

'N OORSIG VAN DIE METODES VIR DIE BEPALING VAN DIE GESLAGSHORMONE

C.H. van Niekerk

Departement Dierefisiologie, Universiteit van Stellenbosch

'n Grondige kennis van die beheer van die estrus-siklus deur die hormone van die hipotalamus, hipofise en die gonade is van die allergrootste belang vir elke navorser op die gebied van die geslagsfisiologie. Tot onlangs was die geslagshormone in die urien van mense en diere deur middel van biologiese metodes bepaal. Daar bestaan nou egter 'n mate van twyfel oor die waarde van hierdie biologiese metodes waarvan navorsers in die verlede gebruik gemaak het. Die metodes is nie sensitief genoeg nie, dit is omslagtig en gekompliseerd en bepalinge kan dus nie met kort tussenposes in die siklus gedoen word nie. Bepalinge is gedoen op urienmonsters wat oor 14 uur gekollekteer word en die volume van die monsters was baie groot; ook is daar nie met die hormoon self nie maar met die metaboliete van die hormone soos in die urien uitgeskei, gewerk. Parallele bepalinge van estrogene, progesterone en gonadotrofiene was ook nie prakties moontlik nie en die interaksies van die hormone in dieselfde individu kan dus nie so maklik bestudeer word nie. Dit was dus noodsaaklik om akkurrater metodes te vind wat sensitief genoeg is om lae konsentrasies van die hormone in 'n klein volume plasma te kan bepaal, en wat prakties uitvoerbaar is sonder om tydrowend te wees.

Biologiese en chemiese bepalinge van die geslagshormone

Estrogene

Die biologiese bepaling van estrogene is vir 'n geruime tyd al vervang met chemiese metodes wat op die Kober-reaksie gebaseer is (Brown, 1955b); Brown, Bullbrook & Greenwood, 1957). Estrogene kan volgens dié metode net in die urien bepaal word.

In die volgende fase is oorgegaan na die chromatografiese en fluorisensiemetodes vir die bepaling van die hormone in urien sowel as in plasma (Preedy & Aitken, 1961). In meeste spesies is die estrogene in die plasma egter so laag dat geweldige groot hoeveelhede plasma (ongeveer 500 ml) gebruik moet word, en is dit ook nie prakties moontlik om sikliese veranderinge oor kort periodes vas te stel nie.

Progesteron

Haskins (1950) was die eerste persoon wat 'n chemiese metode vir die bepaling van progesteron beskryf het wat die biologiese metode (Hooker & Forbes, 1947) sou vervang. Die metode is verbeter deur Klopper, Michie en Brown (1955) asook deur Coyle, Mitchell & Russel

(1956). Butt, Morris, Morris & Williams (1951) het 'n polarografiese metode vir die bepaling van progesteron ontwikkel maar albei die metodes was nie sensitief genoeg om progesteron in sirkulerende bloed gedurende die estrus-siklus te bepaal nie. Short (1957) kon ook nie met die papierchromatografiese metode van Zander & Simmer (1954) progesteron in plasma van huisdiere bepaal nie. Hy het egter die metode in 1958 (Short, 1958) so verbeter dat dit wel moontlik was om progesteron in die bloed van huisdiere d.m.v. chromatografiese en spektrofotometriese metodes te bepaal. In die geval van die mens is hierdie metode doeltreffend maar by die skaap met sy lae konsentrasie progesteron in die perifere bloed was minstens 500 plasma vir die bepaling nodig. Edgar & Ronaldson (1958) vind egter dat hulle met hierdie metode die progesteronkonsentrasie in die plasma afkomstig van die vena van die eierstok van die skaap kon bepaal. Met die ontwikkeling van die gaschromatografiese bepaling van progesteron (van Rensburg, 1970) was dit in werklikheid die eerste keer dat progesteron in die perifere bloed van diere met 'n redelike mate van akkuraatheid bepaal kon word. By die mens en diere soos die bok is redelike klein hoeveelhede plasma nodig, maar in die geval van ooie is nog groot hoeveelhede nodig. Daarby is die metode boonop tydrowend.

