

DIE WIRKUNG VON ÖSTROGENEN AUF OXYDATIVE BIOTRANSFORMATIONS-REAKTIONEN IN DER RATTELEBER

W. KLINGER, A. NEUGEBAUER, F.-K. SPLINTER und K.-H. CHEMNITIUS,
Technische Mitarbeit: D. BAUER, R. ERNST und E. KARGE

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
und den Wissenschaftlichen Laboratorien des VEB Jenapharm, DDR

(Received 16 January 1970; accepted 25 March 1970)

Abstract—Intact and castrated female and male Wistar rats were treated with single and repeated oestrus producing doses of oestradiol benzoate, the different isomers of mestranol, oestriol and diene estriol bisacetate. The duration of the treatment was 2 and 14 days. Twenty-four hr after the last application the extent of phenazone hydroxylation, aminophenazone-*N*- and codeine-*O*-demethylation was determined with 9000 g-supernatant of the liver. The oxidative reactions were altered in different ways and to different extents though usually inhibition was observed. An increase of aminophenazone-*N*-demethylation activity especially after pretreatment with estradiol is notable.

DIE BIOTRANSFORMATION von Arzneimitteln zeigt nur bei sehr wenigen Spezies geschlechtsspezifische Unterschiede: Bei weiblichen *Ratten* ist ihre Geschwindigkeit in der Regel um ein Vielfaches langsamer als bei männlichen Tieren.¹⁻¹⁵

Nur wenige Reaktionen, z. B. die S-Demethylierung¹⁶ zeigen bei der Ratte keine geschlechtsspezifischen Unterschiede.

Bei *Mäusen* wurden von Brown¹⁷ und Rümke^{18, 19} geschlechtspezifische Differenzen im umgekehrten Sinne im Vergleich zu Ratten beschrieben: Der Abbau von Barbituraten verläuft bei reifen männlichen Mäusen langsamer als bei weiblichen, die Narkosedauer ist entsprechend länger.

Bei *anderen Spezies* und insbesondere beim *Menschen* wurden derartige geschlechtspezifische Unterschiede bei der Biotransformation von Fremdstoffen nicht gefunden.³ Nach neuesten Untersuchungen¹⁵ sind nicht unterschiedliche Enzym- oder Kofaktorkonzentrationen für die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der Ratte die Ursache, sondern unterschiedliche Affinitäten der Arzneimittel zum Protein des Koenzyms P 450, das bei weiblichen Ratten die Arzneimittel schwächer bindet als bei männlichen Tieren. Durch Testosteronbehandlung ließ sich die Aktivität von Biotransformationsreaktionen bei weiblichen Ratten auf das Niveau männlicher Tiere anheben, umgekehrt hemmt eine Östrogenbehandlung bei männlichen Tieren die Aktivität mikrosomaler Biotransformationsenzyme.^{2-5, 7} Pulkkinen²⁰ vermutet, daß die bei schwangeren Ratten gefundene Verminderung der Sulfatierung eine Östrogenwirkung sei. Die zitierten Befunde stehen in Widerspruch zu Untersuchungen, wonach die Sulfatierung von 2-Naphthylamin durch Östrogene beschleunigt wird.²¹ Die Glukose-6-Phosphat- und Isozitratoxydation werden durch Östrogene unter

Steigerung der NADPH₂- und der ATP-Bildung vergrößert, so daß anabole Prozesse, wie die Eiweiß-, die Nukleinsäuren- und die Lipid-Synthese, erhöht werden können.²² Mehrere Autoren²³⁻²⁸ fanden unter Östrogeneinwirkung einen gesteigerten Einbau von Aminosäuren in Proteine und von markierten Vorstufen in Nukleinsäuren. Sie äußerten die Vermutung, daß ebenso wie für andere Hormone auch für die Östrogene angenommen werden darf, daß sie die Synthese einer begrenzten Zahl von Proteinen und von RNA stimulieren.

