

DIE NATUURLIKE ESTROGGEENAKTIWITEIT IN VOEDSEL

EN DIE RESIDUELE AKTIWITEIT IN WEEFSELS

VAN STILBOESTROL-BEHANDELDE BEESTE.

'N VERHANDELING AANGEBIED TER GEDEELTELIKE
VOLDOENING AAN DIE VEREISTES VIR DIE GRAAD
MAGISTER SCIENTIAE AAN DIE POTCHEFSTROOMSE
UNIVERSITEIT VIR CHRISTELIKE HOER ONDERWYS.

D E U R

P. J. PRETORIUS.

POTCHEFSTROOM.

J U L I E 1957.

I.	INLEIDING.....	1
II.	EKSPERIMENTELE METODEDES EN MATERIAAL.....	4
	1. Behandeling van beeste.....	4
	(a) Proef (i).....	4
	(b) Proef (ii).....	5
	2. Ander toetsmateriaal.....	6
	3. Biologiese bepalingsmetodes.....	6
III.	RESULTATE.....	9
	Proef 1. Residuele estrogeenaktiwiteit in die vleis van osse wat met 5 en 10 mg. stilboëstrol per dag behandel is.....	9
	Proef 2. Residuele estrogeenaktiwiteit in die lewer van osse wat 5 en 10 mg. stilboëstrol per dag ont- vang het.....	10
	Proef 3. Residuele estrogeenaktiwiteit in die vleis van beeste wat met 10 mg. stilboëstrol en 10 mg. stilboëstrol plus 75 mg. oureomisien per dag behandel is..	11
	Proef 4. Estrogeenaktiwiteit in vars pruime.....	12
	Proef 5. Estrogeenaktiwiteit in pruime- dante.....	14
	Proef 6. Estrogeenaktiwiteit in perskes.	16
	Proef 7. Estrogeenaktiwiteit in grond- boontjies.....	17
	Proef 8. Estrogeenaktiwiteit in grond- boontjie-koekmeel.....	18
	Proef 9. Estrogeenaktiwiteit in droë boontjies.....	19
	Proef 10. Estrogeenaktiwiteit in groen- bone.....	19
	Proef 11. Estrogeenaktiwiteit in droë ertjies.....	20
	Proef 12. Estrogeenaktiwiteit in patats..	21
	Proef 13. Estrogeenaktiwiteit in die standaard muisvoer voor en na ekstrahering.....	22
	Proef 14. Uterusgewigtoename na toe- diening van bekende hoeveel- hede stilboëstrol.....	23
	Proef 15. Estrogeenaktiwiteit in Salie- plant.....	25

Proef 16.	Estrogeenaktiwiteit in lusern- kuilvoer.....	26
Proef 17.	Estrogeenaktiwiteit in Ladino- klawer.....	27
Proef 18.	Die estrogeenaktiwiteit van drie verskillende hidroksie-chal- kone.....	28
Proef 19.	Uterusgewigtoename na toediening van bekende hoeveelhede stil- boëstrol(n Herhaling van proef 14).....	29
Proef 20.	Uterusgewigtoename na toediening van stilboëstrol alleen en stil- boëstrol en foliensuur saam.....	31
Proef 21.	Uterusgewigtoename na toediening van bekende hoeveelhede stil- boëstrol per maagbuis.....	33
Proef 22.	Invloed van toediening van ver- skillende plant-ekstrakte per maagbuis aan proefmuise.....	36
IV.	LITERATUURORSIG.....	37
1.	Metode.....	37
2.	Estrogeenaktiwiteit in Voedsel.....	42
(a)	Voorkoms van estrogene in Diere- weefsels.....	42
(b)	Voorkoms van estrogene in Plant- weefsels.....	52
(c)	Chemie van Plant-estrogene.....	55
V.	BESPREKING.....	60
1.	Metode.....	60
2.	Estrogeenaktiwiteit in Voedsel.....	71
(a)	Residuele estrogeenaktiwiteit in Diereweefsels.....	71
(b)	Voorkoms van estrogene in Plantweefsels.....	77
(c)	Chemie van Plant-estrogene.....	84
3.	Slot-opmerkings.....	85
VI.	OPSOMMING.....	90
VII.	DANKBETUIGING.....	92
VIII.	BIBLIOGRAFIE.....	93

DIE NATUURLIKE ESTROGEENAKTIWITEIT IN VOEDSEL
EN DIE RESIDUELE AKTIWITEIT IN WEEFSELS
VAN STILBOESTROL-BEHANDELDE BEESTE.

I. INLEIDING:

Estrogene kom wydverspreid in die natuur voor, in dier- en plantmateriaal en volgens Cook et al. (1934) selfs in lewelose organiese materiaal soos bitumineuse stowwe. Daar bestaan egter nog min kennis aangaande die hoeveelhede en aard van die verbindings wat in plante en in voedselsoorte voorkom, en die moontlike uitwerking wat dit by die mens kan hê. Verskeie navorsers het gevind dat plantestrogene opvallende invloed op diere kan uitoefen. Bennets et al. (1946) beskryf ernstige steriliteitsverskynsels by skape wat in Wes-Australië op klawergewasse gewei het. Die werk van Bartlett et al. (1948) en Evans en Evans (1949) toon ook die invloed op beeste en muise aan. Met die isolasie van estrogeniese isoflavone uit plante deur verskeie navorsers soos Pope et al. (1953), Cheng et al. (1953 a en b), Cheng et al. (1954), Bradbury en White (1954), Curnow en Rossiter (1955) en Carter et al. (1955) is n groot vooruitgang gemaak met die studie van plantestrogene.

Plantprodukte wat vir die mens as voedsel dien, besit volgens Dohrn et al. (1926) en Kroszczyński en Bychowska (1939) estrogeenaktiwiteit. Hulle vind in aartappels, suurdeeg, beetsaad, pietersieliewortels en sekere mintblare bepaalbare hoeveelhede aktiwiteit. Daar is volgens Bradbury en White (1954) aanduidings van estrogeenaktiwiteit in ander voedselsoorte, soos kersies, hawer en knoffel.

Die waardes wat die vroeëre navorsers gee vir die aktiwiteit, is egter baie vaag, waarskynlik ten gevolge van die gebrek aan 'n geskikte bepalingmetode.

Estrogene word vandag algemeen aangewend in die meeste wêrelddele om die produksie van vleis, melk en eiers te verhoog. Die meeste navorsers vind dat diere wat met estrogene behandel word, versnelde gewigstoename en 'n meer ekonomiese voerverbruik toon en dat in baie gevalle ook beter produkte gelewer word. Hierdie praktyk is van groot ekonomiese belang, maar daar is ook sekere gevare aan verbonde. Die moontlikheid bestaan dat daar residuele estrogeenaktiwiteit in die vleis kan wees, waardeur die hoeveelheid estrogeenaktiewe stowwe wat in die menslike dieet voorkom, verhoog kan word. Daar mag ook, veral waar van stilboëstrolinplantings by diere gebruik gemaak word, oorblyfsels van die ingeplante tablet in die afvalstowwe wat in die maak van diervoedsel gebruik word, voorkom.

Dit kan veroorsaak dat versteurings voorkom by diere waaraan bogenoemde voedsel toegedien word, soos byvoorbeeld die belemmering van die haargroei van pelsdiere.

Kennis van die absorpsie, metabolisme en uitskeiding van stilboëstrol is nog baie onvolledig; daarom kan nie met sekerheid voorspel word of die toediening van estrogene aan diere aanleiding sal gee tot residuele aktiwiteit in hul weefsels nie. Navorsers wat residuele aktiwiteit by diere gevind het na stilboëstrolinplantings, is onder andere Gowe (1949), Stob et al. (1954 a en b.) en Cairy (1955). Die hoeveelhede is egter baie gering. Met mondtoediening van stilboëstrol aan beeste vind die meeste navorsers, onder andere Preston et al. (1956), geen residuele aktiwiteit nie.

Stob et al.(1956) en Turner (1956) kon wel in sekere weefsels, klein hoeveelhede aktiwiteit vasstel.

Vanweë die gevare wat aan stilboëstrolbehandeling van diere verbonde mag wees, word die praktyk in Suid-Afrika nog by wet verbied. Omdat sekere onbekende faktore waardeur die residuele aktiwiteit in die weefsels van behandelde diere mag verskil van die waardes wat in ander wêrelddele gevind is, in Suid-Afrika mag heers, is dit noodsaaklik dat sodanige bepaling hier uitgevoer moet word. Bepaling van die residuele estrogeenaktiwiteit in die weefsels van diere wat stilboëstrolbehandeling ontvang het, is ook van fundamentele belang, aangesien dit 'n aanduiding mag wees van die metaboliese veranderinge wat stilboëstrol in die liggaam ondergaan.

Kennis aangaande die verband tussen die chemiese struktuur van 'n stof en sy estrogeenaktiwiteit is nog onvolledig. Die studierigting sal in die toekoms waarskynlik die eenvoudigste stowwe waarvan die invloed ooreenkom met dié van die natuurlike estrogene, aantoon en ook lig werp op sekere aspekte van die kankerprobleem. Die studie van plantestrogene kan 'n verdere bydrae lewer tot die oplossing van die probleem van die verband tussen chemiese struktuur en estrogeenaktiwiteit.

Die proewe wat hier beskryf word, is uitgevoer om die residuele estrogeenaktiwiteit te bepaal van vleis wat afkomstig is van osse wat mondtoediening van stilboëstrol ontvang het, asook van die vleis van beeste wat oureomisien plus stilboëstrol op dieselfde wyse ontvang het. Verder is die estrogeenaktiwiteit van 'n paar voedselsoorte veral die wat deur die mens gebruik word, ondersoek. Die estrogeenaktiwiteit is bereken in terme van die aktiwiteit van stilboëstrol.

Die estrogeenaktiwiteit van 'n paar plantpigmente wat in chemiese struktuur ooreenkoms toon met estrogeenaktiwiewe stowwe, is ook ondersoek.

II. EKSPERIMENTELE METODES EN MATERIAAL.

Hierdie navorsingswerk is in die Fisiologiedepartement van die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys uitgevoer in samewerking met die Veeteelt-afdeling van die Potchefstroomse Landboukollege. Die vleis wat ondersoek is, was afkomstig van osse wat met stilboëstrol (diëtielstilboëstrol) behandel is en van beeste wat met stilboëstrol en oureomisien behandel is op die wyse soos hieronder beskrywe:

1. Behandeling van beeste.

Gedurende die winter van 1955 en 1956 is proewe met beeste uitgevoer, by bogenoemde Landboukollege, om die invloed van toediening van stilboëstrol in die voer op die gewigstoename vas te stel. Vleismonsters waarvan die estrogeenaktiwiteit bepaal moes word, was afkomstig van beeste wat soos volg behandel is:

(a) Proef (i)

Sussex-Afrikaner-kruis-osse van 18 maande ouderdom is in drie groepe; A, B en C van 8 elk verdeel. Aan elke groep is 1 pond grondboontjie-koekmeel per os per dag toegedien. By die rantsoen van groep B is 5 mg. stilboëstrol per pond grondboontjie-koekmeel gevoeg en by die rantsoen van groep C is 10 mg. per pond gevoeg. Groep A het as kontrole gedien en het geen stilboëstrol ontvang nie; groep B se osse het dus 5 mg. en groep C se osse 10 mg. per os per dag ontvang. Verdere voeding van die osse het bestaan uit 10 pond kragvoer per os per dag wat 80% meliemeel en 10% lusernmeel bevat het en curvulahoë ad libitum.

Die behandeling is v.l.a. 107 dae lank volgehou. Die diere is almal gekastreer op 'n ouderdom van 6 tot 9 maande. Die diere is vir die hele proeftydperk in krale gehou.

(b) Proef (ii)

Hierdie diere is ook in 3 groepe van 8 elk verdeel. Groep 1 het bestaan uit 5 verse en 5 osse, groep 2 uit 4 verse en 6 osse en groep 3 uit 4 verse en 6 osse. Die diere was omtrent 18 maande oud en die rantsoen was dieselfde as vir proef (i), behalwe dat vir groep 2 in die koekmeel 10 mg. stilboëstrol gemeng is en in die grondboontjie-koekmeel van groep 3 10 mg. stilboëstrol en 75 mg. oureomisien per pond. Die diere het dus in groep 2 10 mg. stilboëstrol per bees per dag en in groep 3 10 mg. stilboëstrol en 75 mg. oureomisien per bees per dag ontvang.

Om die stilboëstrolmengsels te verkry is 1 gm. suiwel stilboëstrol noukeurig afgeweg en in 96%-etanol opgelos. Die oplossing is oor 2 pond grondboontjie-koekmeel versprei en die etanol in 'n droogoond afgedamp. Die 2 pond grondboontjie-koekmeel is daarna met 200 pond grondboontjie-koekmeel gemeng in 'n meganiese menger. Elke pond van die mengsel het dus 5 mg. stilboëstrol bevat. In die gevalle waar 10 mg. stilboëstrol per pond grondboontjie-koekmeel toegedien moes word, is dieselfde prosedure as hierbo genoem gevolg, behalwe dat 2 gm. suiwel stilboëstrol gebruik is en uiteindelik met 200 pond meel gemeng is.

Al die diere is op Onderstepoort geslag waar vleismonsters van ongeveer 2 pond van die kruisskyf ("rump steak") en van die lewer van elke dier geneem is. Die monsters van elke groep is saamgevoeg en in 'n koelkamer bewaar totdat dit getoets kon word.

Die vleis is gemaal en in n oond by 70° C gedroog. Op die stadium is die vleismonsters na die Fisiologielaboratorium van die Universiteit vervoer waar die biologiese estrogeenbepalings uitgevoer is.

2. Ander toetsmateriaal.

Die estrogeenaktiwiteit van ander soorte voedsel is ook biologies bepaal. Die voedselsoorte wat vir die mens van belang is, sluit pruime, perskes, grondbone, groen en droë bone, patats, geelwortels, uie en droë ertjies in. Dierervoedsel wat ondersoek is, sluit die volgende in: grondbone -koekmeel, lusernkuilvoer, Ladino-klawer en die muisvoermengsel. Verder is die estrogeenaktiwiteit van die Salieplant, 3, 4- dihidroksie-chalkoon, 3, 3', 4'- trihidroksie-chalkoon en 3, 3', 4, 4'- tetra-hidroksie-chalkoon ondersoek.

3. Biologiese bepalingmetodes.

Die muis wat hiervoor gebruik is, was die nakomelinge van muis wat van Onderstepoort afkomstig was. Jong wyfiemuis is op n ouderdom van ongeveer 6 weke geovariotomeer. Die diere is 14 dae lank gelaat om te herstel en vir volledige regressie van die uterus. Volgens Stob et al.(1954a) is 14 dae voldoende vir uterusregressie. Gedurende die laaste 6 dae van die regressietydperk is vaginasmere van al die muis gemaak. Die smere is gemaak met behulp van n selfgemaakte glaspijpet met n rubberdrupper soos beskrywe word deur Hawk et al.(1952). Aan die einde van die tydperk is die smere 30 sekondes lank in 96% etanol gefikseer en in Giemsa se kleurstof geplaas 20 minute lank. Die vaginasmere is mikroskopies ondersoek en daar is aangeneem dat indien die smeer meer as 1% polimorfeleukosiete vertoon, die muis volledig geovariotomeer is.

Die muis is in groepe van 10 elk verdeel op grond van hulle liggaamsgewigte. In elke geval is daar n kontrolegroep gehou wat ook uit 10 volledige geovariotomeerde muis bestaan het.

In al die gevalle is die materiaal wat ondersoek moes word, vooraf in n droogoond gehou by 60 tot 70°C totdat die gewig 9 tot 10% van die oorspronklike vars gewig was. Daarna is dit so fyn as moontlik gemaal met n koffiemeul en met etanol geëkstraheer. Die ekstrak is op die volgende manier verkry: 600 ml. 96% etanol is by die droë materiaal in n 2 liter rondeboomfles geplaas en een uur lank met n terugvloei-kondensator in n waterbad gekook. Die mengsel is gefiltreer en die filtraat bewaar. Nog 600 ml. 96%-etanol is by die vaste materiaal gevoeg en nog n uur lank gekook en gefiltreer. Hierdie filtraat is by die eerste gevoeg en die etanol is onder verlaagde druk afgedamp totdat die volume ongeveer 140 ml. was. Die 140 ml. mengsel is oor 40 gm. muisvoermengsel versprei en die orige etanol is 12 tot 18 uur lank in n droogoond by 60 tot 70° C afgedamp. Meer voermengsel is bygevoeg totdat die totale gewig 80 gm. was.

Hierdie mengsel is aan 10 volledig geovariotomeerde muis gevoer oor n tydperk van 4 dae. Aan n kontrolegroep van 10 geovariotomeerde muis is 80 gm. gewone muisvoermengsel vir dieselfde tydperk toegedien. Die muisvoermengsel het bestaan uit kuikengroeimeel wat plaaslik gekoop is. Spesiale voerbakke is gebruik om die voer van die muis in te plaas. Op die wyse is vermorsing van die voer verhoed. n Groep van 10 muis is in een blikhok van 12 dm. by 15 dm by 8 dm. gehou. In elke hok is drie voerbakke geplaas.

Op die vyfde dag is al die muis op 'n meganiese wyse gedood, die uterusse verwyder en van soveel as moontlik vetweefsel bevry. Die uterusse is op klam filtreerpapier gehou totdat al 10 van een groep verwyder is en daarna is elke uterus tussen filtreerpapier gedroog en op 'n Mettler-balans tot die naaste tiende mg. geweeg. Die liggaamsgewigte van die muis is ook bepaal.

'n Standaard-dosisreaksie-kromme is opgestel deur verskillende dosisse suiwer stilboëstrol in etanol op te los en oor die voermengsel van die muis te versprei en die droë mengsel aan die muis 4 dae lank te voer. 'n Lineêre regressie-kromme is uit die gegewens bereken en daaruit is die ekwiwalente hoeveelheid stilboëstrol afgelees wat ooreenkom met die estrogeenaktiwiteit wat in die proefmonsters gevind is.

In sommige gevalle is egter gevind dat die etanol-ekstrak wat van die droë materiaal berei is, nie droog genoeg afgedamp kon word nie en dat die muis dit nie vreet as dit nie absoluut droog is nie. Die ekstrak is toe per maagbuis toegedien volgens die metode van Farris en Griffith (1949) vir rotte. Die maagbuis is verkry deur die poli-eteen-omhulsel van 'n dun elektriesedraad af te trek en oor 'n onderhuidse naald te trek. Die buis word maklik deur die esofagus van die muis gedruk tot in die maag. Die ekstrak is dan met 'n 5 c.c. onderhuidse spuit toegedien. Verder het die dieet van die muis bestaan uit muisblokkies. Hier is ook 'n standaard-dosis-reaksie-kromme opgestel maar 'n regressie-kromme is nie bereken nie, omdat die monsters wat ondersoek is, nie estrogeenaktiwiteit vertoon het nie. Die standaard-dosisse is berei deur verskillende hoeveelhede stilboëstrol in soetolie op te los en die per maagbuis toe te dien.

Vollediger besonderhede van die bepalinge wat uitgevoer is, word onder resultate behandel.

III. RESULTATE.

Vir sommige bepalinge is n ander hoeveelheid droë materiaal geëkstraheer en die muis het ook nie met elke bepaling ewe veel van die oorspronklike ekstrak ingeneem nie. Dit is dus nodig om elke bepaling kortliks te behandel.

Proef 1.

Residuele estrogeenaktiwiteit in die vleis van osse wat met 5 en 10 mg. stilboëstrol behandel is.

Vleis van die osse wat met stilboëstrol behandel is, soos reeds beskryf onder „Behandeling van Beeste" p.4, is gebruik. Van die droë materiaal is gemaal en 200 gm. is twee maal met 600 c.c. 96%-etanol geëkstraheer, volgens die metode wat reeds beskryf is. Die ekstrak is met muisvoer gemeng en vier dae lank aan 10 geovariotomeerde muis gevoer. Die prosedure is gelyktydig met 200 gm. droë gemaalde vleis van elkeen van die drie groepe osse A, B en C, uitgevoer. Die resultate verskyn in Tabel 1.

Tabel 1. (Proef 1.)

Bepaling van residuele estrogeenaktiwiteit in osvleis.

Behandeling van osse	Hoeveelheid droë materiaal getoets Gm.	Aantal muis	Gemiddelde uterusgewig Mg.
Groep A:Kontrole	200	10	13.7 ± 1.2
Groep B: 5 mg. stilboëstrol/dag.	200	10	15.9 ± 1.4
Groep:C 10 mg. stilboëstrol/dag.	200	10	16.1 ± 0.9

Statistiese ontleding van die resultate het getoon dat daar geen betekenisvolle verskil was nie tussen die uterusgewigte van die muise wat vleisekstrak van die kontrole-groep se osse ontvang het, en van die muise wat vleisekstrak van groep B se osse ontvang het. Vleisekstrak van groep C se osse het ook nie die uterusgewigte betekenisvol verander nie.

Die res van die droë vleismateriaal is ongeveer drie maande lank in glashouers bewaar. Daarna is weer 'n bepaling uitgevoer, maar net met die vleis van groep A en C se osse. Dit is gedoen om die invloed van bewaring van die droë vleis op die moontlike residuele estrogeen-aktiwiteit na te gaan. Die resultate verskyn in Tabel 2.

Tabel 2. (Proef 1.)

Bepaling van residuele estrogeenaktiwiteit in droë osvleis wat 3 maande lank bewaar is.

Behandeling van osse	Hoeveelheid droë materiaal getoets Gm.	Aantal muise	Gemiddelde uterusgewig Mg.
Groep A:Kontrole	200	10	12.5 ± 1.0
Groep C:10 mg.stilboëstrol per dag.	200	10	14.1 ± 1.1

Statisties het die uterusgewig van muise wat ekstrak van groep C se osse ontvang het, nie betekenisvol van die kontrole verskil nie.

Proef 2.

Residuele estrogeenaktiwiteit in die lewer van osse wat 5 en 10 mg. stilboëstrol per dag ontvang het.

Lewerweefsel van dieselfde osse waarvan die vleis in proef 1 ondersoek is, is hier gebruik. Die gedroogde lewer materiaal is egter ongeveer ses maande lank bewaar voordat dit getoets is. Van elke groep is 200 gm. gedroogde materiaal geëkstraheer en die ekstrak met die voer van tien muise gemeng.

Die ekstrak was egter baie vloeibaar en die muise het nie alles opgeëet nie. Die hoeveelhede ekstrak wat die muise ingekry het, verteenwoordig soos in Tabel 3 gesien kan word, met gedeeltes van die oorspronklike droë materiaal. Die resultate verskyn in Tabel 3.

Tabel 3. (Proef 2.)

Residuele estrogeenaktiwiteit in lewer van osse.

Behandeling van osse	Hoeveelheid droë materiaal getoets Gm.	Aantal muise	Gemiddelde uterusgewig Mg.
Groep A:Kontrole	123.2	10	12.3 ± 0.8
Groep B:5 mg.Stilboëstrol/dag.	118.4	10	12.2 ± 0.7
Groep C:10 mg.Stilboëstrol/dag.	124.8	10	12.6 ± 0.8

Die uterusgewigte wat verkry is met die ekstrak van lewer van Groep B en C, verskil statisties nie betekenisvol van die kontrole nie.

Proef 3.

Residuele estrogeenaktiwiteit in die vleis van beeste...
wat met 10 mg. stilboëstrol en 10 mg. stilboëstrol plus
75 mg. oureomisien per dag behandel is.

Vleis van beeste wat met stilboëstrol alleen en stilboëstrol plus oureomisien in hul voer behandel is, in die proewe wat reeds beskryf is onder „Behandeling van beeste”, p.4 is hier gebruik. Die droë vleis is gemaal en 200 gm. van elke groep is in drie glasbakke geplaas en 600 ml. van n 0.4% water-NaOH-oplossing is bygevoeg 56 uur lank. Die volume is verminder deur afdamping en die gewone etanolekstrahering op die vaste materiaal uitgevoer. Die ekstrak is met muisvoer gemeng, drooggedamp en aan die toetsmuise gevoer. Die uterusgewigte verskyn in Tabel 4.

Tabel 4. (Proef 3).

Estrogeenaktiwiteit in beesvleis wat met NaOH behandel is.

Behandeling van beeste	Hoeveelheid droë materiaal getoets Gm.	Aantal muise	Gemiddelde uterusgewig mg.	Berekende aktiwiteit in terme van ugm. stilboëstrol/gm. droë materiaal
Groep I: Kontrole	200	10	14.6 \pm 0.6	-
Groep II: 10 mg. stilboëstrol/dag.	200	10	17.2 \pm 1.1	-
Groep III: 10 mg. stilboëstrol + 75 mg. Oureomisien per dag.	200	10	18.2 \pm 1.1*	0.00235

Uit die resultate is bereken dat die beeste van ^{*}P < 0.05 groep 3 se vleis die uterusgewig betekenisvol verhoog het in vergelyking met die kontrole (groep 1). Die uterusgewig van die muise wat n vleisekstrak van groep 2 se beeste ontvang het, is nie betekenisvol hoër as die van muise wat van groep 1 se beeste se vleisekstrak ontvang het nie (F= 4.23, vir P < 0.05 is die tabulêre F-waarde 4.41). Met behulp van die lineêre regressiekromme is bereken dat die droë vleis van die osse van groep 3 residuele estrogeenaktiwiteit vertoon wat gelykstaan aan die aktiwiteit van 0.00235 ugm. stilboëstrol per gm. droë vleis.

Proef 4.

Estrogeenaktiwiteit in vars pruime. (Prunus domestica)

Die pitte van vars pruime is verwyder, daarna is dit met skil en al gemaal, gedroog by 75° C en weer gemaal. Hiervan is 172.6 gm. geneem, met etanol geëkstraheer en die ekstrak oor 20 gm. muisvoermengsel gegooi. Die ekstrak was baie taai en swaar en die totale gewig van ekstrak en voer was 101.0 gm.

Omdat die mengsel vir die muise baie onaantreklik was, het hulle net 15 gm. daarvan gevreet, wat ekwiwalent is aan 12.03 gm. ekstrak, of aan 25.63 gm. droë pruimmateriaal. Soos in Tabel 5 gesien kan word, het die pruimekstrak die uterusgewig van die muise betekenisvol laat toeneem. Vir die bepaling is net 8 muise per groep gebruik.

Tabel 5. (Proef 4).

Estrogeenaktiwiteit in vars pruime.

Groep	Gewig droë materiaal geëkstraheer gm.	Ekwiwalente Gewig droë materiaal deur muise geëet gm.	Aantal muise	Gemiddelde uterusgewig mg.	Berekende aktiwiteit in terme van ugm. stilboëstrol/gm. droë materiaal.
Kontrole			8	15.49 [±] 1.16	-
Proef	172.6	25.63	8	21.15 [±] 2.20*	0.02247

* $p < 0.05$

Met behulp van 'n regressiekromme wat in eksperiment 14 opgestel is, is bereken dat die estrogeenaktiwiteit wat in die pruimmateriaal voorkom, gelyk staan aan die aktiwiteit wat 0.02247 ugm. stilboëstrol per gm. pruimmateriaal sou uitoeven.

