

Beobachtungen zur Beschleunigung der Geschlechtsreife junger Mäuseweibchen durch die Gegenwart adulter Männchen und durch exogenes Oestrogen

Observations on the Acceleration of the Sexual Maturation of Female Mice by the Presence of Males and by Exogenous Oestrogen

SUZANNE BLOCH

Universitäts-Frauenklinik Basel, Schanzenstrasse 46, CH-4004 Basel (Schweiz), 1. Juli 1976.

**Summary.** The influence of the presence of adult males on the acceleration of sexual maturation of female mice was examined under various experimental conditions and compared with the influence of exogenous oestrogen. The criteria of sexual maturation were not equally influenced. It is concluded that sexual maturation is a complex feature and that acceleration of single criteria does not signify sexual maturation.

VANDENBERGH<sup>1,2</sup>, VANDENBERGH, DRICKAMER and COLBY<sup>3</sup> stellten bei der weiblichen Maus einen beschleunigenden Effekt der Gegenwart adulter Männchen auf die Geschlechtsreife der Weibchen fest und konnten diese Wirkung auf den Geruch der Männchen, speziell ihres Urins, zurückführen. Die Kriterien der Geschlechtsreife waren: Die Eröffnung der Vagina, der erste Oestrus, die erste Begattung. Da wir (BLOCH<sup>4,5</sup>) angenommen haben, dass die Gegenwart der Männchen beim Weibchen eine Oestrogensekretion hervorruft, haben wir die Wirkung der Gegenwart der Männchen auf die Beschleunigung der weiblichen Geschlechtsreife mit der Wirkung exogen zugeführten Oestrogens verglichen. Die Versuche wurden mit Mäusen des Stammes NMRI durchgeführt, die 9 verschiedenen Versuchsanordnungen unterworfen wurden.

**Gegenwart der Männchen.** 1. Junge Weibchen wurden ohne Vater und ohne männliche Wurfgeschwister aufgezogen und dienten als Kontrollen. Nach dem ersten Oestrus wurden junge, geschlechtsreife Männchen zu den Weibchen gebracht. 2. Die jungen Weibchen wurden in Gegenwart des Vaters aufgezogen. 3. Ausser dem Vater waren mehrere adulte Männchen im Käfig der jungen Weibchen. 4. Die adulten Männchen wurden erst nach 3-4 Wochen zu den Weibchen gegeben.

**Exogenes Oestrogen.** 5. Der Rücken der säugenden Mütter wurde am 15. und 16. Tage mit Oestrogen (Oestradiol-Dipropionat, Ovocyclin-Salbe Ciba) eingerieben. 6. Der Bauch der säugenden Mütter wurde am 15. und 16. Tage mit Ovocyclinsalbe eingerieben, wobei vermieden wurde, die Zitzen der Milchdrüsen mit der Salbe in Berührung zu bringen, um eine orale Einnahme durch die Jungen zu vermeiden. 7. Den jungen Weibchen wurde an 2 Tagen der dritten Lebenswoche 0,0005 µg Oestradiol-Dipropionat (Ovocyclin) s.c. injiziert. 8. Den jungen Weibchen wur-

den an 2 Tagen der dritten Woche 0,05 µg Ovocyclin injiziert. 9. Den jungen Weibchen wurden an 2 Tagen der dritten Woche 5 µg Ovocyclin injiziert.

Als Kriterien der Geschlechtsreife registrierten wir: a) Die Eröffnung des vaginalen Verschlusses (der bei der Maus nicht durch eine Membran, sondern durch einen kompakten Gewebepfropf gebildet wird). b) Den ersten Oestrus. c) Die erste Begattung. d) Den ersten Wurf.

Die Resultate sind in der Tabelle zusammengestellt. Wie daraus ersichtlich ist, wurden die verschiedenen Kriterien unterschiedlich beeinflusst.

a) Die Eröffnung der Vagina wurde in allen Versuchen beschleunigt, aber durch die exogenen Oestrogene deutlich stärker als durch die Gegenwart der Männchen. Da in Versuchen über die Blockierung der Gravidität die Gewöhnung an die Gegenwart des Männchens deren nidationshemmende Wirkung aufhob (BLOCH<sup>6</sup>), wurden im Versuch 4 die Männchen erst nach 3-4 Wochen zu den Weibchen gebracht. Die Öffnung der Vagina erfolgte in diesem Versuch nicht früher als durch die Gegenwart der Männchen, die seit der Geburt bei den Weibchen waren, die also an sie gewöhnt waren, wohl aber der erste Oestrus.

b) Der erste Oestrus wurde durch die Gegenwart der Männchen nur beschleunigt, wenn diese erst später zu den Weibchen gebracht wurden. Für dieses Kriterium