Wegen dieser zum Teil widersprüchlichen Befunde haben wir die Wirkung verschiedener Östrogene auf die oxydativen, NADPH₂-abhängigen Biotransformations-Reaktionen in der Leber untersucht: auf die Phenazonhydroxylierung, Aminophenazon-*N*- und Kodein-*O*-demethylierung im 9000 g-Überstand. Durch die Applikation verschiedener Östrogene in äquiöstrogenen Dosen sollten Wirkungsunterschiede als Ausdruck einer Wirkungsdissoziation z. B. bei der Oxydation von Östradiol zu Östriol erfaßt werden.

Diese Untersuchungen wurden in einem ersten Versuch an kastrierten reifen Weibchen durchgeführt. Dabei zeigte sich unerwartet besonders nach Östriol eine erhebliche Aktivitätssteigerung bei der Aminophenazon-*N*-demethylierung. In einem zweiten Versuch wurden zur Überprüfung dieses Befundes neben reifen weiblichen Kastraten auch normale reife Weibchen und Männchen mit Östriol behandelt. Um Hinweise auf die Ursache dieser Aktivitätssteigerung zu erhalten (anabole oder induktive Wirkungen, Hungereffekt), wurden neben den Aktivitäten der Biotransformationsreaktionen noch Frisch- und Trockengewicht der Leber, Eiweiß- und Gesamtglykogengehalt und als Maß für die Aktivität des Glukuronsäurestoffwechselweges die Askorbinsäurekonzentration in der Leber bestimmt.⁹

2. METHODIK

2.1. Versuchstiere

Es wurden geschlechtsreife Wistar-Ratten aus der Koloniezucht des VEB Jenapharm verwendet. Sie wurden mit Preßfutter der Arbeitsgemeinschaft Versuchstierzucht Berlin und Wasser *ad libitum* gefüttert. Das Alter der Tiere bei Versuchsbeginn wird im Ergebnisteil angegeben. Die Ovarektomie erfolgte stets 4 Wochen vorher.

2.2. Behandlung der Versuchstiere

Im akuten Versuch erhielten die Tiere an 2 aufeinanderfolgenden Tagen das 20-fache der östruserzeugenden Dosis von Östradiol-benzoat, (\pm)- und (+)-Mestranol (17 α -Äthiny-3-methoxy-1,3,5(10)-östratrien-17 β -ol, Äthinylostradiol-3-methyläther), Dienöstroldiazetat sowie Östriol s.c. Östradiolbenzoat wurde zum Vergleich auch in der einfachen östrogenen Dosis gegeben. Im subchronischen Versuch wurden die Tiere 14 Tage mit der 10-fachen östruserzeugenden Dosis behandelt. (-)-Mestranol wirkte in eigenen Vorversuchen nicht auf das Vaginalepithel, die Dosis wurde daher willkürlich und relativ hoch gewählt. Genaue Dosisangaben s. Tabelle 1.

Die Versuchssubstanzen entstammten alle der Produktion des VEB Jenapharm u entsprachen den Anforderungen des DAB 7.

2.3. Die Bestimmung der Phenazon-Hydroxylierung, Aminophenazon-*N*- und Kodein-*O*-demethylierung wurde nach kinetischen Voruntersuchungen,²⁹ wie bei Klinger *et al.*,³⁰ angegeben, durchgeführt.

2.4. Bestimmung des Eiweißes nach der Biuret-Reaktion.

TABELLE 1.