In 'n poging om die muise meer van die pruimmateriaal te laat inneem, is die mengsel van muisvoer en pruimekstrak wat oorgebly het by die vorige proef, verder met voermengsel verdun totdat 80 gm. van die nuwe mengsel 28.2 gm. van die oorspronklike ekstrak bevat het. Hierdie mengsel is aan 'n tweede groep van 10 geovariotomeerde muise gevoer en 'n tweede kontrole van 10 muise is gehou. Ongelukkig het die muise net 24 gm. van hierdie mengsel ingeneem. Dit is ekwiwalent aan 8.46 gm. oorspronklike ekstrak, of 18.02 gm. droë pruimmateriaal.

Die pruimekstrak het nie die uterusgewig van die behandelde muise betekenisvol laattoeneem nie, alhoewel die gemiddelde uterusgewig van die behandelde muise hoër is as die van die kontrole. Die resultate verskyn in Tabel 6.

Tabel 6. (Proef 4)

Estrogeenaktiwiteit in pruimekstrak.

Groep	Gewig droë materiaal geëkstraheer Gm.	Aantal muise	Gewig droë materiaal deur geëet Gm.	Gemiddelde Uterusgewig mg.
Kontrolle		10		13.75 [±] 0.92
Proef	172.6	10	18.02	15.27 [±] 0.52.

Proef 5.

Estrogeenaktiwiteit in pruimedante.

Soos uit proef 4 blyk, is daar aanduidings van estrogeenaktiwiteit in pruimmateriaal. Daarom is gepoog om die estrogeenaktiwiteit van pruimedante vas te stel. Omdat in die menslike dieet ook meer van pruimedante gebruik gemaak word as van vars pruime, is dit uit die oogpunt van menslike voeding van belang om die estrogeenaktiwiteit vas te stel.

In proef 4 is gevind dat n etanol-ekstrak van pruimmateriaal baie taai is, te veel vaste materiaal bevat en nie droog genoeg afgedamp kon word vir die muise om dit te eet nie. Om hierdie probleme te bowe te kom, is die bereiding van die ekstrak soos volg uitgevoer:

Pruimedante wat van n plaaslike handelaar gekoop is, is gemaal nadat die pitte verwyder is. Die gemaalde materiaal is 96 uur lank in n droogoond geplaas by 70° C. Hierdie droë materiaal is in n desikator met kalsiumchloried afgekoel en gemaal. Van die droë materiaal is 78 gm. een uur lank met 300 c.c. eter geëkstraheer deur dit in n waterbad te kook met n terugvloei-kondensator.

Die eter is afgefiltreer en die vaste materiaal nog n uur met 250 c.c. eter geëkstraheer en weer afgefiltreer. Die twee filtrate is saamgevoeg en die eter afgedistilleer. Die ekstrak is met die voer van 10 muise gemeng en die orige eter in n droogoong afgedamp en die voer gemeng. Hierdie mengsel was heeltemal droog genoeg en die muise het alles gevreet. Soos in Tabel 7 gesien kan word, is daar geen betekenisvolle verskil in uterusgewig tussen kontrole en proefmuise nie.

Die moontlikheid bestaan dat die estrogeenaktiwiteit wat waarskynlik in die pruimmateriaal voorkom óf gedurende die proses van bereiding van die pruimedante vernietig word, óf dat ekstrahering daarvan onvolledig was en nie in die voer van die proefmuise gemeng is nie. Om die laaste moontlikheid te ondersoek, is die ekstraheermetode soos volg gewysig: Pruimedante is net soos in die vorige geval behandel en 127 gm. droë materiaal is gebruik. In plaas van dit te maal is dit met n mengsel van 30 c.c. 96%-etanol en 5 c.c. 35%-soutsuur 15 minute lank in n waterbad gekook om n sagte, homogene massa te vorm. Hierby is 300 c.c. etanol gevoeg, 3 uur lank geëkstraheer op die gewone manier en gefiltreer. By die vaste materiaal is weer 300 c.c. etanol gevoeg en 2 uur lank geëkstraheer en gefiltreer. Die twee filtrate is saamgevoeg en die etanol onder verlaagde druk afgedistilleer. Hierdie gekonsentreerde ekstrak wat nog etanol bevat het, is met 300 c.c. gedistilleerde water verdun en die mengsel is met 300 c.c. eter een uur geëkstraheer. Die eter-ekstrak is versigtig gedekanteer en 100 c.c. suiwer eter is weer bygevoeg en die mengsel is 30 min., nog in die waterbad, gekook. Die eter-ekstrak is weer versigtig gedekanteer en nog 100 c.c. suiwer eter is weer by die water-alkohol-ekstrakmengsel gevoeg en 15 minute gekook en gedekanteer.

n Verdere 100 c.c. eter is bygevoeg, die mengsel 15 minute gekook en gedekanteer. Al die eter-ekstrakte is saamgevoeg en die meeste eter is afgedistilleer. Die ekstrak is met muisvoer gemeng en verder drooggedamp in n oond en aan 10 proefmuisse gevoer. Die resultate verskyn in Tabel 7.

Tabel 7. (Proef 5).

Estrogeenaktiwiteit in pruimedante na verskillende ekstraheermetodes.

Groep	Behandeling van materiaal	Ekwiwalente hoeveelheid droë materiaal deur muisse geëet Gm.	Aantal muisse	Gemiddelde uterus gewig mg	Berekende aktiwiteit in ugm. stilboëstrol/gm. droë materiaal.
Kontrole			10	11.92 ±0.35	
Proef	Met eter ge-ekstraheer	78	10	12.11 ±0.50	
Kontrole			10	14.84 ±0.64	
Proef	met alkohol water en eter geëkstraheer	127	10	18.94 ±0.82**	0.00417.

**P < 0.01.

Statistiese ontleding van die resultate het getoon dat daar hoogs betekenisvolle verskil tussen die uterus-gewig van die proef-groep en kontrole-groep muisse was. Daar is bereken dat die estrogeenaktiwiteit ooreenkom met die aktiwiteit wat deur 0.00417 ugm. stilboëstrol per gm. droë pruimmateriaal uitgeoefen sal word.

Proef 6.

Estrogeenaktiwiteit in perskes. (Prunus Persica).

Hiervoor is 135 gm. gedroogde, gemaalde perskemateriaal gebruik, wat met etanol op die gewone manier geëkstraheer is.

Die ekstrak is met muisvoer gemeng en aan 10 proefmuisgevoer. Ongelukkig was die mengsel ook te vogtig en taai en het die muis net 54 gm. daarvan ingeneem wat ekwivalent is aan 28.3 gm. ekstrak of 86.6 gm. droë perskema-teriaal. Die resultate verskyn in Tabel 8. Daar is nie betekenisvolle verskil tussen die uterusgewig van die proef- en kontrole-groep nie, hoewel daar skynbaar toename van die gemiddelde uterusgewig was.

Tabel 8. (Proef 6).

Estrogeenaktiwiteit in perskemateriaal.

Groep	Materiaal geëkstraheer Gm.	Ekwiwalente hoeveelheid materiaal deur muis geëet Gm.	Aantal muis	Gemiddelde Uterusgewig mg.
Kontrole			10	16.52 ± 1.14
Proef	135	86.6	10	18.89 ± 0.57.

Proef 7.

Estrogeenaktiwiteit in grondboontjies. (Arachis hypogaea).

Gebakte grondboontjies is gemaal en 24 uur in n droogoond geplaas by 70° C. Van die gedroogde materiaal is 150 gm. op die gewone wyse met etanol geëkstraheer. Die ekstrak is by 20 gm. muisvoer gevoeg en die alkohol verder afgedamp. Omdat die ekstrak baie vet bevat het, was die mengsel baie olierig en het n totale gewig 78 gm. gehad. n Monster van 1 gm. hiervan is vooraf aan 3 muis gegee en daar is vasgestel dat hulle dit nie eet nie. Die ekstrak-voer-mengsel is toe met muisvoer gemeng tot dat 80 gm. mengsel 28.4 gm. van die oorspronklike ekstrak bevat het. Van hierdie mengsel het die muis net 55.0 gm. geëet wat ooreenkom met 19.5 gm. ekstrak of 37.5 gm. droë grondbonemateriaal. Die resultate verskyn in Tabel 9.

Die uterusgewigte van die muise wat grondbone-ekstrak ontvang het, verskil betekenisvol van die kontrole-muise se uterusgewigte. ($P < 0.05$)

Tabel 9. (Proef 7).

Berekende estrogeenaktiwiteit in gebakte grondbone.

Groep	Ekwiwalente gewig materiaal deur muise ge-eet Gm.	Aantal muise	Gemiddelde uterusgewig mg.	Berekende aktiwiteit in terme van ugm. stilboëstrol/gm. droë materiaal.
Kontrole		9	13.06 ± 0.79.	
Proef	37.5	9	16.21 ± 0.92*	0.00699

* $P < 0.05$.

Met behulp van die standaard-dosisreaksie, waarvan die regressiekromme bereken is, is bereken dat die estrogeenaktiwiteit in die grondbonemateriaal ooreenkom met die aktiwiteit wat deur 0.00699 ugm. stilboëstrol per gm. droë grondbonemateriaal uitgeoefen sou word.

Proef 8.

Estrogeenaktiwiteit in Grondboontjie-koekmeel..

Na aanleiding van proef 6, waar geringe estrogeenaktiwiteit in grondboontjies aangetoon is, is hierdie proef uitgevoer. Grondbone-koekmeel word ook baie algemeen gebruik vir dierevoeding en word in baie groter hoeveelhede toegedien as grondboontjies.

Grondbone-koekmeel is nie vooraf gedroog nie en 200 gm. van die gemaalde materiaal is twee maal met 600 ml. etanol geëkstraheer. Die ekstrak is met muisvoer gemeng en aan 10 proefmuise gevoer. Die resultate verskyn in Tabel 10. Statistiese analise het getoon dat daar geen betekenisvolle verskil in uterusgewigte van die proef- en kontrole-muise was nie.

Tabel 10. (Proef 8).

Estrogeenaktiwiteit in grondbone-koekmeel.

Groep	Ekwiwalente hoeveelheid materiaal deur muise geëet Gm.	Aantal muise	Gemiddelde Uterus-gewig mg.
Kon-trole		10	11.33 ± 0.26
Proef	200	10	12.16 ± 0.40

Proef 9.

Die estrogeenaktiwiteit in droë boontjies.

(Phaseolus vulgaris).

Op grond daarvan dat baie peulgewasse estrogeenaktiwiteit vertoon en daar ook reeds n estrogeniese pigment, genistien, uit sojabone geïsoleer is, is hierdie proef uitgevoer om vas te stel of die boontjies wat meestal vir menslike voeding gebruik word, ook enige estrogeenaktiwiteit vertoon. Boontjies is nie vooraf gedroog nie, gemaal en 130 gm. van die gemaalde materiaal is met etanol geëkstraheer en die ekstrak met die voer van 10 proef-muise gemeng en aan hulle toegedien. Die resultate verskyn in Tabel 11.

Tabel 11. (Proef 9).

Estrogeenaktiwiteit in droë boontjies.

Groep	Ekwiwalente hoeveelheid materiaal deur muise gevreet Gm.	Aantal muise	Gemiddelde Uterus-gewig mg.
Proef		10	12.59 ± 0.91
Kon-trole	130	10	15.52 ± 1.13

Alhoewel daar skynbaar n toename van uterusgewig was by die groep muise wat bone-ekstrak ontvang het, was dit nie betekenisvol nie. (F= 4.05 en tabulêre F-waarde vir $P < 0.05$ is 4.41.)

Proef 10.

Estrogeenaktiwiteit in Groenbone.

Omdat groenbone uit die oogpunt van menslike voeding een van die peulplante is wat in groot hoeveelhede ingeneem word, is dit van belang om vas te stel wat die estrogeenaktiwiteit daarvan is.

Vars jong groenbone is met peule en al fyn gekerf, gedroog by 70° C 24 uur lank en gemaal. Van die gemaalde materiaal is 104 gm. tweekeer met 400 c.c. etanol geëkstraheer en die ekstrak met die voer van 10 proefmuise gemeng en aan hulle toegedien. Die resultate verskyn in Tabel 12.

Tabel 12. (Proef 10).

Estrogeenaktiwiteit in vars groenbone.

Groep	Ekwiwalente hoeveelheid materiaal deur muise gevreet Gm.	Aantal muise	Gemiddelde Uterusgewig mg.	Estrogeenaktiwiteit bereken in terme van ugm. stilboëstrol/gm. droë materiaal gevreet.
Kontrolle		10	14.20 [±] 0.73	
Proef	104	10	17.38 [±] 0.74**	0.00375.

**P < 0.01.

Daar is gevind dat die uterusgewigte van die muise wat groenboontjie-ekstrak ontvang het, hoogs betekenisvol verskil van die uterusgewigte van n kontrole-groep muise. (P < 0.01). Met behulp van die regressiekromme is bereken dat die estrogeenaktiwiteit in die groenbonemateriaal ooreenkom met die aktiwiteit wat deur 0.00375 ugm. stilboëstrol per gm. droë groenbonemateriaal uitgeoefen sou word.

Proef 11.

Estrogeenaktiwiteit in droë ertjies. (Pisum sativum).

Aangesien met proef 10 aangetoon is dat daar wel aanduidings van estrogeenaktiwiteit in boontjies is, is met hierdie proef die moontlikheid nagegaan dat n ander peulgewas wat dikwels in die menslike dieet voorkom, ook estrogeenaktiwiteit mag besit.

Vir die doel is droë ertjies wat van n plaaslike handelaar gekoop is, gemaal. Hiervan is 200 gm. materiaal twee maal met 90%-etanol geëkstraheer en die ekstrakoor die voer van 10 proefmuise gegooi en drooggedamp. Die resultate verskyn in Tabel 13.

Tabel 13. (Proef 11).
Estrogeenaktiwiteit in droë ertjies.

Groep	Ekwiwalente hoeveelheid materiaal deur muise gevreet.	Aantal muise	Gemiddelde Uterusgewig mg.	Estrogeenaktiwiteit bereken in terme van ugm. stilboëstrol/gm. materiaal.
Kontrole		10	14.00 ± 0.61	
Proef	200	10	17.86 ± 1.25*	0.0022

* $P < 0.05$.

Die uterusgewig van die muise wat ertjie-ekstrak ontvang het, verskil betekenisvol van die uterusgewig van die kontrole. ($P < 0.05$). (Die F-waarde is 7.67 en die verskil sou hoogs betekenisvol gewees het as $F = 8.28$.) Daar is bereken dat die estrogeenaktiwiteit ooreenkom met die aktiwiteit van 0.0022 ugm. stilboëstrol per gm. droë ertjie-materiaal.

Proef 12.

Estrogeenaktiwiteit in patats. (Ipomoea batatas).

Vars patat-materiaal is, nadat dit gemaal is, 48 uur lank by 70° C gedroog en gemaal. Van die droë materiaal is 170.2 gm. tweemaal een uur lank geëkstraheer met etanol. Die ekstrak is met die voer van 9 proefmuise gemeng en aan die muise toegedien. Die resultate verskyn in Tabel 14. Die uterusgewig van die muise wat patat-ekstrak ontvang het, verskil nie betekenisvol van die kontrole nie en die gemiddelde uterusgewigte verskil baie min.

Tabel 14. (Proef 12).

Estrogeenaktiwiteit in patats.

Groep	Ewkwivalente hoeveelheid materiaal deur muis gevreet Gm.	Aantal muis	Gemiddelde uterus-gewig mg.
Kontrole		9	15.52 \pm 1.18
Proef	170.2	9	15.31 \pm 1.22.

Proef 13.

Estrogeenaktiwiteit in die standaard-muisvoer voor en na ekstrahering.

Die moontlikheid bestaan dat die estrogeniese stowwe wat in voedselsoorte mag voorkom, nie volledig geëkstraheer word nie, of dat daar op een of ander wyse verlies van estrogeenaktiwiteit mag plaasvind gedurende die proses van bepaling. Om dit vas te stel is 80 gm. muisvoermengsel 2 maal met etanol geëkstraheer 1 uur lank elke keer en die ekstrak is weggegooi. Die geëkstraheerde materiaal is bewaar. Nog 80 gm. muisvoer is weer op dieselfde wyse geëkstraheer en hierdie ekstrak is oor die geëkstraheerde muisvoer wat met die eerste ekstrahering verkry is, gegooi en afgedamp. Die geëkstraheerde muisvoer wat met die tweede ekstrahering verkry is, is ook gedroog. Geovariotomeerde muis is in 3 groepe verdeel van 10 elk. Aan groep een is gewone muisvoer gegee, die groep het as kontrole gedien, aan groep 2 is die geëkstraheerde muisvoer gegee en aan groep 3 die muisvoer wat eers geëkstraheer is en waarby die ekstrak van groep 2 se voer toe weer gevoeg is. Die resultate verskyn in Tabel 15. Dieselfde muis as wat in proef 8 as kontrole gedien het, is hier ook as kontrole gebruik.

Tabel 15. (Proef 13).

Estrogeenaktiwiteit-verlies gedurende ekstraheer-prosedure en die estrogeenaktiwiteit van die muisvoer-mengsel.

Groep	Behandeling van materiaal.	Hoeveelheid geëkstraheer Gm.	Aantal muisse	Gemiddelde Uterusgewig mg.
1	Kontrole		10	11.33 ± 0.26.
2.	kontrole-ekstrak	80	10	8.54 ± 0.85**
3.	kontrole-ekstrak + ekstrak van gr. 2	80	10	10.73 ± 1.53.

**p < 0.01

Met die statistiese ontleding van die resultate het geblyk dat die uterusgewigte van die muisse van groep 1 en 3 nie betekenisvol verskil het nie. Die uterusgewigte van groep 2 verskil egter betekenisvol van die van groep 3 en hoogs betekenisvol van die uterusgewigte van groep 1 ($P < 0.01$). Die estrogeenaktiwiteit kan egter nie direk in terme van mikrogram stilboëstrol bereken word nie omdat die laagste uterusgewigwaardes wat met die dosis-reaksie-standardisasie verkry is, dié van die kontrole was, wat gewone muisvoer ontvang het.

Proef 14.

Uterusgewigtoename na toediening van bekende hoeveelhede stilboëstrol.

Ten einde die uterusgewigtoename wat verkry word met toediening van sekere voedselekstrakte in terme van die aktiwiteit wat deur stilboëstrol uitgeoefen word, te bereken, is 'n standaard-dosisreaksie-kromme opgestel.

Vyf groepe muisse van 10 elk is gebruik. Die dosisse is soos volg berei: Presies 3.2 mg. suiwer stilboëstrol is afgeweg en in 1000 c.c. 96%-etanol opgelos. (Oplossing A.) Een c.c. van oplossing A is verder verdun met 99 c.c. 96%-etanol. (Oplossing B.) Vir groep 1 se muisse is 80 gm. muisvoer gegee; dit het as kontrole gedien.

Oor 80 gm. muisvoer van groep 2 is 10 c.c. van oplossing B gegooi. Vir groep 3 is 20 c.c.; vir groep 4, 40 c.c. en vir groep 5, 80 c.c. van oplossing B oor 80 gm. voer gegooi vir elk. Die etanol is in n droogoënd afgedamp en die voer aan die muisse toegedien. Die totale dosisse stilboëstrol wat die muisse op die wyse ingekry het was: vir groep 1 - nul; groep 2 - 0.32 ugm.; groep 3 - 0.64 ugm.; groep 4 - 1.28 ugm. en groep 5 - 2.56 ugm. vir 10 muisse in 80 gm. voer 4 dae lank. Die resultate verskyn in Tabel 16.

Tabel 16. (Proef 14).

Standaard-dosisreaksie na toediening van stilboëstrol in die voer.

Groep	Dosis in ugm/gm. voer	Aantal Muisse	Gemiddelde uterusgewig mg.
1	Kontrole	10	13.02 ± 0.59
2	0.004	10	16.26 ± 0.88*
3	0.008	10	19.97 ± 0.91**
4	0.016	10	26.53 ± 1.05***
5	0.032	10	41.17 ± 2.29**

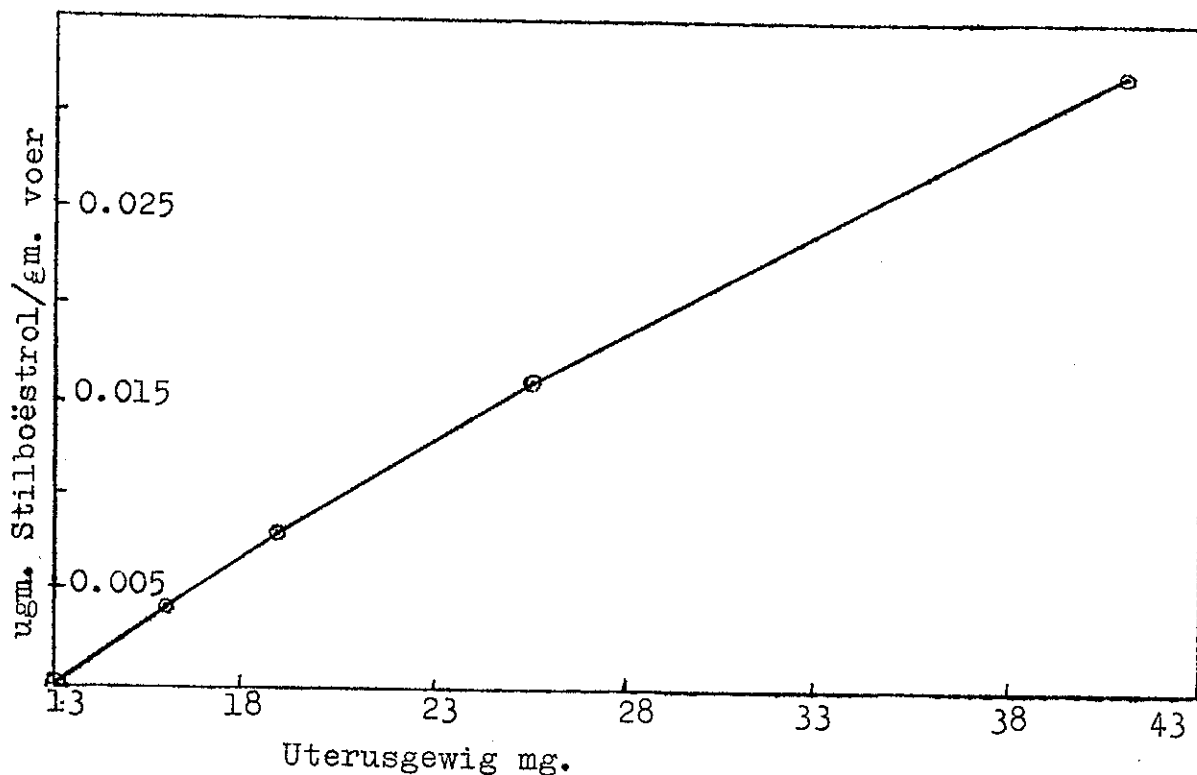
*P < 0.05 **P < 0.01.

Statistiese ontleding van die resultate het getoon dat die verskil tussen die uterusgewigte van groep 1 en 2 betekenisvol is ($P < 0.05$), dat die verskil tussen die uterusgewigte van groep 1 en die uterusgewigte van al die ander groepe hoogs betekenisvol is ($P < 0.01$) en dat die verskil tussen groep 2 en 3, 3 en 4 en 4 en 5 ook betekenisvol is.

Uit die gegewens wat verkry is, is n dosis-reaksie-kromme opgestel wat in figuur 1 verskyn. Proef 14 is later weer herhaal, sien proef 19, i. p.29.

Figuur 1. (Proef 14).

Dosis-reaksie-kromme.



Proef 15.

Estrogeenaktiwiteit in Salieplant. (Salvia Sisymbriifolia Skan.)

Vir die proef is salieplante wat net bokant die grond afgesny is, gedroog nadat dit gekerf is. Die meeste plante het in die blomstadium verkeer en is 48 uur lank gedroog en daarna gemaal. Die droë materiaal het, nadat dit gemaal is, 84 gm. geweeg. Dit is met etanol geëkstraheer op die gewone wyse en die ekstrak oor die voer van 10 muise gegooi, en die alkohol verder afgedamp. Die muise het die mengsel nie volledig gevreet nie, maar net 40 gm. van die 80 gm. mengsel. Die muise het dus van die oorspronklike droë materiaal se ekstrak soveel ingeneem dat dit ekwiwalent is aan 42 gm. droë salie-materiaal. Die resultate verskyn in Tabel 17.

Tabel 17. (Proef 15).

Bepaling van die estrogeenaktiwiteit in Salvia
Sisymbriifolia Skan.

Groep	Ekwiwalente hoeveelheid droë materiaal gevreet Gm.	Aantal muise	Gemiddelde Uterusgewig mg.	Berekende aktiwiteit in ugm. Stilboëstrol/gm. droë materiaal.
Kontrole		10	13.07 ± 0.34	
Proef	42	10	16.69 ± 0.73**	0.00786

** P < 0.01.

Uit die resultate het geblyk dat die uterusgewigte van die proefmuise wat salie-ekstrak ontvang het, hoogs betekenisvol verskil van die uterusgewigte van die kontrole-muise. (P < 0.01). Verder is bereken dat die estrogeenaktiwiteit in die salie-ekstrak ooreenkom met die aktiwiteit van 0.00786 ugm. stilboëstrol per gm. droë salie-materiaal.

Proef 16.

Estrogeenaktiwiteit in lusernkuilvoer.

Vir die proef is 200 gm. lusernkuilvoer wat reeds gedroog en gemaal is, gebruik. Die kuilvoer is by die Potchefstroomse Landboukollege gemaak. Die ekstrak is op die gewone manier berei en met die voer van 10 proefmuise gemeng. Daar is egter gevind dat die muise nie al die voer-ekstrakmengsel wou vreet nie, maar net 45 gm. wat ekwiwalent is aan 112.5 gm. droë kuilvoermateriaal. Vir hierdie proef en vir proewe 8, 13, 17, 18 en 19 is dieselfde 10 muise as kontrolegroep gehou. (Dié proewe is gelyktydig uitgevoer) Die uterusgewig van die muise wat lusernkuilvoer-ekstrak ontvang het, het hoogs betekenisvol verskil van die kontrole (P < 0.01). In Tabel 18 kan die toename in uterusgewig gesien word.

Tabel 18. Proewe 16 en 17).

Estrogeenaktiwiteit in lusernkuilvoer en Ladino-klawer.

Behandeling van muisse	Ekwiwalente hoeveelheid droë materiaal toegedien Gm.	Aantal muisse	Gemiddelde Uterusgewig mg.	Berekende aktiwiteit in terme van ugm. stilboëstrol/gm. materiaal
Kontrole		10	11.33 ± 0.26	
Lusernkuilvoer	112.5	10	16.13 ± 0.45**	0.00249.
Ladino-klawer	127.5	10	17.27 ± 0.42**	0.00312.