Gonadotrofiene hormone: FSH en LH

Vir die bepaling van FSH en LH kon daar geen suiwer chemiese metode gevind word nie en tot onlangs was daar nog gebruik gemaak van die biologiese bepalinge. Die metode wat algemeen vir LH-bepalinge gebruik word is die "Ovarian Ascorbic Acid Depletion Test" van Parlow (1961). Vir FSH word die "HCG Augmentation Assay" van Steelman & Pohley (1953), soos verbeter deur Igarashi & McCann (1964), algemeen gebruik.

Die akkuraatheid van die metodes is nie na wense nie, en kan nie op bloed gedoen word wat lae konsentrasies van die betrokke hormone bevat nie.

Serologiese tegnieke vir die bepaling van hormone

Baie substansie in die bloed is gebind aan plasma-proteïene en in sommige gevalle is dié binding van 'n baie spesifieke aard met 'n hoë graad van affiniteit tussen die proteïene en die bindingstof. Dié tipe binding bestaan

- (a) tussen sekere antiliggampies en sy antigeen (proteïene), en

(b) tussen sekere hormone en proteïene (globulien).

Die bindingsprinsiep, soos uiteengesit onder (a) en (b), is deur Berson & Yalow (1957) gebruik vir die ontwikkeling van 'n metode vir die bepaling van seruminsulien. Later is die bindingsvermoë van heelwat kleiner molekule aan proteïene gebruik vir die bepaling van steroïede hormone (Murphy, Engelberg & Pattee, 1963), (Murphy & Pattee, 1964).

Uit die kennis sover ingesamel het die twee hoofmetodes vir die bepaling van die geslagshormone ontwikkel, naamlik:

- A. Die radioimmunologiese metode vir die bepaling van die polipeptied-hormone van die voorste lob van die hipofise (FSH, LH en Prolaktien), en
- B. Die kompeterende proteïenbindingsmetode vir die steroïede hormone van die eierstok (estrogene en progesteron).

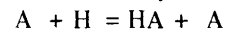
A. *Radioimmunologiese bepaling van FSH en LH*

Die metode berus op die immunologiese reaksies van die liggaam teen vreemde proteïene, d.w.s. spesifieke antiliggaamvorming teen die betrokke proteïen met 'n sterk bindingsaffiniteit tussen die betrokke proteïen en die antiliggaampies wat gevorm is. Die klassieke radioimmunologiese sisteem soos beskryf deur Yalow & Berson (1960) berus verder op die vermoë van 'n antiliggaampie om sy antigeen (proteïen), gemerk met 'n radioaktiewe isotoop, te bind, asook die kompeterende inhibisie van die reaksie deur ongemerkte antigeen. Die antiliggaampies gebind aan die gemerkte antigeen kan dan geskei word van die ongebonde en die radioaktiwiteit gemeet word om so doende die konsentrasie van die antigeen (proteïenhormoon) te bepaal. Die hormone van die voorste lob is proteïene en daar kan dus 'n spesifieke antiserum vir die hormone berei word sodat hulle volgens hierdie metode bepaal kan word. In 1960 is daar drie verskillende prosedures vir die bepaling van HCG gelyktydig gerapporteer deur Brody & Carlström (1960), McKean (1960) en Wide & Gemzell (1960). Daarna het verskeie werkers tot dié veld toegetree maar basies kom al die metodes op die volgende neer, en sluit die volgende stappe in:

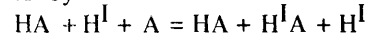
1. Bereiding van die suiwer hormoon (Donini, Puzzuoli, D'Allescio, Lunenveld, Eshkol & Parlow, 1966).
2. Bereiding van 'n antiserum teen die hormoon deur die hormoon in bv. marmotte te spuit (Butt, 1969; Odell, Abraham, Raud, Swerdloff & Fisher, 1969; Petrusz, 1969; Rasa, 1966).
3. Merk van die suiwer antigeen (proteïenhormoon) of die antiliggaam met radioisotope bv. I^{131} of I^{125} (Greenwood, Hunter & Glover, 1963; Eshkol, 1969; Miles & Hales, 1970; Wide & Porath, 1967).