<sup>1</sup> J. G. VANDENBERGH, *Endocrinology* 87, 345 (1967).  
<sup>2</sup> J. G. VANDENBERGH, *Endocrinology* 84, 658 (1969).  
<sup>3</sup> J. G. VANDENBERGH, L. C. DRICKAMER and D. R. COLBY, *J. Reprod. Fert.* 28, 397 (1971).  
<sup>4</sup> S. BLOCH, *J. Endocr.* 49, 431 (1971).  
<sup>5</sup> S. BLOCH, *J. Endocr.* 57, 185 (1973).  
<sup>6</sup> S. BLOCH, *J. Reprod. Fert.* 38, 469 (1974).

Alter der Weibchen in Tagen beim Eintritt der Kriterien der Geschlechtsreife

Versuch	Eröffnung der Vagina (Tage)	N ♀	p	1. Oestrus (Tage)	N ♀	p	Erste Begattung (Tage)	N ♀	p	Erster Wurf (Tage)	N ♀	p
Kontrollen	31,78±3,54	50		35,90±4,64	50		48,00± 3,80	30		67,53± 5,78	49	
Ein adultes Männchen	30,94±2,59	33	n.s.	35,77±3,78	34	n.s.	47,92± 8,93	24	n.s.	67,13±11,45	32	n.s.
Mehrere adulte Männchen	28,51±2,75	45	<0,01	36,42±6,70	34	n.s.	44,15±13,81	13	n.s.	74,42±15,07	25	<0,01
Männchen später	29,73±3,99	62	<0,01	33,65±4,67	48	<0,05	48,42±15,41	38	n.s.	84,00±20,08	37	<0,01
Rücken der Mutter	21,12±2,59	59	<0,01	21,82±2,91	56	<0,01	40,77± 8,78	35	<0,01	66,90±10,19	52	n.s.
Bauch der Mutter	18,87±0,88	55	<0,01	19,30±0,83	47	<0,01	38,90±11,07	38	<0,01	63,87±11,63	39	<0,05
Oestrogen (0,0005 µg)	26,28±3,25	32	<0,01	29,29±3,49	28	<0,01	45,84±10,61	19	n.s.	66,04±11,07	28	n.s.
Oestrogen (0,5 µg)	21,20±0,76	25	<0,01	21,88±0,67	25	<0,01	44,95± 9,73	17	n.s.	65,95± 6,55	19	n.s.
Oestrogen (5 µg)	17,50±0,52	16	<0,01	18,06±0,57	18	<0,01	42,23± 6,83	13	<0,01	81,63±10,91	8	<0,01

Berechnung der Signifikanz mit Student's t-Test. n. s. = nicht signifikant.

spielt also die Gewöhnung eine Rolle. Die den Müttern applizierten Oestrogene beschleunigten den Eintritt des ersten Oestrus. Die Wirkung trat in den meisten Fällen nach der zweiten Salbenapplikation ein, der erste Oestrus meist gleichzeitig mit der Vagina-Eröffnung, bei einem Jungengewicht von nur 10–13 g, mit turgeszenter, geröteter Vulva und massiven Schollenabstrichen. Das den Jungen injizierte Oestrogen wirkte schon in sehr geringen Dosen beschleunigend. Die Dosis von 5 µg bewirkte bei allen Weibchen nach einem Tage den Abbau des Vaginalverschlusses, dem am nächsten Tage ein massiver Schollenabstrich folgte, der sich als bis zu 60 Tagen dauernder Daueroestrus erwies. Es erfolgten zahlreiche Deckakte (bei 12 Weibchen 67 in 60 Tagen), die aber nur zu 8 Graviditäten führten. Die Jungen gediehen nicht, und viele starben.

c) Die erste Begattung ist ein weniger massgebendes Kriterium als die beiden ersten, weil sie nicht nur von den Weibchen, sondern auch von den Männchen bestimmt wird. Zudem kann sie, auch bei täglicher Kontrolle, übersehen werden, weil die Kopulationen meist in der Nacht erfolgen und der Vaginalpfropf oft schon nach wenigen Stunden herausfällt oder auch bei der Inspektion noch nicht erhärtet ist. VANDENBERGH<sup>1</sup> stellte den Pfropf bei 13 von 50 Weibchen fest, die später warfen (26%), wir haben ihn bei 217 von 280 Weibchen gefunden (77,5%).

d) Der erste Wurf. Noch komplexer als Kriterium der Geschlechtsreife ist das Datum des ersten Wurfs. Konzeption und Gravidität erfordern die Koordination aller Faktoren der Genitalfunktion. Die Beschleunigung einzelner Komponenten bedeutet nicht den Eintritt der Geschlechtsreife, die erst mit der Fortpflanzungsfähigkeit verwirklicht ist. Auch beim frühen und intensiven Oestrus der Versuchsgruppe 9 traten trotz zahlreicher Begattungen die Graviditäten erst im dafür normalen Alter ein.