**P < 0.01.

Daar is bereken, met behulp van die regressiekromme, dat die aktiwiteit in die lusernkuilvoer ooreenkom met die aktiwiteit wat deur 0.00249 ugm. stilboëstrol per gram droë lusernkuilvoer uitgeoefen sou word.

Proef 17.

Estrogeenaktiwiteit in Ladino-klawer.

Ladino-klawer wat deur die plaaslike Landboukollege gekweek is, is daar gedroog en gemaal. Van die gedroogde materiaal is 200 gm. op die gewone wyse geëkstraheer en met die voer van 10 proefmuisse gemeng en aan hulle toegedien. Van die voer-ekstrak-mengsel het die muisse net 51 gm. gevreet wat ekwiwalent is aan 127.5 gm. droë klawer materiaal. Die resultate verskyn in Tabel 18. Daar was 'n hoogs betekenisvolle verskil tussen die uterusgewigte van muisse wat klawer-ekstrak ontvang het en die kontrole. (P < 0.01). Die estrogeenaktiwiteit is bereken in terme van ugm. stilboëstrol en daar is gevind dat 0.00312 ugm. stilboëstrol per gram droë Ladino-klawer dieselfde mate van aktiwiteit sou vertoon.

Proef 18.

Die estrogeenaktiwiteit van drie verskillende hidrokse - chalkone.

Op grond van hulle chemiese verwantskap met stowwe wat estrogenies aktief is, bestaan die moontlikheid dat sekere chalkoon-verbindings ook aktief mag wees. Die moontlikheid bestaan ook dat ten minste n gedeelte van die estrogeenaktiwiteit van sekere plantmateriaal wat in hierdie reeks proewe ondersoek is, aan sulke verbindings toegeskryf kan word. Dit is reeds bekend dat sekere flavonoïed-verbindings estrogeenaktiwiteit besit, soos die isoflavone (Bradbury & White 1954). Die chalkone is ook n subgroep verbindings wat na verwant is aan die isoflavone. Volgens Geissman en Hinreiner (1952) kom die verbindings almal taamlik algemeen in plante voor. Presies 0.5 gm. van elk van die drie verbindings, nl. 3, 4- dihidroksie-chalkoon, 3', 3, 4',- trihidroksie-chalkoon en 3', 3, 4', 4- tetrahidroksie-chalkoon is afgeweeg. Elke monster is in 20 c.c. 96%-etanol opgelos en oor 80 gm. muisvoer versprei. Die etanol is daarna in n oond afgedamp en die voermengsels aan twee groepe proefmuis gevoer.

Die resultate verskyn in Tabel 19. Elke groep muis het 50 mg. per muis ontvang en dit is bevind dat die uterusgewigte van twee groepe hoogs betekenisvol verskil van die kontrole groep wat net muisvoer ontvang het ($P < 0.01$).

Tabel 19. (Proef 18).

Die estrogeenaktiwiteit van hidroksie-chalkone.

Behandeling	Dosis mg./gm. voer	Aantal muis	Gemiddelde Uterus-gewig mg.	Aktiwiteit bereken in terme van ugm. Stilboëstrol/mg. chalkoon.
Kontrole	-	10	18.74 \pm 0.83	
Dihidroksie chalkoon	6.25	10	18.39 \pm 0.65	
Kontrole		10	11.33 \pm 0.26	
Trihidroksie-chalkoon.	6.25	10	13.44 \pm 0.42**	0.00008
Tetra hidroksie-chalkoon	6.25	10	15.33 \pm 0.64**	0.00042

** $P < 0.01$.

Die kontrole wat vir die twee groepe gebruik is, was dieselfde as wat vir proef 17 gebruik is. (Dié proewe is gelyktydig uitgevoer.)

Daar is gevind dat twee van die chalkoon-verbindinge wat getoets is, die uterusgewigte van die proefmuis hoogs betekenisvol laat toeneem het in vergelyking met die kontrole ($P < 0.01$). Met behulp van die regressiekromme is bereken dat die aktiwiteit van 3', 3, 4'-trihidroksie-chalkoon gelykstaan aan die aktiwiteit van 0.00008 ugm. stilboëstrol per mg. chalkoon en dat die aktiwiteit van 3', 3, 4', 4-tetrahidroksie-chalkoon 5.25 keer hoër is, of gelykstaan aan die aktiwiteit van 0.00042 ugm. stilboëstrol per mg. van die betrokke chalkoon-verbinding.

Proef 19.

Uterusgewigtoename na toediening van bekende hoeveelhede stilboëstrol. (n Herhaling van proef 14).

Die doel van die proef was om vas te stel of die vorige standaard-dosisreaksie wat verkry is met die toediening van stilboëstrol in die voer van die muis, betroubaar is en by herhaling weer dieselfde waardes sal gee. Die proef is presies net soos proef 14 uitgevoer behalwe dat hier 32 mg. suiwer stilboëstrol opgelos is in 1000 c.c. 96%-etanol om oplossing A te kry. Vir die bereiding van oplossing B is 1 c.c. van oplossing A in 999 c.c. etanol opgelos. Dieselfde hoeveelhede van oplossing B is oor 80 gm. muisvoer vir elke groep gegooi en drooggedamp. Die dosisse was dus presies dieselfde as vir proef 14. In Tabel 20 kan die resultate gesien word.

Tabel 20. (Proef 19).
Standaard-dosisreaksie met toediening van stilboëstrol
in die voer van muisse.

Groep	Dosis in ugm. per gm. voer	Aantal muisse	Gemiddelde uterusgewig mg.
1	Kontrole	10	13.65 ± 0.34
2.	0.004	10	17.87 ± 0.70**
3.	0.008	10	20.75 ± 0.63**
4.	0.016	10	27.54 ± 1.35**
5.	0.032	10	43.98 ± 2.38**

**P < 0.01

Statistiese ontleding het getoon dat daar tussen groep 1 en al die ander groepe hoogs betekenisvolle verskil in uterusgewigte bestaan ($P < 0.01$). Groep 1 en 2 verskil hoogs betekenisvol van mekaar maar groep 3 en 4 verskil betekenisvol ($P < 0.05$).

Verder is gevind dat die gegewens wat in die proef verkry is, nie betekenisvol verskil van die resultate van proef 14 nie.

n Dosis-reaksiekromme is van die resultate opgestel en verskyn in figuur 2 p. 31. Die gemiddelde waardes is bereken vir die uterusgewigte wat met proef 14 en 19 verkry is, en daaruit is die lineêre-regressiewaardes bereken wat soos volg is:

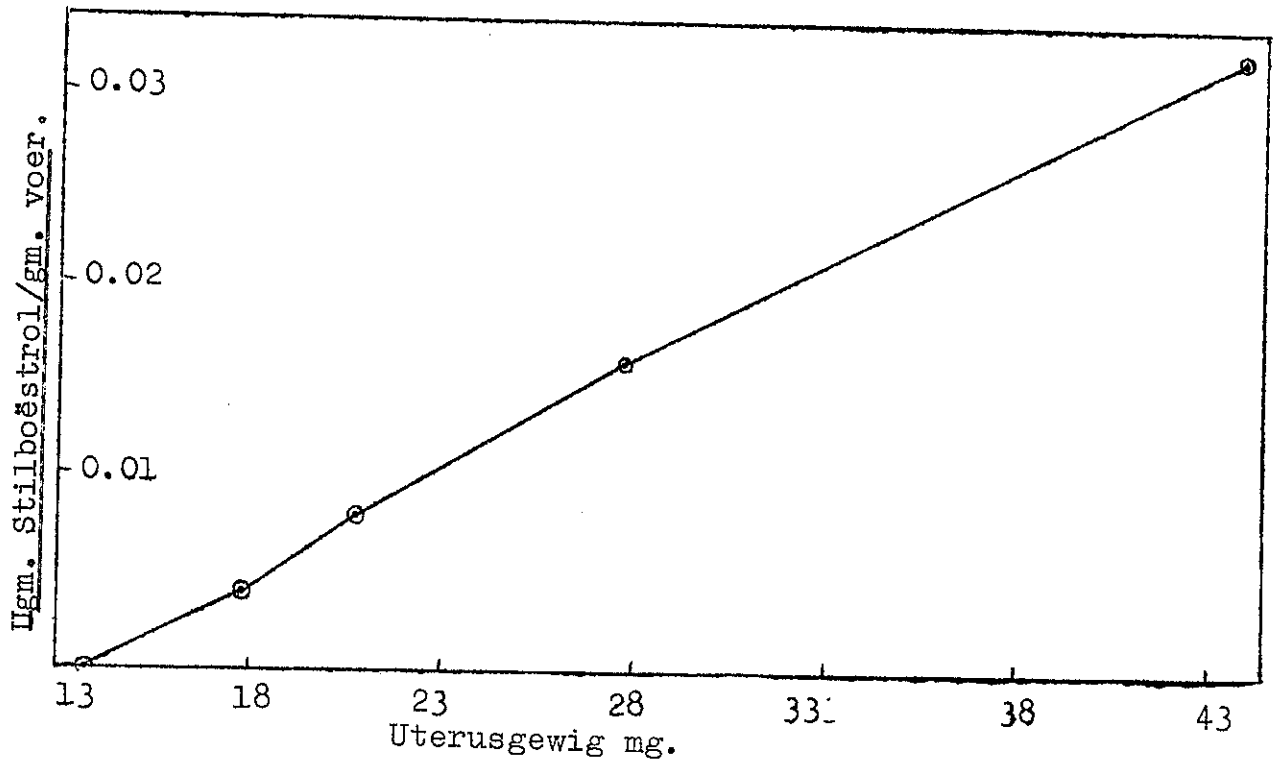
Groep	Dosis stilboëstrol ugm/gm.voer.	Werklike gemiddelde waardes mg.	Lineêre regressie waardes mg.
1	Kontrole	13.34	12.946
2	0.001	16.94	16.584
3	0.002	19.86	20.222
4	0.004	26.64	27.498
5	0.008	42.53	42.050

Uit die gegewens is n lineêre-regressiekromme opgestel wat in fig. 3 p.32. verskyn.

Die kromme wat die log. van die dosis teenoor gemiddelde uterusgewig voorstel, was nie 'n reguit lyn nie en is nie vir die berekeninge gebruik nie.

Figuur 2. (Proef 19).

Dosis-reaksie-kromme.

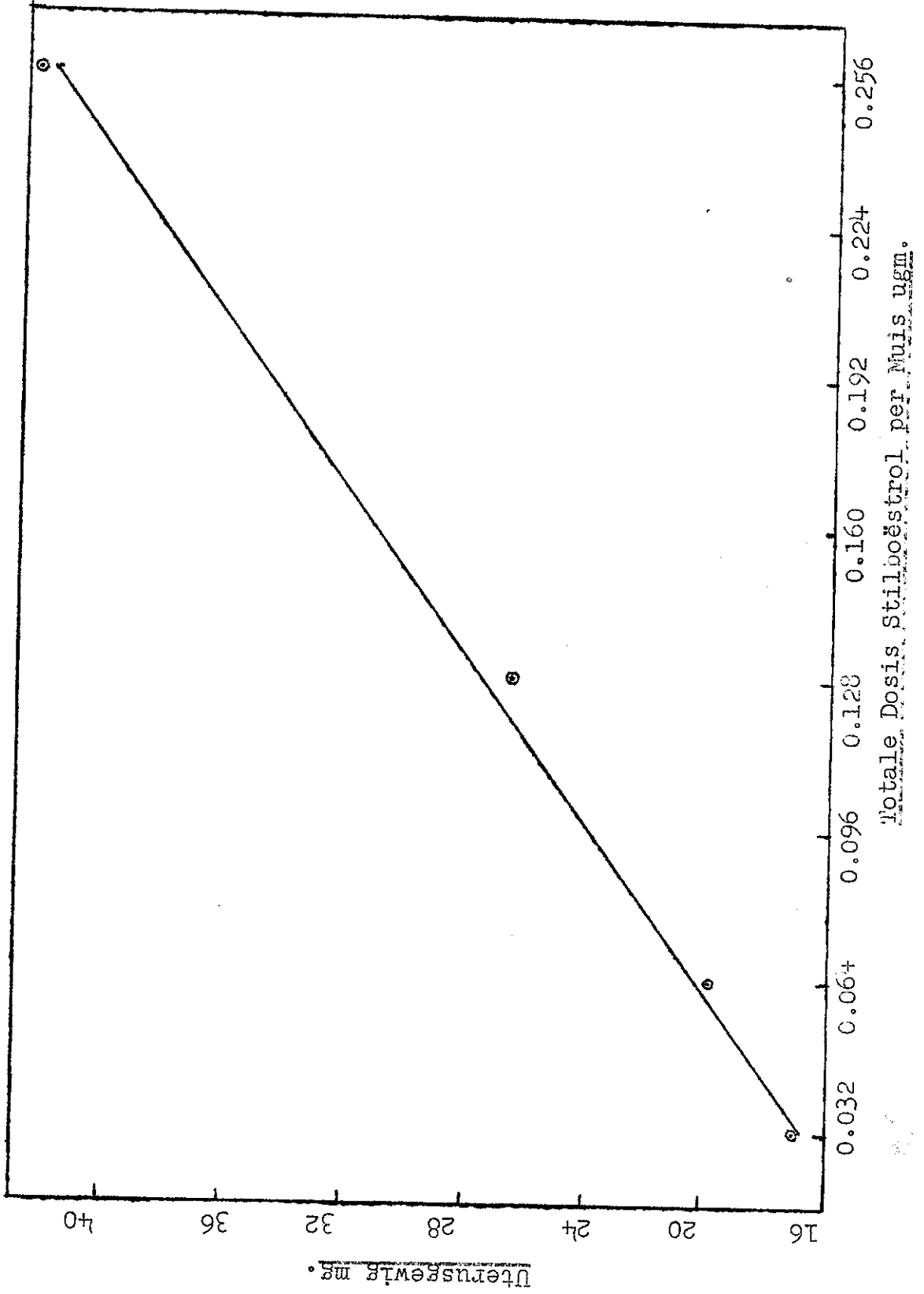


Proef 20.

Uterusgewigtoename na toediening van stilboëstrol alleen en stilboëstrol en foliensuur saam.

Daar bestaan aanduidings volgens Jukes (1952) en Haque et al. (1949) dat foliensuur onontbeerlik is vir die toename in uterusgewig na die toediening van estrogeeniese stowwe. Die moontlikheid bestaan dat dit ook vir die muisuterusgewigtoename 'n noodsaaklike faktor in die dieet is. 'n Tekort aan foliensuur in die voedsel wat aan proefmuise, veral vir estrogeenbepalings, toegedien word sal dan waarskynlik die resultate beïnvloed. Om die moontlikheid te ondersoek is hierdie proef uitgevoer.

Figuur 3.
Lineêre-Regressiekromme.



Drie groepe van 10 geovariotomeerde muise is gebruik. Groep 1 wat as kontrole gedien het, het 80 gm. voer ontvang; groep 2 het 80 gm. voer ontvang waaroor 0.64 ugm. stilboëstrol in etanol-oplossing versprei is; groep 3 het 80 gm. voer ontvang waarin 0.64 ugm. stilboëstrol en 250 mg. foliensuur gemeng is. Om die dosis van groep 2 en 3 te berei, is 20 c.c. van oplossing B, wat in proef 19 gemaak is (dit het 0.032 ugm. stilboëstrol per c.c. bevat), oor 2 monsters van 80 gm. muisvoer gegooi en die etanol in n droogoond afgedamp. Die foliensuur is toe afgeweeg en 250 mg. is met 5 gm. van een van die 80 gm. gedroogde stilboëstrol-muisvoer-mengsels goed gemeng. Hierdie 5 gm. monster is agtereenvolgens met 10, 15 en 50 gm. van die res van die muisvoer gemeng en aan die muise toegedien. Die resultate verskyn in Tabel 21.

Tabel 21. (Proef 20).

Invloed van foliensuur toediening op standaard-dosis-reaksie.

Groep	Behandeling	Aantal muise	Gemiddelde Uterusgewig mg.
1	Kontrole	10	13.90 \pm 0.76
2	0.008 ugm. stilboëstrol per gm. voer	10	20.20 \pm 0.90**
3	0.008 ugm. stilboëstrol en 3.125 mg. foliensuur per gm. voer.	10	19.93 \pm 0.65**

**P < 0.01

Die uterusgewigte van groep 2 en 3 verskil albei hoogs-betekenisvol van die kontrole (P < 0.01), maar die uterusgewigte van groep 2 verskil nie betekenisvol van die van groep 3, wat foliensuur ontvang het nie.

Proef 21.

Uterusgewigtoename na toediening van bekende hoeveelhede stilboëstrol per maagbuis.

Wanneer die standaard-dosisse stilboëstrol aan die muis toegedien word deur dit met hul voer te meng, ontstaan daar sekere probleme. Sommige van die voedselstowwe wat ondersoek is, se samestelling is van so n aard dat die etanol-ekstrak wat daarvan gemaak is, selfs nadat dit met n oormaat muisvoer gemeng is, nog vir die proefmuis oneetbaar is. Indien sulke ekstrakte per maagbuis toegedien kan word, mag dit moontlik sommige van die probleme uitskakel. Om vas te stel of so n metode toegepas kan word, is dieselfde standaard-dosisse wat in proef 14 en 19 toegedien is, hier ook toegedien. Op die manier kan enigsins n vergelyking tussen die twee metodes van toediening verkry word.

Vyf groepe proefmuis van 10 muis elk is gebruik. Die verskillende dosisse stilboëstrol is in 20 c.c. soetolie opgelos. Oplossing B wat in proef 19 berei is, en 0.032 ugm. stilboëstrol per c.c. etanol bevat het, is gebruik. By die 20 c.c. soetolie is die volgende hoeveelhede van oplossing B vir elke groep bygevoeg: Groep 1 het as kontrole gedien en het geen stilboëstrol-oplossing ontvang nie; groep 2 het 10 c.c. oplossing B ontvang, groep 3: 20 c.c., groep 4: 40 c.c. en groep 5: 80 c.c.. Die mengsels is in n droogdoond geplaas by 80° C totdat die grootste gedeelte van die etanol afgedamp was. Daarna is die oplossings goed geroer om deeglike vermenging van die etanol-oplossing met die olie te verkry. Die etanol is daarna volledig afgedamp en die soetolie weer deeglik gemeng. Elke muis van die 4 proefgroepe het 0.5 c.c. soetolie-mengsel per maagbuis ontvang een keer per dag 4 dae lank en die kontrolegroep net soetolie. Die poli-eteenbuis is so glad as moontlik geskuur aan die voerpunt sodat dit nie die muis se esofagus sou beskadig nie.

Daar is vooraf vasgestel dat n dosis van 1 c.c. opvallende laksering by die muis veroorsaak. Die resultate verskyn in Tabel 22.

Tabel 22. (Proef 21).

Standaard-dosisreaksie na toediening van stilboëstrol per maagbuis in soetolie-oplossing.

Groep	Dosis in μ gm. per ϕ . 0.25 c.c. olie	Aantal muis	Gemiddelde Uterusgewig mg.
1	Kontrole	10	13.88 \pm 1.01
2	0.004	10	14.90 \pm 1.00
3	0.008	10	17.88 \pm 1.00**
4	0.016	10	22.54 \pm 1.82**
5	0.032	10	27.69 \pm 1.44**

** $P < 0.01$.

Daar is gevind dat die muis nog n neiging tot laksering toon. Veral die kontrolegroep het opvallende laksering getoon. Dit wil ook voorkom of die muis geleidelik met verloop van die proef minder gelakseer het.

Die aantal muis wat laksering getoon het, was soos volg:

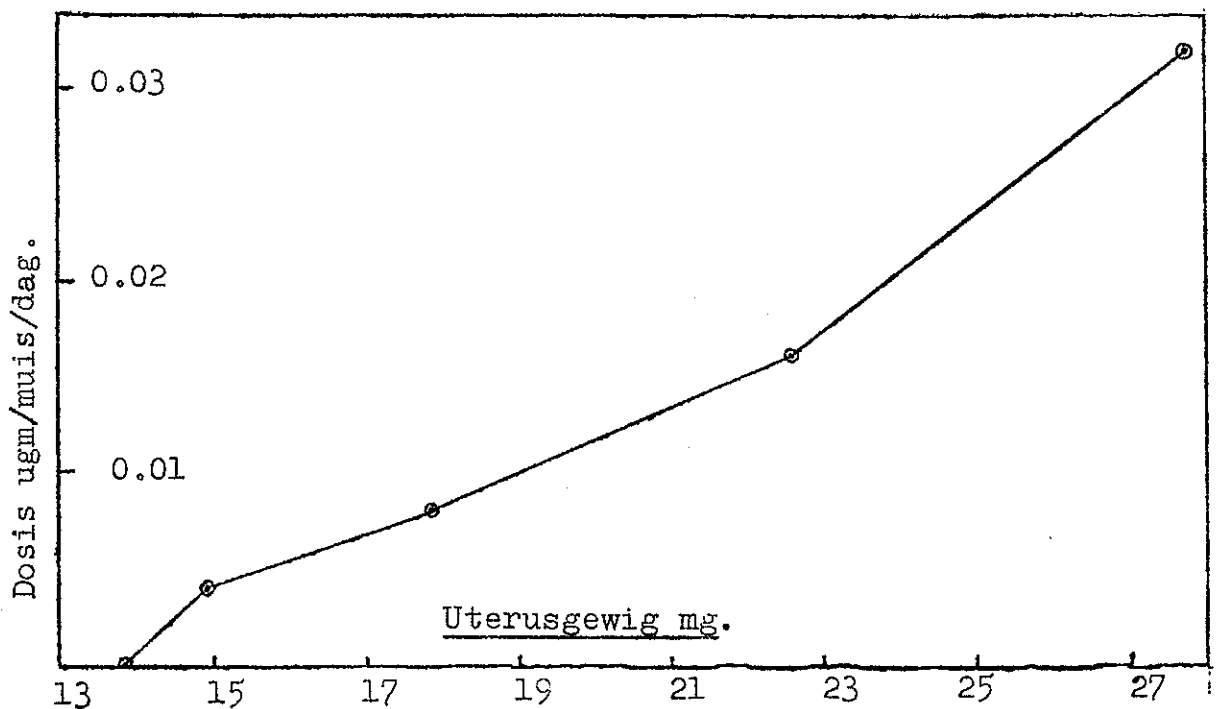
<u>Groep</u>	<u>1e dag</u>	<u>2e dag</u>	<u>3e dag</u>	<u>4e dag</u>
1	8	4	1	1
2	3	2	1	0
3	1	1	0	1
4	0	1	0	1
5	0	0	1	0

Met statistiese analise van die resultate vir die uterusgewigte het dit duidelik geword dat groep 1 en 2 nie betekenisvol van mekaar verskil nie. Groep 1 en 3; 1 en 4; en 1 en 5 verskil wel hoogs betekenisvol van mekaar ($P < 0.01$). Daar is verder ook betekenisvolle verskil tussen die uterusgewigte van groep 2 en 3; 3 en 4 en groep 4 en 5. ($P < 0.05$).

Die dosisreaksie is grafies voorgestel in fig. 4.p.36. Die kromme wat die logaritme van die dosis teenoor uterusgewig voorstel, was nie n reguit lyn nie.

Figuur 4. (Proef 21).

Dosis-reaksiekromme met toediening van stilboëstrol
in soetolie per maagbuis.



Proef 22.

Invloed van toediening van verskillende plantekstrakte
per maagbuis aan proefmuise op die uterusgewig.

(a) Geelwortels (Daucus carota):

Hiervoor is vars geelwortels gemaal, gedroog en weer gemaal. Van die droë materiaal is 144 gm. op die gewone manier met etanol geëkstraheer. Die etanol is afgedistilleer onder verlaagde druk. Die ekstrak was n vloeibare, taai, rooi-bruin, stroopagtige massa en kon nie oor die muisvoer gegooi word nie. Al die etanol is toe 72 uur lank afgedamp by 80° C en die ekstrak met gedistilleerde water verdun sodat die volume water wat bygevoeg is n $\frac{1}{8}$ ste van die totale volume gevorm het. Van die mengsel is n totaal van 28 c.c. toegedien aan 7 muise, in dosisse van 1 c.c. per muis per dag, wat ekwiwalent is aan 70.0 gm. van die oorspronklike droë wortelmateriaal. Die resultate verskyn in Tabel 23.

Tabel 23. (Proef 22).

Invloed van toediening van wortel- en uie-ekstrak, per maagbuis, op uterusgewig.

Groep	Aard van ekstrak	Hoeveelheid ekstrak toegedien c.c.	Aantal muise	Gemiddelde uterusgewig mg.
1	Kontrole	-	10	13.06 ± 0.79
2	Geelwortels	28	7	12.00 ± 0.84
3	Uie	24	6	12.61 ± 1.33.

Oorspronklik is die proef met 10 muise begin, maar 3 daarvan is gedurende die proef dood.

Daar is geen betekenisvolle verskil tussen die uterusgewigte van die muise wat wortelekstrak ontvang het en die kontrole nie.

(b) Uie (Allium Cepa):

Presies dieselfde metodes is gevolg as by die wortel-ekstrak-proef. Hier is 100 gm. droëmateriaal geëkstraheer. Van die ekstrak is 'n totale dosis van 24 c.c. vir 6 muise, 4 dae lank in dosisse van 1 c.c. per muis per dag, toegedien. Hier was ook geen betekenisvolle verskil tussen proef- en kontrolemuise se uterusgewigte nie. Die resultate verskyn in Tabel 23. 'n Poging is ook aangewend om 'n vye-ekstrak op dieselfde wyse te toets, maar die ekstrak het waarskynlik nog etanol bevat en 8 van die proefmuise is dood na die eerste toediening. Die twee oorlewende muise se uterusse het geen teken van estrogenprikkeling getoon nie en die gemiddelde uterusgewig was 11.4 mg.

IV. LITERATUUROORSIG.

1. Metode.

By die studie van die voorkoms van estrogene in die natuur, soos in dierlike en plantaardige weefsels, is die metode van bepaling van die uiterste belang.

Dit moet betroubare resultate lewer en ook baie klein hoeveelhede, wat soms onder natuurlike omstandighede voorkom, kan aantoon. Weens gebrek aan so n metode kan sodanige navorsingswerk baie gestrem word.

Vir die bepaling van estrogeenaktiwiteit in plante kan chemiese bepalingmetodes nie gebruik word nie, omdat die chemiese struktuur van die betrokke estrogeen of estrogene meestal onbekend is. Wat die bepaling van die residuele aktiwiteit in die vleis van beeste wat met stilboëstrol behandel is, betref, kan o.a. kolorimetriese of radioaktiewe isotopiese metodes ongelukkig nie gebruik word nie weens sekere steurende faktore. (Onderhoud met dr. P.J.S. Pieterse).

