

Dr Zvonimir Robić
Poljoprivredni fakultet, Zagreb

PRILOG POZNAVANJU PROMJENA TITRA ESTROGENIH HORMONA U TOKU GRAVIDITETA KOD KRAVA

DISERTACIJA — IZVOD*

Regulacija niza bioloških procesa u tijelu živih organizama se odvija pod uplivom neuroendokrinog kompleksa.

U tom sklopu zbivanja, estrogene hormoni igraju znatnu ulogu. Smatra se da estrogene hormoni reguliraju rast i razvitak ženskih individua u postnatalnom a vjerojatno i u embrionalnom stadiju života.

Okolnost, da je spol genetski određen u času oplodnje, određuje hoće li se u indiferentnom stadiju razvijati kora ili srž klične žlijezde.

Kod ženskih individua dolazi do razvoja kore klične žlijezde iz koje se kasnije razvije ovarij.

Ovarij putem sekrecije estrogene hormona uvjetuje modifikacionu (fenotipičnu) determinaciju u smjeru ženskog individua.

U postnatalnom životu izvjesni organi pokazuju pojačanu reakcionu sposobnost na djelovanje estrogene hormona. Ova vrst organa je poznata pod nazivom efektorni organi (target organi).

Izraziti efektorni organi na kojima se očituje djelovanje estrogene hormona su hipofiza, genitalni trakt, mliječne žlijezde i vezivno tkivo.

Pored mogućnosti djelovanja estrogene hormona na efektorne organe, postoji veća ili manja osjetljivost staničnog metaboličkog sistema na estrogene hormone.

Tako na primjer prema navodima iz PINCUS-a (1955) estrogene hormoni djeluju stimulatorno na rast epitelnog tkiva u uterusu, vagini i jajovodu. Zatim učestvuju u formiranju sekundarnih spolnih oznaka.

Isto tako u zajednici s gonadotropnim hormonima utječu na odvijanje spolnog ciklusa.

Pored navedenih djelatnosti, postoji još dugi niz fizioloških procesa na koje djeluju estrogene hormoni. Na osnovu navedenih efekata estrogene hormona, nauka je stala na stajalište da je uloga estrogene hormona u životu viših organizama regulatorne prirode.

Do nedavna se smatralo da pojedini hormoni djeluju samostalno na odvijanje fizioloških procesa u tijelu viših živih organizama.

Novija endokrinološka istraživanja opovrgla su ovo stajalište.

Tako prema navodima SCHEUNEERT-TRAUTMAN-a (1965) djelovanje hormona je moguće samo u okviru jednog složenog biološkog sistema.

* Disertacija obranjena 16. rujna 1968. godine.

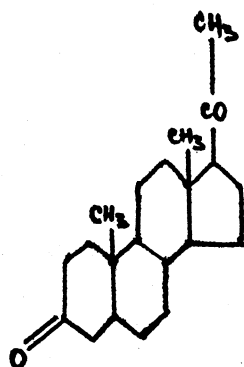
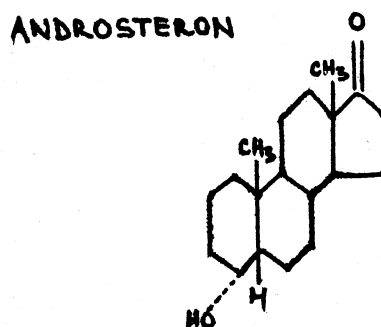
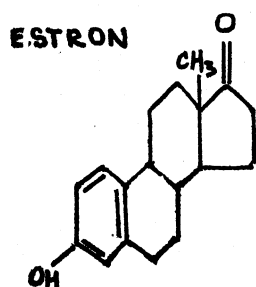
Ovaj složeni biološki sistem poznat je pod nazivom neuroendokrini kompleks. Samo nam ime govori da je taj kompleks sastavljen zapravo iz dva sistema: nervnog i endokrinog. Endokrini sistem je sastavljen iz više hormonskih grupa. Hormonske grupe koje sačinjavaju endokrini sistem jesu: hipofizarni hormoni, hormoni štitnjače, hormoni kore nadbubrežne žlijezde, spolni hormoni itd.

Djelovanje endokrinog sistema zavisi o međusobnim kvantitativnim odnosima hormona koji ga sačinjavaju. Prema tome možemo zaključiti da djelovanje estrogenih hormona zavisi o njihovom kvantitativnom odnosu spram ostalih hormona članova endokrinog sistema.

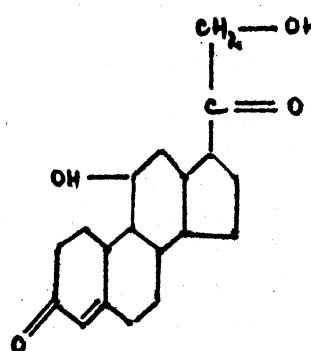
Obzirom na svoje porijeklo estrogeni hormoni mogu potjecati iz različitih izvora.

Do sada poznati izvori su animalnog, biljnog i sintetskog porijekla.

Estrogeni hormoni koji potječu iz životinjskih izvora imaju molekulu steroidne strukture. Pored estrogenih hormona steroidnu strukturu imaju još progesteron, androgeni hormoni i hormoni kore nadbubrežne žlijezde što smo i prikazali ovim formulama.



PROGESTERON



KORTIKOSTERON

Promatrajući ove formule uočavamo da estrogene i androgene hormone (spolni hormoni) na položaju broj 17 svoje molekule nemaju za razliku od progesterona i hormona kore nadbubrežne žlijezde vezan nikakav postrani lanac ugljikovih atoma.

Razlika između estrogene i androgene hormone sastoji se u tome što estrogene hormoni na položaju broj 10 svoje molekule nemaju adiranu metilnu skupinu.

Nedostatak metilne skupine na položaju broj 10 daje mogućnost da prsten A molekule estrogene hormone imade fenolni karakter.

Osnovni kemijski spoj od kojeg se odvede estrogene hormoni jeste estran $C_{18}H_{30}$ poznat još pod imenom ciklopentanoperhidrofenantren.

Glavni predstavnici estrogene hormone koji su pronađeni kod životinja su ESTRON, β ESTRADIOL i ESTRIOL.

Kako su ova tri estrogene hormone prvi pronađeni, donedavno se smatralo da su oni jedini (stoga su i nazvani klasični). Novija su istraživanja pokazala da ih imade znatno više. Tako prema navodima GREEN-a kod ljudi je do 1965. pronađeno 17 estrogene hormone, koji su s klasičnim identični samo u A prstenu svoje molekule (imaju aromatsku strukturu).

Razmještaj pojedinih funkcionalnih grupa na njihovoj molekuli se razlikuje od smještaja funkcionalnih grupa klasičnih estrogene hormone.

U tijelu viših organizama estrogene hormone nalazimo u slobodnim i konjugiranim oblicima.

Najznačajniji konjugati estrogene hormone su spojevi sa sumporom i glukuronskom kiselinom.

Prema nekim autorima kao na primjer O'DONEL (1961) jedan dio estrogene hormone u plazmi krava je vezan za albumin. Zbog nerazvijenosti tehničkih sredstava ova veza do danas nije potpuno dokazana.

Što se tiče estrogene hormone kod bilja nalazimo ih u steroidnim i nesteroidnim oblicima.

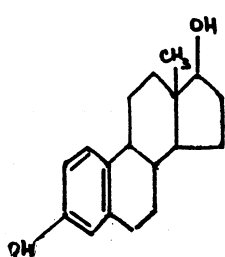
Na osnovu dosadašnjih istraživanja ovoga područja možemo zaključiti da kod biljaka prevladavaju estrogene hormoni nesteroidnog tipa. Prema HENRICKS-u (1961) najznačajniji predstavnici biljnih estrogene supstanci su genistein iz skupine izoflavona i kumestrol iz skupine kumarina. Genistein je prema POPE-u za 30 puta reaktivniji od kumestrola.

Od estrogene hormone koji potječu iz sintetskih izvora najpoznatiji je stilbestrol, dok su heksestrol i dinestrol manje poznati.