Versuchsgruppen Nr.	Behandlung mit	Phenazon-Hydroxylierung	Signifikante Differenz gegenüber der Kontrollgruppe bei der		
			Aminophenazon-N-demethylierung	O-demethylierung	Kodein-O-demethylierung
1	Kastrierte ♀ Erdnußöl		Kontrollgruppe		
2	♀ im Östrus unbehandelt	○	○	+	
3	Östradiolbenzoat 2 × 1 µg		○	○	
4	item 2 × 20 µg	--	--	--	
5	item 14 × 10 µg	○	○	+	
6	(+)-Mestranol 2 × 100 µg	○	○	○	
7	(-)-Mestranol 2 × 12 mg	○	++	○	
8	(±)-Mestranol 2 × 200 µg	--	--	--	
9	(+)-Mestranol 14 × 50 µg	--	+	○	
10	(-)-Mestranol 14 × 2,5 mg	--	-	-	
11	(±)-Mestranol 14 × 100 µg	○	○	○	
12	Östriol 2 × 2,2 mg	○	○	-	
13	Östriol 14 × 1 mg	○	++	+	
14	Dienöstroldiazetat 2 × 40 µg	--	++	○	
15	Dienöstroldiazetat 14 × 20 µg	○	+	○	
16	Kastrierte ♀		Kontrollgruppe		

Die Kontrollgruppen am Versuchsanfang und versuchsende unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Signifikante Hemmungen bei den Versuchsgruppen mit $P \leq 0,05$ sind mit -, mit $P \leq 0,01$ mit -- gekennzeichnet, Steigerungen der Aktivität entsprechend mit + und ++.

2.5. Bestimmung der Leber-Ascorbinsäure nach Roe *et al.*^{31*}

2.6. Glykogen wurde nach der Anthron-Methode, wie bei Klinger *et al.*¹⁰, angegeben, bestimmt.†

2.7. Von allen Ergebnissen werden die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach dem *t*-Test, Werte mit $P \leq 0,05$ gelten als signifikant.

3. ERGEBNISSE

3.1. Die Ergebnisse des ersten Versuches mit reifen weiblichen Kastraten sind in den Abb. 1-3 dargestellt, der Signifikanzvergleich erfolgt in Tabelle 1.

Es zeigte sich, daß die Biotransformationsreaktionen im allgemeinen gleichsinnig beeinflußt werden. Lediglich nach 14-tägiger Behandlung mit täglich 50 µg (+)-Mestranol und nach 2 × 40 µg Dienöstroldiazetat wurden bei einer signifikanten Steigerung der Aminophenazon-N-demethylierung Hemmungen der Phenazon-hydroxylierung nachgewiesen.

* Wir danken Frau Dr. A. Traeger für die Durchführung der Bestimmungen.

† Wir danken Herrn Dr. C. Reinicke für die Durchführung der Bestimmungen.

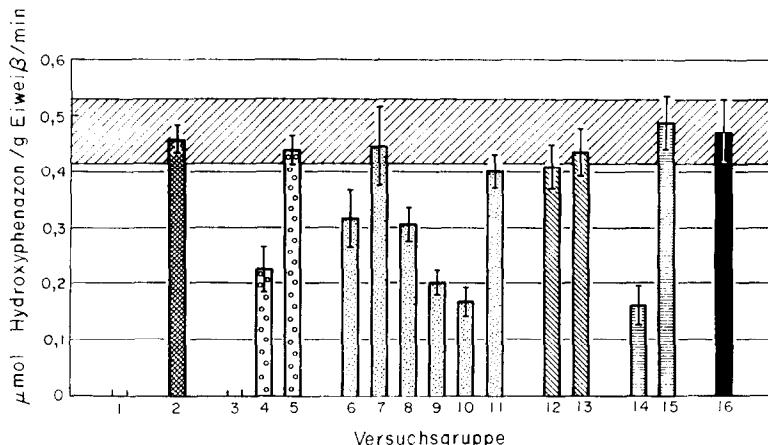


ABB. 1. Phenazonhydroxylierung durch Leberüberstand (9000 g \times 20 min) kastrierter ♀ Ratten nach Behandlung mit verschiedenen Östrogenen in unterschiedlicher Dosierung. Zum Vergleich außerdem ♀ Ratten im Östrus. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler Gruppenumfang n jeder Versuchs- und Kontrollgruppe = 8. Der Kontrollbereich aus der Anfangs- und Endkontrolle ist gestrichelt angegeben. Versuchsgruppen-Nr. s. Tabelle 1. Die Versuchsgruppen 1 und 3 konnten wegen eines technischen Versehens nicht ausgewertet werden.