Biologiese bepaling skyn dus die doeltreffendste metode te wees. n Groot verskeidenheid van biologiese estrogeenbepalings bestaan. Emmens (1946, 1950 en 1955) en Pincus en Thimann (1948) bespreek die meeste daarvan. Volgens bg. navorsers is sommige van die biologiese metodes in baie gevalle meer sensitief as die chemiese metodes. In byna al die metodes word van knaagdiere soos muise of rotte wat baie sensitief en spesifiek reageer na estrogeentoediening, gebruik gemaak. "The Pharmaceutical Society of Gt. Britain"(1951) verklaar dat vir noukeurigheid van 10% met die vagina-kornifikasie-toets van Allen en Doisy, ten minste 110 muise vir n enkele bepaling nodig is. Daarby moet vagina-smere van al die muise ten minste twee maal per dag gemaak word. Daar bestaan baie wysigings van die metode soos die metode van Coward en Burn wat deur Dodds (1949) beskryf word, waar gebruik gemaak word van die kornifikasie van die rot se vagina na estrogeentoediening.

Emmens (1946) beskryf n metode van Littrell en Tom wat berus op die tydsverloop tussen die toediening van n stof en die opening van die vagina van onvolwasse geovariotomeerde rotte. n Metode wat deur Gordon en Villee(1956) beskryf is, maak gebruik van die mate van reduksie, wat die difosfopiridien-nukleotied-ensiem-sisteem van die menslike plasenta ondergaan, wanneer dit in vitro met estradiol of estroon in aanraking kom, en dit is waarskynlik net so sensitief as die vagina-kornifikasietoets.

Die toename in uterusgewig wat deur estrogeentoe-diening veroorsaak word, is die basis vir die toets wat deur Bülbring en Burn gebruik word.(volgens Brownlee en Green (1946). In die beskrywing wat deur Pincus en Thimann (1948) gegee word, word melding gemaak van die metode van Astwood wat berus op die invloed van estrogene op die watergehalte van die uterus en die metodes van Dorfman en Lawson et al. wat berus op uterusgewigtoename: Dorfman en Dorfman (1954) maak gebruik van die geovariotomeerde rot se uterusgewigtoename.

Die meeste van die navorsers pas onderhuidse toediening toe. Daar is aanduidings dat groter gevoeligheid verkry word met intra-vaginale toediening. Goeie resultate is ook verkry met mondtoediening. Dit was vroeër gebruiklik om die resultate van estrogeenbepalings in terme van diereenhede uit te druk, wat egter baie vaag en onnoukeurig was. Vandag bestaan daar n internasionale eenheid (i.e.) wat die spesifieke aktiwiteit wat deur 0.1 μ gm. estradiolmonobensoaat of estroon uitgeoefen word, voorstel. . Die vroeëre roteenhede is gelyk aan 3 tot 25 i.e. en die muiseenhede gelyk aan 0.44 tot 0.77 i.e. (Uit Lancet 230: 595, 1936.)

Aan elkeen van bogenoemde metodes is daar sekere voordele en nadele verbonde. Met die vaginale kornifikasie-toets moet n groot aantal muise gebruik word en baie tyd word in beslag geneem. Die uterusgewigtoename-metode is as bepalingmetode in sekere opsigte meer geskik omdat kleiner konsentrasies estrogene aangetoon kan word en omdat minder diere en arbeid waarskynlik daarvoor nodig is. Volgens Stob et al. (1954a) wat die kornifikasie-metode met die uterusgewigtoename-metode vergelyk het, kon hulle n minimumdosis van 0.022 ugm. stilboëstrol per gram voer met behulp van die kornifikasie-metode bepaal, terwyl hulle met die uterusgewigtoename-metode so min as 0.0055 ugm. per gram voer kon vasstel. Hulle gebruik geovariotomeerde muise en dien die estrogene per mond toe. Dorfman en Dorfman(1954) was met die geovariotomeerde-rot-uterus-metode wat hulle gebruik het, in staat om n minimumdosis van 2.5 ugm. te bepaal.

Daar is verskeie faktore wat die resultate van n biologiese bepaling kan beïnvloed. Volgens Pincus(1948) en Pedersen-Bjergaard(1939) speel faktore soos die spesie van die proefdier, oplosmiddel waarin die toetsstof toegedien word, die roete, plek en frekwensie van toediening n rol by die bepaling. Verdere faktore wat n rol speel soos deur Marrian en Parkes(1929) beskryf word, is: individuele variasies van die sensitiwiteit van die toetsdiere en variasie van die kondisie van die diere. Verder beveel hulle aan dat vagina-smere drie maal per dag gemaak word omdat sommige muise n kort estrussiklus mag hê. Stob et al.(1954a) het gevind dat die tydperk wat verloop na ovariotomie n invloed op die uterusgewig van muise uitoefen. Volgens laasgenoemde navorsers bereik die muisuterus ongeveer 14 dae na ovariotomie n minimum gewig en dit word beskou as die tydperk waarin aktiewe regressie plaasvind.

By die meeste bepalingmetodes word gebruik gemaak van 'n ekstrakt wat van die materiaal wat ondersoek moet word, berei is. Die moontlikheid bestaan dat sulke ru-ekstrakte ook ander stowwe mag bevat wat androgeniese- of selfs anti-estrogeniese werking het. Danneberg en Schmahl(1952) het reeds die anti-estrogeenaktiwiteit van sekere verbindings beskryf.

Die vagina-kornifikasie-toets is, volgens Emmens (1955) waarskynlik meer spesifiek vir die bepaling van estrogeenaktiwiteit in ru-ekstrakte. 'n Verdere nadeel verbonde aan die toediening van ekstrakte aan proefdiere is die moontlikheid dat daar verliese of verhoging van die estrogeenaktiwiteit gedurende die ekstraheringsproses kan plaasvind. Dit geld vir sowel ekstrahering van plant- as van diermateriaal. Volgens Pieterse en Andrews(1956) het behandeling met alkoholiese KOH die aktiwiteit van die plantpigment, genisteïn, verhoog. Verskeie navorsers pas alkoholiese hidrolise toe gedurende die ekstraheringsproses. Malpress(1946) het gevind dat verhitting van ψ - of trans - stilboëstrol met 2.5N water-oplossing van soutsuur 'n mengsel van die aktiewe trans- en van ψ - stilboëstrol in die verhouding van 9:1 gee. Dus 'n daling van aktiwiteit wat gedurende die ekstraheringsproses kan plaasvind in gevalle waar van suur- hidrolisering gebruik gemaak word.

Om die moeilikheid te oorbrug het Stob et al.(1954c) die toetsmateriaal gedroog en net so aan die proefmuise toegedien deur dit met hul voer te meng. Die nadeel wat hieraan verbonde is, is die feit dat die muise nie veel meer as 2 gm. per dag van die gedroogde materiaal kon inneem nie. Baie minder materiaal word dus aan die toets onderwerp as wanneer 'n ekstrakt berei kan word waarin die estrogene-materiaal gekonsentreer is.

Daar is ook sekere stowwe wat muise nie vreet nie, selfs al word die muise vooraf uitgehonger. Met uithongering word ook ander faktore geskep, bv. n foliensuur-tekort in die dieet van die diere, wat die bepaling beïnvloed.

Die snelheid en mate van absorpsie uit die spysverteringskanaal by proefdiere is nog n faktor wat in aanmerking geneem moet word. Verder speel die snelheid van afbreking en skadeloosstelling van estrogene in die liggaam ook n rol. Dit is volgens Dodds (1949) waarskynlik die rede waarom stilboëstrol meer aktief is per mond as die natuurlike estrogene. Waarskynlik is dit ook die rede waarom daar spesieverskille in die gevoeligheid teenoor estrogene is.

n Groot nadeel van die toediening van ekstrakte deur onderhuidse inspuiting is die moontlikheid dat n gedeelte van die toegediende dosis weer kan uitloop en op die wyse verlore gaan.

2. Estrogeenaktiwiteit in Voedsel.

(a) Voorkoms van estrogene in diereweefsels.

Stowwe wat estrogeenaktiwiteit vertoon, kom wyd verspreid in die natuur voor. Daar is n verskeidenheid van verskillende chemiese stowwe wat aktiwiteit vertoon. Die term estrogeen dui eintlik n estrus-veroorsakende stof aan. Omdat by die mens en sekere soogdiere nie estrus voorkom nie, kan, streng gesproke, nie van estrogene gepraat word as die natuurlike, menslike, vroulike hormone soos estradiol, estrone en estriol bedoel word nie. Dit het egter om verskeie redes gebruiklik geword om die stowwe estrogene te noem. Wright (1952) onderskei duidelikhedshalwe tussen natuurlike en kunsmatige estrogene.

Kunsmatige estrogene dui die stowwe aan wat nie in die dierlike liggaam onder normale omstandighede voorkom nie, soos stilboëstrol en sy derivate. Die estrogene wat uit diereweefsel geïsoleer is, is almal steroïede en word die natuurlike of soms, steroïede-estrogene genoem. Sintetiese estrogene dui enige estrogeenaktiewe stof wat in die laboratorium berei is, aan en kan dus natuurlike of kunsmatige estrogene wees. Verder kan onderskei word tussen ware en pro-estrogene en eksogene- en endogene-estrogene.

Reeds in die jaar 1900 is vermoed dat sekere geslagsfunksies van die vrou afhanklik is van die ovaria. In 1905 het Marshall en Jolly (1905) gevind dat estrus by geovariotomeerde honde opgewek kan word deur inspuitings van ovaria-ekstrak. Volgens Stephens (1947) het Stockard en Papanicolaou in 1917 gevind dat daar gedurende estrus in die marmot se vagina karakteristieke selle voorkom en dit is in 1921 deur Long en Evans bevestig. Hierdie bevindings het die basis gevorm van die bepalingsmetode vir estrogene wat later deur Allen en Doisy ontwerp is. Allen en Doisy (1923) het gevind dat inspuiting van follikelvog van die sog se ovaria, estrus-veranderinge van die rot-vagina veroorsaak. Laasgenoemde navorsers het die studie van estrogene op 'n vaste wetenskaplike grondslag geplaas. In 1929 isoleer Doisy et al. (1929) en Butenandt (1929) onafhanklik van mekaar 'n kristallyne estrus-veroorsakende stof uit die urine van swanger vroue.

Volgens Pearlman (1948) is die ovaria en plasenta die belangrikste bronne van estrogene in die dierlike liggaam. Volgens Paschkiss (1950) word die hormone waarskynlik in die ovaria en plasenta uit boustowwe gesintetiseer en is dit dus ware endogene estrogene.

Waarskynlik word die hormone in die teka-selle van die ovaria gevorm, volgens die bevindings van verskeie vroeëre navorsers wat onlangs bevestig is, aldus Venning (1955). Die hormone wat in die ovaria van die mens gevorm word, is estrone, estriol en estradiol waarvan lg. die aktiefste is. Estrogene is in die plasenta gevind deur verskillende navorsers volgens Pearlman (1948) en Paschkiss (1950). Allen (1932) vind ook estrogene in die amnionvloeistof maar baie min in die embryo self. Burrows (1949) beweer dat Frank et al. (1936) die verskynsel dat geovariotomeerde vroue en vroue na die menopouse soms nog estrogene in die urine uitskei as bewys dien dat daar n ander setel van estrogeen-vorming in die liggaam kan wees behalwe die ovaria; hulle stel die byniere voor.

Dit is vandag n bekende feit dat estrogene o.a. een van die groep hormone is wat deur die bynierskors vervaardig word en bekend is as die gonado-kortikoïedes. Verder kom estrogene ook voor in die testes van verskillende spesies. Volgens Burrows (1949) en Pearlman (1948) is daar baie navorsers wat estrogene-stowwe in testes van beeste en van die mens gevind het; veral die testes van hingste bevat groot hoeveelhede estrogene-stowwe. Volgens Zuckerman (1950) word hierdie estrogene waarskynlik in die Sertoli-selle van die hond en in die Leydig-selle van die vark se testes gevorm.

Estrogene-stowwe kom ook in die feses en gal van diere en die mens voor. Wright (1952) beskryf dat die uitskeiding van estrogene by n swanger vrou geleidelik styg en dat dit voor geboorte n maksimumwaarde bereik van 20 mg. per liter per 24 uur. In die urine van nie-swanger vroue kom daar maar enkele ugm. per liter per 24 uur voor en by die man waarskynlik nog minder.

Zondek (1941) verklaar dat in die urine van die hings van 10,000 tot 400,000 muis-eenhede per liter estrogene voorkom. (Dit is ekwiwalent aan 0.5 tot 20.0 mg. estradiol). Verder kom estrogene-stowwe ook in die feses van swanger beeste voor, volgens Levin (1945); is dit waarskynlik afkomstig van die gal en plant-estrogene. Gedurende die lente maande kon Juhn en Gustavson (1930) volgens Burrows (1949) sowat 700 tot 1,000 rot-eenhede per Kg. in die feses van die hen bepaal. Paschkiss en Rakoff (1950) beweer dat die estrogene wat in gal voorkom, deur die lewer daarin uitgeskei word en dat 'n gedeelte daarvan weer uit die spysverteringskanaal teruggeabsorbeer word.

Estrogene kom waarskynlik in baie meer organe en weefsels in die mens- en dierliggaam voor, maar die hoeveelhede is so gering dat dit nie met die metodes wat beskikbaar is, maklik aangetoon kan word nie. Onder abnormale omstandighede soos wanneer estrogene van buite toegedien word, mag dit wees dat daar bepaalbare hoeveelhede eksogene-estrogene in feitlik enige weefsel kan voorkom. Die skadeloosstelling van estrogene geskied ook nie in alle weefsels ewe vinnig nie. Omdat sekere dierlike weefsels vir die mens as voedsel dien, kan dit gebeur dat produkte afkomstig van diere wat groot hoeveelhede estrogenaktiewe stowwe in hul weefsels bevat, die normale werking van die menslike liggaam versteur.

Baie navorsers het gevind dat die toediening van estrogene aan ekonomies- belangrike diere bevorderlike uitwerking het. So vind onder andere Clegg en Carroll (1956); O'Mary en Cullison (1956); O'Mary et al. (1956); Andrews et al. (1954); Stob et al. (1954b) en Dinusson (1950) dat ~~die~~ inplanting van stilboëstrol in dosisse van 24 tot 108 mg. onder die vel van beeste betekenisvolle versnelling van die gewigstoename veroorsaak het.

Goetsch (1955) en Baum (1956) verklaar dat inplanting van stilboëstrol by hoenders reeds lankal toegepas word. By skape word ook verhoogde toename van liggaamsgewig gevind met stilboëstrol-inplantings volgens Andrews (1949); Wilkinson et al. (1955); Whitehair et al. (1953) en Bell et al. (1954). Die gedagte om stilboëstrol in die voer van die diere te meng is deur Burroughs (1954) toegepas. Hulle vind dieselfde bevorderlike invloede wat met inplantings van stilboëstrol verkry word en verklaar verder dat sekere nadelige neue-uitwerkings wat met inplanting voorkom, daardeur vermy word. Hulle beveel 10 mg. per bees per dag in die voer aan. Uit die navorsing van Richardson et al. (1955) blyk dat daar nog sekere nadelige neue-invloede is. Dieselfde bevind Perry et al. (1955) ook. Die nadelige uitwerking is o.a. ontwikkeling van die melkkliere by osse, verswakking van karkasgehalte en verslapping van die lumbale ligamente. Burroughs et al. (1955) dien dosisse van 5 tot 10 mg. stilboëstrol per dag per bees in die voer toe en vind versnelde groei en verbeterde voerverbruik en geen nadelige invloed nie. By skape vind Hale et al. (1955) ook dat met toediening van 2 mg. per dag in die voer 'n versnelling van 22% in die gewigstoename verkry word. Dosisse van 2.5, 5.0 en 10.0 mg. per dag 84 dae lank veroorsaak by osse 'n toename van die groeisnelheid en 'n afname van die voerkoste van 20% volgens Burroughs et al. (1954).

Estrogene word ook gebruik om funksionele kapoenisering van hane te bewerkstellig en sulke hane is baie rustiger en meer hanteerbaar, neem vinniger in gewig toe en die vleis is waarskynlik sagter en smaakliker. Die nadelige gevolge van kastrasie op die groeisnelheid van kalwers soos deur Raimondi (1955) beskryf word, word deur stilboëstrol-toediening meestal opgehef.

Lg. navorser het bereken dat die bulkalwers wat as kontrole gedien het in sy proewe, se voer-onkoste 10.48% laer was as die van die gekastreerdes as gevolg van n meer ekonomiese voerverbruik.

Die estrogeen wat die algemeenste gebruik word, is stilboëstrol. Dit is baie goedkoper as die natuurlike estrogene en is ook baie meer aktief per mond. Volgens Solmssen (1945) is die trans-isomeer die aktiewe van die twee moontlike isomere. Grundy (1957) verklaar dat die cis-isomeer nog nie geïsoleer is nie. Trans-diëtiel-stilboëstrol is n kleurlose, kristallyne of wit, poeieragtige stof. Carayon - Gentil en Cheymol (1946) gee die oplosbaarheid van stilboëstrol aan as 0.028 gm. per 100 c.c. water, 18.5 gm. per 100 c.c. etiel-alkohol en 32.0 gm. per 100 c.c. eter almal by 17° C. Volgens Stephens (1947) is dit stabiel teenoor hitte en kan een uur lank by 150° C gehou word sonder verlies van aktiwiteit. Wilder Smith en Williams (1945) vind egter dat dit onstabiel is in water-oplossings veral van sure en alkali's.

Die voordele van estrogeenbehandeling van diere is van groot ekonomiese belang. Kennis aangaande die lot van eksogene-estrogene is nog baie onvolledig en gebrekkig. Die lot van eksogene-estrogene is van fundamentele wetenskaplike belang, maar ook van ekonomiese belang, want dit bepaal die faktore wat betrokke is by die uiteindelijke residuele estrogeenaktiwiteit wat daar in die weefsels van sodanig behandelde diere sal voorkom.

Metaboliese reaksies in die liggaam wat deur estrogene beïnvloed word, is deur verskeie navorsers al blootgelê, maar die metabolisme van estrogene self is volgens Pincus (1950) nie so duidelik nie.

Daar is nog probleme soos die invloed wat die mikroflora van die spysverteringskanaal op estrogene het en omgekeerd, ook die snelheid en wyse van absorpsie, die metode van vervoer in die bloedstroom, die invloed van die lewer en die mate van skadeloosstelling wat plaasvind in die liggaam, die metode van absorpsie by die weefsels uit die bloedstroom, die wyse waarop dit die ensiem-reaksies in die selle beïnvloed en die verandering wat dit self ten gevolge daarvan ondergaan, die wyse waarop dit die selle en weefsels weer verlaat en uiteindelik hoe die uitskeiding daarvan plaasvind.

Een van die belangrikste faktore wat die uiteindelijke residuele aktiwiteit van die weefsels van enige dier wat estrogeen-behandeling ontvang, sal bepaal, is die onaktivering wat dit in die liggaam ondergaan.

Volgens Zondek (1941) kan net 'n klein gedeelte van die toegediende estrogene weer herwin word. Ongeveer 10% van die toegediende dosis is in die urine uitgeskei; die res kon in geen weefsel opgespoor word nie, selfs met geheel-ekstrahering van die dier. Dat 'n klein gedeelte van die toegediende estrogene uitgeskei word, is ook die bevinding van Doisy et al. (1942) en Jailer (1949). Dit is dus duidelik dat daar vernietiging van die estrogeenaktiwiteit in die liggaam moes plaasgevind het. Deur verskeie navorsers is dit aangetoon dat die lewer die belangrikste setel van die onaktiveringsproses is. Dit geld vir beide natuurlike en kunsmatige estrogene vir konyne, marmotte en honde. Nielsen et al. (1946) vind egter dat stilboëstrol nie deur die lewer van rotte onaktief gemaak word nie. Uit die bespreking van Paschkiss en Rakoff (1950) en Pearlman (1948) is dit duidelik dat die lewer wel 'n belangrike rol moet speel.

Volgens Grundy (1957) het verskeie navorsers ook gevind dat lewer-ondoeltreffendheid wat deur beskadiging van die lewerselle veroorsaak is, die skadeloosstelling van estrogene deur die lewer by die mens verminder. Gedeeltelike lewerverwydering het dieselfde invloed gehad.

In vitro het menslike lewerweefsels die vermoë getoon, volgens Tagnon et al. (1952), om 11.5 gm. estradiol per 24 uur te onaktiveer. Dié vermoë van die menslike lewer is volgens Twombly en Taylor (1942) minder as dié van rotlewer. Volgens Paschkiss en Rakoff (1950) is daar aanduidings van die ensiem-sisteme in die lewer wat betrokke is by estrogeen-onaktivering. Hulle stel voor dat daar ten minste gedeeltelik 'n dehidrogenasie-meganisme betrokke is. Uit die bespreking van die probleem wat deur Grundy (1957) gegee word, is dit duidelik dat verskeie navorsers reeds getoon het dat behalwe dehidrogenasie-ensieme ook difosfo-piridiennukleotied-, kosimase- en sitokroomoksidase-ensieme betrokke is. Zimmerberg (1946) vind dat wanneer stilboëstrol in 'n weefselkultuur van rotlewer voorkom, dit gedeeltelik geoksideer en gedeeltelik gekonjugeer word deur ensiemreaksies en dat die aard van die eindprodukte onbekend is. Uit die oorsig wat deur Paschkiss en Rakoff (1950) gegee word, is dit duidelik dat daar 'n entero-hepatiese-estrogeen-sirkulasie is waartydens klein hoeveelhede estrogene in die ontlasting verlore gaan. Onder sekere omstandighede kan die vermoë van die lewer om estrogene onaktief te maak, ook verminder word. Volgens Engel (1952) het die toediening van sekere kolloïdale stowwe onaktivering van estrogene deur die lewer vertraag. Biskind en Biskind (1942) vind dat die lewer van rotte op 'n dieet wat nie genoegsaam vitamine van die B-kompleks bevat nie, die estrogeen-onaktiveringsfunksie van die lewer verhoed.

Volgens Grundy (1957) vind ander navorsers egter dat die verhongering gedurende n vitamien -B-tekort die versteurde lewerfunksie kan verklaar en dat toediening van proteïen of meticnien die toestand ophef. Mentz, Odendaal en Steyn (1950) het egter getoon dat die vitamine van die B-kompleks noodsaaklik is vir die onaktivering van estrogene deur die lewer.

Volgens Wessely et al. (1952) word estrogene ook deur bloed geonaktiveer.

Die uitskeidingsprodukte van estrogene wat deur verskeie navorsers uit urine verkry is, is meestal konjugate. Dodgson en Williams (1948) vind na toediening van stilboëstrol by vroue dat 35% van die dosis herwin kan word uit die urine as die bensielamiensout van stilboëstrolmonoglukuronied. By beeste vind Malpress en Owen (1946) dat na toediening van 4.5 gm. stilboëstrol, 23.2% daarvan in die ontlasting en 11.8% in die urine voorkom. Met die onderhuidse toediening van 121 mg. vind hulle n styging van die eteriese en anorganiese-swawel-verbindings in die urine. Wilder Smith (1947) vind dat by die mens 50% as die monoglukuronied, 6% as die sulfaat-ester en minder as 1% as die vry estrogeen uitgeskei word. Fishman (1947) beskou die vorming van estrogeen-glukuroniede as n tussenstof wat ontstaan gedurende die verbruik van estrogene in die liggaam. Hanahan et al. (1953) beskou die konjugate as die vorm waarin estrogene in die liggaam gestoor word en waaruit vrye estrogene gevorm kan word wanneer die liggaam dit nodig het.

Verskeie navorsers vind residuele estrogeniese aktiwiteit in die weefsels van diere wat met stilboëstrol behandel is. Veral na inplanting vind Cairy (1955) en Stob et al. (1954b) residuele aktiwiteit.

Laasgenoemde navorsers vind dat 0.01 ugm. stilboëstrol per gm. droë lewerweefsel by diere aangetref word wat met 60-120 mg. stilboëstrol-inplantings 140 dae lank, behandel is. In spierweefsel vind hulle by dieselfde beeste residuele aktiwiteit wat ekwiwalent is aan die aktiwiteit van 0.01 ugm. stilboëstrol per gram droë vleis. In spierweefsel van skape wat met 12 mg. stilboëstrol-inplantings 28 tot 84 dae lank behandel is, was daar volgens die bevindings van Stob et al. (1954b) van 0.01 tot 0.1 ugm. ekwiwalente residuele aktiwiteit. By hoenders wat 12 mg. inplantings 7 tot 28 dae lank ontvang het, vind laasgenoemde navorsers 0.01 tot 0.05 ugm. aktiwiteit. Merker et al. (1955) kon geen residuele aktiwiteit by hoenders wat met 12 mg. inplantings behandel is, vind nie. Na inplanting van 90 mg. en hoër dosisse stilboëstrol by die mens, kon Greenblatt et al. (1952) ook nie residuele aktiwiteit in die abdominale vet vasstel nie.

Met toediening van stilboëstrol per mond vind die meeste navorsers dat daar geen residuele aktiwiteit in die weefsels van sulke diere voorkom nie. Preston et al. (1956) het die vleis van osse wat 2.75, 5.5 en 11.0 mg. stilboëstrol per os per dag 112 dae lank ontvang het, met behulp van twee verskillende metodes ondersoek. Verder het hulle ook die weefsels van beeste wat 6 en 12 mg. per dag 113 dae lank en van beeste wat 9 mg. per dag 84 dae lank ontvang het, ondersoek. Geen aktiwiteit kon in die vet, ^{hart} lewer, niere, milt of spierweefsel van enige van die diere vasgestel word nie. Turner (1956) vind egter dat osse wat 148 dae lank met 10 mg. stilboëstrol per os per dag behandel is, wel residuele aktiwiteit in die nier- en longweefsel vertoon.

Ander weefsel wat hy ondersoek het, soos spierweefsel van die nek en ribstuk, punt van die tong, lewer, milt, hart, brein, vet en bloed het geen residuele aktiwiteit besit nie. Daar is ook volgens Stob et al. (1956) aanduidings van residuele aktiwiteit in die niere en dele van die spysverteringskanaal van beeste wat 10 mg. heksoëstrol en chlortetrasiklein (oureomisien) per mond ontvang het. By ander diere gee toediening van stilboëstrol per mond ook aanleiding tot residuele aktiwiteit in die weefsels. Gowe (1949) vind dat hoenders wat 11 weke lank 0.004% dienoëstrol en daarna 2 weke lank 0.0088% dienoëstrol in hul voedsel kry van 12 tot 14 ugm. in vleis en vel en 5 ugm. per 100 gm. in lewerweefsel residuele aktiwiteit, vertoon.

(b) Voorkoms van Estrogene in Plantweefsels.