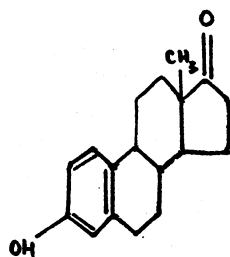
Poznato je da stilbestrol pokazuje relativno visoku estrogenu aktivnost, te se kao takav upotrebljava u stočarstvu prilikom tova, te u veterinarskoj i humanoj medicini (u terapijske svrhe).

Estrogene hormoni animalnog porijekla imaju izvjesnu sličnost sa estrogene hormonima biljnog i sintetskog porijekla. Ova sličnost se sastoji u tome da oni u svojim molekulama imaju prstenove sa aromatskom strukturom (što se vidi iz donjih formula).

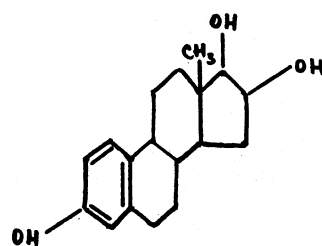
ESTROGENI HORMONI STEROIDNOG TIPA



ESTRADIOL

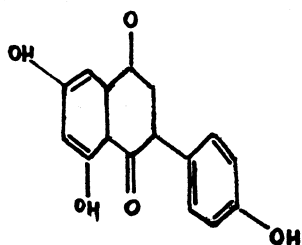


ESTRON

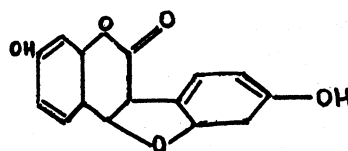


ESTRIOL

FITOESTROGENI



GENISTEIN

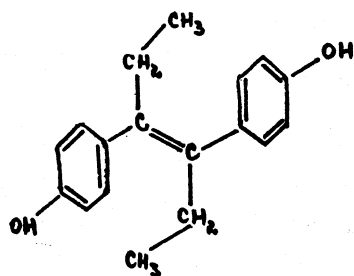


CUMESTROL

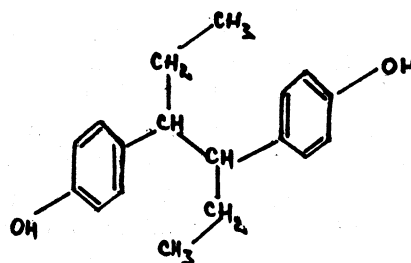
Na osnovu ove sličnosti možemo izvući zaključak o njihovoj istovrsnoj aktivnosti poznatoj pod nazivom estrogena aktivnost.

Lučenje estrogenih hormona nalazimo kod muških i ženskih životinja. Postoji nekoliko izvora estrogenih hormona kod viših organizama. Izvori estrogenih hormona kod ženskih životinja su ovariji a kod muških testisi. Pored navedenih izvora kora nadbubrežne žlijezde kod muških i kod ženskih životinja luči estrogene hormone.

SINTETSKI ESTROGENI



STILBESTROL



HEXESTROL

Značajan izvor estrogenih hormona jeste fetoplacentarna jedinica (za vrijeme graviditeta).

Fetoplacentarna jedinica po svom proizvodnom kapacitetu za estrogene hormone nadmašuje prethodno navedene izvore. Po pitanju biogeneze estrogenih hormona dosada se mnogo ne zna. Na osnovu istraživanja velikog broja autora smatra se da su acetati glavni ishodišni materijal za sintezu estrogenih hormona. Kao prilog postavci o sintezi estrogenih hormona iz acetata navest ćemo istraživanja SAVARD-a (1958). SAVARD je injicirao kobilu acetate markirane s radioaktivnim ugljikom (^{14}C). Nakon izvjesnog vremena po injiciranju u mokraći kobile su pronađeni radioaktivni metaboliti estrogenih hormona.

Način djelovanja estrogenih hormona do danas nije sasvim razjašnjen.

Razlog ove nejasnoće leži u činjenici da do sada nisu sasvim poznati niti metabolizam niti mehanizam djelovanja estrogenih hormona.

BREUER (1962) smatra da je metabolizam estrogenih hormona jedan složen biokemijski proces.

Ovaj proces započinje biogenezom pa preko intermedijarnog metabolizma završava konjugacijom i degradacijom estrogenih hormona. Konjugacija i degradacija estrogenih hormona se vrši u jetri nakon čega se putem bubrega izlučuju u mokraću kao otpadni produkt.

Jedna od najznačajnijih reakcija koja se zbiva u toku intermedijarnog metabolizma jeste reverzibilna reakcija prelaska estrona u estradiol ($\text{E}_1 \rightleftharpoons \text{E}_2$). Ova reakcija igra jednu od bitnih uloga prilikom procesa bioksidacije. Prema ZARROW-u (1964) uloga estrogenih hormona prilikom procesa biooksidacije se tumači time što oni igraju ulogu koencima encima dehidrogenaze prilikom procesa transhidrogenacije.

U pogledu objašnjenja mehanizma hormonalnog djelovanja, angažirali su se brojni istraživači no niti jedan od njih nije mogao dati zadovoljavajući odgovor.

Tumačenja ovih autora su bila uglavnom slična. Ovdje smo izabrali tumačenje HECHTER-a (1955) (budući da je ono najtipičnije za problematiku djelovanja hormonalnog mehanizma).

Hechter u svom tumačenju mehanizma hormonalnog djelovanja navodi 3 hipoteze na osnovu kojih možemo stvoriti izvjesne pretpostavke o hormonalnom djelovanju.

Prva od ovih triju hipoteza se temelji na staroj Ehrlichovoj teoriji o postojanju grupa receptora na staničnoj membrani. Prema ovoj hipotezi estrogenski hormoni stupaju u kemijsku reakciju s navedenim receptorima.

Posljedica ove reakcije je promjena fizikalno-kemijskog stanja stanične mebrane, što se očituje u povećanju njenog permeabiliteta (propustljivosti).

Druga hipoteza je nešto novijeg datuma, a postavio ju je 1941. Green. Prema Greenu hormoni igraju ulogu koencima prilikom encimatskih reakcija.

Treća hipoteza se zasniva na pretpostavci da estrogenski hormoni djeluju kao aktivirajuća supstanca na odvijanje niza metabolijskih procesa (signalna teorija).

U jednom svom najnovijem napisu HECHTER (1965) smatra da estrogenski hormoni djeluju kao koencim na encim polimerazu prilikom sinteze RNK.

Uloga proteinske komponente (histoni kod sisavaca) prema navodima STILINOVIĆ-a 1966. godine nije razjašnjena, ali postoji gledište o histonskoj blokadi izvjesnih dijelova spirale DNK, čime je vjerojatno uvjetovana diferencijacija tkiva kod više staničnih organizama. Time je u stvari omogućeno na izvjesnim mjestima razdvajanje dvostruke spirale DNK, a time se oblikuje nukleusov kalup. Prema tom kalupu u određenim uvjetima će se oblikovati potrebna m-RNK (glasonoša RNK) i ostale RNK.

Ta se pojava manifestira u novim kvalitetnim promjenama na živom organizmu u vidu sinteze određenih proteinskih molekula, odnosno fermenta u stanici. Dosadašnja istraživanja pokazala su da estrogenski hormoni stimuliraju te procese, pa prema tome oni su i faktori koji u određenoj situaciji uklanjaju histonsku blokadu na određenim dijelovima (genima) spirale DNK. Time je omogućena aktivnost gena koji se nalaze locirani na dotičnom mjestu u spirali DNK.

Na temelju svih navoda prethodno navedenih možemo zaključiti da još ne poznajemo mehanizam djelovanja hormona općenito, ali da je i najviše svjetla uneseno baš na području mehanizma djelovanja estrogenskih hormona u životinjskom organizmu.