4. Bepaling van die hormoonkonsentrasie in die plasma.

4.1 1 ml van die plasma (Hormoonkonsentrasie (H) onbekend) word dan by 'n bekende oormaat hoeveelheid hormoonantiliggaampies gevoeg (A) en gekwilibreer by 4°C .



Voeg nou 'n bekende hoeveelheid gemerkte hormoon H^I by



4.2 Skeiding van gebonde en ongebonde hormoon deur presipitasie (antimarmot-globulienteëliggaampies) of die soliedefasemetode (Catt & Tregear, 1967; Catt, 1969).

4.3 Tel van die radioisotope met behulp van 'n sintilasieteller en bereken die konsentrasie van die hormoon, in die plasma.

In plaas daarvan dat die antigeen (H) gemerk word kan die antiliggaam (A^I) ook gemerk word soos onder stap 3. Dan sal die bepaling van die hormoonkonsentrasie in plasma, as volg verloop:

a. 1 ml plasma, H onbekend + A^I gemerkte antiliggaam oormaat $H + A^I = HA^I + A^I$

b. *Skeiding:* Skei die gebonde fraksie HA^I van A^I

c. *Tel:* Tel die radioaktiwiteit en bereken die konsentrasie van hormoon in die plasma.

B. *Kompeterende proteïenbindingsmetode vir die bepaling van estrogene en progesteron*

Die omkeerbare binding van klein molekules (steroïedhormone), aan 'n spesifieke proteïen dien as basis vir 'n sensitiewe, vinnige en redelik goedkoop metode vir die bepaling van die gonadehormone (Murphy, 1964; 1967; 1970; Ekins, 1970).

Benodighede:

a. 'n Suiwer hormoon gemerk met 'n isotoop S^* (Greenwood, Hunter & Glover, 1963).

b. 'n Spesifieke bindingsproteïen (P) wat 'n hoë bindingsaffiniteit vir die hormoon (S) het wat bepaal moet word.

Daar is in bloed 'n spesifieke globulien gevind wat 'n hoë bindingsaffiniteit vir progesteron het naamlik transkortien of C.B.G. (Seal, Mackey & Doe, 1964; Diamond, Rust & Westphal, 1969; Milgram, Atgar, Baulieu, 1970; Murphy, 1967; Westphal, 1970). Wat die estrogene betref is daar in die baarmoeder van diere 'n baie spesifieke estrogeenbindingsproteïen, sitosol, gevind (Korenman & Rao,

1968; Corker & Exley, 1970; Corker, Exley, Naftolin, 1970; Mayes & Nugent, 1970).

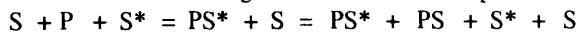
1. Monstervoorbereiding

Die monster plasma waarin die hormoon (S) bepaal moet word, moet eers gesuiwer word van die bindingsproteïen van die hormoon wat teenwoordig is in die plasma. Presipiteer die proteïen met bv. etanol of ekstraheer die steroïed (S) met stowwe soos eter, di-eteleter of metielchloried (Murphy, 1967; Corker & Exley, 1970). Suiwer die monster dan verder chromatografies.

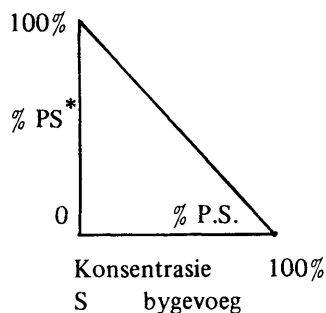
2. Bepaling van die hormoon

2.1 Ekwilibrasie:

Laat die monster waarin die hormoon (S), wat bepaal moet word, en die merkerhormoon (S*) met die bindingsproteïen (P) meng by kamertemperatuur en koel daarna af na 10°C. Die volgende reaksies sal dan plaasvind:



As die konsentrasie van S + S* meer word as die aantal bindingsplekke op P, sal hulle met mekaar kompeteer vir die bindingsplekke in verhouding met hulle konsentrasie. As die konsentrasie van P S* konstant gehou word en S (dit is die hormoon in die serum) bygevoeg word, sal dit meer en meer S* verplaas om PS te vorm en die PS* sal daal. As die konsentrasie PS* grafies voorgestel word teenoor die aantal S bygevoeg, word min of meer die volgende kurwe verkry:



2.2 Skeiding:

Na ekwilibrasie kry ons dan die volgende:

$SP + S^*P + S^* + S$. Die proteïengebonde fraksie word dan geskei van die ongebonde hormoon d.m.v. dialise, elektroforese, gelfiltrasie, presipitasie of adsorpsie (Florosil of houtskool) (Murphy, 1967).

2.3. Telling:

Tel die gebonde fraksie en lees die hormoon (s) konsentrasie van die standaardkurwe af (Mancuso, Dell'Aqua, Erickson, Migvest & Diczfalusy, 1965).

C. Radioimmunologiese bepaling van estrogene en progesteron

Vir die radioimmunologiese bepalings van die gonadehormone word van die volgende feite gebruik gemaak:

1. 'n Steroïed kan wel aan 'n proteïen gebind word.
2. Die proteïen-steroïedkompleks kan dan dien as anti-geen om antiliggampies teen die kompleks self te laat vorm.
3. Merk die steroïed met isotoop I^{131} .
4. Radioimmunologiese bepaling verder soos beskryf vir proteïenhormone (Midgley & Niswender, 1970).

Hormoonkonsentrasies in die plasma van ooi gedurende die estrusiklus soos bepaal met die radioimmunologiese en proteïenbindingsmetodes

1. Progesteron:

Sedert die publikasie van die algemene metode vir die bepaling van die steroïedes deur middel van kompeterende proteïenbinding (Murphy, 1964, 1967), is veral drie metodes ontwikkel vir die bepaling van progesteron in plasma naamlik dié van Neil, Johansson, Datta & Knobil (1967) wat later deur Reeves, De Souza & Thompson (1970) verbeter is: die metode van Yoshini & Lipsett (1968) wat redelik omslagtig is, asook die metode van Johansson (1969) en Martin, Cook & Black (1970) wat 'n vinnige, hoewel ietwat minder sensitiewe metode is.

In die geval van die skaap het veral die volgende navorsers werk gepubliseer op die progesteronbepalings in die perifere bloed van die ooi gedurende die estrusiklus: Erb, Estergreen, Jones, Plotka & Frost (1968); Plotka & Erb (1967); Thorburn, & Mattner (1969); Thorburn, Basset & Smith (1969); Thorburn, Basset & Smith (1968); Baird, Goding, Ichikawa & McCracken (1969); Moore, Barret, Brown, Scindler, Smith & Smyth (1969); Stabenfeldt, Holt & Ewing (1969); Basset, Ox-borrow, Smith & Thorburn (1969); Plotka, Erb & Harrington (1970) en Obst. Seamark & Brown (1971).

As al die publikasies saamgevat word vind ons dat die progesteronkonsentrasies in die bloed die volgende patroon volg gedurende die normale 17-daagse estrusiklus: Die progesteronkonsentrasie in die bloed val nooit tot zero nie maar bereik 'n laagtepunt vanaf \pm 20 uur voor tot 8 uur na die begin van estrus, waarna dit baie stadig styg tot \pm die 4de dag, waarna daar 'n vinnige vermeerdering is tussen dag 4 en 8 om 'n plek te bereik tussen dae 8 en 12. Net voor estrus, tussen dag 14 en 16, daal die konsentrasie baie vinnig.

In geheel is die progesteronkonsentrasies in die bloed van ooi heelwat laer as in ander diere in die mens

(Stabenfeldt *et al.*, 1969).