Die fehlende Koordination beeinträchtigt wie beim juvenilen auch beim alten Weibchen die Fertilität, das trotz fortdauernder Zyklizität nur noch wenige Graviditäten aufweist (BLOCH und FLURY<sup>7</sup>).

VANDENBERGH, WHITSETT und LOMBARDI<sup>8</sup> (Kriterium: Uterusgewicht juveniler Weibchen) bezweifeln auf Grund teilweiser chemischer Isolierung des Pheromons des männlichen Urins, die nicht auf einen flüchtigen Stoff schliessen lässt, dessen olfaktorische Wirkung, obwohl sie von Männchen, die durch ein doppeltes Drahtgitter von den Weibchen getrennt sind, und auch durch den auf die Nase der Weibchen aufgetragenen Urin der Männchen ausgeübt wird.

Die olfaktorische Wirkung des männlichen Urins auf die Nidation und die Provozierung der Zyklen (Bruce-effect, Whitten-effect) galt bisher auf Grund zahlreicher Untersuchungen als erwiesen, es wäre aber möglich, dass die Wirkung auf die einzelnen Kriterien der Geschlechtsreife von verschiedenen Komponenten des Pheromons ausgeübt wird und dass neben der olfaktorischen Wirkung auch taktile, perkutane oder andere Übertragungsweisen vorkommen, vielleicht auch durch Belegen des eigenen (oder in unseren Versuchen des mütterlichen) Fells oral eingenommene Substanzen wirksam sind. Bei den mit Oestrogen injizierten Jungen wurden nicht behandelte Wurfgeschwister, die unter den behandelten aufwuchsen, nicht beeinflusst, was für diese Behandlungsart nicht auf eine olfaktorische Wirkungsweise schliessen lässt. Die Möglichkeit verschiedener Wirkungsweisen sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

<sup>7</sup> S. BLOCH und E. FLURY, *Gynaecologia* 147, 414 (1959).

<sup>8</sup> J. G. VANDENBERGH, J. M. WHITSETT and J. R. LOMBARDI, *J. Reprod. Fert.* 43, 515 (1975).

## PRO EXPERIMENTIS

### Enrichment in Spontaneous and Complement Dependent Rosette Forming Cell Populations Using Ficoll-Hypaque Gradient Centrifugation<sup>1</sup>

E. D. CAROSELLA<sup>2</sup>, I. PAULONE<sup>3</sup>, R. W. ROHWEDDER<sup>4</sup>, A. E. BACHMANN<sup>5</sup>

*Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, Buenos Aires (Argentina), 6 April 1976.*

**Summary.** Peripheral blood human T (TL) and B (BL) lymphocytes were separated by continuous Ficoll-Hypaque (FH) gradients. BL were found at the 1050 density interfase (70.5% EAC rosettes) with no TL (0% EAC rosettes); while at the 1068 density interfase there was an enrichment of TL (68% E rosettes) with very few BL (8.5% EAC rosettes).

Several methods have been used to separate subpopulations of lymphocytes. Continuous and discontinuous gradients with bovine serum albumin, acacia gum, and Ficoll-Hypaque (FH) have been employed to isolate human lymphocytes<sup>6,7</sup> and other mammalian<sup>8–15</sup>. We now report a quick and simple method based on FH gradients, able to separate peripheral blood human T and B lymphocytes and apparent alteration on the cell membranes.

**Materials and methods.** Total lymphocyte separation. 15 ml of defibrinated blood from normal donors were diluted with saline 1:2 and layered on a FH gradient with a 1074 density, according to THORSKY and BRATLIER<sup>16</sup>. The gradient was centrifuged at 200 g for 1 h at room temperature and the lymphocyte population was collected from the interphase.

Selection of appropriate gradients. In order to find the correct density for the separation of lymphoid subpopulations, continuous linear gradients were prepared with densities ranging between 1074 and 1048;  $2.5 \times 10^7$  total lymphocytes (from a 1074 density gradients) were layered over the continuous gradient and centrifuged as above. The type of lymphocytes that were layered at different densities were identified by their surface markers. The relevant densities were determined through refractometry.

Identification of T and B cells. T cells were identified by the spontaneous rosette technique<sup>17,18</sup> and B cells by the complement dependent rosette test<sup>19</sup>. Cell viability was tested by trypan blue exclusion.

Discontinuous gradients. Based on the results obtained with the continuous gradients, densities were controlled