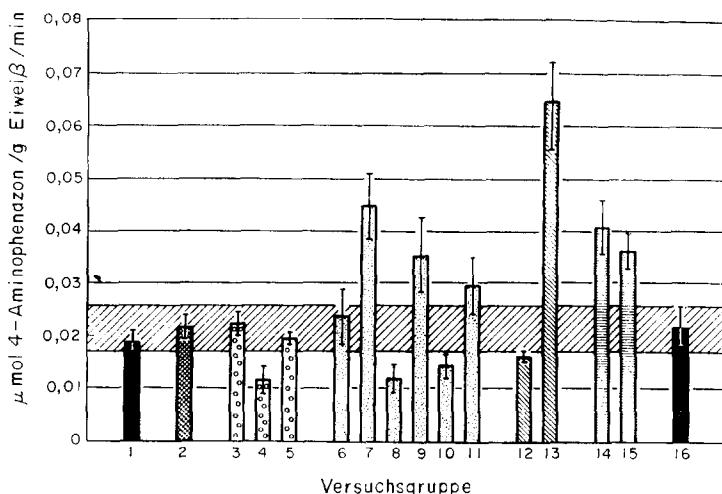


ABB. 2. Aminophenazon-N-demethylierung zu 4-Aminophenazon durch Leberüberstand der gleichen Ratten wie in Abb. 1 angegeben.

3.2. Nach den vorliegenden Literaturbefunden (s. Einleitung) waren ausschließlich Hemmefekte, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß, nach den verschiedenen Östrogenen erwartet worden. Es wurde daher zur Klärung der Frage, ob anabole oder induktive Wirkungen der Östrogene oder Hungereffekte die Aktivitätssteigerungen verursachten, ein zweiter Versuch unter Hinzuziehung weiterer Parameter (Leberfrisch- und -trockengewicht, Eiweiß-, Glykogen- und Askorbinsäuregehalt) angeschlossen.

Die Wirkung einer 14-tägigen Applikation von Östriol auf normale und kastrierte ♀ Ratten sowie auf Männchen ist in der Tabelle 2 dargestellt.

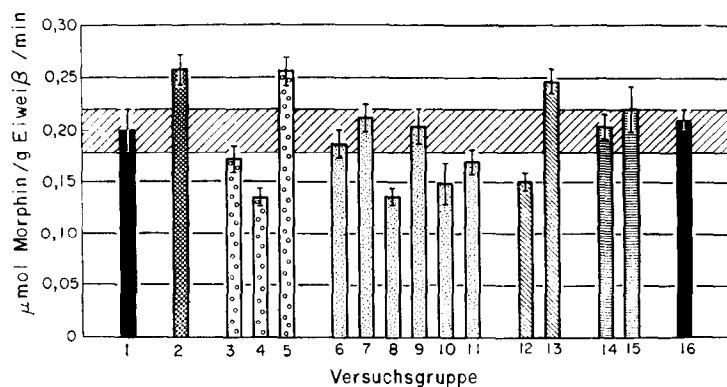


ABB. 3. Kodein-*O*-demethylierung zu Morphin durch Leberüberstand der gleichen Ratten wie in Abb. 1 angegeben.

TABELLE 2.