Istraživanju estrogenskih hormona u govedarstvu prethodila su istraživanja na ovariju i placenti koje je izvršio FELLNER (1913) godine. Fellner je našao da je alkoholni ekstrakt ovarija uvjetovao hiperplaziju uterusa kod kunića. Do istih rezultata je neovisno od Fellner-a došao i SEITZ (1914) godine. Veliku prekretnicu u istraživačkom radu na tome području predstavljalo je uvođenje bioloških metoda za određivanje estrogene aktivnosti. Prvi biološki test na osnovu kojega se numerički izražavala estrogenska aktivnost bio je Allen-Doisey-ev test izveden 1923. godine, a upotrebljava se još i danas (EMENS 1950). Prva istraživanja u govedarstvu pomoću toga testa izvršili su 1927. PARKES i BELLERBY. Ta istraživanja su izvršena na uterusu i placenti krava.

Istraživači su pronašli da uterus čija je prosječna težina iznosila 2,163 kg dao 9,492 g »suhe hormonske supstance«, što je odgovaralo 809,8 mišjih jedinica (1 mj = 100 ng estrona). Daljnjim istraživanjima na području estrogenih hormona kod goveda prešlo se na analizu njihovog sadržaja u tjelesnim tekućinama. Budući da još nisu bile razvijene metode za direktno kvantitativno određivanje estrogenih hormona, to su sva tadašnja istraživanja zasnovana na mjerenju estrogene aktivnosti (biološki testovi). Kao primjer takvog istraživanja jeste određivanje estrogene aktivnosti urina gravidnih krava. Ta istraživanja je sproveo Zondek 1928. godine dobivši aktivnost od 4.000 do 6.000 mj. nakon prerade 200 l kravljeg urina.

Nastavak toga istraživanja su radovi HISAW-a i suradnika te NIBLER-a i suradnika.

HISAW i suradnici (1929. godine) utvrdili su da je došlo do porasta estrogene aktivnosti u urinu u razdoblju od 45-og do 100-og dana gravidnosti. Do kraja graviditeta estrogena aktivnost je iznosila i do 6.000 štakorskih jedinica.

NIBLER i suradnici (1929 godine) su zapazili isto porast estrogene aktivnosti između 45-og i 100-og dana graviditeta.

Za razliku od HISAW-a, NIBLER i suradnici su na kraju graviditeta našli aktivnost samo od 500 štakorskih jedinica. Godinu dana kasnije TURNER i suradnici, među kojima se nalazi i NIBLER 1930. godine pronalaze da krave istočno-frizijske pasmine izlučuju više estrogena od krava jersey pasmine. Ista ekipa pronalazi još, da mliječne pasmine krava luče više estrogenih hormona od mesnih pasmina.

U prilog te tvrdnje govori i nalaz ANDERSON-a (1934) koji je također našao veće količine estrogene supstance u urinu mliječnih u usporedbi sa mesnim pasminama. Hidrolizom urina BARIE i suradnici 1935. su pronašli da jedna litra urina od gravidnih krava pokazuje aktivnost od 17.000 mišjih jedinica.

Izolacija estrogenih hormona iz bioloških supstanci otvara mogućnost njihovog kvantitativnog određivanja.

Prvi izolirani estrogenu hormon steroidnog tipa bio je estron. Taj spoj su pronašli 1929. godine neovisno jedan od drugoga DOISY u Americi i BUTENANDT u Evropi.

Nakon otkrića estrona dolazi do izolacije estriola koju je izvršio MARRIAN (1930 godine).

Zadnji od te grupe klasičnih estrogena izoliran je estradiol kojega su izolirali SCHWENK i HILDEBRANDT (1933).

U to vrijeme pada i otkriće KOBER-ove reakcije (1931), koja je do dana današnjega ostala jedan od temelja analitičkog određivanja estrogenih hormona.

Dolaskom Drugog svjetskog rata došlo je do izvjesne stagnacije u istraživanjima te vrste. Poslije rata LEVIN 1945. je utvrdio povećanu koncentraciju estrogenih hormona u fecesu gravidnih krava.

Prema BENNET-u (1946) za vrijeme, a i neposredno poslije rata, u Australiji je primijećen znatan porast steriliteta i prolapsusa uterusa kod ovaca napasivanih na podzemnoj djetelini (*trifolium subteraneum*).

Tim je nalazom skrenuta pažnja na ishranu kao jednog od bitnih faktora koji pridonose estrogenoj aktivnosti u životinjskom organizmu.

Poslije nalaza u Australiji slijedi mnoštvo pokusa s govedima tretiranim s estrogenim supstancama (DES) imalo je za posljedicu signifikantno povećanje prirasta (ANDREWS i suradnici 1954).

Ta je pojava na veliko iskorištavana u industrijskom tovu goveda.

Istovremeno se sve više vodi računa o biljkama kao izvorima estrogene supstance. BRADBURY (1954 godine) smatra da su biljni produkti koji izazivaju estrogenu aktivnost steroidi, te ostali hidrogenantrenski spojevi i stilbeni.

Isti autor navodi neke biljke kao nosioce estrogene aktivnosti, to su sjeme zob, repe (*beta vulgaris*) itd. Navedenim radovima slijede radovi niza istraživača koji obrađuju estrogenu supstancu kod boljaka.

Od svih radova najpoznatiji su radovi POPE-a (1959. godine) koji opisuju estrogenu supstancu na britanskim pašnjacima.

Gotovo u isto vrijeme istraživanje estrogene aktivnosti biljaka vrši u Americi BICKOFF (1960. godine) koji zajedno sa svojim suradnicima opisuje estrogenu aktivnost u raznim stadijima zrelosti.

Veoma interesantne podatke daju SMITH i suradnici (1956. godine) o koncentraciji estrogene aktivnosti u mokraći gravidnih krava. Ta su istraživanja izvršena primjenom fluorimetrijske metode. Istraživanja su obavili na kravama koje su bile u različitim stadijima graviditeta. U mokraći krava gravidnih 250 dana je 32 mcg/l estradiola, i 7,2 mcg/l estriola. U krava gravidnih 275 dana nađeno je 77,6 mcg/l estradiola, 4,6 mcg/l estrona i 5,8 mcg/l estriola.

EL ATAR je (1957. godine) izvršio ispitivanje omjera količine estrogene aktivnosti u fecesu i urina kod visoko gravidnih krava. Kod krava gravidnih između 215 i 263 dana taj je omjer iznosio 1:1,25 u korist urina.

Kod krava koje su bile gravidne od 271 do 273 dana omjer estrogene aktivnosti u fecesu i urina je bio 1:1,47 u korist urina.

Jedino kod krava gravidnih od 167 do 210 dana taj je omjer bio 1:0,1 u korist fecesa.

U isto vrijeme TURNER (1957. godine) ispituje estrogenu aktivnost kravljeg mlijeka. Na osnovu dobivenih rezultata Turner zaključuje da sa razvojem graviditeta raste i estrogena aktivnost mlijeka.

VELLE VEIRT je (1958. godine) utvrdio u mokraći teladi tretirane sa 2 mg estrona slijedeće količine estrogene aktivnosti: u 250 ml mokraće prije iniciranja bilo je 10 mcg estradiola, a nakon iniciranja je bilo 7,8 mcg dok je količina estrona prije iniciranja iznosila 2 mcg, a poslije iniciranja 80 mcg.

U urinu gravidnih krava KLEIN i suradnici (1959. godine) su našli 0,3 mg estrona i 0,1 mg estradiola u 100 ml urina.

ROMMEL (1964. godine) je izvršio izolaciju estrogenih hormona iz bioloških medija pomoću mikrosublimacije. Na taj način je dobio u kristalnoj formi i estradiol iz amnionske tekućine krava, zatim je dobio estron iz urina visoko gravidnih krava. U isto vrijeme ADLERKREUTZ i suradnici (1965. godine) obavljaju analizu žuči krave gravidne 6 mjeseci. U 400 ml žuči spomenuti autori su našli 24 mcg estradiola.

Kvantitativno određivanje estrogenih hormona u urinu gravidnih krava izvršili su KUDLAČ i suradnici 1966. godine. Za analize estrogenih hormona oni su sakupljali urin kroz 24 sata.

U prvoj trećini graviditeta životinje su pokazivale kvantitativni ekvivalent jednak 85 mcg estrona. Maksimalna količina estrogenih hormona dobivena neposredno pred partus iznosila je 17.213 mcg, dok je u periodu postpartuma ta količina postepeno padala.