2. *Estrogene*

Wat die estrogeenkonsentrasie in die bloed van die ooi gedurende die siklus betref, is daar heelwat minder werk as in die geval van progesteron gepubliseer. Moontlik is die lae konsentrasie van die hormoon in die bloed daarvoor verantwoordelik (Moore *et al.*, 1969; Thorburn & Mattner, 1969; Baird *et al.*, 1968; Barret *et al.*, 1971; Obst. *et al.*, 1961).

Gedurende die normale 17-daagse estrussiklus word gewys dat oestradiol-17 alleenlik vir 'n kort tydperk, een tot twee dae, laat in die pro-estrusperiode, uitgeskei word. Ongeveer 40 uur voor die aanvang van estrus styg die estradiolvlak vinnig en daal dan weer vinnig in die vroeë estrus, \pm 0–8 uur, en bereik die zeromerk 24 uur na die begin van estrus. Die piek duur net ongeveer 24 uur.

Die estrogeenvlak daal dus dramaties tot 'n laagtepunt 'n geruime tyd voor ovulasie en die meeste navorsers wat estrogeen met die proteïenbindingsmetode bepaal het, vind dat die estrogeenwaarde laag bly dwarsdeur die luteale fase. Dit verskil van die werk van Short, McDonald & Rowson (1963) wat met die chemiese metodes op plasma gevind het dat die estrogeen wel in die luteale fase styg. Thorburn *et al.* (1969) en Cox *et al.* (1971) vind wel met die proteïenbindingsmetode dat ook in die ooi die estrogeen 3–4 dae na die end van estrus styg om weer tussen die 5de en 6de dag vinnig te daal; dit is min of meer die tyd wanneer die bevrugte ovum op pad is na die uterus. In die vrou volg die estrogeenkurwe dieselfde patroon en word daar ook 'n luteale piek waargeneem (Catt, 1970; Ross, Cargille, Lipsett, Rayford, Marshall, Stratt & Rodbord, 1959).

Daar die estrogeensekresie hoofsaaklik tot die vroeë gedeelte van die follikulêre fase beperk is, blyk dit dus dat die volwasse follikel nie veel estrogeen afskei nie. Vir bronstigheid is dit noodsaaklik dat die estrogeenafskieding voorafgegaan moet word deur 'n hoë progesteronvlak (Robinson & Brander, 1962). Obst *et al.* (1971) is van mening dat as die plasmaprogesteroon val, 'n vinnige toename in die estrogeenkonsentrasie van die plasma volg. Die LH-piek kom 16 uur na die estrogeenpiek voor. Daar is ook gevind dat \pm 10 uur na die inspuiting van estradiol in anestrusooie, styg die LH vinnig (Goding *et al.*, 1969) tot 'n maksimum binne 24 uur na die inspuiting (Radford, *et al.*, 1971).

3. *LH:*

Werk op dié gebied is nog in 'n redelike beginstadium in die geval van ooie (Pelletier, Kann, Doleus & Rosselin, 1968; Goding *et al.*, 1969; Wheatley & Radford, 1969; Roche, Foster, Karsch, Cook & Dzuik, 1970; Gesch-

wind & Dewey, 1968; Catt, 1969; Cumming, Brown, Blockley, Wingfield, Baxter & Goding, 1971).

Die plasmavlakke van LH gedurende die estrussiklus van die ooi, soos deur genoemde navorsers gevind, kom baie ooreen met die konsentrasies van LH in die bloed van die mens gedurende die menstruasiesiklus (Ross *et al.*, 1969). Die plasmakonsentrasie van LH begin stadig styg vanaf sy laagste vlak op dag 14 of 15 in die siklus. Daarna volg 'n dramatiese verbetering 4–5 uur na die begin van estrus, en bereik 'n piek, genoem die LH-piek, 12 uur na die begin van estrus en \pm 24 uur voor ovulasie, waarna dit vinnig daal tot pre-estruswaardes teen 20 uur voor ovulasie. Die piek kom oor 'n heelwat korter periode as by die mens voor en duur net van 8 tot 10 uur. Die LH-waarde van die plasma bly vir korter as 2 uur op sy hoogste punt. Met 24 uur monsterring kan die LH-piek dus maklik misgeloop word.