Verskeie navorsers het estrogeenaktiwiteit in plante en plantprodukte gevind. Bradbury en White (1954) het n volledige oorsig opgestel oor die onderwerp. Volgens hulle is estrogeenaktiwiteit reeds in 1926 in plante aangetoon. n Groot aantal plante en plant-ekstrakte is reeds ondersoek waarvan baie positiewe resultate gelewer het. Die isolasie van n paar plant-estrogene kan ook bydra tot die fundamentele biochemiese kennis van die verband tussen chemiese struktuur en estrogeenaktiwiteit. Sekere voedselsoorte wat produkte van plante is, kan dus ook estrogeenaktiwiteit vertoon. Volgens Juhn en Gustavson (1930) vertoon heuning ook estrogeenaktiwiteit wat waarskynlik van plantaardige oorsprong is. Verder is daar estrogeenaktiwiteit in plantprodukte, soos knoffel, (Allium Sativum L.), hawersaad (Avena sativa L), produkte van die palm (Elaeis guineensis Jacq.), "Sage" (mintblare wat as kruie gebruik word) (Salvia officinalis L.), en verskillende variëteite van die klawerplant (Trifolium Subterraneum L.) en lusern (Medicago sativa) aangetref, wat taamlik hoog is.

Daar is ook aanduidings van aktiwiteit in plante soos Solanum tuberosum(aartappel), Arachis hypogaea (grondbone), Beta vulgaris se saad (beet), Prunus domestica (pruim), Butea superba Roxb. en Tulipa spesies (tulp), veral bolle. Verwysings word deur Bradbury en White (1954) gegee . Baie van die plante waarin aktiwiteit gevind is, behoort aan die familie Leguminosae.

Dit is duidelik dat die voedsel van mens en dier stowwe kan bevat wat estrogenies aktief is en dit hang van die hoeveelhede waarin die stowwe in plante voorkom, af, of dit enige invloed op die dierlike en menslike liggaam sal uitoefen. Pope (1954) vind dat die estrogeenaktiwiteit wat in rooiklawer voorkom, sodanige hoeveelhede bedra dat dit onvrugbaarheid by diere wat daarop wei, kan veroorsaak. Die gevalle van die ernstige voortplantingsversteurings wat in Wes-Australië voorgekom het by skape wat op klawer gewei het, (T. Subterraneum L.v. Dwalganup), en deur Bennets et al. (1946) beskryf word, was uitsluitlik aan die voorkoms van estrogeenaktiewe stowwe in die klawer toe te skryf. Die seisoenveranderinge wat in die samestelling van koeimelk voorkom, volgens Bartlett et al. (1948), kan ook aan die wisselende hoeveelhede estrogeenaktiewe stowwe wat in die plante wat deur die diere gevreet word, toegeskryf word. Hulle vind dat sekere grassoorte estrogeenaktiwiteit vertoon. Dit is in ooreenstemming met die bevindings van Evans en Evans (1949) wat gedroogde jong grasmonsters aan muise toegedien het en gevind het dat die muise vervroegdegeslagsrypheid vertoon. Carter et al. (1955) vind dat diere wat met soja-bone gevoer word, voortplantingsversteurings vertoon.

By die lusernplant is die estrogeenaktiwiteit nie konstant nie.

Die werk van Pieterse en Andrews (1956b) het getoon dat die ekwiwalente aktiwiteit wissel van 2.6 ugm. per pond in die vroeë knopstadium na 0.15 ugm. per pond voor die blomstadium, dan neem dit weer toe na 4.3 ugm. per pond gedurende die blomstadium, in terme van ugm. stilboëstrol. Dieselfde navorsers vind ook wisselende aktiwiteit in lusernhooi, nl. van 16.3 ugm., 5.6 ugm. en minder as 0.5 ugm. per pond, in terme van die ekwiwalente aktiwiteit van stilboëstrol. Die verskillende dele van die lusernplant toon ook variasie, met die hoogste aktiwiteit in die blare. Uit die resultate van die estrogeenbepalings wat deur Cheng et al. (1953a) uitgevoer is, is dit duidelik dat hulle ook aktiwiteit vind wat ekwiwalent is aan 0.87 tot 2.72 ugm. stilboëstrol per pond in lusern. Pieterse en Andrews (1956a) vind dat wanneer lusern ingekuul word, daar 'n toename van estrogeenaktiwiteit voorkom na 'n tydperk van inkuiling.

Verskeie soorte peulplante bevat waarskynlik estrogeenaktiwiteit. Rooiklawer bevat volgens Pope et al. (1953) 'n estrogene-isoflavoon nl. Biochanien A. Sojabone bevat volgens Cheng et al. (1953b, 1954) aktiewe isoflavoon-verbinding; dit is ook die bevinding van Carter et al. (1953). Curnow en Rossiter (1955) isoleer ook uit verskeie Trifolium-spesies die aktiewe genistein. Pieterse en Andrews (1956b) het estrogeenaktiwiteit in verskeie peulplante gevind. Volgens Geissman en Hinreiner (1952) kom isoflavoon-derivate in verskeie ander genera van die Leguminosae-familie voor, bv. Ononis spinosa en Baphia nitida. Volgens Bradbury en White (1954) het verskeie navorsers reeds estrogene-verbindinge uit ander peulplante geïsoleer.

(c) Chemie van Plant-estrogene.

Die estrogene-stowwe wat reeds uit plante geïsoleer is, sluit volgens Bradbury en White (1954) hidro-fenantraen-, stilbeen- en isoflavoon-verbindinge in. Die reeds geïsoleerde hormone is estroon, estriol, genistien en sy derivate. Kennis van die plant-estrogene is egter baie gebrekkig en fragmentaries; daar mag met verdere navorsing nog meer stowwe geïsoleer word wat aktief is.

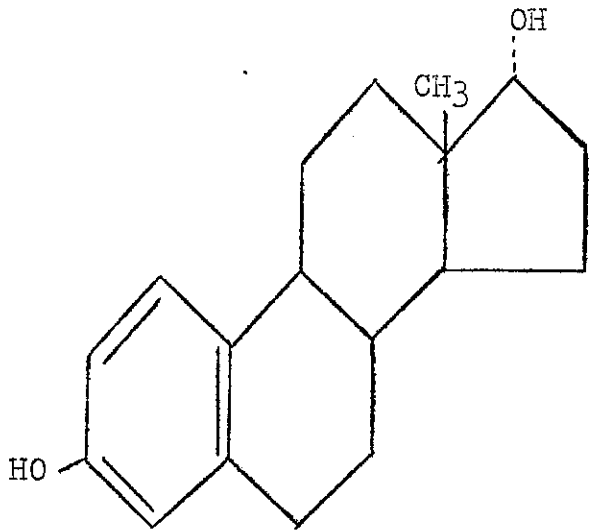
Geissman en Hinreiner (1952) noem in hulle oorsig van die biosintese van plant-flavonoïede verskeie plante waarin silbene en isoflavone voorkom. Onder andere kom die stowwe voor in sojabone, verskillende klawergewasse, (Cicer arietinum L.) en dyer's green weed „chick pea“ (Genista tinctoria L.) Volgens Bradbury en White (1954) is die estrogeenaktiwiteit van bg. plante en van Ferreirea spectabilis toe te skryf aan een van die genisteïn-verbindinge wat daarin voorkom. Genisteïn is 5, 7, 4'-tri-hidroksie-isoflavoon en die derivate daarvan wat reeds geïsoleer is, is die 4'-metiel-eter (biochanien-A) en 7-metiel-eter of prunetien. Die isoflavoon wat die algemeenste voorkom, is waarskynlik genisteïn, wat ook deur Pope et al. (1953) uit Engelse rooiklawer geïsoleer is. Dit is ook deur verskeie navorsers uit ander klawerspesies geïsoleer. Curnow en Rossiter (1955) het dit bv. uit 123 variëteite van T. Subterraneum L. en ook uit ander Trifolium-spesies geïsoleer.

Dit is eienaardig dat stowwe wat chemies soveel van mekaar verskil, dieselfde biologiese uitwerking het op die dierlike liggaam, m.a.w. dat stowwe wat chemies verskil, almal kornifikasie van die muis- en rotvagina, of toename van die uterusgewig kan veroorsaak.

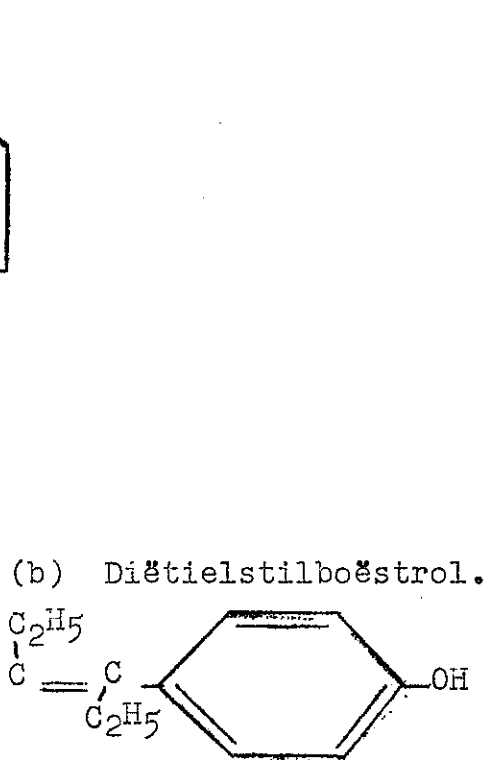
Die natuurlike estrogene-hormone het meestal n siklopentano-perhidrofenantreen-struktuur bv. α -estradiol (fig. 5a, p. 57); die meeste kunsmatige hormone het n stilbeen-struktuur bv. stilboëstrol (4:4' - dihidroksie B-dietiel-stilbeen) (fig. 5b, p. 57). Ander kunsmatige estrogene besit egter nie n stilbeen- of fenantreen-struktuur nie, soos Horeau-suur (fig. 5c, p. 57). Die struktuur van die plantestrogene wat tot dusver geïsoleer is, toon almal verwantskap met die isoflavoon genisteïn (fig. 5d, p. 57). Hieruit is dit duidelik dat daar n gebrek aan molekulêre-spesifiekheid by estrogene-verbindings is.

Reeds gedurende 1930 is eksperimente uitgevoer om vas te stel hoe die molekule van die natuurlike estrogene verander kan word sonder verlies van aktiwiteit. Volgens Dodds en Lawson (1938) en Dodds (1949 en 1955) is aanvanklik gevind dat n eenvoudige verbinding soos anol nog aktiwiteit besit maar dit was, soos later geblyk het, toe te skryf aan onsuiverhede soos di-anol wat in die toetsmateriaal voorgekom het. (Vgl. Campbell et al. (1949). Bogenoemde navorsers het dus deur die ontdekking van stilboëstrol bewys dat die fenantreenkern nie noodsaaklik is vir estrogeenaktiwiteit nie. Hulle stel ook aanvanklik n teorie op om die verband tussen aktiwiteit en struktuur te verklaar. Die teorie is egter deur latere navorsing omvergewerp. Volgens Solmssen (1945), wat n volledige oorsig gee van die verband tussen struktuur en aktiwiteit van die sintetiese estrogene, is daar n paar vereistes waaraan n chemiese verbinding moet voldoen om aktief te wees. Volgens navorsers na wie hy verwys, is gevind dat verskuiwing van die fenoliese-hidroksielgroepe na ander posisies aan die feniel-kerns van stilboëstrol die aktiwiteit opvallend verander.

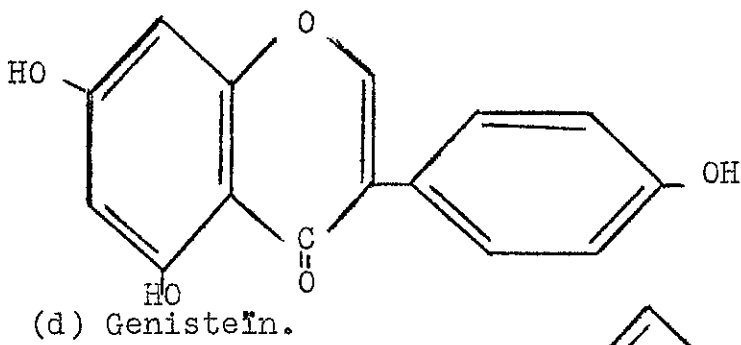
Figuur 5.



(a) α - Estradiol.

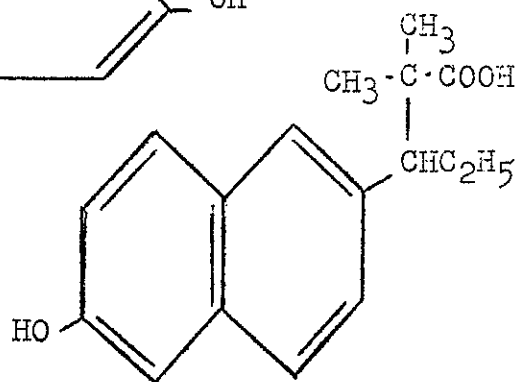


(b) Diëtielstilboëstrol.



(d) Genistein.

(c) Horeau-suur.

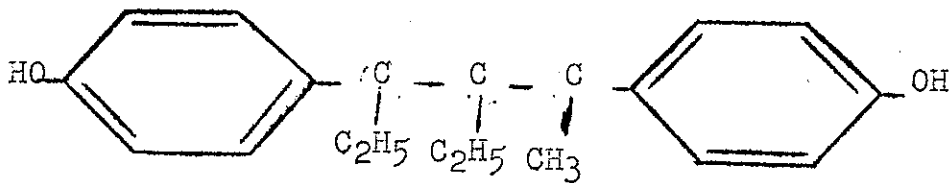


Die aktiefste verbindings is dié waar die hidroksielgroepe in die paraposisie t.o.v. die alifatiese-verbindingsketting voorkom. Wysiging van die alifatiese ketting het ook die aktiwiteit beïnvloed. Veral substitusie van etielgroepe aan die ketting verhoog die aktiwiteit aansienlik. Verlenging van die ketting of verskuiwing van die dubbelband het nie die aktiwiteit verander nie. Difenielpropaan-verbindings se aktiwiteit is ook verhoog deur substitusie aan die ketting met metiel of etielgroepe. Die aktiefste van die groep verbindings was bensoëstrol (fig.6a,p.59). Volgens Solmssen (1945) is die belangrikste faktore vir aktiwiteit dus die posisie en aantal van die hidroksielgroepe t.a.v. die alifatiese ketting en die substitusieprodukte van die alifatiese-ketting.

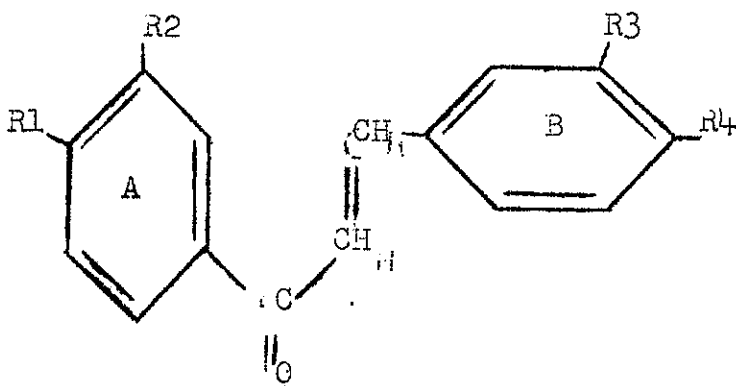
Uit die oorsig wat Grundy (1957) gee van die verband tussen struktuur en estrogeenaktiwiteit, is dit duidelik dat verskeie faktore in aanmerking geneem moet word. Oki en Urushibara (1952) vind dat stilboëstrol se aktiwiteit toe te skryf is aan die dikte wat die molekule besit. Verder is daar ook 'n verband tussen die absorpsievermoë van stilbeen-estrogene en hul aktiwiteit soos blyk uit die werk van Rideal (1945). 'n Ander faktor wat deur Grundy (1957) bespreek word, is die oplosbaarheid van estrogene. Dit is duidelik dat stilboëstrol meer oplosbaar is in water as heksoëstrol of dienoëstrol. Dit is moontlik dat verbindings in die liggaam gehidroksileer kan word en die gemak waarmee dit by 'n betrokke verbinding kan plaasvind, sal ook bepaal hoe aktief dit is.

In die geval van difenielpropaan-verbindings speel substitusieprodukte by die alifatiese ketting blykbaar 'n belangrike rol.

Figuur 6.



(a) Bensoëstrol.



(b) 3, 3', 4'-tetrahidroksie-chalkoon.

(R1 = R2 = R3 = R4 = OH)

(c) 3, 3', 4-trihidroksie-chalkoon.

(R1 = H; R2 = R3 = R4 = OH)

(d) 3, 4-dihidroksie-chalkoon.

(R1 = R2 = H; R3 = R4 = OH)

Terwyl die aktiwiteit van bensoëstrol tussen dié van ~~de~~ estradiol en estroon is, is die aktiwiteit van mono-alkiel-1, 3-difenielpropaan, volgens Solmssen (1945) baie laer. Pieterse en Andrews (1956a) het gevind dat, wanneer genisteïn (fig. 5d, p57) met alkoholiese KOH behandel word, ontstaan n verbinding waarvan die aktiwiteit hoër is as die van genisteïn self. Die produk wat so ontstaan, toon baie ooreenkoms met stilboëstrol, en dit is waarskynlik die rede waarom die aktiwiteit verhoog is.

Volgens Geissman en Hinreiner (1952) p. 130, kom daar in sekere plante n groep pigmente bekend as chalkone voor.

Die stowwe kom voor as verskillende derivate van chalkoon in plante soos Butea frondosa (Leguminosae), verskillende genera van die Compositae soos spesies van Coreopsis en Carthamus tinctorius. Bate - Smith en Swain (1953) isoleer ook 2', 4, 4'-trihidroksie-chalkoon uit geel-variëteite van Dahlia variabilis. Loewe et al.(1927) en Loewe (1933) vind estrogeenaktiwiteit in blomme van Salix Caprea L. Volgens Geissman en Hinreiner (1952) bevat die bas van Salix purpurea n 2-glukosied van 2', 4, 4', 6'-tetrahidroksie-chalkoon. Die stof phloridzin is die 2'-glukosied van 2', 4, 4', 6' tetra-hidroksie-hidrochalkoon wat berei word uit die wortels van verskillende vrugtebome van die Rocacae soos appels en pere.

V. BESPREKING.

1. Metode.

Die metode wat in hierdie bepalinge gevolg is, is een waar die toename in uterusgewig van geovariotomeerde muise, na toediening van n ekstrak van die toetsmateriaal, as kwantitatiewe maatstaf van die estrogeenaktiwiteit in die ekstrak gebruik word.

Uit die resultate van proewe 14 en 19 is dit duidelik dat n dosis van 0.004 ugm. stilboëstrol per gram muisvoer respektiewelik n betekenisvolle en hoogs betekenisvolle toename in uterusgewig veroorsaak het. Dit is in ooreenstemming met die bevindings van Preston et al.(1956).

Soos in figuur 1, 2 en 7 gesien word, is die krommes wat die dosis-reaksie voorstel met herhaling, feitlik dieselfde en daar is statisties ook nie betekenisvolle verskil tussen die twee groepe resultate nie. Daar kan dus aangeneem word dat dit die standaard-reaksie is wat vir hierdie betrokke muiskolonie geld.

Om faktore wat in die literatuuroorsig behandel is en wat die resultate moontlik kon beïnvloed, uit te skakel is ingeteelde muis gebruik en is al die muis op 'n ouderdom van ongeveer 48 dae geovariotomeer en presies 14 dae gelaat vir regressie van die uterus. Ander faktore wat nog 'n invloed kon hê, is met behulp van proewe ondersoek. Volgens Davis et al. (1956) verhoed 'n foliensuur-tekort die reaksie van die uterus na estrogeentoediening. Volgens hulle het die toediening van aminopterien, 'n stof wat die vorming van die sitrovorum-faktor uit foliensuur in die liggaam verhoed, veroorsaak dat die verhoogde fosfolipiede-, suur-oplosbare-fosfate- en proteïen-stikstof- waardes wat normaalweg deur estrogene in die uterus van diere veroorsaak word, nie voorkom nie. Die verhoogde aktiwiteit van alkaliese- en suur-fosfatase wat deur estrogeentoediening veroorsaak word, is ook deur die kunsmatige foliensuur-tekort verhoed. Dit is ook in ooreenstemming met die bevindings van Haque et al. (1949) wat dieselfde verskynsel by die hoender se oviduk opgemerk het. Jukes (1952) verwys ook na 'n hele aantal navorsers wat soortgelyke waarnemings gemaak het, o.a. Hertz wat vind dat pteroglutaamsuur ook noodsaaklik is vir die estrogeen-reaksie by die rhesusbobbejaan. Ander vitamien het nie dié invloed nie.

Die moontlikheid bestaan dus dat, indien die voer van die proefmuis nie voldoende foliensuur bevat nie, daar nie 'n normale uterus-reaksie sal wees nie, en dit kan die bepaling beïnvloed. Om die moontlikheid te ondersoek, is aan twee groepe geovariotomeerde muis dieselfde dosis stilboëstrol toegedien nl. 0.008 μg . per gram voer. In die voer van een groep is 6.25 mg. foliensuur per muis per dag bygevoeg.

Soos uit die resultate van proef 20 blyk, was daar nie betekenisvolle verskil tussen die uterusgewigte van die twee groepe muis nie. Daaruit moet afgelei word dat indien foliensuur, soos by ander soogdiere die geval is, noodsaaklik is vir die invloed van estrogene op die uterus van die muis, die muisvoer wat in hierdie proef aan die muis toegedien is, genoegsaam foliensuur bevat het. Die moontlikheid dat 'n foliensuur-tekort by die muis die bepaling van estrogene wat hier uitgevoer is, kon beïnvloed, is dus baie gering.

'n Tweede faktor wat 'n invloed op die bepalingsmetode kan hê, is die moontlike estrogeenaktiwiteit van die muisvoer wat hier gebruik is. Volgens Stob et al.(1954b) en Zarrow et al.(1953) het die kommersiële muisvoer wat hulle gebruik het, wel estrogeenaktiwiteit besit. So vind Cheng et al. (1953a) ook dat die proewe wat hulle uitgevoer het om die invloed van stilboëstrol op die gewigtoename van diere te bepaal, negatiewe resultate getoon het omdat die voer wat die kontrolediere ontvang het, 'n hoë estrogeenaktiwiteit besit het en die kontrolediere dus alreeds aan estrogeen-prikkeling blootgestel is. Zarrow et al. (1953) het vasgestel dat die estrogeenaktiwiteit van die muisvoer wat hulle ondersoek het, ekwivalent is aan die aktiwiteit van 3.75 μg m. estradiol per Kg. voer. Dit het veroorsaak dat die kontrolemuis alreeds 'n uterusgewigtoename ondergaan het. Die estrogeenaktiwiteit van die muisvoer kan toegeskryf word aan die plantmateriaal wat daarin voorkom, of aan die dierlike weefsels wat gebruik word by die vervaardiging, veral as die afvalprodukte van diere wat met stilboëstrol behandel is, daarvoor gebruik word.

Of die estrogene-materiaal kan toevallig in die muisvoer beland, soos in die geval wat deur Hadlow en Grimes (1955) beskryf word, waar die vervaardiger se meul met stilboëstrol besmet was.

Om die rede is die estrogeenaktiwiteit van die muisvoer-mengsel wat in hierdie proewe gebruik is, ondersoek. Aan een groep muis is 'n etanol-geëkstraheerde muisvoermengsel toegedien. Soos uit die resultate van proef 13 (Tabel 15), p. 23 blyk, is daar wel hoogs betekenisvolle verskille tussen die uterusgewigte van die kontrole wat gewone muisvoer ontvang het en die uterusgewigte van die muis wat geëkstraheerde muisvoer ontvang het. Daar moet aangeneem word dat die estrogeenaktiewe materiaal uit die muisvoer verwyder is deur die etanol-ekstrahering. Omdat foliensuur onoplosbaar is in 96%-etanol is die verlaagde uterusgewig wat deur die vooraf-geëkstraheerde voer veroorsaak is, waarskynlik toe te skryf aan die verwydering van estrogeenaktiewe materiaal en nie as gevolg van 'n foliensuur-tekort nie. In sekere van die bepalinge wat uitgevoer is, was die ekstrak wat van die toetsmateriaal gemaak is, taamlik swaar en het dit in verhouding 'n groot deel van die totale gewig van die ekstrak-voermengsel wat uiteindelik aan die muis toegedien is, uitgemaak. Daarenteen het die kontrolemuis net muisvoer ontvang.

Die estrogeenaktiwiteit van die muisvoermengsel kon nie direk bereken word uit die regressiekromme wat opgestel is vir die standaard-dosisreaksie nie. Met die standardisasie is van gewone muisvoer gebruik gemaak en die kontrolemuis se uterusgewigte het dus alreeds hoogs betekenisvol verskil van die muis wat geëkstraheerde muisvoer ontvang het.

Die gemiddelde uterusgewig van die kontrolemuise van proef 13 was 11.33 ± 0.26 mg. en die wat geëkstraheerde muisvoer ontvang het, se gemiddelde uterusgewig was 8.54 ± 0.85 mg., 'n verskil van omtrent 2 mg. Uit die regressiekromme in figuur 3 blyk dit dat 'n toename van 2 mg. in uterusgewig op enige plek op die kromme gelykstaan aan 'n toename van ongeveer 0.002 ugm. in die dosis stilboëstrol wat toegedien word. As aangeneem word dat die estrogenaktiwiteit van die muisvoer gelykstaan aan die aktiwiteit van 0.002 ugm. stilboëstrol per gm. voer, beteken dit dat die totale estrogenaktiwiteit van die 80 gm. muisvoer wat die muise ontvang het, ekwivalent is aan 0.16 ugm. stilboëstrol. (2.0 ugm. per Kg. voer). Indien die gewig van die ekstrak wat van die proefmateriaal berei is, 11.79 gm. weeg (wat waar is vir die ertjie-ekstrak wat in proef 11 berei is) dan beteken dit dat daar 68.3 gm. muisvoer in die uiteindelijke mengsel wat aan die muise toegedien is, voorgekom het. Die ekwivalente estrogenaktiwiteit van die muisvoer alleen was dus 0.002 ugm. per gram of 0.1366 ugm. stilboëstrol in totaal. Die estrogenaktiwiteit van die ekstrak wat by die 68.3 gm. muisvoer gevoeg is, moet dus ten minste ook 'n ekwivalente aktiwiteit van 0.002 ugm. stilboëstrol per gram besit; anders sal die kontrolemuise aan 'n hoër dosis estrogen-aktiewe stowwe blootgestel wees as die proefmuise. Indien die ekstrak geen estrogenaktiwiteit besit nie, sal die muise dus net aan die estrogenaktiwiteit van die 68.3 gm. muisvoer blootgestel wees, m.a.w. aan 'n aktiwiteit ekwivalent aan 0.00171 ugm. stilboëstrol per gm. ekstrak-voermengsel terwyl die kontrolemuise aan 'n estrogenaktiwiteit ekwivalent aan 0.002 ugm. stilboëstrol per gm. voer blootgestel is, 'n verskil van 0.000293 ugm. per gm.