Napredak u istraživačkom radu na području estrogenih hormona kod goveda predstavljaju istraživanja u krvnoj plazmi. Istraživanje estrogenih hormona u krvnoj plazmi je započelo određivanjem njene estrogene aktivnosti primjenom biološkog testa. Ova je istraživanja prvi započeo SABA (1963. godine). Krvna plazma životinja obuhvaćena tim istraživanjima nije pokazala nikakve estrogene aktivnosti sve do 41 dana prije partusa. Tada je estrogena aktivnost krvne plazme ispitivanih životinja bila jednaka aktivitetu 0,028 mcg estradiola.

Na sam dan partusa estrogena je aktivnost krvne plazme ispitivanih životinja bila ravna aktivnosti 0,15 mcg estradiola. Poslije partusa se estrogena aktivnost umanjivala, tako da se nakon 11 dana sasvim izgubila. Slijedeće određivanje estrogene aktivnosti krvne plazme su izvršili POPE i suradnici (1965. godine).

Rezultati njihovoga istraživanja su pokazali da 1 l krvne plazme krava gravidnih 6 mjeseci pokazuje estrogenu aktivnost ravnu 1 mcg estrogena. Kod krava gravidnih 7 do 9 mjeseci estrogena je aktivnost 1 l krvne plazme bila ravna aktivnosti 8 mcg estrona.

Kod krava u estrusu i krava gravidnih 2 do 3 mjeseca nije utvrđena nikakva estrogena aktivnost krvne plazme.

CAR i ROBIC (1966. godine) su izvršili kvantitativno određivanje estrogenih hormona u krvnoj plazmi sterilnih i nestreilnih negravidnih krava (primjenom Ittrich-ove fluorimetrijske metode). Koncentracija estrogenih hormona u 100 ml krvne plazme nesterilnih negravidnih krava je iznosila u prosjeku 40 ng.

Kod sterilnih krava ta je koncentracija bila viša, te je u prosjeku iznosila 160 ng/100 ml.

Nešto kasnije ROBIC i CAR (1967. godine) odredili su koncentraciju estrogenih hormona u krvnoj plazmi teladi oba spola u prepubertetskoj dobi do 3 mjeseca. Koncentracija estrogenih hormona u krvi muške teladi je u

prosjeku iznosila 208 ng %. Unatoč povišene koncentracije estrogenih hormona u krvnoj plazmi ženske teladi nije utvrđena statistički opravdana razlika između obje grupe.

Istraživanja na području estrogenih hormona se temelje na dvije vrste metoda.

U prvu vrstu spadaju biološke metode, a u drugu fizikalnokemijske metode.

Biološke metode se temelje na određivanju aktivnost iskazane na nekom tkivu ili organu ispitivane životinje. Prema EMMENS-u (1950) temelj naučnog određivanja estrogene aktivnosti jeste rad STRECKARD-a i PAPANICOLAV-a 1917. godine. U tome radu spomenuti su autori opisali kornifikaciju vaginalnog epitela kod ženke zamorca za vrijeme estrusnog ciklusa.

Taj je nalaz bio podloga na osnovu koje su ALLEN i DOISY 1923. godine temeljili svoju metodu za određivanje estrogene aktivnosti, koja je uz izvjesne modifikacije u upotrebi još i danas imenom ALLEN-DOISY-ev test.

ALLEN-DOISY-ev test se zasniva na registraciji epitelijalnih promjena vaginalne sluzokože (tunica mucosa) pod utjecajem estrogenih hormona kod nezrelih mišjih ženki.

Pored ALLEN-DOISY-evog testa postoji još i ASTWOOD-ov zatim BULBRING i BRUNOV test (1935).

Fizikalno kemijske metode obuhvaćaju veliki broj metoda za kvalitativna i kvantitativna određivanja estrogenih hormona. U posljednje se vrijeme najveći broj kvantitativnih određivanja estrogenih hormona zasniva na primjeni kolorimetrijskih i fluorimetrijskih metoda. U manjoj mjeri kvantitativno određivanje estrogenih hormona se obavlja pomoću radioizotopnih, metoda plinske kromatografije i metoda masenespektografije.

Kolorimetrijska metoda se temelji na mjerenju ekstinkcije ulaznog intenziteta svjetla. Jedna od tipičnih predstavnika kolorimetrijskih metoda jeste metoda po OERTL-u (1962). Ta se metoda temelji na hidrolizi i ekstrakciji estrogenih hormona iz krvne plazme. Na taj se način dobivaju purificirani hormoni. Poslije purifikacije hormoni se podvrgavaju tretmanu s koncentriranom sumpornom kiselinom i kuhaju u vreloj vodi. Nakon završenog kuhanja doda im se otopina p-nitrofenola otopljenog u tetrakloreтанu. Poslije dodavanja p-nitrofenola stvara se kompleks kromogena, koji se može kolorimetrijski odrediti. Reakciju koja je dovela do stvaranja kromogena otkrio je KOBER još 1931. godine.

Daljnijim istraživanjem je utvrđeno da svjetlo živine lampe propušteno kroz zeleni filter (546 m μ) pobuđuje fluorescencu. Intenzitet pobuđene energije odgovara količini estrogenih hormona u ispitivanom uzorku.

Metodu fluorimetrijskog određivanja estrogenih hormona u tjelensim tekućinama je razradio ITTRICH (1958. i 1961. godine). Prema STRICKLER-u 1961. godine primjenom ITTRICH-ove metode mjerenja fluorescencije povećana je osjetljivost u određivanju estrogenih hormona.

Od niza radioizotopnih metoda najpouzdanija je dvostruka derivatna metoda prema SWENSDEN-u (1960. godine). Ova metoda koristi ^{131}J i S_{34} iskoristavajući mogućnost jodiranja i sulfoniranja izvjesnih položaja na molekuli estrogenih hormona.

Iz naprijed iznesenog se vidi da se u istraživanju estrogenih hormona primjenjuje veliki broj metoda. Osvrnuvši se na istraživanje estrogenih hormona u krvnoj plazmi goveda, uočljivo je da su ona do sada obavljena jedino primjenom bioloških metoda SABA (1964. godine), POPE (1965. godine).

Unatoč svojoj osjetljivosti na estrogenu supstancu, biološki testovi imaju i svoj nedostatak.

Taj se nedostatak očituje u tome, da nikada ne postoji apsolutna sigurnost da je reakcija pokusnih životinja izazvana jedino pod utjecajem tretmana s estrogenim supstancama. Stoga je unatoč pouzdanih bioloških testova, nemoguće tačno kvantitativno odrediti estrogene hormone u tjelesnim tekućinama živih bića.

Najtačnije kvantitativno određivanje estrogenih hormona moguće je jedino primjenom fizikalno-kemijskih metoda. Pomoću kolorimetrijskih i fluorimetrijskih metoda moguća su određivanja koncentracije estrogenih hormona u slučajevima određivanja ukupne količine. Ukoliko se radi o proučavanju metabolizma estrogenih hormona u svakom slučaju su preporučljive metoda plinske kromatografije i metode masene spektrografije.

Glavni problem određivanja koncentracije estrogenih hormona (primjenom fizikalno kemijskih metoda) sastoji se u njihovoj purifikaciji.

Purifikacija ekstrakta estrogenih hormona se obavlja primjenom kromatografije (stupac, papirna i tankoslojna kromatografija).

U ovome našem slučaju prišlo se istraživanju koncentracije estrogenih hormona kod krava u različitom stadiju graviditeta primjenom fluorimetrijske metode (Ittrichova metoda), kao najprikladnije u ovom momentu.

Između niza fizioloških funkcija na koje imaju upliv estrogeni hormoni jedna od najvažnijih jeste svakako proces reprodukcije.

Proces reprodukcije pripada među osnove proizvodnje domaćih životinja. Ukoliko dolazi do poremećaja u procesu reprodukcije, to se onda odražava u proizvodnji mesa, mlijeka, jaja itd. Dosadanjim istraživanjima utvrđeno je djelovanje estrogenih supstanci na proces reprodukcije.