Versuchs- meßgröße	Versuchsgruppe			
	Kastr. ♀ 0,25 ml Tyloselösung	Kastr. ♀ 1 mg östriol	♂ 0,25 ml Tyloselösung	♂ 1 mg östriol
Körpergewichts- veränderungen in % zum Aus- gangsgewicht	+ 6	- 20	+ 10	- 22
Gesamtleber- frischgewicht in g	8,540 ± 0,272	9,370 ± 0,298*	8,540 ± 0,098	8,350 ± 0,415
Trockengewicht von 1 g Leber in mg	300,5 ± 2,3	285,5 ± 10,5	303,0 ± 2,4	289,0 ± 5,5
Eiweiß im Homogenat von 1 g Leber in mg	161,40 ± 6,39	157,10 ± 4,06	188,80 ± 3,82	172,50 ± 4,46
Leber-Gesamt- Ascorbinsäure in mg/100 g Leberfrischgewicht	15,8 ± 1,1	10,4 ± 1,3*	21,2 ± 2,0	11,0 ± 1,0*
Glykogen in g/100 g Leberfrischgewicht	6,31 ± 0,86	5,10 ± 0,49	7,66 ± 0,84	6,96 ± 0,47
Eiweiß in der 9000 g-Fraktion aus 1 g Leber in mg	69,40 ± 1,83	65,60 ± 2,27	69,30 ± 2,06	76,90 ± 2,23
Hydroxyphenazon in μmol/5mg Protein/min	651,0 ± 64,6	680,0 ± 65,3	568,0 ± 36,8	563,0 ± 90,5
4-Aminophenazon in μmol/5mg Protein/min	8,8 ± 1,1	49,8 ± 7,4*	44,7 ± 13,8	84,8 ± 9,2*
Morphin in μmol/mg Protein/min	198,0 ± 15,3	278,0 ± 37*	242,0 ± 10,1	304 ± 21,1

14-tägige Behandlung von adulten kastrierten ♀ und normalen ♂ Ratten mit 1 mg/kg täglich i.p. Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen des Suspensionsmittels. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel mit Standardfehler (ausgenommen die Körpergewichtsveränderungen). Gruppenumfang der Versuchs- und Kontrollgruppen $n = 8$. Signifikant differente Werte zu jeweiligen Kontrollgruppen sind mit * gekennzeichnet.

Unter Östriol kommt es bei den kastrierten Weibchen zu einer Zunahme des Lebergesamtgewichtes. Das Lebertrockengewicht wird nicht signifikant verändert und zeigt eher eine Tendenz zur Verringerung. Auch Gesamteiweiß und Leberglykogen sind gegenüber den Kontrolltieren nicht signifikant verändert. Die Phenazon-hydroxylierung ist nicht sicher, die Kodein-*O*-demethylierung um rund 40% und die Aminophenazon-*N*-demethylierung um das 5-fache gesteigert. Bei den männlichen Tieren sind die Verhältnisse analog, quantitative Unterschiede zu den Wirkungen bei weiblichen Kastraten sind jedoch deutlich: Durch Östriol erfolgt eine geringere Steigerung der Kodein-*O*-demethylierung im Vergleich zu den weiblichen Kastraten, die Aminophenazon-*N*-demethylierung wird noch weniger gesteigert. Die Grundaktivität ist bei den männlichen Tieren deutlich höher als bei den weiblichen. Die Leber-Ascorbinsäure-Konzentration, normalerweise bei den männlichen Tieren höher als bei den weiblichen, wird durch die Östriol-Behandlung bei den männlichen Tieren prozentual zum Ausgangswert stärker gesenkt als bei den weiblichen Kastraten. Die Östriolbehandlung führt zu einem Körperegewichtsverlust.

4. DISKUSSION

An unseren Ergebnissen ist besonders auffallend, daß neben einer Hemmung der von uns untersuchten Biotransformationsreaktionen durch einige Östrogene (1) Östriol und in geringerem Ausmaß auch (+)-Mestranol bei der Aminophenazon-*N*-demethylierung zu einer erheblichen Aktivitätssteigerung führen, daß (2) die von uns untersuchten Reaktionen, die durch die NADPH₂-abhängigen mischfunktionellen Oxydasen katalysiert werden, in unterschiedlichem Ausmaß und sogar in unterschiedlicher Richtung beeinflußt werden, und daß (3) Östradiol und Östriol sich in ihrer Wirkung als Induktoren für mischfunktionelle Oxydasen unterscheiden.