Daaruit kan afgelei word dat die uterusgewig van die proefgroep muis laer moet wees as die van die kontrole indien die ekstrak wat getoets word geen aktiwiteit besit nie en dat, indien die kontrole- en proefmuis se uterusgewigte nie verskil nie, die moontlikheid nog bestaan dat die ekstrak n estrogeenaktiwiteit, ekwiwalent aan 0.000293 ugm. stilboëstrol per gm. ekstrak, uitgeoefen het. Dit beteken dan dat as die ekstrak bv. 11.7 gm. weeg, die totale ekwiwalente estrogeenaktiwiteit aan 0.00343 ugm. stilboëstrol gelyk sou wees of aan 0.00121 ugm. stilboëstrol per gram droë materiaal indien die ekstrak berei is uit 200 gm. droë materiaal.

In die meeste gevalle van die proewe wat hier gedoen is, was die gewig van die ekstrak minder as 11.7 gm. sodat die moontlike aktiwiteit nog aan minder as 0.000293 ugm. stilboëstrol per gm. ekstrak gelyk sal wees. Hierdie moontlikheid geld nie vir die vleismonsters wat ondersoek is nie, aangesien in die gevalle vir die kontrole ook n vleisekstrak berei is en by die muisvoer gevoeg is. By die ander bepaling wat uitgevoer is, is hierdie faktor egter nie in aanmerking geneem nie aangesien dit maar n geringe verskil sou uitoefen. Die bepalingmetode sal waarskynlik gebruik kan word om kleiner hoeveelhede estrogeenaktiwiteit aan te toon indien n estrogeen-vry dieet aan die muis verskaf word.

n Derde faktor wat ondersoek is in verband met die bepalingmetode, is die moontlike verlies van estrogeenaktiwiteit wat gedurende die ekstraheringsproses mag plaasvind. Die muisvoer is met etanol geëkstraheer, die ekstrak is weggegooi en n tweede monster is geëkstraheer en die ekstrak is oor die eerste geëkstraheerde monster gegooi, afgedamp en aan die proefmuis toegedien.

Soos in proef 13 (Tabel 15) gesien kan word, is die verskil in uterusgewig tussen kontrole- en proefmuis baie min en statisties nie betekenisvol nie. Daaruit mag afgelei word dat die estrogeenaktiwiteit gedurende die ekstraheringsproses nie betekenisvolle verandering ondergaan nie, mits die estrogeenaktiwiteit van die betrokke monsters dieselfde was voor ekstrahering. Dit geld waarskynlik nie vir alle gevalle nie. Daar is baie voorbeelde van navorsers wat 'n afname van aktiwiteit vind. Merker et al. (1955) beskryf 'n proef waar 2.0 mg. stilboëstrol by 1.5 tot 2 Kg. gemaalde hoendervleis gevoeg is en daarvan kon net 50% weer teruggevind word na ekstrahering. Selfs met ekstrahering in 'n atmosfeer van stikstof was die herwinning nie hoër nie. Dit kan egter ook aan ensiemwerking toe te skryf wees. Ander gevalle is ook bekend waar die aktiwiteit deur die ekstraheringsprosedure verhoog is, soos in die eksperimente wat deur Pieterse en Andrews (1956a) uitgevoer is, waar vasgestel is dat behandeling van plantmateriaal met alkoholiese KOH die aktiwiteit kan verhoog. (vergelyk bevindings van Malpress(1946)).

Die bepalingmetode is nie vry van kritiek nie en daar is nog faktore wat die resultate kan beïnvloed. Daar is byvoorbeeld opgemerk dat die muisvoer veselagtige materiaal bevat wat nie deur die muis gevreet word nie. Wanneer 'n etanol-ekstrak wat estrogeenaktiewe stowwe bevat nou oor die muisvoer gegooi word, kleef daar met afdamping van die etanol, van die estrogeenaktiewe materiaal ook o.a. aan hierdie veselagtige, oneetbare, muisvoerdeeltjies vas. Op die wyse kan dit gebeur dat die proefmuis nie aan die volle estrogeenaktiwiteit van die ekstrak blootgestel word nie.

Verdere moeilikhede wat aan die manier van toediening verbonde is, is die moontlikheid dat die muis nie al die voer- ekstrakmengsel inneem nie. Ten spyte van die spesiale voerbakkies wat gebruik is, kan dit tog gebeur dat die muis, alhoewel die voer meestal met 'n vysel vooraf gemaal is, klein stukkie daarvan uit die voerbakke kon verwyder en dit verlore gegaan het. Die hoeveelhede wat so verlore gegaan het, is waarskynlik baie gering. Gewoonlik is drie voerbakkies in 'n hok vir 10 muis geplaas om die moontlikheid van kompetisie tussen die muis uit te skakel, maar dit kan waarskynlik nog gebeur dat een of meer muis, meer as die ander muis van dieselfde groep van die voer vreet en dus aan 'n hoër dosis estrogenies-aktiewe stowwe blootgestel kan word. Die gevolg is dat die betrokke muis se uterusgewig baie hoër sal wees as die ander van dieselfde groep en dit verminder die statistiese waarde van die resultate.

Daar is ook gevind dat die ekstrak wat van sommige plante en plantprodukte berei is, op een of ander wyse nie aantreklik genoeg is vir die muis om te vreet nie. Sommige plante bevat groot hoeveelhede gomagtige stowwe of suikers of ander stowwe wat hidrofilies is; dit veroorsaak dat die voer-ekstrakmengsel wat verkry word, so vloeibaar is dat die muis dit nie wou eet nie. Daar is ook ander plante wat o.a. bitterstowwe bevat wat die voer-mengsel waarskynlik vir die muis onsmaklik maak.

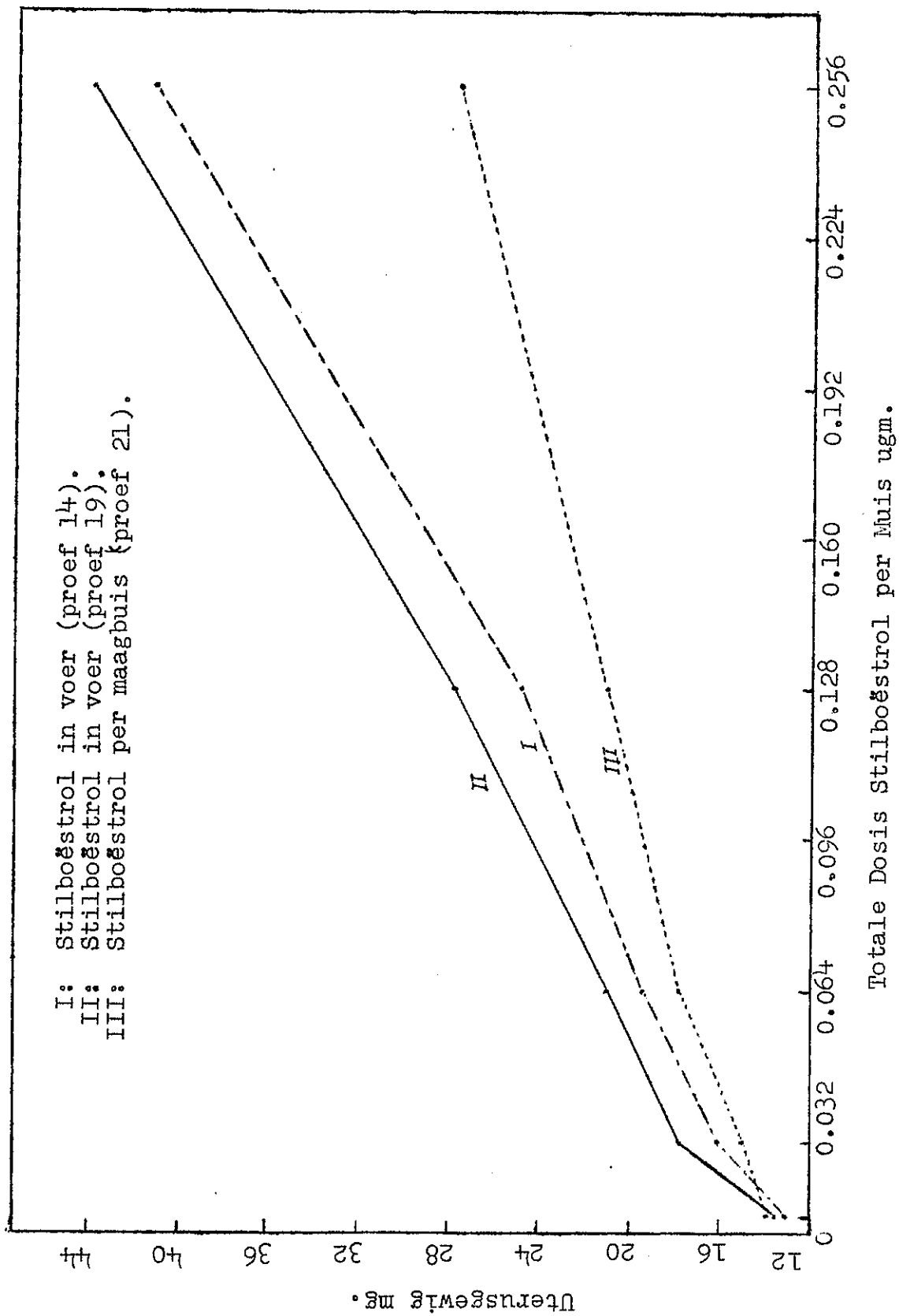
In 'n poging om sommige van die probleme wat aan die manier van toediening verbonde is, te bowe te kom, is 'n wysiging van die toedieningsmetode ondersoek. Dit berus daarop dat die ekstrak nie met die voer van die muis gemeng word nie, maar direk per maagbuis aan die muis toegedien word.

Om die minimumhoeveelheid estrogeenaktiwiteit wat nog 'n betekenisvolle uterusgewigtoename sal veroorsaak in terme van mikrogram stilboëstrol vas te stel, is 'n standaard-dosisreaksie opgestel deur die dosisse in soetolie op te los en per maagbuis toe te dien. Statisties is daar egter eers betekenisvolle toename met toediening van 0.008 ugm. per $\frac{1}{4}$ c.c. soetolie. Vir die hoër-dosis-groepe is die reaksie ook heelwat laer as met die toediening van stilboëstrol in die voer. Wanneer die krommes wat die dosisreaksie voorstel met mekaar vergelyk word, (fig. 7, p. 69), is dit duidelik dat die reaksie vir die dosisgroepe baie verskil. Die hoogste dosis nl. 0.032 ugm. per $\frac{1}{4}$ c.c. olie het 'n uterusgewig van gemiddeld 27.69 mg. gelewer terwyl met die toediening van dieselfde dosis in die voer van die muis 'n gemiddelde uterusgewig van 42.53 mg. verkry is.

'n Moontlike verklaring vir hierdie swakker reaksie is dat die soetolie wat as oplosmiddel gebruik is, die absorpsie van die stilboëstrol uit die spysverteringskanaal van die muis sodanig belemmer het dat daar net gedeeltelike absorpsie van stilboëstrol plaasgevind het en dat daardeur die konsentrasie van stilboëstrol in die bloedstroom so laag was dat net 'n gedeelte van die uterusgewigtoename wat by die ander toedieningsmetode verkry word, hier gevind is. Indien 'n ander oplosmiddel gebruik sou word kan 'n beter reaksie verwag word. 'n Aanduiding van die invloed van die soetolie op die spysverteringskanaal van die muis word gesien in die lakserende invloed wat dit uitgeoefen het. Soos in proef 21 gesien is, het laksering by die muis veral na die eerste dosis soetolie en veral by die kontrolegroep voorgekom.

Figuur 7.

Vergelyking van Dosis-reaksiekrrommes.



By die eerste en hoër dosis-groepe het minder gevalle van laksering voorgekom. Na die tweede dag was daar in al die groepe baie minder muis wat laksering getoon het en by die hoogste-dosis-groep was daar net na die derde toediening een muis wat tekens van laksering getoon het. Na die derde toediening was daar verdere afname van die aantal muis wat tekens van laksering getoon het. Dit skyn dus of die muis geleidelik gewoond geraak het aan die soetolie en verder wil dit voorkom of die stilboëstrol een of ander invloed op die spysverteringskanaal uitgeoefen het waardeur laksering beperk is. Geen grond kon egter in die literatuur vir so 'n teorie gevind word nie. Die vraag wat ontstaan, is of die absorpsie-snelheid enigsins deur stilboëstrol beïnvloed kon gewees het. As dit die geval is, verklaar dit waarom 'n beter uterus-reaksie by die hoër-dosis-groepe verkry is. As egter na die krommes wat die dosis-reaksie vergelyk (fig. 7, p69), gekyk word, is dit duidelik dat die kromme III vir die maagbui-toediening tussen die dosisse 0.032 en 0.064 μg . per muis per dag, feitlik parallel loop met die krommes I en II vir die toediening per voer. By die hoër dosisse is daar egter 'n vermindering van die mate van reaksie. Indien stilboëstrol die absorpsie-snelheid in die spysverteringskanaal beïnvloed het, sou verwag kon word dat die kromme nie 'n daling sou toon nie, maar eerder 'n stygende neiging sou hê. Die moontlikheid is dus groot dat stilboëstrol net vermindering van die lakseringsneiging by die muis veroorsaak het en nie die absorpsie-snelheid verhoog het nie.

Die voordele wat aan die maagbui-toediening verbonde is, is dat die dosis wat aan elke muis toegedien word, presies gemeet kan word.

Daardeur word die moontlikheid dat een muis aan 'n groter dosis estrogene-aktiewestowwe blootgestel word as ander van dieselfde groep, uitgeskakel en bly net die individuele variasie in sensitiviteit oor as faktor waardeur die statistiese waarde van die resultate beïnvloed kan word. Baie min van die oorspronklike ekstrak gaan ook verlore en die muise kry nie die geleentheid om die ekstrak volgens hul eie smaak te eet of te laat nie. Wanneer die standaarddosis in soetolie opgelos word, kan hoeveelhede van minder as 0.008 ugm. stilboëstrol per $\frac{1}{4}$ c.c. egter nie bepaal word nie.

(2) Estrogeenaktiwiteit in Voedsel.

(a) Residuele estrogeenaktiwiteit in Diereweefsels.

Uit die bepalings van die residuele aktiwiteit wat hier uitgevoer is, is dit duidelik dat die vleis van stilboëstrol-behandelde osse geen of baie geringe aktiwiteit besit. Soos uit proef 1 en 2 (Tabel 1, 2 en 3) blyk, is daar wel 'n toename van die uterusgewig van muise wat weefsel ekstrak van behandelde osse ontvang het. Daar is 'n toename van uterusgewig vir spierweefsel (kruisstuk) vir osse wat 5 mg. en 10 mg. stilboëstrol per dag ontvang het. Die toenames is egter nie statisties betekenisvol nie. Ook na bewaring van die vleismonsters in die droë toestand, soos met biltong gedoen word, het die aktiwiteit in die weefsels van die osse wat 10 mg. per dag ontvang het, nie 'n styging van die aktiwiteit veroorsaak nie. In dié geval was daar ook 'n toename in die gemiddelde uterusgewig (Tabel 2), maar dit was nie betekenisvol nie. Indien daar dus enige ensiem-aktiwiteit in die droë vleis voorkom, is dit nie van so 'n aard dat dit die estrogeen-metaboliete wat in die weefsels voorkom, sodanig aktiveer dat dit 'n merkbare styging van die residuele aktiwiteit meebring nie.

Biltong wat van beeste wat stilboëstrol-behandeling ontvang het, gemaak word, sal waarskynlik dus nie hoër residuele aktiwiteit vertoon as wat die vars weefsels vertoon nie.

Soos uit die resultate van proef 2 (Tabel 3) blyk, het die toediening van lewer-ekstrak, afkomstig van osse wat met stilboëstrol behandel is, geen toename van die muis-uterusgewig veroorsaak nie. Daaruit kan afgelei word dat die lewer-weefsel geen residuele aktiwiteit besit nie. Uit die werk wat gedoen is in verband met die invloed van die lewer op eksogene estrogene kan verwag word dat die lewer die stilboëstrol onaktief maak. Die vermoë van die lewer om estrogene te onaktiveer is waarskynlik vir stilboëstrol nie so doeltreffend as vir die natuurlike estrogene nie. Dit kan ook verklaar waarom stilboëstrol meer aktief is per mond as die natuurlike estrogene. Indien die lewerweefsel van die bees nie van die lewerweefsel van ander diersoorte verskil nie, kan aangeneem word dat die hoeveelhede stilboëstrol wat die lewer deur die poortaar bereik na 'n toediening van 10 mg., gedeeltelik geonaktiveer word. Die eindproduk van die onaktiveringsproses is waarskynlik 'n gekonjugeerde stilboëstrol-verbinding of onaktiewe degradasieprodukte. Dit mag ook wees dat 'n verbinding gevorm word wat van so 'n aard is dat die weefsels dit kan verbruik, waarskynlik ook 'n konjugasie-verbinding. (Vergelyk Fishman (1947) en Hanahan et al. (1953). 'n Gedeelte van die stilboëstrol word waarskynlik in die gal uitgeskei wat weer gedeeltelik herabsorbeer en gedeeltelik uitgeskei word. 'n Mate van onaktivering vind waarskynlik in die bloedstroom plaas en uitskeiding van die bloed-estrogen-verbinding en van vry stilboëstrol vind by die niere plaas.

Dit is dus duidelik dat net n gedeelte van die oorspronklike dosis uiteindelik die weefsels bereik. As verder in aanmerking geneem word dat, indien n dosis van 10 mg. in die hele dierelike liggaam eweredig sou versprei word, die uiteindelige verdunning by n bees wat 700 pond weeg n belangrike faktor is wat die residuele aktiwiteit bepaal. Indien daar nie een of ander vorm van ophoping of opberging in sekere weefsels plaasvind nie, sal die residuele aktiwiteit so laag as 3 ugm. per 100 gm. weefsel wees kort na die toediening.

Volgens Ryan en Engel (1956) is die aard van die estrogeen-verbinding van die natuurlike estrogene wat in die menslike serum woorkom, nog onbekend en daar bestaan alleen aanduidings dat dit n estrogeen-proteïen-konjugasie is. Laasgenoemde navorsers verwys ook na die werk van Roberts en Szego (1955) wat aangetoon het dat daar n proteïen-aggregaat in die serum voorkom. Stob et al. (1954a) het van hierdie teorie gebruik gemaak om die verskynsel dat daar residuele estrogeenaktiwiteit in die vleis van beeste kan voorkom, 168 dae na die inplanting van stilboëstrol onder die vel, te verklaar. Volgens hulle ontstaan die proteïen-verbinding met stilboëstrol in die weefsels solank die bloed-estrogeen-konsentrasie hoog is, net na die inplanting. Die proteïen-gebonde stilboëstrol word in die spierselle gevorm en kan, omdat die molekule groot is, baie stadig terug in die bloedstroom beweeg wanneer die bloed-estrogeen-konsentrasie begin daal. Dit mag ook wees dat die estrogeen-proteïen-verbinding so groot is dat dit nie weer die selle kan verlaat nie en dus aanleiding sal gee tot ophoping van estrogeniese stowwe.

Die vraag bestaan of die proteïen-estrogeen-aggregaat onder sekere omstandighede weer vrygestel kan word uit die selle en of die aktiwiteit van die aggregaat dieselfde is as dié van vry stilboëstrol. Waarskynlik is die aktiwiteit daarvan laer as die van stilboëstrol en sal die aktiwiteit verhoog kan word deur afsplitting met behulp van hidrolise. Die moontlikheid bestaan dus dat verhoging van die aktiwiteit verkry kan word deur die hidrolise wat sulke weefsels in die spysverteringskanaal ondergaan nadat dit gekook en geëet is.

Om hierdie moontlikheid te ondersoek is die vleis van die tweede groep beeste vooraf met 0.4% NaOH-oplossing in water, behandel. Soos uit die resultate van proef 3 (Tabel 4) blyk, het die weefsels van beeste wat 10 mg. stilboëstrol ontvang het nie betekenisvolle hoeveelhede residuele aktiwiteit bevat nie. Die spierweefsel van diere wat 10 mg. stilboëstrol plus 75 mg. ureomisien per dag ontvang het, het wel betekenisvolle residuele aktiwiteit vertoon. Die ekstrak van weefsels van beeste wat 10 mg. stilboëstrol ontvang het, het wel die uterusgewigte van die muise laat toeneem soos in Tabel 4 gesien kan word. Daar was egter groot individuele variasies wat die statistiese waarde van die resultate verminder het. (Die F-waarde was 4.23. Vir die resultate om betekenisvol te verskil van die kontrole se uterusgewigte, moet die F-waarde 4.41 wees.) Die groot individuele variasies is waarlik toe te skryf aan variasies van die sensitiviteit van die muise teenoor estrogene of aan kompetisie tussen die muise. Volgens Zondek (1941) het suur- of alkaliese hidrolise van die weefsels van muise waaraan estrogene toegedien is, die hoeveelheid aktiwiteit wat herwin kon word, van 3 na 20% verhoog.

Hy stel voor dat dit plaasvind ten gevolge van hidrolise van die onaktiewe proteïen-estrogeen-verbinding waardeur meer aktiewe estrogene vrygestel word. Aan die ander kant het die bevindings van Malpress (1946) getoon dat suurhidroliese van stilboëstrol die aktiwiteit daarvan kan verlaag ten gevolge van die vorming van Ψ -isomeer. Die moontlikheid bestaan ook dat plantprodukte soos isoflavone wat in die weefsels van die diere mag voorkom, n styging van aktiwiteit kan ondergaan. Pieterse en Andrews (1956) het aangetoon dat die behandeling van genisteïn met 1.5% alkoholiese KOH die estrogeenaktiwiteit daarvan verhoog het.

Alhoewel al die vleismonsters in proef 3 met NaOH behandel is, het net die uterusgewig van die muise wat n ekstrak, afkomstig van beeste wat stilboëstrol en oureomisien ontvang het, betekenisvol toegeneem. Die uterusgewig van muise wat n ekstrak, afkomstig van die kontrole-groep beeste, ontvang het, verskil nie betekensivol van die uterusgewig van proef 1 se kontrolemuise nie. Dit is dus duidelik dat die NaOH-behandeling nie die aktiwiteit merkbaar beïnvloed het in die geval van die kontrolebeeste se vleis nie. Op watter wyse die behandeling met oureomisien die residuele aktiwiteit kon beïnvloed, is nie duidelik nie. Uit die bevindings van ander navorsers is duidelik dat die residuele estrogeniese aktiwiteit vasgestel kon word by diere wat antibiotiese middels saam met stilboëstrol ontvang. Die verhoogde groeiselheid wat verkry word deur die toediening van oureomisien aan herkouers, kan volgens Fruton en Simmonds (1953) verklaar word deur aan te neem dat dit n invloed op die aktiwiteit van die mikroflora van die spysverteringskanaal uitoefen. ..

As aangeneem word dat die mikroflora van die herkouer se spysverteringskanaal onder normale omstandighede n gedeelte van die eksogene stilboëstrol onaktiveer, dan volg dit logies dat indien toediening van oureomisien hierdie onaktiverings-werking vertraag die konsentrasie stilboëstrol wat geabsorbeer sal word verhoog en sodoende die dier aan groter stilboëstrol-prikkeling blootstel. Hieruit kan die hoër residuele aktiwiteit verklaar word. Verder is dit ook moontlik dat oureomisien die onaktivering van stilboëstrol deur die lewer kan vertraag. Judah en Lipmann (1951) het gevind dat oureomisien op een of ander wyse die proses van oksidatiewe-fosforilasie versteur. Ten gevolge van die invloed wat dit moontlik op ensiem-sisteme in die liggaam kan hê, kan dit moontlik wees dat dit mag bydra tot die ophoping van stilboëstrol in die weefsels van beeste.

Uit die regressie-kromme wat met die standaard-dosis-reaksie opgestel is, is bereken dat die residuele estrogeenaktiwiteit in die vleis van beeste wat oureomisien plus stilboëstrol ontvang het en daarna aan alkaliese hidrolise onderwerp is, ekwiwalent is aan die aktiwiteit van 0.00235 ugm. stilboëstrol per gram droë vleis. As die watergehalte van gekookte vleis 50% is, beteken dit dat die aktiwiteit van die vleis ekwiwalent is aan 1.175 ugm. per kilogram of 0.533 ugm. per pond gekookte vleis. Indien dieselfde mate van hidrolise ook in die spysverteringskanaal van die mens kan plaasvind, is die styging wat dit in die residuele aktiwiteit egter veroorsaak nog so gering dat 851 Kg. gekookte vleis eers die ekwiwalente hoeveelheid aktiwiteit sou besit wat n terapeutiese dosis van 1 mg. stilboëstrol uitoefen. Die moontlikheid dat sulke klein hoeveelhede estrogeenaktiwiteit n invloed op die mens kan hê, is onwaarskynlik.

By die bepalings wat deur Turner (1956) uitgevoer is, kon in die niere en longe van osse wat met 10 mg. stilboëstrol behandel is, 4 en 10 tot 12 dele per biljoen residuele aktiwiteit onderskeidelik aangetoon word. (4 ugm./Kg. vir niere en 10-12 ugm./Kg vir longe).

(b) Voorkoms van Estrogene in Plantweefsels.

In proewe 16 en 17 wat hier uitgevoer is, is gevind dat lusernkuilvoer en Ladino-klawer estrogeenaktiwiteit besit. Soos in Tabel 18 gesien kan word, is die berekende aktiwiteit vir lusernkuilvoer ekwiwalent aan die aktiwiteit van 0.00249 ugm. stilboëstrol per gram droë kuilvoer of 1.13 ugm. per pond droë kuilvoer. Die aktiwiteit wat in proef 17 vir Ladino-klawer gevind is, is ekwiwalent aan die aktiwiteit van 0.00312 ugm. stilboëstrol per gm. droë materiaal of 1.49 ugm. per pond. Dit is nie heeltemal in ooreenstemming met wat Cheng et al. (1953a) vind nie. Volgens hulle het Ladino-klawer geen aktiwiteit vertoon nie en lusernmonsters wat getoets is, het soveel as 2.72 ugm. stilboëstrol per pond hooi, ekwiwalente aktiwiteit in die vars gedroogde toestand vertoon, wat waarskynlik na inkuiling nog hoër sou wees. Die aktiwiteit wat hier vir Ladino-klawer gevind is, is ook amper driemaal so hoog as die aktiwiteit wat deur Pieterse en Andrews (1956b) gevind is, wat dit gestel het op minder as 0.5 ugm. stilboëstrol aktiwiteit per pond droë materiaal.

As in aanmerking geneem word dat die aktiwiteit van lusern nie altyd ewe hoog is nie, kan aangeneem word dat die mate van aktiwiteit wat dit vertoon op die tydstop dat dit gesny is, een van die belangrikste faktore sal wees wat die uiteindelijke aktiwiteit sal bepaal wat dit vertoon na die inkuilingsperiode.