BENETS (1946. godine) i EMMENS (1950. godine) govore da ishrana životinja s hranom bogatom estrogenim supstancama dovodi do poremećaja u procesu reprodukcije.

Istraživanja SABA-e (1963. godine) i POPE-a (1965. godine) su pokazala povećanu estrogenu aktivnost krvne plazme gravidnih krava u toku zadnjih stadija graviditeta. Isto tako iz rezultata istraživanja CAR-a i ROBIĆ-a (1966. godine) se vidi da postoji statistički opravdana povezanost između povećane koncentracije estrogenih hormona u krvi goveda sa sterilitetom.

Isto tako prema ROBIĆ-u i CAR-u (1967. godine) postoji povećana koncentracija estrogenih hormona u krvnoj plazmi teladi oba spola u predpubertetskoj dobi.

Od citiranih autora samo su SABA i POPE ispitivali koncentraciju estrogenih hormona u toku graviditeta. No ta istraživanja nisu obuhvatila cijeli tok graviditeta (uz to su to bili i biološki testovi), nego samo više stadije.

Na taj su način ostale nepoznate koncentracije estrogenih hormona u početnim stadijima graviditeta.

U cilju razjašnjavanja tih promjena od ranog stadija (40-og dana) pa do najkasnijih stadija (284-og dana) graviditeta, prišlo se istraživanju koncentracije estrogenih hormona u krvnoj plazmi 44 gravidne simentalke krave.

MATERIJAL I METODA RADA

Određivanje koncentracije estrogenih hormona je izvršeno na 44 gravidne krave simentalke pasmine. Ispitivane životinje su podijeljene u 4 grupe prema stadiju graviditeta i to na slijedeći način:

1. grupa	10 živ. grav.	40— 76 dana	u prosj.	58,90 dana	
2. "	13 "	" "	111—149 "	" "	127,06 "
3. "	11 "	" "	158—222 "	" "	186,36 "
4. "	10 "	" "	243—284 "	" "	266,70 "

Za ispitivanje koncentracije estrogenih hormona u krvnoj plazmi uzimali smo jednokratno 1000 ml krvi iz vene jugularis.

Dobivenu krv smo heparinizirali sa 1 ml heparina kako bi spriječili grušanje.

Kemijsko određivanje estrogenih hormona u krvnoj plazmi gravidnih krava izvršeno je primjenom Ittrichove metode (1959. g. i 1962. g).

Prije početka analitičkog postupka, bocu s uzorkom krvne plazme smo izvadili iz hladnjaka i zagrijali u vodenoj kupelji kod 38° do 40°C. Bocu s uzorkom smo držali u toploj kupelji do potpunog otapanja njenog sadržaja (odleđivanja).

Kada je otapanje bilo završeno u Erlenmayerovu tikvicu od 500 ml smo stavili 50 ml otopljene krvne plazme, zatim dodali 40 ml aque destillatae steril.

Tome sadržaju smo dodali 6 ml koncentrirane solne kiseline (p. a.), poslije čega je čitava sadržina tikvice promućkana i podvrgnuta hidrolizi u vodenoj kupelji.

Sve upotrebene kemikalije su bile pro analysi.

Poslije jednosatne hidrolize, tikvica s hidrolizatom se hladila pod tekućom vodom. Poslije hlađenja hidrolizat je prebačen u lijevak za odjeljivanje zapremine 1000 ml gdje mu je dodano najprije 16 ml 10/n NaOH, a zatim 40 ml benzola.

Poslije dodavanja spomenutih otopina čitav sadržaj lijevka je muškan 3 minute.

Tim postupkom započinje proces ekstrakcije estrogenih hormona od neutralnih steroida. Pošto je mućkanje sadržaja lijevka bilo završeno dodali

smo 40 ml petroletera i ponovno mučkali 3 minute. Poslije završetka mučkanja lijevci su ostavljeni da miruju tako dugo dok se ne odijele organska (gornja) i alkalijska (donja) faza.

Kada je razdvajanje završeno ispuštena je donja (alkalijska) faza u Erlenmayrovu tikvicu, dok je gornja (organska) podvrgnuta dvokratnom pranju sa po 25 ml 1/n NaOH.

Pošto je pranje završeno ponovo se oba ekstrakta spajaju (ekstrakt sa 10/n NaOH + ekstrakt sa 1/n NaOH).

Navedenom ekstrakcijom nisu dobiveni čisti estrogenski hormoni, već se oni nalaze u zajednici s drugim steroidima.

Odvajanje estrogenskih hormona od ostalih steroida obavlja se tako da se spojeni ekstrakti podvrgnu neutralizaciji s koncentriranom solnom kiselinom sve dok se ne postigne vrijednost pH 7,00. Tako neutralizirana otopina puferizira se pomoću NaHCO₃ sve dok vrijednost pH ne iznosi 8,00 ± 0,5. Puferizirana otopina se prebacuje u lijevak za odjeljivanje gdje se podvrgava trostrukoj eterskoj ekstrakciji.

Prve dvije ekstrakcije se obavljaju svaka sa po 80 ml etera, a treća ekstrakcija se obavlja sa 40 ml etera.

Kada je ekstrakcija završena eterski ekstrakt se podvrgava pranju sa NaHCO₃ i destiliranom vodom (2 pranja sa NaHCO₃ i 2 pranja sa destiliranom vodom).

Pošto je pranje završeno eterski se ekstrakt filtrira preko brezvodnog Na₂SO₄ u tikvicu za isparavanje. Eterski ekstrakt se isparuje u vodenoj kupelji pod strujom dušika.

Temperatura vodene kupelji ne smije prelaziti 40°C (da se izbjegne eventualna razgradnja estrogena). Ispareni ostatak se otopi u 1 ml etilnog alkohola nakon čega se alkalnoj otopini doda 50 ml benzola. Poslije dodavanja benzola čitava se sadržina tikvice prebaci u lijevak za odjeljivanje, a ispražnjena tikvica se ispire sa 20 ml petroletera (ispirak se prebaci isto u lijevak za odjeljivanje). U lijevku za odjeljivanje se izvrši dvokratna ekstrakcija sa po 25 ml 1/n NaOH. Skupljenom ekstraktu se doda 5 ml koncentrirane HCl i 1 gr NaHCO₃ poslije čega se alkalni ekstrakt prebaci u lijevak za odjeljivanje.

Alkalni ekstrakt se zatim podvrgava ekstrakciji (2 puta sa po 40 ml i 1 puta sa 20 ml).

Kada je završena ekstrakcija, ekstrakt se dva puta pere vodom i na kraju se profiltrira preko bezvodnog Na₂SO₄ u tikvicu za isparavanje. Isparavanje eterskog ekstrakta se obavlja na vodenoj kupelji u struji dušika.

U cilju uklanjanja onečišćenja (masti) pristupa se provođenju procesa kromatografije u stupcu. Kromatografska kolona se priprema od slabo bazičnog Al₂O₃. Visina kolone iznosi 6 cm, a njen je promjer 0,5 cm. Prije provođenja kromatografskog procesa kolona se ispire sa 10 ml vrućeg benzola.

Proces kromatografiranja započinje tako da se isparenom eterskom ekstraktu doda 2 ml vrućeg benzola, a zatim se prenese u kolonu za kromatografiranje. Tikvicu za isparivanje podvrgava se dvostrukom ispiranju sa po 20 ml vrućeg benzola (s time da se svaki ispirak prebaci u kromatografsku kolonu).

Prvo eluiranje se obavlja sa 15 ml vrućeg benzola i eluat se baca. Drugo eluiranje se obavlja sa 20 ml 10% otopine metanola u benzolu i eluat se hvata. Kad je kromatografija završena, pristupa se pripremama za izvođenje Koberove reakcije.