Ad 1. Östriol wirkt in unseren Versuchen ebenso stimulierend auf eine Reaktion der mikrosomalen mischfunktionellen Oxydasen der Leber wie Testosteron.^{32, 33} Unter Berücksichtigung, daß nicht reine Mikrosomen, sondern der sog. 9000 g-Überstand eingesetzt wurden, liegt eine Steigerung der spezifischen Aktivität vor, die an einen Induktionseffekt wie nach Vorbehandlung mit Barbituraten z. B. denken läßt. Auf Grund der eingangs zitierten Literatur ist eine echte Enzym-de-novo-Synthese denkbar, der Körperegewichtsverlust läßt jedoch auch an eine Hungerfolge denken.³⁴ Der Gewichtsverlust der Nebennieren und Hypophysen³⁵ könnte allenfalls eine Aktivitätsminderung, jedoch nicht die Aktivitätserhöhung erklären.¹¹ Nach Timar³⁶ erfolgt der Barbituratabbau auch durch das Retikuloendotheliale System (RES) der Leber, nach Govier³⁷ wird Sulfanilamid durch das RES der Leber (und anderer Organe) azetyliert. Diese RES-Funktionen lassen sich auf verschiedene Weise beeinflussen.^{36, 38, 39} Da Östrogene die RES-Funktionen wie z. B. die Phagozytoseaktivität steigern,⁴⁰ könnte die von uns nachgewiesene Steigerung besonders der Aminophenazon-*N*-demethylierung auch als Stimulation des Leber-RES gedeutet werden. Die Beteiligung des RES an Biotransformationsprozessen ist jedoch nur für die Azetylierung erwiesen,^{37, 39} alle anderen Reaktionen laufen nach der übereinstimmenden Meinung verschiedener Arbeitsgruppen in der Leberparenchymzelle ab.⁴¹ Die Deutung unserer Befunde als einer Östrogenwirkung auf das Leber-RES hat daher einen nur sehr geringen Wahrscheinlichkeitswert.

Hinweise für eine anabole Wirkung können anhand der bestimmten Parameter nicht gewonnen werden.

Die Steigerung der Aminophenazon-*N*-demethylierung vor allem durch Östriol könnte schließlich seiner Eigenschaft als "gebremstes Östrogen" zugeschrieben werden: Durch Verdrängung von Östradiol aus seinen spezifischen Rezeptoren würden dessen hemmende Wirkungen wegfallen, ohne daß Östriol eine gleiche Wirkung entfaltete.^{23, 42} Dann hätte Östriol seine Wirkung aber nicht bei weiblichen Kastraten und bei Männchen entfalten dürfen.

Ad. 2. Das unterschiedliche Ausmaß und die z. T. sogar unterschiedliche Richtung der Östrogenwirkung auf die drei Biotransformationsreaktionen unterstützt die Annahme,^{30, 43-45} daß eine ganze Gruppe von sog. mischfunktionellen Oxydasen existiert, deren Untereinheiten wie auf eine Induktion oder eine CCl₄-Schädigung so auch auf die Einwirkung von Östriol unterschiedlich reagieren.

Auch die Hemmung einer Reihe von oxydativen Biotransformationsreaktionen durch Vorbehandlung von Ratten mit Progesteron war unterschiedlich ausgeprägt.⁴⁶

Ad. 3. Die Steigerung der Aminophenazon-*N*-demethylierung wurde nach der Applikation von Östrioldosen beobachtet, die die gleiche Östruswirksamkeit haben wie das ebenfalls untersuchte Östradiolbenzoat und die Mestranolisomeren. Es handelt sich somit um eine selektive Wirkungsänderung bei der Oxydation von Östradiol zu Östriol. Unterschiede in der Pharmakokinetik müßten ebenfalls berücksichtigt werden, sie können aber, da in äquiöstrogenen Dosen, d. h. nach einer biologischen Wirkung, behandelt wurde, nicht die alleinige Ursache sein.