4. *FSH:*

Catt (1969) sê dat daar tot op dié datum nog nie 'n bevredigende radioimmunologiese metode vir die bepaling van FSH in die skaap gevind is nie omrede die ondoeltreffende suiwering van skaap-FSH. Cumming, Brown, Blockley & Goding (1971) noem dat die finale opstelling van 'n hormoonmodel vir die regulering van die estrussiklus van die ooi nog in afwagting is vir die bepaling van FSH in die plasma van hierdie dier.

In die mens word die FSH in serum wel radioimmunologies suksesvol bepaal met duidelike sikliese veranderinge (Catt, 1970; Ross *et al.*, 1969).

5. *Prolaktien:*

'n Radioimmunologiese bepaling van prolaktien in die ooi word deur Arai & Lee (1967) beskryf, maar die konsentrasies gedurende die estrussiklus is nie bestudeer nie.

Verwysings

- ARAI, Y. & LEE, T.H., 1967. *Endocrinology*, 81, 1041.
BAIRD, D.T., GODING, J.R., ICHIKAWA, Y. & McCracken, J.A., 1968. *J. Endocr.* 42, 283.
BARRET, S., BLOCKLEY, M.A., BROWN, J.M., CUMMING, I.A., GODING, J.R., MALE, B.J. & OBST., J.M., 1971. *J. Reprod. Fert.* 24, 136.
BASSET, J.M., OXBORROW, T.N., SMITH, I.D. & THORBURN, J.D., 1969. *J. Endocr.* 45, 449.
BERSON, S.A. & YALOW, R.S., 1957. *J. clin. Invest.* 36, 873.
BRODY, S. & CARLSTROM, G., 1960. *Lancet* 1, 99.
BROWN, J.B., 1955. *Biochem. J.* 60, 185.
BROWN, J.B., BULBROOK, R.D. & GREENWOOD, F.C., 1957. *J. Endocr.* 16, 41.
BURR, R.W., 1969. In: *Immunoassay of Gonadotrophins*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm.*