U eluat se doda 1 ml 2% otopine hidrokinona u apsolutnom alkoholu, zatim da se ispari do suha u struji dušika. Ispareni ostatak se otopi sa 0,5 ml vode, pa mu se oprezno doda 0,74 ml koncentrirane H_2SO_4 . Pošto se doda koncentrirana sumporna kiselina sadržaj tikvice se stavi u kipuću vodenu kupelj gdje ostaje 40 minuta. Poslije toga sadržaj tikvice se stavi u hladionik na hlađenje koje traje 5 minuta. Kada je hlađenje završeno sadržaju se doda 1 ml vode i ponovno se podvrgne hlađenju, koje u ovome slučaju traje samo 3 minute. Poslije drugog hlađenja, ohlađenom sadržaju se doda 3 ml 2% otopine p-nitrofenolau tetraklorethanu. Dobivena smjesa se podvrgne oštrom mućkanju koje traje 30 sekundi.

Kada je mućkanje završeno, smjesa se stavlja u centrifugu i centrifugira se 4—5 minuta sa 4.000 obrtaja u minuti. Poslije završenog centrifugiranja, pažljivo se odijeli supernatant i odbaci, a donji se sloj prebaci u kvarcnu kivetu zapremine 3 ml.

Prebačen uzorak u kivetu postaje sposoban za mjerenje. Prolaz svjetla valne dužine 546 m μ kroz kivetu s uzorkom estrogenih hormona pobuđuje fluorescenciju, koja se registriira na skaleru spektrofotometra. Fluorimetrijsko je određivanje estrogenih hormona izvršeno pomoću spektrofotometra firme Zeiss model PMQ II uz primjenu fluorescentnog dodatka. Izvor svjetla je živina lampa jakog intenziteta na liniji 546 m μ . Kao komparator služi 5,3% otopina fluorosceina. Kao standard služila je alkalna otopina estrogenih hormona u slijedećem omjeru (po Oertl-u):

2 estron : 1 estradiol : 1 estriol

Izrada je radnog standarda izvršena odgovarajućim razrjeđenjem tako da su se standardi kretali od 0,00—0,500 mcg estrogenih hormona. Standardna je otopina estrogenih hormona pripravljena otapanjem 1 mg estrona, 5 mg estradiola i 5 mg estriola u 25 ml apsolutnog alkohola. Uzorci krvne plazme svake životinje rađeni su u triplikatu.

Iskorištenje metode jest 49,03% a reproducibilnost 99,00%.

Na osnovu rezultata mjerenja fluorescencije standardne otopine estrogenih hormona (provedene kroz cijeli proces) izračunali smo baždarnu krivulju

$$\hat{y} = -128,1743 + 16,4168 x - 0,0808 x^2$$

REZULTATI ISTRAŽIVANJA

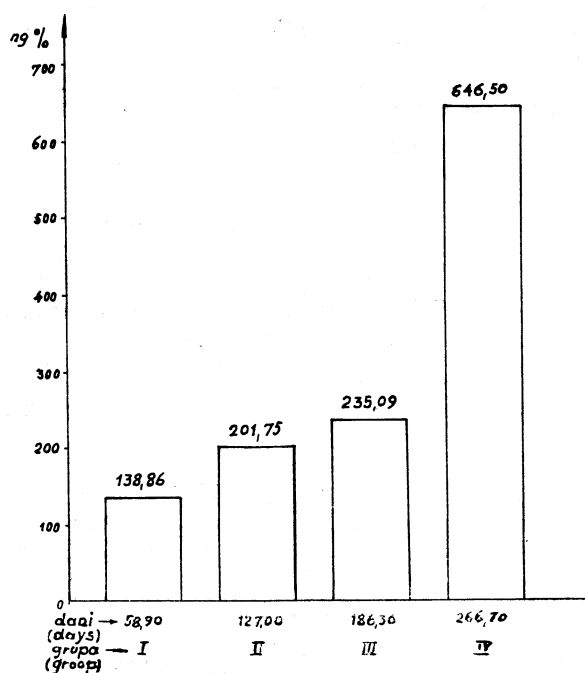
U tabeli broj 1 su prikazani rezultati istraživanja koncentracije estrogenih hormona u pojedinim fazama graviditeta.

Tabela 1 — Rezultati istraživanja koncentracije estrogenih hormona u krvnoj plazmi krava za vrijeme graviditeta

Table 1 — The results of the investigation into the level of oestrogen hormones in cows plasma

Broj životinja (n) Number of animals (n)	Grupa Group	Prosječno trajanje gravid. u danima Average duration of gravidity in days	Prosječna koncentracija estrogenih hormona ng/% Average concentration of oestrogen hormones ng%	S	S _x
10	I	58,90	138,86	50,35	15,95
13	II	127,00	201,75	55,56	15,41
11	III	186,36	235,09	91,74	27,66
10	IV	266,70	646,50	286,47	90,59

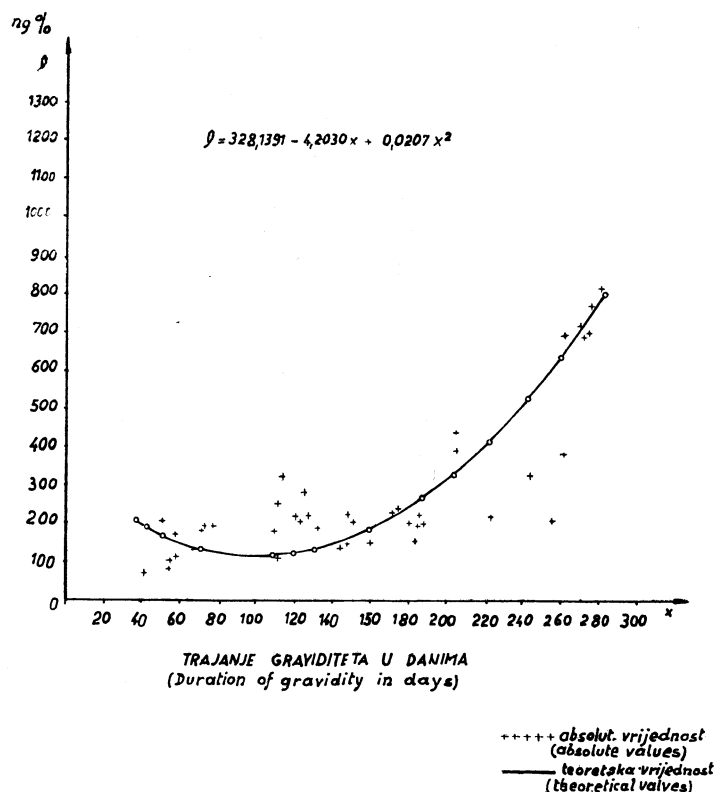
Grafički prikaz koncentracije estrogenih hormona u raznim stadijima graviditeta je prikazan u grafikonu broj 1.



Grafikon 1 — Grafički prikaz koncentracije estrogenih hormona u raznim stadijima graviditeta

Fig No 1 — Graphic Presentation of the level of oestrogen hormones during various stages of pregnancy

Grafički prikaz kretanja koncentracije estrogenih hormona u toku cijeloga graviditeta je prikazan u grafikonu broj 2.



Grafikon 2 — Grafički prikaz koncentracije estrogenih hormona u toku graviditeta

Fig No 2 — Graphic presentation of oestrogen concentrations during pregnancy

Koncentracija estrogenih hormona u toku cijeloga graviditeta je izražena jednadžbom

$$\hat{y} = 328,1391 - 4,2030 x + 0,0207 x^2$$

Statističkom obradom podataka nismo našli statistički opravdanu razliku u koncentraciji estrogenih hormona između I i II grupe.

DISKUSIJA

Iz dobivenih rezultata je očito da se koncentracija estrogenih hormona mijenja po zakonu kvadratne funkcije. Grafički prikaz ove kvadratne funkcije jeste parabola s minimumom u 102-om danu graviditeta (grafikon broj 2).

Progresivno smanjivanje koncentracije estrogenih hormona jeste posljedica progesteronske aktivnosti u početnom i srednjem stadiju graviditeta.

Ova progesteronska aktivnost ima za cilj da spriječi lučenje estrogenih hormona (čime je spriječeno daljnje sazrijevanje Graf-ovih folikula). Počevši od 140-og dana zapažamo progresivni porast koncentracije estrogenih hormona.