Auf welchem Mechanismus die nach Östriolbehandlung beobachtete Steigerung der Aminophenazon-*N*-demethylierung beruht, kann also anhand der vorgelegten Versuche nicht entschieden werden. Den Abfall der Leberaskorbinsäurekonzentration bei kastrierten Weibchen wie auch bei intakten Männchen nach Östriolapplikation steht in Übereinstimmung mit dem Befund, wonach Östriol die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase hemmt.⁴² Andererseits wurde unter der Einwirkung von Östrogenen eine Aktivierung der Glukose-6-Phosphatoxydation nachgewiesen:^{22, 23} Auch hier bietet sich wider die Erklärung an, daß Östriol als "gebremstes Östrogen" Östradiol verdrängt und dadurch dessen fördernder Einfluß wegfällt.

Die höhere Leberaskorbinsäurekonzentration bei Männchen kann nicht als direkte Östrogenwirkung aufgefaßt werden: Die der Glukose-6-Phosphat-Oxydation bei der Askorbinsäuresynthese nachgeschalteten Reaktionen müssen offenbar bei männlichen Tieren schneller ablaufen oder männlichen Tiere haben eine höhere Speicherkapazität.

Unsere Befunde zeigen, daß verschiedene Östrogene nicht nur, wie bereits beschrieben, zu einer Hemmung von Biotransformationsreaktionen führen, sondern auch eine Aktivitätserhöhung herbeiführen können. Verschiedene Reaktionen vom gleichen Reaktionstyp können in unterschiedlichem Ausmaß und sogar in unterschiedlicher Richtung auf ein Östrogen ansprechen. Unsere Befunde sind ein weiteres Beispiel für eine mit der östrogenen Wirkung nicht unmittelbar gekoppelte biologische Wirkung des wichtigsten Östradiol-Metaboliten.

Zusammenfassung—Geschlechtsreife Wistar-Ratten, sowohl intakte als auch kastrierte Weibchen sowie intakte Männchen, wurden mit einfachen und mehrfachen äquiöstrogenen Dosen von Östradiolbenzoat, den verschiedenen Mestranol-Isomeren, Östriol und Diänoestroldiazetat 2 bzw.

14 Tage behandelt. 24 h nach der letzten Applikation wurden die Phenazon-Hydroxylierung, die Aminophenazon-*N*- und Kodein-*O*-demethylierung im 9000 g-Leberüberstand bestimmt. Die oxydativen Biotransformationsreaktionen wurden in unterschiedlicher Richtung beeinflußt: Überwiegend wurde eine Hemmung beobachtet, auffällig war besonders nach Östriol-Behandlung eine Steigerung der Aktivität der Aminophenazon-*N*-demethylierung.

