung der Aufzeichnungen stellte es sich heraus, daß die Tiere der erfolglosen Versuche ständig kurze Zyklen aufwiesen. Demgegenüber war bei den mit Befruchtung einhergehenden Versuchen der Zyklentypus der Tiere leider nicht bestimmbar, denn eben diese Tiere gerieten schon in den ersten Tagen des Versuches in Östrus und paarten sich mit Erfolg.

### Zusammenfassung

1. Innerhalb der bisher bekannten vier Phasen des Geschlechtszyklus der weiblichen weißen Maus ist allein auf Grund der Untersuchung des Vaginalabstrichs eine weitere Gliederung möglich.
2. Im Verlauf des Östrus ändert sich Größe und Färbung der Schollen.
3. Die zelligen Elemente des Metöstrus sind lediglich Schollen und Leukozyten.
4. Der Diöstrus kann unter Berücksichtigung der morphologischen Eigenarten der Epithelzellen und Leukozyten, ferner der Menge und Qualität des Schleims in vier Stadien geteilt werden. Sämtliche Stadien bilden sich nur während des langen Zyklus aus.
5. Die im Proöstrus erscheinenden kleinen Epithelzellen färben sich sowohl mit Hämatoxylin als auch mit Eosin oder mit Bismarckbraun.

### LITERATUR

1. ALLEN, E.: (1922) The oestrus cycle in the mouse. *Amer. J. Anat.* 30, 297. — 2. ALLEN, E.: (1923) Racial and familial cyclic inheritance and other evidence from the mouse concerning the cause of oestrous phenomena. *Amer. J. Anat.* 32, 293. — 3. ALLEN, E. and DOISY, E. A.: (1923) An ovarian hormone. Preliminary report on its localisation, extraction and partial purification, and action in test animals. *J. Am. Med. Ass.* 81, 819. — 4. BEZNÁK, A.: (1941) Orvosi élettan. Budapest. — 5. BOMSKOV, C.: (1939) Methodik der Hormonforschung. Leipzig. — 6. BORST, M., DÖDERLEIN, A. und GOSTMIROVIC, D.: (1931) Geschlechtsphysiologische Studien. V. Mitt. Der Brunstzyklus als Kontrolle der Ovarialfunktion. *Münch. med. Wschr.* No. 14, 572. — 7. BUSSE, O.: (1931) Über den Genitalzyklus und die Schwangerschaft bei der weißen Maus. (Anatomische Studien an Ovarien, Uterus und Scheide.) *Med. Diss.* Kiel. — 8. CLAUBERG, C.: (1931) Genitalcyclus und Schwangerschaft bei der weißen Maus. Dauer des Genitalcyclus. *Arch. Gyn.* 147, 549. — 9. EISLER, B.: (1926) Über die Trypanblauspeicherung während der cyclischen Wandlungen im weiblichen Geschlechtsapparat der weißen Maus. *Z. Zellf. u. mikr. Anat.* 3, 383. — 10. GUTTMACHER, A. F.: (1926) Studies on supravivally stained living and dead leucocytes and epithelial cells in vagina of Rat. Their relation to ovulation cycle. *John Hopkins Hosp. Bull. Baltimore* 33, 61. — 11. KIRCHHOFF, H.: (1937) Jahreszeiten und Belichtungen in ihrem Einfluß auf weibliche Genitalfunktionen. *Arch. Gyn.* 163, 141. — 12. LAQUEUR, E., HART, P. C., DE YONGH, S. E. und WIJSENBEEK, J. A.: (1926) Über das Hormon des östrischen Zyklus II. *Deutsche med. Wschr.* 52, 4. — 13. LATASTE, F.: (1893) Rhythme vaginal des mammifères. *C. R. Soc. Biol.* 45, 135. — 14. LOEVE, S.: (1925) Über einige Wirkungskennzeichen und Wirkungsbedingungen eines Ovarialhormons. *Zbl. Gyn.* 49, 1735. — 15. PARKES, A.: (1926) *Proc. Roy. Soc. London S. B.* 100, 151. — 16. Sós, J. és SÓSNÉ LÖDI, I.: (1954) Kísérleti állatok biológiai és fiziológiai standard értékei. (In: KOVÁCH, A.: A kísérleti orvostudomány vizsgálo módszerei I., Budapest). — 17. STOCKARD, CH. R. and PAPANICOLAOU, G. N.: (1917) The Existence of a Typical Oestrous Cycle in the Guinea-pig — with a Study of its Histological and Physiological Changes. *Amer. J. of Anat.* 22, 225. — 18. TSCHERNE, E.: *Sexual-Hormontherapie.* Wien. — 19. VERZÁR, F.: (1948) Lehrbuch der Inneren Sekretion. Liestal. — 20. ZAMKOF, A. A. et ROKHLINA, M. L.: (1930) La durée moyenne du cycle sexuel des femelles chez les souris blanches. *C. R. Soc. Biol. Paris*, 102, 1003. — 21. ZONDEK, B. und ASCHNEIM, S.: (1925) Experimentelle Untersuchungen über die Funktion und das Hormon des Ovariums. *Klin. Wschr.* 4, 1388.

### О ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ФАЗ ПОЛОВОГО ЦИКЛА САМОК БЕЛЫХ МЫШЕЙ

М. М.—ОДОРФЕР

Автору удалось на основании исследования мазков с влагалища дальнейшее расчленение известных четырех фаз полового цикла самок белых мышей. Она наблюдала, что в период течки величина и окрашивание глыб изменяется. Согласно ее исследованиям клеточные элементы metoestrus представляют собой только глыбы и лейкоциты. На основании морфологических особенностей эпителиальных клеток и лейкоцитов, далее принимая во внимание количество и качество слизи, автор разделяет dioestrus на четыре стадии. Все стадии образуются только в течение длительных циклов. Относительно prooestrus она наблюдала, что цитоплазма небольших эпителиальных клеток окрашивается, равным образом, как гематоксилином, так и эозином или же бисмарк-брауном.

CYTOLOGICAL DIFFERENTIATION OF THE GENITAL CYCLE PHASES  
IN THE FEMALE ALBINO MOUSE

M. M.—ODORFER

The four phases of the genital cycle of the female albino mouse were further differentiated by means of vaginal smears. It has been observed, that during oestrus size and staining of granules undergo changes. The cellular elements of the metoestrus were found to be merely granules and leucocytes. On the basis of the morphological characteristics of epithelial cells and leucocytes, further of the amount and quality of mucus, dioestrus could be divided into four stages. All of these were seen to occur only during long cycles. In prooestrus the cytoplasm of small epithelial cells was found to take equally haematoxylin and eosin, as well as Bismarck brown.

Dr. Magdolna M.—ODORFER, Budapest VIII., Puskin u. 3. Ungarn.