U razdoblju od 250-og dana pa do kraja graviditeta uočen je nagli porast gotovo skok (grafikon broj 2).

Ova velika količina estrogenih hormona u ovome periodu imade zadatak da pripremi vime za sekreciju mlijeka, porođajni kanal za prolaz fetusa i da senzibilizira miometrium.

Prilikom prethodne interpretacije rezultata naglasili smo da ne posoji statistički opravdana razlika u koncentraciji estrogenih hormona između II i III grupe (ispitivanih životinja). Smatramo da je do ove oscilacije došlo pod utjecajem progesterona. Istraživanja kretanja koncentracije estrogenih hormona u krvi u toku graviditeta su vršili SABA (1964) i POPE (1965).

SABA je prilikom svojih ispitivanja utvrdio da je estrogena aktivnost 100 ml krvne plazme krava gravidnih 8 mjeseci jednaka aktivnosti 28 ng estriola, dok je na sam dan partusa dosegla vrijednost od 158 ng estriola.

POPE je utvrdio da estrogena aktivnost 100 ml krvne plazme krava gravidnih 5—6 mjeseci je jednaka 100 ng estrogena. Isti autor je utvrdio da 100 ml krvne plazme krava u 9. mjesecu graviditeta pokazuje aktivnost koja je jednaka aktivnosti 700 ng estrogena.

Rezultati istraživanja SABA su znatno niži od rezultata POPE-a i naših. Razlog ove razlike leži vjerojatno u osjetljivosti metode biotesta.

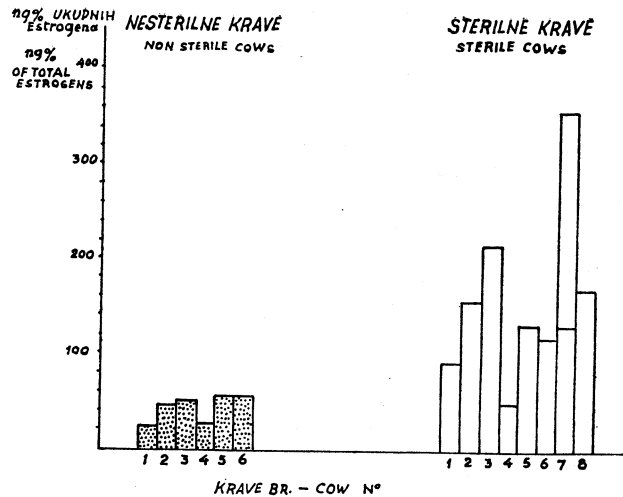
Što se tiče usporedbe POPE-ovih rezultata s našima utvrđeno je da se oni u zadnjim stadijima graviditeta potpuno podudaraju dok su se u razdoblju 150-og do 180-og dana graviditeta znatno niži.

Ova razlika se može protumačiti neosjetljivošću POPE-ove metode u nižim područjima koncentracije estrogenih hormona. Na osnovu prikazanih podataka se jasno vidi da je osjetljivost Ittrich-ove fluorimetrijske metode znatno viša od ovdje prezentiranih biotestova koje su upotrebljavali POPE i SABA.

U prilog ove tvrdnje govore i neki rezultati naših prethodnih istraživanja (CAR — ROBIĆ 1966) koji su prikazani u grafikonu broj 3.

U toku ovih istraživanja smo utvrdili statistički opravdanu razliku između sterilnih i nesterilnih životinja.

Ovu pojavu možemo protumačiti na slijedeći način. Od prije nam je poznato da je djelovanje estrogenih hormona zavisno o njihovim međusobnim kvantitativnim odnosima prema drugim hormonima koji sačinjavaju endokrini kompleks. Kvantitativni odnosi estrogenih hormona prema drugim članovima endokrinog sistema se tumače na osnovu njihovih koncentracija u pojedinim tjelesnim medijima (krv, mokraća, žuč). (1956) smatra da se normalno odvijanje fizioloških procesa u organizmu, može vršiti jedino kod određenih hormona.



Grafikon 3 — Koncentracija estrogenih hormona u perifernoj krvi nesterilnih i sterilnih krava
 Fig No 3 — The concentration of oestrogens in the peripheral blood of non-sterile and sterile cows

Na osnovu toga on je u pogledu estrogenih hormona i postavio hipotezu koja glasi: »Normalno odvijanje fizioloških procesa je moguće ako se koncentracija estrogenih hormona u tijelu životinja kreće između dva određena nivoa (praga)«. Kretanje hormonalnih titara izvan ovih pragova dovodi do hormonalnog disbalansa. Tako povišene koncentracije dovode do pojave smetnji u reprodukciji što obično završava sterilitetom.

Prema našem sadašnjem stajalištu gornja granica praga estrogenih hormona bi se kretala negdje između 100 i 130 ng% (u krvnoj plazmi goveda). U slučaju graviditeta situacija s obzirom na visinu praga je sasvim drugačija. Ovdje se isto može prihvatiti FOLEY-eva hipoteza i to na slijedeći način. Za vrijeme graviditeta radi se zapravo o dvije individue, koje se međusobno razlikuju po duljini fiziološkog dana. Prema BRODY-u kod mlađih životinja u kraćem vremenskom periodu odvija se veći broj fizioloških procesa nego kod starijih. U ovome slučaju se zapravo radi o integralnom efektu. S obzirom na to da su majka i fetus povezani zapravo s jednim krvotokom koji se dijeli na maternalni i fetalni.

Prema navodima SABLE već nakon 11 dana po partusu dolazi do iščeznuća povećane estrogene aktivnosti u plazmi. Ukoliko su u ovaj proces uključeni još i neki drugi faktori, kao na primjer estrogeni hormoni dijetarnog porijekla onda do ovoga iščeznuća ne dolazi.

Ukoliko je životinja bila izložena dulje vrijeme djelovanju većih količina estrogenih supstanci dolazi do oštećenja njenog regulatornog aparata za estrogene hormone, što obično onda završava trajnim sterilitetom.

Značaj dobivenih rezultata tokom istraživanja titra estrogenih hormona za vrijeme graviditeta se sastoji u tome što je dobiven numerički izraz promjena titara tokom većeg dijela graviditeta.

Ovaj dobiveni teoretski izraz se poklapa s teoretskim očekivanjima o kretanju koncentracije estrogenih hormona.

ZAKLJUČAK

1. Itrich-ovom fluorimetrijskom metodom smo uspjeli direktno odrediti koncentraciju ukupnih estrogenih hormona u krvnoj plazmi krava u toku graviditeta od 40 do 284 dana.

2. Koncentracija ukupnih estrogenih hormona izraženih u ng% pokazuje da se u toku graviditeta odigravaju značajne i statistički signifikantne promjene koje se u potpunosti slažu sa poznatim fiziološkim aktivnostima corpora luteuma i placentae (kao endokrinog organa). Grafički prikaz i u vidu parabole drugog stupnja pokazuje periode smanjene estrogene aktivnosti za vrijeme oblikovanja embionskih ovojnica, zatim drugi period pojačane aktivnosti u doba proizvodnje estrogenih hormona sa strane placentae i corpora luteuma. Time je postepeno pripremljen organizam za partus i nastupajuću laktaciju.

3. Parcijalni grafički prikazi pojedinih razdoblja istraživanog graviditeta daju nam podatke o individualnim varijacijama kod istraživanih grupa krava.

SUMMARY

The object of the experiment was to investigate the total concentration of oestrogen hormones in the cows plasma during pregnancy (from 40 till 284 days).

The cows were distributed in 4 groups (tab. 1) and average total concentration was from 138,86 (1st group) till 646 ng% (4th group).

Significant differences were found between all groups with the exception of the 2nd and 3rd groups.