- BUTT, W.R., MORRIS, P., MORRIS, C.J.O.R. & WILLIAMS, D.C., 1951. *Biochem. J.* 49, 434.
- CATT, K.J., 1969. In: *Immunoassay of Gonadotrophins*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm.*
- CATT, K.J. & TREGGAR, G.W., 1967. *Science*, 158, 1570.
- CORKER, C.S. & EXLEY, D., 1970. *Steroids*, 15, 469.
- CORKER, C.S., EXLEY, D. & NAFTOLIN, F., 1970. In: *Steroid assay by Protein Binding*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm.*
- COX, R.I., MATTNER, P.E., SHUTT, D.A. & THORBURN, G.D., 1971. *J. Reprod. Fert.* 24, 133.
- COYLE, M.G., MITCHELL, F.L. & RUSSEL, C.S., 1956. *J. Obstet. Gynaec. Br. Emp.* 63, 560.
- CUMMING, I.A., BROWN, J.M., BLOCKLEY, M.A. & GODING, J.R., 1971. *J. Reprod. Fert.* 24, 148.
- CUMMING, I.A., BROWN, J.M., BLOCKLEY, M.A., WINGFIELD, C.G., BAXTER, R. & GODING, J.R., 1971. *J. Reprod. Fert.* 24, 134.
- DIAMOND, M., RUST, N. & WESTPHAL, U., 1969. *Endocrinology*, 84, 1143.
- DIERSCHKE, D.J. & CLEGG, M.T., 1968., *J. Reprod. Fert.* 15, 321.
- DONINI, P., PUZZUOLI, O., D'ALLESCIO, I., LUNENVELD, B., ESHKOL, A. & PARLOW, A.F., 1966. *Acta Endocr., Copenh.* 52, 186.
- EDGAR, D.G. & RONALDSON, J.W., 1958. *J. Endocr.* 16, 387.
- EKINS, R.P., 1970. In: *Steroid assay by Protein Binding*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm.*
- ERB, R.B., ESTERGREEN, V.L., JONES, W.R., PLOTKA, E.D. & FROST, O.L., 1968. *J. Dairy Sci.* 51, 401.
- ESHKOL, A., 1969. In: *Immunoassay of Gonadotrophins*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm.*
- GESCHWIND, I.I. & DEWEY, R., 1968. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 129, 451.
- GODING, J.R., CATT, K.J., BROWN, J.M., KALTENBACH, C.C., CUMMINGS, I.A. & MALE, B.J., 1969. *Endocrinology*, 85, 133.
- GREENWOOD, F.C., HUNTER, W.M. & GLOVER, J.S., 1963. *Biochem. J.* 89, 114.
- HASKINS, A.L., 1950. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. N.Y.*, 73, 439.
- HOOVER, C.W. & FORBES, T.R., 1947. *Endocrinology*, 41, 158.
- IGARASHI, M. & McCANN, S.M., 1964. *Endocrinology*, 74, 440.
- JOHANSSON, E.D.B., 1969. *Acta endocr., Copenh.* 61, 592.
- KLOPPER, A., MICHIE, E.A. & BROWN, J.B., 1955. *J. Endocr.* 12, 209.
- KORENMAN, S.G. & RAO, B.R., 1968. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 61, 1028.
- MANCUSO, S., DELL'AQUA, S., ERIKSON, G., MIGVEST, N. & DICZFALUSY, E., 1965. *Steroids*, 5, 183.
- MARTIN, B.T., COOKE, B.A. & BLACK, W.P., 1970. *J. Endocr.* 46, 369.
- MAYES, D. & NUGENT, C.A., 1970. *Steroids*, 15, 391.
- McKEAN, C., 1960. *Am. J. Obstet. Gynec.* 80, 596.
- MIDGLEY, A.R. & NISWENDER, G.D., 1970. In: *Steroid assay by Protein Binding*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm.*
- MILES, L.E.M. & HALES, C.N., 1970. Reprint from "In vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine". *Int. Atomic Energy Agency, Vienna, 1970.*
- MILGRAM, E., ATGER, M. & BAULIEU, E.E., 1970. *Nature, Lond.* 228, 1205.
- MOORE, N.W., BARRET, S., BROWN, G.B., SCINDLER, I., SMITH, M.A. & SMYTH, B., 1969. *J. Endocr.* 44, 55.
- MURPHY, B.E.P., 1964. *Nature, Lond.* 301, 679.
- MURPHY, B.E.P., 1967. *J. clin. Endocr.* 27, 973.
- MURPHY, B.E.P., 1970. In: *Steroid Assay by Protein Binding*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm.*
- MURPHY, B.E.P., ENGELBERG, W. & PATTEE, C.J., 1963. *J. clin. Endocr. Metab.* 23, 253.
- MURPHY, B.E.P. & PATTEE, C.J., 1964. *J. elin. Endocr. Metab.* 24, 140.
- NEILL, J.D., JOHANSSON, E.D.B., DATTA, J.K. & KNOBEL, E., 1967. *J. clin. Endocr.* 27, 1167.
- OBST, J.M., SEAMARK, R.F. & BROWN, J.M., 1971. *J. Reprod. Fert.* 24, 140.
- ODELL, W.D., ABRAHAM, G., RAUD, H.R., SWERDLOFF, R.S. & FISHER, D.A., 1969. In: *Immunoassay of Gonadotrophins*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm.*
- PARLOW, A.F., 1961. In: *Human Pituitary Gonadotrophins*, eds. A. Alberts & Charles C. Thomas. *Springfield, Illinois.*
- PELLETIER, J., KANN, J. DOLEUS, J. & ROSSELIN, M.G., 1968. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 266, 2352.
- PERRIN, L.E. & McCALLUM, T.P., 1969. *J. clin. Endocr.* 29, 879.
- PETRUSZ, P., 1969. In: *Immunoassay of Gonadotrophins*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm.*
- PLOTKA, E.D. & ERB, R.E., 1967. *J. Anim. Sci.* 26, 1363.
- PLOTKA, E.D., ERB, R.E. & HARRINGTON, R.B., 1970. *J. Anim. Sci.* 30, 412.
- PREEDY, J.R. & AITKEN, E.H., 1961. *J. biol. Chem.* 236, 1300.
- RADFORD, H.M., WALLACE, A.L. & WHEATLEY, I.S., 1971. *J. Reprod. Fert.* 24, 147.
- RASA, U., 1966. *Immunological Properties of Protein Hormones*, *Proceedings of Meeting Organised under Auspices of Accademia Nazionale dei Lincei and Consiglio Nazionale - delle Recerche - Rome, June, 1964.* London: Academic Press.
- REEVES, B.D., DE SOUZA, M.L.A. & THOMPSON, I.E., 1970. *Acta Endocr. Copenh.* 63, 225.
- REICHERT, L.E. & PARLOW, A.F., 1964. *Endocrinology*, 74, 236.