Daar mag ook ander faktore wat gedurende die bereiding van die kuilvoer 'n rol speel, wees, waardeur die aktiwiteit beïnvloed kan word. Waarskynlik is die styging van aktiwiteit wat gedurende die inkuilproses van lusern optree, toe te skryf aan die werking van mikro-organismes en dit mag wees dat, as al die faktore vir die werking van die mikro-organismes nie optimaal is, die uiteindelijke styging wat die aktiwiteit sal ondergaan, nie so hoog sal wees nie. Daar mag ook onbekende omgewings- en ander faktore gewees het wat die ontwikkeling van estrogeenaktiwiteit gedurende die groeitydperk van die besondere lusernplante sodanig beïnvloed het, dat die aktiwiteit voor inkuiling alreeds laag was. Op dieselfde wyse kan die hoër estrogeenaktiwiteit van die Ladino-klawer ook verklaar word. 'n Belangrike faktor wat die estrogeenaktiwiteit van lusern bepaal, is die groeifase waarin die lusernplante was toe dit gesny is. As die lusern gesny word op 'n tydstip wanneer die aktiwiteit laag is, bv. gedurende die vroeë knop-stadium (Vgl. Pieterse en Andrews 1956b) kan dit moontlik wees dat die aktiwiteit nie so hoog sal wees nie. Die moontlikheid bestaan dat dieselfde ook vir die Ladino-klawer geld.

Volgens Bradbury en White (1954) het Kroszczyński en Bychowska (1939) gevind dat die blare van Salvia officinalis L. hoër estrogeenaktiwiteit besit nl. 6,000 muisenhede per Kg. (ongeveer 300 ugm. estradiol monobensoaat per Kg.) Die inheemse salie S. sisymbriifolia Skan. wat hier ondersoek is, het egter 'n baie laer estrogeenaktiwiteit besit, nl. ekwiwalent aan 0.00786 ugm. stilboëstrol per gram droë materiaal.

As aangeneem word dat die watergehalte van die plant 80% is, beteken dit dat 5.0 gm. vars materiaal dieselfde aktiwiteit het as 1 gm. droë materiaal, of dat 100 gm. vars materiaal dieselfde aktiwiteit sal vertoon as 0.1572 ugm. stilboëstrol. Die moontlikheid bestaan dat ander variëteite van die spesie ook aktiwiteit mag vertoon.

Die praktiese waarde wat die voorkoms van estrogene in plante het, is dat die plante aan diere wat van ekonomiese belang is, toegedien kan word, in plaas van stilboëstrol, om dieselfde bevorderlike invloed te verkry. Indien meer kennis byvoorbeeld versamel kan word oor die faktore wat die estrogeenaktiwiteit in kuilvoer bepaal, mag dit moontlik wees om aan diere n hoeveelheid voer te gee wat n ekwiwalente aktiwiteit van n sekere dosis stilboëstrol kan uitoefen. Meer kennis is egter nodig aangaande die voorkoms, chemie, plant-fisiologie en lot van estrogene by die dier na inname. Daar bestaan baie min gegewens oor die estrogeenaktiwiteit wat bv. in die inheemse grassoorte en klawergewasse voorkom.

In n poging om vas te stel of daar enige estrogeenaktiwiteit in sekere voedselsoorte wat deur die mens gebruik word, is, is die bepaling uitgevoer op verskillende plantprodukte. Soos uit die resultate geblyk het, was die hoogste uterusgewig wat verkry is, dié met toediening van vars-pruimekstrak. (Proef 4, Tabel 5) die berekende aktiwiteit is ekwiwalent aan 0.02247 ugm. stilboëstrol per gm. droë pruimmateriaal. As die voggehalte van pruime 85% is, beteken dit dat elke 6.66 gm. vars materiaal dieselfde aktiwiteit sal hê as een gm. droë materiaal of 0.337 ugm. per 100 gm. vars materiaal of 1.53 ugm. per pond.

Volgens Bradbury en White (1954) het Dohrn et al. (1926) aktiwiteit in pruime en kersies aangetoon en het Finne-
more (1910) en King en Jurd (1952) n glukosied van prune-
tien uit Prunus Sp. en prunetien uit Prunus puddum Roxb.
onderskeidelik geïsoleer, stowwe wat estrogeenaktiwiteit
besit volgens Bradbury en White (1953). Die estrogeen-
aktiwiteit in die vars pruimmateriaal is dus heelwaar-
skynlik hier ook toe te skryf aan die teenwoordigheid
van prunetien, n 7-metiel eter van genistein. Wat die
estrogeenaktiwiteit van pruimedante betref, (proef 5
Tabel 7) bestaan die moontlikheid dat daar ten gevolge
van die behandeling met soutsuur n aktivering van pro-
estrogene wat in die materiaal kon voorgekom het, plaas-
gevind het. Dit kan verklaar waarom die eter-ekstrak
~~dit het~~ geen aktiwiteit getoon het nie, maar na behan-
deling met soutsuur was daar wel aktiwiteit ekwiwalent
aan 0.00417 ugm. stilboëstrol per gram droë materiaal.
As aangeneem word dat die watergehalte van gekookte
pruimedante 60-70% is, dan is die estrogeenaktiwiteit
van elke 2.5 gm. gekookte materiaal ekwiwalent aan
0.00417 ugm. of 0.17 ugm. per 100 gm. of 0.77 ugm. stil-
boëstrol per pond gekookte pruimedante.

Vars perskes is ook ondersoek en uit die resultate
van proef 6 blyk dat die toename in uterusgewig wat voor-
gekom het, nie betekenisvol was nie. Hier is opgemerk
dat die uterusgewigte van sommige van die kontrolemoise
hoog was, terwyl ander laag was. Dit het die statistiese
waarde van die resultate verminder.

Die moontlikheid dat peulplante wat vir menslike
voeding gebruik word, ook estrogene-stowwe kan bevat, is,
soos uit die literatuuroorsig blyk, nie uitgesluit nie.

Uit die resultate van proef 7 (Tabel 9) is bereken dat gebakte grondbone estrogeenaktiwiteit ekwiwalent aan 0.00699 ugm. stilboëstrol per gm. droë materiaal bevat. As aangeneem word dat die watergehalte van vars gebakte grondbone 2.6% is, beteken dit dat die aktiwiteit van 1.03 gm. dieselfde is as die aktiwiteit van 1 gm. droë materiaal, m.a.w. 0.68 ugm. per 100 gm. of 3.08 ugm. per pond vars gebakte grondbone. Grondbone-koekmeel wat in groot hoeveelhede vir landboudoeleindes gebruik word, is ook ondersoek maar dit het nie betekenisvolle aktiwiteit bevat nie (Proef 8, Tabel 10). Dit wil dus voorkom asof die estrogeenaktiwiteit hoofsaaklik in die oliegedeelte van die grondbone voorkom. Die moontlikheid bestaan dat die ekstrak wat aan die muis toegedien is in proef 7, die absorpsie-snelheid in die muis se spysverteringskanaal kon belemmer. Die etanol-ekstrak wat van die grondbone-materiaal gemaak is, het 'n groot hoeveelheid olie bevat. In proef 21 is gevind dat die toediening van stilboëstrol opgelos in soetolie nie dieselfde dosis-reaksie lewer as wanneer stilboëstrol in die voer gemeng word nie. Indien die grondbone-olie dieselfde uitwerking sou hê, kan verwag word dat die estrogeenaktiwiteit van grondbone-materiaal hoër sal wees as wat gevind is indien die aktiewe estrogene-stowwe uit die ekstrak geïsoleer sou kan word en aan die muis toegedien word.

Die estrogeenaktiwiteit van droë boontjiesade is ook ondersoek in proef 9, (Tabel 11), en daar is gevind dat die toename in uterusgewig wat voorgekom het, nie betekenisvol was nie. Die aktiwiteit is waarskynlik baie laag. In vars groenbone is in proef 10 (Tabel 12) wêl bepaalbare hoeveelhede aktiwiteit gevind.

Die berekende aktiwiteit was 0.00375 ugm. per gram droë materiaal in terme van die ekwiwalente aktiwiteit van stilboëstrol. M.a.w., indien die watergehalte van vars bone op 88% gestel word, dan bevat 8.3 gm. vars materiaal dieselfde aktiwiteit as 1 gm. droë materiaal, of 0.0451 ugm. per 100 gm. vars materiaal, of n ekwiwalente aktiwiteit van 0.205 ugm. stilboëstrol per pond vars materiaal. As bone gedurende die kookproses 8% water verloor, sal een pond gekookte groenbone gelykstaan aan die aktiwiteit van 0.34 ugm. stilboëstrol.

Die estrogeenaktiwiteit van droë ertjiesade is in proef 11. (Tabel 13) bereken en daar is gevind dat dit ekwiwalent is aan die aktiwiteit van 0.0022 ugm. stilboëstrol per gram ertjiemateriaal, d.w.s. 0.22 ugm. per 100 gm. Veronderstel dat gedurende die kookproses soveel water deur die ertjies opgeneem word dat die watergehalte van die gekookte ertjies 55% is, dan bevat 2.2 gm. gekookte ertjies dieselfde estrogeenaktiwiteit as 1 gm. droë materiaal, of n ekwiwalente aktiwiteit van 0.1 ugm. per 100 gm. of 0.45 ugm. per pond.

Drie ander groentesoorte wat ondersoek is, nl. patats, wortels en uie, het geen uterusgewigtoename veroorsaak nie.

Indien n persoon die hoeveelhede, in Tabel 24 genoem, van die voedselsoorte waarin aktiwiteit gevind is, sou eet, kan verwag word dat die ekstrogeenaktiwiteit waaraan hy blootgestel sal wees, ekwiwalent is aan 1.57 ugm. stilboëstrol.

Tabel 24.

Die berekende estrogeenaktiwiteit in n paar plantprodukte.

Hoeveelheid in ons per dag	Aard van produk	Plant waarvan dit afkomstig is	Estrogeenaktiwiteit in terme van ugm. stilboëstrol
4	nie geskilde vars pruime	<u>Prunus domestica</u>	0.382
4	gekookte pruimedante	<u>Prunus domestica</u>	0.192
2	vars gebakte grondbone	<u>Arachis hypogaea</u>	0.770
4	gekookte groenbone	<u>Phaseolus vulgaris</u>	0.085
5	gekookte droë ertjies	<u>Pisum sativum</u>	0.141
Totale aktiwiteit			1.570

Die moontlikheid dat n persoon dus aan n estrogeenaktiwiteit, wat ekwiwalent is aan die aktiwiteit van n terapeutiese dosis van 1 mg. stilboëstrol, blootgestel kan word, is dus baie klein.

In plante kom blykbaar verskillende estrogeenaktiewe stowwe voor, wat nie noodwendig aanmekaar chemies verwant hoef te wees of aan die natuurlike dierlike hormone nie. Daar kan verder moontlik verskillende estrogene stowwe in dieselfde plant voorkom en die verskillende stowwe is moontlik nie ewe aktief nie. Die moontlikheid bestaan verder dat die stowwe wat gedurende die sinteseproses van estrogene-verbindinge in plante ontstaan, meer of minder aktief kan wees as die eindprodukte. Dit mag die veranderinge in aktiwiteit wat voorkom by lusernplante gedurende die knop-, blom- en saadstadia, verklaar. Dit mag dus wees dat die waardes vir die aktiwiteit wat hier gevind is vir sekere plantprodukte, nie n aanduiding is van die aktiwiteit wat daar onder ander omstandighede in die stowwe kan voorkom nie. Dit mag ook wees dat die aktiwiteit gedurende die kookproses n styging of daling kan ondergaan.

(c) Chemie van Plantestrogene.

Wanneer die struktuurformules van die chalkone in figuur 6 b, c en d met die van bensoëstrol (fig.6a,p.59) vergelyk word, is die ooreenkoms duidelik. Die vereistes vir estrogeniese aktiwiteit, volgens Solmssen (1945), bepaal dat daar para-hidroksielgroepe moet wees, wat wel die geval is. Daar is egter geen alkiel-substitusiegroepe aan die alifatiese ketting nie. Die moontlikheid bestaan dus dat hierdie verbindings ook aktief kan wees. Drie verbindings nl. 3, 4-dihidroksie-chalkoon (figuur 6d) 3, 3', 4, 4',-tetrahidroksie-chalkoon (figuur 6b) en 3, 3', 4-tri-hidroksie-chalkoon (figuur 6c) se estrogenaktiwiteit is getoets in proef 18 (Tabel 19). Laasgenoemde twee stowwe het in dosisse van 50 mg. per muis, betekenisvolle toename van die uterusgewig veroorsaak. Uit die standaard-dosis-reaksie (proef 19 en 14) is bereken dat die aktiwiteit van tetra-hidroksie-chalkoon $\frac{1}{2,381,000}$ van die aktiwiteit van stilboëstrol besit. Die aktiwiteit van tri-hidroksie-chalkoon is 5.25 maal laer as die van tetrahidroksie-chalkoon. Dit is duidelik dat enige 4', 4-dihidroksie-chalkoon aan die vereiste parahidroksierangskikking voldoen. Dit is daarom verstaanbaar dat die 4', 3, 3'-trihidroksie-verbinding wat getoets is, laer aktiwiteit besit. Die relatiewe laer aktiwiteit van albei verbindings as die van stilboëstrol en genisteïn, is waarskynlik daaraan toe te skryf dat daar geen alkielgroepe aan die alifatiese propaan-ketting voorkom nie. Volgens Geissman en Hinreiner (1952) besit die meeste chalkone en dihydrochalkone wat in plante voorkom, die para-hidroksiel of orto-hidroksielrangskikking vir kern A, maar in baie gevalle is die orto-hidroksielrangskikking afwesig.

Volgens Cheng et al. (1953) is die aktiwiteit van genisteïn wat in dosisse van 2 mg. per muis toegedien is 1/50,000ste van die aktiwiteit van stilboëstrol, terwyl Carter et al. (1955) geen voortplantingsversteurings van muise gevind het, wat met sojabone - olie-meel of die geïsoleerde genisteïn daarvan, in hul voer behandel is nie. Lg. navorsers merk wel vervroegde opening van die muis-vagina met genisteïn behandeling. Carter et al. (1953) vind dat die aktiwiteit van genisteïn 4.44×10^{-6} is van die aktiwiteit van stilboëstrol. Genisteïn kom meer algemeen in plante voor en ook in groter hoeveelhede as chalkone. Curnow en Rossiter (1955) vind hoeveelhede van 2.5 - 5.0 ugm. genisteïn per 20 vierkante m.m. blaar oppervlakte by Trifolium Subterraneum variëteite.

Aangesien die aktiwiteit van die getoetste chalkone albei baie laag is, is dit onwaarskynlik dat die aktiwiteit wat in sekere plantprodukte gevind is, uitsluitlik of hoofsaaklik aan die teenwoordigheid van chalkone toegeskryf kan word. Vir 'n ekwiwalente aktiwiteit van 0.0451 ugm. stilboëstrol per 100 gm. vars plantmateriaal, soos by boontjies in proef 10 gevind is, sal daar ten minste 696 mg. tetra-hidroksie-chalkoon per 100 gm. vars boontjiemateriaal moet voorkom. Dit is egter moontlik dat chalkone in sekere plante mag bydra tot die totale estrogeenaktiwiteit wat deur al die aktiewe verbindings in die plant uitgeoefen word.

3. Slot-opmerkings.

Die totale estrogeenaktiwiteit waaraan 'n mens blootgestel kan word deur die vleis te eet wat afkomstig is van beeste wat stilboëstrol-behandeling ontvang het, en die plantprodukte wat aktiwiteit vertoon, daarmee saam op een dag te gebruik, kan moeilik die aktiwiteit van 1.84 ugm. stilboëstrol per dag oorskry.

Dit is omtrent die aktiwiteit wat deur 1/542ste van die gewone terapeutiese dosis van 1 mg. stilboëstrol per dag uitgeoefen word. Dit is duidelik dat die estrogeen-aktiwiteit wat in die vleis van diere wat met stilboëstrol en ousomisien behandel is, so laag is, dat dit waarskynlik dieselfde, of minder kan wees, as die aktiwiteit wat deur die plantprodukte wat in die mens se daaglikse dieet voorkom, sal uitoefen. Die estrogeenaktiwiteit is so laag dat dit waarskynlik geen uitwerking by die mens sal hê nie, selfs al sou dit oor lang tydperke ingeneem word. Indien dit moontlik is dat daar onder sekere omstandighede tog groter hoeveelhede estrogeenaktiwiteit in die plantprodukte kan voorkom, mag dit wees dat dit n invloed op die liggaamsfunksies sal uitoefen.

Daar is in die proewe wat uigevoer is, gevind dat daar nie verlies van estrogeenaktiwiteit plaasvind ten gevolge van die ekstraheringsprosedure nie. Die vraag ontstaan egter of dit ook vir al die plantprodukte wat ondersoek is, geld. Daar mag moontlik stowwe in die plant-ekstrak voorkom wat die absorpsie of die invloed van estrogene by die muis vertraag of verhoed soos dierige stowwe of anti-estrogene. Ander moontlikhede is dat daar spesieverskille mag bestaan, wat die reaksie op die estrogene-stowwe betref wat by plante aangetref word, tussen die mens en muis. M.a.w. die menslike sisteem kan miskien pro-estrogene ombou na ware estrogene en die muis nie, of omgekeerd, óf sekere anti-estrogene wat in die plant-ekstrakte voorkom, mag by die muis werk- saam wees en by die mens nie of omgekeerd.

Die versoeking is groot om te spekuleer oor die invloed wat 'n estrogeen-ryke dieet op die liggaam kan hê en die verband wat daar mag bestaan tussen voedsel-estrogene en sekere liggaamsversteurings wat voorkom. Uit die werk van Salmony (1955) en Meyer en Mc Shan (1950)(p.465) is dit duidelik dat estrogene 'n invloed uitoefen op sekere oksidasie-ensieme. Dit verhoog o.a. malien- en suksien-dehidrogenases. As gevolg daarvan kan die reaksies van die isositroensuur-siklus vertraag word en die metabolisme van koolhidrate, vette en proteïene word versteur. Dit verklaar moontlik die styging van die bloedvetwaardes wat deur verskeie navorsers gevind is o.a. Entenman et al. (1938); Landauer et al. (1939); Entenman et al. (1940); Nalbandov en Card (1943); Lorenz (1943) en Ranney en Chaikoff⁽¹⁹⁵¹⁾ vind 'n styging van serum lipiede by voëls en hoenders en Eilert (1953) vind dieselfde vir die serum fosfolipiede maar nie vir die totale serum-lipiede van vroue nie. Die dosisse wat hy toegedien het, was van 0.5 tot 1.0 mg. stilboëstrol en 0.05 tot 0.10 mg. etinielestradiol per dag. Estrogeentoediening veroorsaak ook verhoogde vetdeponering in die liggaam volgens Korenchevsky en Dennison (1934) en Loeb (1942). Volgens Burrows (1949) vind Janes en Nelson (1940) ook verhoogde glikogeendeponering by rotte na estrogeentoediening. Die styging van die bloedlipiedekonsentrasie sluit ook 'n styging van die cholesterolkonsentrasie in volgens die bevindings van Horlick en Katz (1948) met hoenders. Eilert (1953) vind egter 'n daling van die cholesterolkonsentrasie by vroue terwyl Fillios (1957) 'n duidelike cholesteremia by die rotte vind na estrogeentoediening en 'n daling van die bloedcholesterolkonsentrasie na toediening van testosteroon.

Daar is volgens hom ook gevind dat estrogene die biosintese van cholesterol versnel. Deuel (1956) verklaar dat die snelheid van vetmetabolisme by die vrou verskil van die snelheid daarvan by die man.

Horlick^{en Katz} (1948) kon by hoenders cholesteremia en arteriosklerose opwek deur estrogeentoediening. In teenstelling met die bg. bevinding is die van Rivin en Dimitroff (1954) dat toediening van estrogene aan mans die voorkoms van arteriosklerose verminder het en dat vroue wat onderworpe was aan 'n hipo-estrogeniese toestand, 'n verhoogde voorkoms van arteriosklerose toon.

Estrogene het ook 'n invloed op 'n groot aantal verskillende weefsels in die liggaam: so vind Ebling (1948) byvoorbeeld dat dosisse van 1 tot 100 ugm. estradiolmonobensoaat by manlike rotte, atrofie van die sebunkliere veroorsaak. Ramsay en Campbell (1956) vind dat estrogene die bloedhemoglobienkonsentrasie van hoenders laat daal het.

Dit is heelwaarskynlik dat estrogene hul invloed uitoefen deur die verandering wat dit in die endokrine-eweewig in die liggaam veroorsaak. Hier hang die resultaat van die invloed hoofsaaklik van die dosis af. Groot dosisse veroorsaak blykbaar óf gedeeltelike óf algehele funksionele hipofisaktomie volgens Cramer en Horning (1936), Zondek (1936) en Greep en Jones (1950). Estrogene onderdruk waarskynlik veral die afskeiding van gonadotrofe-hormone waardeur dan ook funksionele kastrasie ontstaan deurdad die testes en ovaria atrofeer en steriliteit veroorsaak. Vergelyk ook Burrows (1949) en Zondek (1941). Verskeie navorsers vind ook onderdrukking van sekere funksies van die hipofise en versnelling of geen invloed op die ander nie soos Meyer en Clifton (1956) en Greep en Jones (1950).

Daar bestaan lank reeds kennis oor die verband tussen estrogene en die tiroïed. Die verband word ook aange-
toon deur die werk van Grumbrecht en Loeser (1938), Feld-
man (1956a, b+ 1957) Feldman en Danowski (1956) en Eskin
en Bogdanove (1956).

Dat die estrogeenaktiwiteit in plante enige van die
bogenoemde reaksies kan hê, word getoon deur die beskry-
wing wat Bennets et al. (1946) gee van die steriliteits-
verskynsels by skape wat op Trifolium subterraneum gewei
het. In die oorsig wat Pope (1954) gee van die invloed
van plantestrogene op die voortplanting en melkproduksie
van diere en die invloed wat plantestrogene op melk-
sekresie het, wat deur Bartlett et al. (1948) beskryf
word, illustreer die moontlikheid goed. Volgens Noble
et al. (1950) het inspuitings van die plant Lithospermum
runderale se ekstrak die funksies van die hipofise van
muise gewysig en is gevind dat steriliteit en atrofie
van die geslagsorgane optree. Evans en Evans (1949)
vind n invloed op die geslagsfunksies van muise waaraan
jong gras toegedien is.

Indien die bepalingmetodes wat in hierdie proewe
gebruik is, as aanduiding kan dien van die estrogeen-
aktiwiteit wat in die plantprodukte gevind is en van die
residuele aktiwiteit in die vleis van stilboëstrol be-
handelde osse, kan aangeneem word dat die hoeveelhede
so gering is, dat dit buite rekening gelaat kan word.
Indien daar egter onder sekere omstandighede n styging
van die estrogeenaktiwiteit in die plantprodukte voor-
kom wat vir menslike gebruik aangewend word, sal dit,
mits die uiteindelijke aktiwiteit nie die aktiwiteit van
ongeveer lmg. stilboëstrol per dag oorskry nie, nie na-
delige gevolge by die volwasse mens hê nie.

Soos uit die ondersoek van die chalkone geblyk het, bestaan die moontlikheid dat daar ander plantstowwe mag voorkom, wat behalwe isoflavone, stilbene en sterole kan bydra tot die totale estrogeenaktiwiteit wat die plante vertoon. Indien die aktiewe plant-estrogene en pro-estrogene almal uit die plant geïsoleer kan word en meer kennis versamel kan word oor hul voorkoms, funksies en sintese in plante, sal waarskynlik met meer noukeurigheid voorspel kan word in watter plante en onder watter omstandighede estrogene sal voorkom.

Omdat bioflavonoïede ook van mediese belang is, is 'n verdere ondersoek na die estrogeenaktiwiteit van die groep verbindings noodsaaklik.

VI. OPSOMMING.

1. 'n Biologiese bepalingmetode waar gebruik gemaak word van die toename in uterusgewig van geovariotomeerde muis is gebruik om die estrogeenaktiwiteit van verskeie dier- en plantweefsels te bereken in terme van die aktiwiteit van stilboëstrol.
2. Etanol-ekstrakte wat van die weefselmonsters berei is, is met die voer van proefmuis gemeng en oor 'n tydperk van 4 dae aan hulle toegedien. 'n Standaard-dosisreaksie-kromme is opgestel en daar is gevind dat die laagste dosis wat nog betekenisvolle toename van die uterusgewig veroorsaak het, 0.004 μ gm. stilboëstrol per gram muisvoer is.
3. Faktore wat die resultate kan beïnvloed, is eksperimenteel ondersoek. Daar is gevind dat toevoeging van foliensuur in die voer van die muis nie die dosisreaksie van die uterus beïnvloed het nie.

Die muisvoermengsel wat gebruik is, het estrogeenaktiwiteit vertoon wat waarskynlik nie hoër is as die aktiwiteit van 0.002 ugm. stilboëstrol per gram voer nie.

Verder was daar ook nie betekenisvolle verlies van estrogeenaktiwiteit gedurende die ekstraheringsprosedure nie.

4. n Wysiging van die toedieningsmetode is ondersoek.

Daarvoor is bekende hoeveelhede stilboëstrol met soetolie gemeng en per maagbuis aan proefmuise toegedien. Die minimum bepaalbare dosis was 0.064 ugm. per 0.25 c.c. olie. Die voor- en nadele van beide metodes wat gebruik is, is bespreek.

5. Die residuele^e estrogeenaktiwiteit van spier- en lewerweefsel van osse wat 5 en 10 mg. stilboëstrol en die spierweefsel van beeste wat 10 mg. stilboëstrol en 10 mg. stilboëstrol plus 75 mg. chloortetrasiklien per dag in hul voer ontvang het, is bepaal. In spierweefsel van beeste wat stilboëstrol plus oureomisien ontvang het, is bereken dat die residuele aktiwiteit ekwivalent is aan die aktiwiteit van 0.00235 ugm. stilboëstrol per gram droë vleis. Hierdie weefsels is vooraf met 0.4% NaOH behandel. Geen ander spier- of lewerweefsel het betekenisvolle aktiwiteit vertoon nie. Moontlike verklarings vir die verskynsel is bespreek.

6. Plantmateriaal wat aktiwiteit vertoon het, is die volgende: pruime, 0.02247 ugm., pruimedante 0.00417 ugm., droë ertjies 0.0022 ugm., grondbone 0.00699 ugm., groenbone 0.00375 ugm., bogrondse dele van Salvia Sisymbriifolia Skan. 0.00786 ugm., Ladino-klawer 0.00312 ugm., en lusernkuilvoer 0.00249 ugm. Die aktiwiteit is met behulp van n regressiekromme wat met n standaard-dosisreaksie verkry is, bereken in terme van die aktiwiteit van stilboëstrol. Die totale estrogeenaktiwiteit waaraan die mens blootgestel kan word deur vasgestelde hoeveelhede van bogenoemde voedsel te eet, is bereken as ekwivalent aan die aktiwiteit van 1.57 ugm. stilboëstrol per dag.

Die invloed wat estrogene in die voedsel op die menslike liggaam kan hê, is bespreek. Plantprodukte wat nie aktiwiteit vertoon het nie, was perskes, patats, geelwortels, uie, grondbone-koekmeel en droë bone.