The level of oestrogen hormones during pregnancy is presented by the following equation (fig 2):

$$y = 328,1391 - 4,2030x + 0,0207x^2$$

PREGLED LITERATURE

1. H. ADLERKREUTZ AND T. LUUKAINEN: Isolation and Identification of 17 Estradiol in the Bile of Pregnant Cows (J. Reprod. and Fertil. 9—137, 1965. god.)
2. J. ANDERSON: The Excretion of Oestrin in the Urine of Pregnant Cow (Vet. J. 90—295, 1934. god.)
3. F. N. ANDREWS, W. M. BEESON and F. D. JOHNSON: The Effect of Stilbestrol Dinestrol Testosteron and Progesteron on the Growth and Fatening on Beef Steers (J. of Animal Science 13—1—99, 1954.)
4. M. M. D. BARRIE, J. B. E. PATTERSON and S. W. F. UNDERHIL: The Oestrogenic Activity of the Urine of Cows during Pregnancy (Quart J. Pharm 8—424, 1935.)
5. H. W. BENNETS, E. J. UNDERWOOD and F. L. SHIER: Two Sheep Problems on Subterranean Clover Dominant Pastures (Australian Vet. J. 17—35 1946.)
6. E. M. BICKOFF, A. L. BOOTH, A. L. LIVINGSTON and A. P. HENDRICKSON: Observations on the Effect of Drying on Estrogenic Activity of Alfaala Samples of Varying Maturity (J. of Animal Science 19—3 1960.)
7. E. M. BICKOFF, A. L. BOOTH and A. P. HENDRICKSON: Some Variation in Estrogenic Activity in Fresh and Dried White Clones and the Ladine Variety (J. of Animal Science 19—4—1143 — 1960.)
8. R. B. BRADBURY and D. E. WHITE: Estrogens and Related Substances in Plant (Vit. and Horm. 12—207, 1954.)
9. H. BREUER: The Metabolism of the Natural Estrogens (Vit. and Horm. 20—316, 1962.)

10. S. BRODY: Bioenergetics and Growth with Special Reference to the Efficiency complex in Domestic, Animals (Reinhold Publ. Corp. 330 West 42 str. N. Y., 1945)
11. A. BUTENANDT: Über »Progynon« ein Kristallisiertes Weibliches Sexual Hormon (Naturwiss. 17—879, 1929.)
12. E. BULBRING and J. H. BURN: The Estimation of Oestrin and of Male Hormone in Oily Solution (J. Physiology 85—320, 1935.)
13. M. CAR, Z. ROBIC, I. BALZER i T. FRLJAN: Prilog poznavanju titra estrogenih hormona u krvi sterilnih i nesterilnih krava (Polj. Znan. Smotra, 1966.)
14. EL ATTAR, T. TURNER: Estimation of Estrogen Secretion in Dairy Cows in Late Pregnancy (J. Dairy Science 40—625, 1957.)
15. C. W. EMMENS: Hormone Assay (A. P. N. Y. 1950.)
16. O. FELLNER: Experimentale Untersuchungen über die Wirkung von Gewebsextrakten aus der Plazenta und den weiblichen Sexualorganen auf das Genitale (Archiv für Gynak 100—641, 1913.)
17. FOLEY: Physiology and Biochemistry of Lactation (Oliver Boyd, London 1956.)
18. J. W. GREEN: Recent Advances in the Determination of Estrogens (Am. of Med. Science Vol. 250—6, 1956.)
19. O. HECHTER: Concerning Possible Mechanism of Hormone Action (Vit. and Horm. 13—332, 1955.)
20. O. HECHTER and I. D. K. HALKERSTON: Effects of Steroid Hormones on Gene Regulation and Cell Metabolism (Annual Review of Physiology, Vol. 27—133, 1965.)
21. D. M. HENRICKS: Estrogenic Content of Natural Feedstuffs Including Molts (A. Sci. 661, 1961.)
22. F. L. HISAW and R. K. MEYER: Estrus Hormons in the Urine of Pregnant Cows: (Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 26—586, 1929.)
23. G. ITTRICH: Eine neue Methode zur chemischen Bestimmung des Estrogenen Hormon im Harn (Hoppe Seyler's Z. Psychiol. Chem. 312—1, 1958.)
24. G. ITTRICH: Bestimmung von Oestron, Oestradiol und Oestrol in Plasma (Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 320—103, 1960.)
25. W. KLEYN and A. WRIGHT: Steroids and Other Lipids in Pregnant Cows Urine (J. Endocrin. Vol. 13—32—45, 1959.)
26. S. KOBER: Eine kolorimetrische Bestimmung des Brunsthormones (Menformon) (Biochem. Zeitschrift. 239—209, 1931.)
27. KUDLAČ i B. STUDENČIK: Kvantitativne kemičke určeni estrogeni v moči krav vylučevanih za brezosti pred porodom a v ranem puerperiu (Veterinarna Medicina Ročník II, (XXXIX) Praha, 1960.)
28. L. LEVIN: The Fecal Excretion of Estrogen by Pregnant Cows (J. Biol. Chem. 157—407, 1945.)
29. G. F. MARIAN: The Chemistry of Oestrin (IV. The Chemical Nature of Crystalline Preparations) (Biochem J. 24, 435, 1021, 1930.)
30. C. W. NIBLER and C. W. TURNER: Ovarian Hormone Content of Pregnant Cows Urine (Proc. Soc. Exp. Biol. 26—882, 1929.)
31. V. J. O'DONEL and J. R. K. PREEDY: The Oestrogens (Hormones in Blood edited by C. H. Gray and L. C. Bacharch A. P. N. Y. — London, 1961.)
32. G. W. OERTEL: Chemische Bestimmung Steroiden in menschlichen Plasma (Springer Verlag, Berlin, 1962.)
33. A. S. PARKES and C. W. BELLERBY: Studies on the Internal Secretions of the Ovary (J. Physiol. 62—385, 1927.)
34. G. PINCUS: The Hormones (Vol. III. A. P. N. Y. 1955.)
35. G. S. POPE: Oestrogens in British Pasture Plants (J. of D. Res. 26—1—196, 1959.)
36. G. S. POPE, H. E. H. JONES and H. B. WAYNFORTH: Oestrogen in Blood of the Cow (J. Endocrin. 33—385, 1965.)
37. Z. ROBIC i M. CAR: Prilog poznavanju koncentracije estrogenih hormona kod teladi (U štampi, Veterinarski arhiv 1967.)
38. P. ROMMEL: Isolierung oestrogenen Steroide aus Körperflüssigkeiten Landwirtschaftlicher Nutztiere durch Mikrosublimation (Acta Endocrin. 45—605, 1964.)
39. K. SABA: Oestrogenic Activity in Plasma of Pregnant Cows (J. of Endocrin. 29—205, 1964.)
40. K. SAVARD, K. ANDREC, W. L. BROOKSBANK, REYNERIC and DORFMAN: The Biosynthesis of Estron and Progesterone in the Pregnant Mare (J. Biol. Chem. Vol. 231, 1958.)
41. E. SCHWENK und F. HILDERBRANDT: Reduktion des Follikelhormons (Naturwiss. 21—177, 1933.)
42. SCHEUNERT — TRAUTMAN: Lehrbuch der Veterinar — Physiologie (V. Auflag, Berlin, 1965.)
43. L. SEITZ und WINTZ und FINGERHUT: Über die biologische Function des Corpus luteum, seine chemischen Bestandteile und deren therapeutische Verwendung bei Unregelmäßigkeiten der Menstruation (Med. Voch. München 61—1657, 1914.)
44. Z. STILINOVIC: Grada i funkcija životinjske stanice (Sadržaj predavanja za postdiplomski studij iz govedarstva, 1966.)
45. R. SWENDSEN: Bestimmung von freiem Oestron und Oestradiol (Acta Endocrin. 35—161, 1960.)
46. C. W. TURNER, A. M. FRANK, C. H. LOMAS and C. W. NIBLER: A Study of the Estrus producing Hormones in the Urine of Cattle During Pregnancy (Mo. Agr. Expt. Stat. Bull. 150, 1930.)
47. C. W. TURNER: Biological Assay of Milk Estrogenic Activity (J. of D. Scien. 40—6—624, 1957.)
48. VELLE WEIRT: Studies on Estrogens in Cattle (Acta Endocrinologica 29—109, 1958.)
49. M. X. ZAROW, J. M. YOCHIM and J. L. Mc CARTHY: Experimental Endocrinology (A. P. 1964., New York — London)