LITERATUR

1. E. STREICHER und J. GARBUS, *J. Geront.* **10**, 441 (1955).
2. J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **117**, 322 (1956).
3. B. B. BRODIE, *J. Pharmac.* **8**, 1 (1956).
4. G. P. QUINN, J. AXELROD und B. B. BRODIE, *Biochem. Pharmac.* **1**, 152 (1958).
5. H. REMMER, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* **233**, 173 (1958).
6. S. D. MURPHY und K. P. DUBOIS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **124**, 194 (1958).
7. L. BUCHEL, L. LIBLAU und P. ANGIBEAUD, *Arch. Sci. physiol.* **16**, 227 (1962).
8. R. KATO, E. CHIESARA und G. FRONTINO, *Biochem. Pharmac.* **11**, 221 (1962).
9. W. KLINGER und H. ANKERMANN, *Acta biol. med. germ.* **14**, 764 (1965).
10. W. KLINGER, M. KOCH und B. KRAMER, *Acta biol. med. germ.* **14**, 774 (1965).
11. W. KLINGER, L. KERSTEN und G. MEHLHORN, *Z. Versuch.* **6**, 35 (1965).
12. R. KATO und K. ONODA, *Jap. J. Pharmac.* **16**, 217 (1966).
13. R. KATO, *Jap. J. Pharmac.* **16**, 221 (1966).
14. R. KATO und M. TAKAYANAGHI, *Jap. J. Pharmac.* **16**, 380 (1966).
15. H. REMMER, R. W. ESTABROOK, J. SCHENKMAN und H. GREIM, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* **259**, 98 (1968).
16. P. MAZEL, J. F. HENDERSON und J. AXELROD, *J. Pharmac. exp. Ther.* **143**, 1 (1964).
17. A. M. BROWN, *J. Pharm. Pharmac.* **13**, 679 (1961).
18. CH. L. RÜMKE, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* **255**, 64 (1966).
19. CH. L. RÜMKE, *Arzneimittel forschr.* **18**, 60 (1968).
20. M. O. PULKKINEN, *Acta physiol. scand.* **66**, 120 (1966).
21. A. B. ROY, *Biochem. J.* **74**, 49 (1960).
22. L. ZELEWSKI, *Postepy Biochemii* **9**, 505 (1963).
23. E. DICZFALUSY und CH. LAURITZEN, *Oestrogene beim Menschen*. S. 203 ff. Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1961).
24. H. H. TERRELL, *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **49**, 373 (1963).
25. J. D. WEILL und S. BUSCH, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **10**, 122 (1963).
26. J. GORSKI und M. S. MORGAN, *Biochim. biophys. Acta* **149**, 282 (1967).
27. J. GORSKI, A. NOTIDES, D. TOFT und D. E. SMITH, *Clin. Obstet. Gynec.* **10**, 17 (1967).
28. B. G. MILLER und C. W. EMMENS, *J. Endocr.* **39**, 473 (1967).
29. A. NEUGEBAUER, F.-K. SPLINTER, D. HÄFKE, R. KOBER, H. SCHIRLITZ und W. KLINGER, *Biochem. Pharmac.* **18**, 1559 (1969).
30. W. KLINGER, T. KUSCH, A. NEUGEBAUER, F.-K. SPLINTER und H. ANKERMANN, *Acta biol. med. germ.* **21**, 257 (1968).
31. J. H. ROE, C. A. KUETHER, M. B. MILLS, M. J. OESTERLING und C. M. DAMRON, *Methods of Biochemical Analysis* Vol. 1, 124 (1954).
32. A. RUBIN, C. M. STOHLER und W. J. NOVICK, *Biochem. Pharmac.* **14**, 1898 (1965).
33. R. HEMPEL, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* **259**, 413 (1968).
34. R. KATO, *Biochem. Pharmac.* **16**, 871 (1967).
35. K.-H. CHEMNITIUS, unveröffentlicht.
36. M. TIMAR, *Deutsches Gesundheitswesen* **19**, 927 (1964).
37. W. C. GOVIER, *J. Pharmac. exp. Ther.* **150**, 305 (1965).
38. M. TIMAR, A. BOTEZ, M. TEODORESCU, I. HADRICH und I. NITELEA, *Biochem. Pharmac.* **16**, 1367 (1967).
39. M. TIMAR, I. KHEDRIKH, L. ENESCU, M. TEODORESCU und I. NITELEA, *Pharmakologia i Toksikologia*, **31**, 213 (1968).
40. K. FLEMMING, *Naturwiss.* **53**, 555 (1966).
41. H. REMMER, *Der Internist* **7**, 413 (1966).

42. CH. LAURITZEN, Kolloquium im Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der DAW Jean vom 28. 5. (1968).
43. K. J. NETTER, S. JENNER und K. KAJUSCHKE, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* **259**, 1 (1967).
44. G. LANGE, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* **257**, 230 (1967).
45. H. UEHLEKE, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* **259**, 66 (1967).
46. M. R. JUCHAU und J. R. FOUTS, *Biochem. Pharmac.* **15**, 891 (1966).
47. E. GOETZE, Methoden des klinischen Laboratoriums, 2. Auflage, Jena 1963, VEB Gustav Fischer Verlag.