7. Drie chemiese verbindings wat in plante voorkom, nl. 3, 4-dihidroksie-, 3, 3', 4 trihidroksie-, en 3, 3', 4, 4'-tetrahidroksie-chalkoon se estrogeenaktiwiteit is ondersoek. Laasgenoemde twee verbindings het aktiwiteit besit. Die aktiwiteit van die tetrahidroksiel-verbinding is bereken as een 2.38 miljoenste van die aktiwiteit van stilboëstrol. Die bydrae wat dié plantstowwe tot die estrogeenaktiwiteit van plantprodukte lewer, is bespreek.

VII. DANKBETUIGING.

In die eerste plek wil ek my hartlike dank uitspreek teenoor prof. P.J. Hamersma, hoof van die Fisiologie-departement van die P.U. vir C.H.O., vir die belangstelling, raad, en leiding wat ek van hom ontvang het, voor en gedurende hierdie navorsingswerk.

Dank ook aan mnr. W.A. Verbeek, hoof van die Veeteelt-afdeling van die Potchefstroomse Landboukollege vir die hartlike samewerking, belangstelling en vergunning om van sekere gegewens en materiaal gebruik te maak.

Verder my dank aan dr. P.J.S. Pieterse ook verbonde aan die bg. landboukollege vir die hulp in verband met die ovariotomie-tegniek en die verskaffing van die chalkoonverbindings. Die navorsingsonderwerp is deur dr. Pieterse voorgestel en hy het ook waardevolle hulp verleen in verband met die statistiese verwerking van die resultate. Sy onbaatsugtige hulp en raad was n onmisbare inspirasie.

Aan my eggenote mev. D. Pretorius my dank vir haar onmisbare hulp in verband met die eksperimentele werk en opstelling van die manuskrip.

Dank aan dr. K.W. Gerritsma, hoof van die departement Farmasie, P.U. vir C.H.O., vir sekere waardevolle wenke.

My dank verder ook aan mej. M. Boon vir taalkundige versorging.

Verder ook my dank aan my ouers en familie vir hulle aanmoediging, belangstelling en inspirasie.

in Woord van dank aan alle vriende en belangstellendes wat hulp verleen het in watter opsig ookal.

VIII. BIBLIOGRAFIE.

- ALLEN, E. 1932 : Sex and internal secretions
Baltimore p434.
- ALLEN, E. en DOISY, E.A. 1923: J.A.M.A. 81: 819. (Uit
Burrows 1949).
- ANDREWS, F.N. en BEESON, W.M. 1949: The effects of Stil-
bestrol, testosterone, progesterone
and dienestrol on growth and fatte-
ning of beef steers. J. Anim.
Sci. 13:99.
- BARTLETT, S. FOLLEY, S.J., ROWLAND, S.J., CURNOW, D.H.
en SIMPSON, S.A. 1948: Oestrogens in grass and their pos-
sible effects on milk secretion.
Nature 162:845.
- BELL, T.D., SMITH, W.H. & ERHART, A.B. 1954:
The effects of stilbestrol upon
lamb performance in the feed lot.
J. Anim. Sci 13:425.
- BENNETS, H.W., E.J. UNDERWOOD & F.L. SHIER 1946:
A specific breeding problem of
sheep on Subterranean clover pas-
ture in Western Australia. Austral.
Vet. J. 22:2.
- BISKIND, M.S. & G.R. BISKIND. 1942:
Endocrinol. 31:109. Uit Grundy
1957. (Chem. Rev. 57:395.)
- BRADBURY, R.B. & D.E. WHITE 1953:
J. Chem. Soc. p.871. Uit Bradbury
& White 1954.
- BRADBURY, R.B. & D.E. WHITE. 1954:
Estrogens and related substances
in plants Vitamins and Hormones
XII: 207.
- BROWNLEE, G. & A.F. GREEN. 1946:
The relation between direct and
indirect oestrogenic functions in
a series of synthetic oestrogens.
J. Endocrin. 5:158.

- BURROUGHS, W., C.C. CULBERTSON, E. CHENG, W.H. HALE,
& P. HOMEYER, 1955: The influence of oral administration of diethylstilbestrol to beef cattle. J. Anim. Sci. 14: 1015. Opsomming uit Chem. Rev. 50:5877 h. 1956.
- BURROUGHS, W., C.C. CULBERTSON, J. KASTELIC, E. CHENG
& W.H. HALE. 1954: The effects of trace amounts of diethylstilbestrol in rations of fattening steers. Science 120:66.
- BURROWS, H. 1949: Biological actions of sex hormones. Cambridge University Press.
- BUTENANDT, A. 1929: Deutsch. Med. Woch. 50: 2171.
Uit Burrows 1949.
- CAIRY, C.F. 1955: Hormones for growing and fattening animals. Vet. Med. 50:339.
- CALLOW, R.K. 1955: Biochemistry of the gonadal hormones. Brit. Med. Bull. 11:126.
- CAMPBELL, N.R., E.C. DODDS & W. LAWSON. 1940:
The nature of the oestrogenic substances produced during the demethylation of anethole. Proc. Roy. Soc. Lond. B 128:253.
- CARAYON - GENTIL, A. & J. CHEYMOL 1946:
Bull. soc. Chim biol. 28:136. Uit Grundy 1957 Chem. Rev. 57:304.
- CARTER, M.W., W.W.G. SMART Jr. & G. MATRONE 1955:
Effect of genistin on reproduction of the mouse. J. of Nutrition 55:639.
- CARTER, M.W., W.W.G. SMART Jr. & G. MATRONE 1953:
Estimation of estrogenic activity of genistein obtained from soybean meal. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 84: 506. (Opsomming uit Chem. Abs. 48. 3554 h. 1954)
- CHENG, E., C.D. STORY, L.C. PAYNE,
L. YODER, & W. BURROUGHS. 1953a:
Detection of estrogenic substances in alfalfa and clover hays fed to fattening lambs. J. Anim. Sci. 12:507.
- CHENG, E., C.D. STORY, L. YODER,
W.H. HALE & W. BURROUGHS. 1953b:
Estrogenic activity of isoflavone derivatives extracted and prepared from soybean oil meal. Science 118:164.

CHENG, E., L. YODER, C.D. STORY
& W. BURROUGHS. 1954:

Estrogenic activity of some iso-flavone derivatives. Science 120:575.

CLEGG, M.T. & F.D. CARROLL. 1956:

Further studies on the anabolic effect of stilbestrol in cattle as indicated by carcass composition. J.Anim.Sci.15:37. (Opsomming uit Nutr. Abs.&Rev.26:809:1956).

COMMON, R.H., T.J. KEEFE
& W.A. MAW. 1950:

Some biochemical effects of thiouracil on the response of the immature pullet to estrogen. Canadian J. Res. 28: D, 272.

COOK, J.W., E.C. DODDS
& A.W. GREENWOOD. 1934:

Sex change in the plumage of brown leghorn capons following the injection of certain synthetic oestrus-producing compounds. Proc. Roy. Soc. B, 114:286.

#

COOK, J.W., E.C. DODDS
& C.L. HEWETT & W. LAWSON.
1934:

The oestrogenic activity of some condensed ring compounds in relation to their other biological activities. Proc. Roy. Soc. B, 114:272.

COOKSON, H. 1936:

Oestrin in toxic goitre. Lancet . 231:1069.

CRAMER, W. &
E.S. HORNING. 1936:

The effect of oestrin on the pituitary gland. Lancet 230:1056.

CURNOW, D.H. &
R.C. ROSSITER. 1955:

The occurrence of genistein in subterranean clover (T. subterraneum L.) and other trifolium species. Austral. J. Exptl. Biol. & Med. Sci. 33:243.

DANNEBERG, P. &
D. SCHMAHL. 1952:

Z. Naturforsch. 7b:468. Uit Grundy 1957. (Chem. Rev. 57:325).

DAVIS, J.S., R.K. MEYER
& W.H. MCSHAN. 1956:

The effects of aminopterin and estrogen on the phosphate metabolism of rat uterus. Endocrinol. 59: 505.

COOK, J.W. E.C. DODDS
& C.L. HEWETT. 1933:

A synthetic oestrus-exciting Compound. Nature Lond. 131:56.

- DEUEL, H.J. Jr. 1956: Sex differences in fat and carbohydrate metabolism. Internat. Zschr. Vitaminforsch. 26:352. (Opsomming uit Nutr. Abs. & Rev. 27:135. 1957.)
- DINUSSON, W.E., F.N. ANDREWS & W.M. BEESON. 1950: Effects of stilbestrol, testosterone and thyroid alterations and spaying on the growth and fattening of beef heifers. J. Anim. Sci. 9:32.
- DODDS, C. 1955: Synthetic oestrogens. Brit. Med. Bull. 11:131.
- DODDS, E.C. 1949: Synthetic oestrogens. J. Pharm. & Pharmacol: 137.
- DODDS, E.C. & W. LAWSON 1938: Molecular structure in relation to oestrogenic activity Compounds without a phenanthrene nucleus. Proc. Roy. Soc. B, 125:222.
- DODGSON, K.S. & R.T. WILLIAMS. 1948: Stilboestrol monoglucuronide, isolation from human urine. Nature 161:604 (Uit J. Pharm. & Pharmacol. 1:112. 1949).
- DOHRN, M., W. FAURE, H. POLL & W. BLOTEVOGEL 1926: Med. Klin. (Munich.) 22:1417 (Uit Bradbury en White 1954 en Burrows 1949).
- DOISY, E.A., S.A. THAYER & J.T. VAN BRUGGEN. 1942: Federation Proc. 1:202. Uit Grundy 1957. (Chem. Rev. 57:394.)
- DOISY, E.A., VELER & THAYER. 1929: Amer. J. Physiol. 90:329. Uit Burrows 1949.
- DORFMAN, R.I. & DORFMAN A.S. 1954: Estrogen assays using the rat uterus. Endocrinol. 55:65.
- EBLING, F.G. 1948: The effect of sex hormones on the sebaceous glands of the female albino rat. J. Endocrinol. 5:297.
- EILERT, M.L. 1953: Effect of estrogens on the partition of serum lipids in female patients. Metabolism 2: 137.
- EMMENS, C.W. 1946: The biological assay of urinary oestrogens and androgens J. Endocrinol. 5: LXXV.

- EMMENS, C.W. 1955: Biological assay of the gonadal and gonadotrophic hormones. Brit. Med. Bull. 11:135.
- EMMENS, C.W. 1950: Hormone Assay Academic Press Inc. New York.
- ENGEL, P. 1952: Anales soc. biol. Bogotá 5:1. Uit Grundy 1957. (Chem. Rev. 57:395.).
- ENTENMAN, C. F.W. LORENZ & I.L. CHAIKOFF 1938: The endocrine control of lipid metabolism in the bird. Effects of pregnant mare serum upon the blood and liver lipids of the domestic fowl. J. Biol. Chem. 126:133.
- ENTENMAN, C., F.W. LORENZ & I.L. CHAIKOFF. 1940: The endocrine control of lipid Metabolism in the bird. Effects of crystalline sex homones on blood lipids of the bird. J. Biol. Chem. 134:495.
- ESKIN, B.A. & E.M. BOGDANOWE. 1956: The influence of estrogen upon goiter induction in adult and immature rats. Endocrinol 59:688.
- EVANS, I.A. & W.C. EVANS. 1949: Effects of young grass in the diet on the onset of sexual maturity in mice. Nature 163: 908.
- FARRIS, E.J. & GRIFFITH, J.Q. 1949: The rat in laboratory investigation. Philadelphia. p. 166. J.B. Lippincott, Co.,
- FELDMAN, J.D. 1956a: Effect of estrus and estrogen on thyroid uptake of I 131 in rats. Endocrinol. 58:327.
- FELDMAN, J.D. 1956b: Effect of estrogen on thyroidal iodine trapping and conversion of inorganic I 131 to protein bound I 131. Endocrinol. 59:289.
- FELDMAN, J.D. 1957: Estrogen and peripheral utilization of thyroid hormones. Am. J. Physiol. 188:30.
- FELDMAN, J.D. & T.S. DANOWSKI. 1956: Effect of estrogen on the metabolism of protein - bound iodine. Endocrinol. 59: 463.
- FILLIOS, L.C. 1957: The gonadal regulation of cholesteremia in the rat. Endocrinol. 60:22.

- FINNEMORE, H. 1910: Pharm. J. 31:604. Uit Bradbury en White 1954.
- FISHMAN, W.H. 1947: J.Biol. Chem. 169:7. Uit Grundy 1957.(Chem. Rev. 57:396.).
- FRANK, GOLDBERGER & SALMON. 1936: Proc. Soc. exptl. Biol.& Med. 33:615. Uit Burrows 1949.
- FRUTON, J.S. & S. SIMMONDS. 1953: General Biochemistry. p. 897. J. Wiley & Sons, Inc. New York.
- GEISSMAN, T.A. & HINREINER, E. 1952: Theories of the biogenesis of flavonoid compounds. Botan. Rev. 18:77.
- GOETSCH, D.D. 1955: The effects of feeding and implanting estrogenic substances in ruminants. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 127:531.
- GOETSCH, D.D. 1956: The effects of feeding and implanting estrogenic substances in ruminants. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 127:531. (Opsomming in Nutr. Abs.& Rev. 26: p.514.1956).
- GORDON, E.E. & C.A. VILLEE. 1956: An in vitro assay for estradiol - 17-B and estrone. Endocrinol. 58:150.
- GOWE, R.S. 1949: Residual estrogens in the tissues of fowl treated with dienestrol diacetate. Poult. Sci. 28:666.
- GREENBLATT, R.B., N.H. BROWN B.S. AUGUSTA. 1952: The storage of estrogen in human fat after estrogen administration. Am. J. Obst. & Gynecol. 63:1361.
- GREEP, R.O. & I. CHESTER JONES. 1950: Steroid Control of pituitary function. (Uit Pincus 1950. p.197.)
- GRUMBRECHT, P. & A. LOESER. 1938: Experimentelle Untersuchungen zur Pathologie und Therapie der ovariellen Ausfallserscheinungen. Arch.f. Exptl. Path. u. Pharmak. 189:345.
- GRUNDY, J. 1957: Artificial Estrogens. Chem. Rev.57:281.
- HADLOW, W.J. & E.F. GRIMES. 1955: Stilbestrol-contaminated feed and reproduction disturbances in mice. Science. 122:643.

HALE, W.H., P.G. HOMEYER, C.C.
CULBERTSON & W. BURROUGHS. 1955:

Response of lambs fed varied levels of diethylstilbestrol. J. Anim. Sci. 14:909 (Opsomming uit Nutr. Abs. & Rev. 26:252. 1956.)

HANAHAN, D.J., E.G. DASKALAKIS,
T. EDWARDS & H.J. DAUBEN, Jr. 1953:

The metabolic pattern of C¹⁴-diethylstilbestrol. Endocrinol. 53:163. 1953.

HAQUE, M.E. R.J. LILLIE,
C.S. SHAFFNER & G.M. BRIGGS. 1949:

Response of Vitamin - deficient chicks to the sex hormones. Poult. Sci. 28:916.

HAWK, P.B., B.L. OSER
& W.H. SUMMERSON. 1952: Practical Physiological Chemistry. p.697. J&A. Churchill Ltd., Lond.

HORLICK, L. & L.N. KATZ. 1948:

The effect of diethylstilbestrol on blood lipids and the development of atherosclerosis in chickens on a normal and low fat diet. J. Lab. Clin. Med. 33:733.

JAILER, J.W. 1940: J. Clin. Endocrinol. 9:557. Uit Grundy 1957. (Chem. Rev. 57:394.)

JANES & NELSON. 1949: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 43:340. (Uit Burrows 1949.)

JORDAN, P.S., R.M. JORDAN
& H.G. CROOM. 1955: Effects of stilbestrol, progesterone - estradiol implants and oral administration of stilbestrol on fattening lambs. J. Anim. Sci. 14:936. (Opsomming uit Nutr. Abs. & Rev. 26:526. 1956.)

JUDAH, W.F. &
F. LIPMANN. 1951: Biochem. J. 48:33. Uit Fruton & Simmonds 1953. (p.486.)

JUHN & GUSTAVSON. 1930: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 27:747. (Uit Burrows 1949.)

JUKES, T.H. 1952: B-vitamins for blood formation. C.C. Thomas U.S.A.

KING, F.E. &
L. JURD. 1952: J. Chem. Soc. p.3211. (Uit Bradbury & White 1954).

KORENCHEVSKY, V. &
M. DENNISON. 1934: The effect of oestrone on normal and castrated male rats. Biochem. J. 28:1474.

- KROSZCZYNSKI, S. & M. BYCHOWSKA. 1939: Compt. rend. soc. biol. 130:570; C.A. 33:4299. (Uit Burrows 1949 en Bradbury & White 1954).
- LEVIN, L. 1945: J. Biol. Chem. (Uit Pincus 1948.)
- LOEB, H.G. 1942: Influence of estradiol benzoate on fat storage. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 51:330.
- LOEWE, S. 1933: Klei'ns Handbuch der Pflanzenanalyse. Vol. 4 p.1034. Springer Vienna.
- LOEWE, S., F. LANGE & E. SPOHR. 1927: Biochem. Z. 180:1. (Uit Bradbury & White 1954).
- LORENZ, F.W. 1943: Fattening cockerels by stilbestrol administration Poult. Sci. 22:190.
- MALPRESS, F.H. 1946: Nature 158:790. Uit Grundy 1957. (Chem. Rev. 57:300).
- MALPRESS, F.H. & E.C. OWEN. 1946: Observations of the excretion of diethylstilbestrol by the ruminant. J. Endocrinol. 5:LXII.
- MARRIAN, G. F. & A.S. PARKES. 1929: The assay of oestrin J. Physiol. 67:389.
- MARSHALL & JOLLY 1950: Phil. Trans. Roy. Soc. B. 198:99. (Uit Burrows 1949).
- MENTZ, H.E.A., W.A. ODENDAAL & J. STEYN. 1950: S. African J. Med. Sci. 15:83. Uit Grundy 1957 (Chem. Rev. 57:396.)
- MERKER, P.C., L.D. EDWARDS, F.N. ANDREWS & J.E. CHRISTIAN. 1955: The estrogenic activity of residues obtained from chickens treated with pellets of diethylstilbestrol. Poult. Sci. 34: 1118.
- MEYER, R.K. & K.H. CLIFTON. 1956: Effects of diethylstilbestrol - induced tumorigenesis on the secretory activity of the rat anterior pituitary gland. Endocrinol. 58:686.
- MEYER, R.K. & W.H. MCSHAN. 1950: In Recent progress in hormone research Vol 5 p.465. Pincus 1950. Academic Press. New York.
- NALBANDOV, A.V. & L.E. CARD. 1943: Effect of hypophysectomy of growing chicks J. Exp. Zool. 94:403.
- ⊕ LANDAUER, W., C.A. PFEIFFER, W.U. GARDNER & E.B. MAN. 1939: Hypercalcification - calcemia and -lipemia in chickens following administration of estrogens. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 41:80.

NIELSEN, A.T., K. PEDERSEN-
BJERGAARD & M. TONNESEN. 1946:

Fate of some oestrogenic phenanthrene and stilbene derivatives in the rat. J. Endocrin. 5:111.

NOBLE, R.L., E.R. PLUNKETT
& N.B.G. TAYLOR. 1950:

Uit Recent progress in hormone research. Vol. 5. Pincus 1950.

OKI, M. & Y.
URUSHIBARA. 1952:

Bull. Chem. Soc. Japan 25:109.
Uit Grundy. 1957. (Chem. Rev. 57:303.)

O'MARY, C.C. &
A.E. CULLISON. 1956:

Effects of low level implantations of stilbestrol in steers on pasture. J. Anim. Sci. 15:48.

O'MARY, C.C. E.P. WARREN,
T.J. DAVIS & H.H. PIERCE. 1956:

Effects of low level implantations of stilbestrol in steers fattened on dry lot rations. J. Anim. Sci. 15:52. 1956.

PASCHKISS, K.E. &
A.E. RAKOFF. 1950:

In Recent progress in hormone research Vol. 5. p.115. Pincus. 1950. Academic Press, New York.

PEARLMAN, W.H. 1948: In "The Hormones" Pincus 1948. Academic Press, New York.

PEDERSEN-BJERGAARD, K. 1939:

Comparative studies concerning the strengths of estrogenic substances. University Press, Oxford, Lond.

PERRY, T.W., W.M. BEESON,
F.N. ANDREWS & M. STOB. 1955:

The effect of oral administration of hormone and growth rate and deposition in the carcass of fattening steers. J. Anim. Sci. 14:329.

PHARMACEUTICAL SOCIETY
OF GREAT BRITAIN. 1951:

Hormones, a survey of their properties and uses. Pharmaceutical Press, Lond.

PIETERSE, P.J.S. &
F.N. ANDREWS. 1956a:

The estrogenic activity of legume, grass and corn silage. J. Dairy, Sci. 39:81 (Opsomming uit Chem. Abs. 50: 5190b. 1956).

- PIETERSE, P.J.S. & F.N. ANDREWS.1956b: The estrogenic activity of alfalfa and other feedstuffs. J. Anim. Sci. 15:25.
- PINCUS, G. 1950: Recent progress in hormone research. Vol V. Academic Press, New York.
- PINCUS, G. & K.V. THIMANN. 1948: The Hormones p.341. Academic Press, New York.
- POPE, G.S.1954: The importance of pasture plant oestrogens in the reproduction and lactation of grazing animals. Dairy Sci. Abs. 16:334.
- POPE, G.S., P.V. ELCOATE, S.A. SIMPSON & D.G.ANDREWS. 1953: Isolation of an oestrogenic isoflavone(Biochanin A) from red clover. Chem.& Industr. p.1092. 1953.
- PRESTON, R., E. CHENG, C.D. STORY, P. HOMEYER, J. PAULS & W.BURROUGHS.1956: The influence of oral administration of diethylstilbestrol upon estrogenic residues in the tissues of beef cattle. J.Anim.Sci. 15:3.
- RAIMONDI, R.1955: Effects of castration on somatic growth and carcass character of fattening Piedmontese calves. Ann. Sper. agrar. 9:1247.(Opsomming in Nutr. Abs.& Rev. 26:810. 1956.)
- RAMSEY, W.N.M. & E.A.CAMPBELL.1956: Some effects of oestradiol benzoate on iron - metabolism in the immature pullet. Quart. J. Exp. Physiol.41: 271. (Opsomming in Nutr. Abs. & Rev. 27: 108. 1957.)
- RANNEY, R.E. & I.L. CHAIKOFF.1951: Effect of functional hepatectomy upon estrogen-induced lipemia in the fowl. Amer. J. Physiol. 165:600.
- RICHARDSON, D., F.H. BAKER, D.L. GOOD & R. COX.1955: The value of stilboestrol in beef cattle rations, wintering phase. 42nd. Ann. Livestock Feeders' Day Rep. Kansas State College circular 320, p.50. (Uit Goetsch 1955.)
- RIDEAL, E.K. 1945: Endeavour. 4:83. Uit Grundy 1957. (Chem. Rev. 57:304.)

RIVIN, A.U. & S.P.
DIMITROFF.1954:

The incidence of severity of atherosclerosis in estrogen-treated males and in females with hypo-estrogenic or hiper-estrogenic state. Circulation 9:533. (Opsomming in Chem. Abs. 48:8937d. 1954.)

ROBERTS, S. &
C.M. SZEGO.1955:

Biochemistry of the steroid hormones. Ann. Rev. Biochem. 24:543.

RYAN, K.J. & L.L.
ENGEL. 1956:

Estrogen metabolites in human serum. Endocrinol. 59:499.

SALMONY, D. 1956:

The effect of oestrogens and chemically related compounds on the respiration of yeast and on oxidative phosphorylation. Biochem.J. 62:411.

SMITH, A.E.
WILDER. 1947:

Nature 160:787. Uit Grundy.1957 (Chem. Rev. 57:396).

SMITH, A.E. WILDER
& P.C. WILLIAMS.1945:

Nature 156:718. Uit Grundy 1957 (Chem. Rev. 57:304.

SOLMSEN U.V.1945:

Synthetic estrogens and the relation between their structure and their activity. Chem.Rev. 37:481.

STEPHENS, G.A.1947:

Hormones and Vitamins p.76. G. Newnes Ltd. Lond.

STOB, M., F.N. ANDREWS,
& M.X. ZARROW.1954a:

The detection of residual hormone in the meat of animals treated with synthetic estrogens. Am.J.Vet.Res. XV:319.

STOB, M., F.N. ANDREWS,
M.X. ZARROW & W.M. BEESON 1954b:

Estrogenic activity of the meat of cattle, sheep and poultry following treatment with synthetic estrogens and progesterone. J.Anim. Sci.13:138.

STOB, M., T.W. PERRY, F.N.
ANDREWS, & W.M. BEESON 1956:

Residual estrogen in the tissues of cattle treated orally with diethylstilbestrol, dienestrol, hexestrol and chlortetracycline. J. Anim.Sci. 15:997.

TAGNON, H.J., S.LIEBERMANN, P.
SCHULMAN & A.BRUNSCHWIG.1952:

J. Clin. Invest.31:346. Uit Grundy 1957.(Chem. Rev. 57:394.)

- TURNER, C.W.1956: Biological assay of beef steer carcasses for estrogenic activity following the feeding of diethylstilbestrol at a level of 10 mg. per day in the ration. J.Anim.Sci. 15:13.
- TWOMBLY, G.H. & H.C. TAYLOR.1942: Cancer Research 2:811. Uit Grundy 1957. (Chem. Rev. 57:394.)
- VENNING, E.H. 1955: Clinical value of hormone estimations. Brit. Med. Bull. 11:140.
- WESSELY, F. J. KOTLAN & F. SINWELL.1952: Monatsh. 83:902. Uit Grundy 1957. (Chem. Rev. 57:396.)
- WHITEHAIR, C.K. W.D. GALLUP& M.C. BELL.1953: Effect of stilbestrol on ration digestibility and calcium, phosphorus and nitrogen retention in lambs. J. Anim. Sci. 12:331.
- WILKINSON, W.S.C.C. O'MARY, G.D. WILSON, R.W. BRAY, A.W. POPE, & L.E. CASIDA. 1955: The effect of diethylstilbestrol upon growth, fattening and certain carcass characteristics of full-fed and limited-fed western lambs. J. Anim.Sci.14:866.
- WRIGHT, S., M. MAIZELS & J.B. JEPSON. 1952: Applied Physiology. p.1088. Oxford University Press, Lond.
- ZARROW, M.X., E.A. LAZO-WASEM & R.L. SHOGER. 1953: Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650.
- ZIMMERBERG, H.1946: J. Biol.Chem. 166:97. Uit Grundy 1957. (Chem. Rev. 57:395.)
- ZONDEK, B. 1936: Tumor of the pituitary induced with follicular hormone.Lancet 230:776.
- ZONDEK, B.1941: Fate of the sex hormones in the organism. Williams and Wilkins Co.,Baltimore.
- ZUCKERMAN, S. 1950: In Recent progress in hormone research p. 143 (Pincus 1950).
-

K.J.