- ROBERTSON, H.A. & RAKHA, A.M., 1966. *J. Endocr.* 35, 177.
- ROBINSON, T.J. & BRANDER, W.M., 1962. *J. Reprod. Fert.* 3, 74.
- ROCHE, J.F., FOSTER, D.L., KARSCH, F.J., COOK, B. & DZUIK, P.J., 1970. *Endocrinology*, 86, 568.
- ROSS, G.T., GARGILLE, C.M., LIPSETT, M.B., ROYFORD, P.L., MARSHALL, J.K., STROTT, C.A. & RODBARD, D., 1969. *Recent Progress in Hormonal Research*. New York: Academic Press.
- SAXENA, B.B., LEYENDECKER, G., CHEU WEIYU, GARDY, H.M. & PETERSON, R.E. 1969. In: *Immunoassay of Gonadotrophins*, ed. E. Diczfalusy. *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm*.
- SEAL, U.S., MACKEY, D. & DOE, P., 1964. *The Endocrine Society No. 79, 46th Meeting*.
- SHORT, R.V., 1957. *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology* 11, 362.
- SHORT, R.V., 1958. *J. Endocr.* 16, 415.
- SHORT, R.V., McDONALD, M.F. & ROWSON, L.E.A., 1963. *J. Endocr.* 26, 155.
- STABELFELDT, G.H., HOLT, J.A. & EWING, L.L., 1969. *Endocrinology* 85, 11.
- STEELMAN, S.L. & POHLEY, F.M., 1953. *Endocrinology* 53, 604.
- THORBURN, G.C. & MATTNER, P.E. 1969. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 47, 32.
- THORBURN, G.D., BASSET, J.M. & SMITH, I.D., 1968. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 46, 34.
- THORBURN, G.D., BASSET, J.M. & SMITH, E.D., 1969. *J. Endocr.* 45, 459.
- VAN RENSBURG, S.J., 1970. D.V.Sc. thesis, University of Pretoria.
- WHEATLEY, I.S. & RADFORD, H.M., 1969. *J. Reprod. Fert.* 19, 211.
- WESTPHAL, U., 1970. In: *Steroid assay by Protein Binding*, ed. E. Diczfalusy, *Reprod. Endocr. Res. Unit, Karolinska Sjukhuset, Stockholm*.
- WIDE, L. & GEMZELL, C.A. 1960. *Acta Endocr., Copenh.* 35, 261.
- WIDE, L. & PORATH, J., 1967. *Immunochemistry*, 4, 381.
- YALOW, R.S. & BERSON, S.A., 1960. *J. clin. Invest.* 39, 1157.
- YOSHINI, T. & LIPSETT, M.B., 1968. *Steroids*, 7, 527.
- ZANDER, J. & SIMMER, H., 1954. *Klm. Wschr.* 42, 529.