

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 120 (1978)

Artikel: Radioimmunologische Testosteronbestimmung : Methodik und diagnostische Anwendung

Autor: Thun, R. / Jutz, G. / Fricker, C.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-591478>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 30.01.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Schweiz. Arch. Tierheilk. 120, 205–212 (1978)

Aus dem Institut für Zuchthygiene (Direktor: Prof. Dr. K. Zerobin) und
der Veterinär-Chirurgischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. A. Müller)
der Universität Zürich

Radioimmunologische Testosteronbestimmung: Methodik und diagnostische Anwendung

von R. Thun*, G. Jutz und Ch. Fricker

Problemstellung

In die Veterinär-Chirurgische Klinik wurde ein Ponyhengst ohne sicht- oder tastbare Hoden, aber mit stark ausgeprägter Libido, zur Kastration eingeliefert.

In solchen Fällen handelt es sich oft um sogenannte Kryptorchide, deren Keimdrüsen im Leistenkanal festgehalten werden, jedoch unter Narkose häufig in das Skrotum absteigen. Können die Hoden aus verschiedenen Ursachen nicht ins Skrotum gelangen oder dorthin verbracht werden und kann eine früher erfolgreich durchgeführte Kastration mit Sicherheit ausgeschlossen werden – das Fehlen einer Kastrationsnarbe stellt dabei kein sicheres Indiz dar –, muss zur genauen Lokalisation und Entfernung der Keimdrüsen eine Laparotomie vorgenommen werden. Da bei unserem Patienten weder inguinal noch abdominal Keimdrüsen gefunden wurden, stellten sich zur endokrinologischen Abklärung zwei wichtige Fragen, nämlich:

1. Lässt sich bei diesem Hengst eine basale Testosteronsekretion und somit die Präsenz hormonproduzierenden Hodengewebes (Leydig Zellen) nachweisen?

2. Gelingt es, die Testosteronproduktion durch HCG zu beeinflussen?

Zur Abklärung der ersten Frage erstellten wir anhand von stündlich entnommenen Blutproben während eines Tages eine Testosteron-Verlaufskurve. Dieses Tagesprofil diente zugleich als Kontrolle zur Bearbeitung der zweiten Frage, um die Ansprechbarkeit der Keimdrüsen auf eine HCG-Belastung zu prüfen. Da es sich hier um einen Einzelfall handelt, sollten in dieser Mitteilung insbesondere die hormonanalytische Methodik unter Verwendung eines eigenen Antikörpers beschrieben und die Möglichkeiten für eine Anwendung bei praktischen Fragestellungen aufgezeigt werden.

Material und Methoden

a) Tiermaterial

Als Proband stand uns der eingangs erwähnte 2½-jährige Island-Ponyhengst zur Verfügung, der zum Zeitpunkt der Einlieferung ins Tierspital keine klinischen Krankheitssymptome zeigte. Für die Aufzeichnung des Tagesprofils und der beiden eine Woche auseinanderliegenden HCG¹-Stimulationsteste wurden aus der V. jugularis je Probe 4 ml Blut entnommen, das sofort zentrifugiert und bis zur Hormonbestimmung bei –20 °C aufbewahrt wurde.

* Adresse: Dr. R.Thun, Institut für Zuchthygiene, Winterthurerstr. 260, CH-8057 Zürich.

¹ LH 5000® (Human Chorionic Gonadotropin), W. Stricker AG, Zollikofen.

b) *Besondere Glaswaren, Lösungsmittel und Reagentien für die radioimmunologische Hormonbestimmung*

Für die Testosteronextraktion benutzten wir Corning E Spezialzentrifugenröhrchen², 16 x 95 mm, und für die weitere Probenverarbeitung 12 x 75 mm Corning Reagenzröhrchen². Die Extraktion selber führten wir mit Diäthyläther³ p. a. aus frisch geöffneten Flaschen durch. Zur Herstellung von Phosphatpuffer pH 7.2 wurden 10.75 g Na₂HPO₄, 5.42 g NaH₂PO₄, 8.18 g NaCl und 0.975 g NaN₃ in 1 Liter Aqua bidest. gelöst (0.27 Mol.) Für den Ansatz der Antiserum- und radioaktiven Testosteronverdünnung gaben wir diesem Puffer pro Liter 1 g Gelatine⁴ zu. Der Gelatinepuffer, auch Assay-Puffer genannt, sollte bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Trennung von freiem und gebundenem Hormon geschah mit Hilfe von Aktivkohle³ und Dextran T 70⁵. Die Scintillationsflüssigkeit setzte sich aus 5 g PPO⁶ (2,5-Diphenyloxazol) und 0.3 g POPOP⁷ (1,4-di-2,4-Methyl-5-Phenyloxazol-Benzol), gelöst in 1 Liter Toluol, zusammen. Als Zählküvetten bewährten sich Niederdruck-Polyäthylen-Zählfläschchen².

c) *Steroide*

Sowohl nicht radioaktiv markiertes Testosteron⁸ (17 β-Hydroxy-4-Androsten-3-on), Androstendion⁸ (4-Androsten-3, 17-dion) und Dihydrotestosteron⁸ (17 β-Hydroxy-5 α Androstan-3-on) als auch mit Tritium markiertes Testosteron⁹ (Tracer) mit einer spez. Aktivität von 93 Ci/mMol wurden zur Erstellung der Standardkurve mit abs. Äthanol verdünnt.

d) *Herstellung von Antigen*

Als Antigen zur Erzeugung spezifischer Antikörper gegen Testosteron wurde von uns Testosteron-3 (O-carboxymethyl)-oxim-HSA verwendet. Die Koppelung des Steroids an humanes Serumalbumin (HSA) erfolgte, wie in der Arbeit von Erlanger et al. [6] angegeben, am Kohlenstoffatom C-3, wobei die 17 β-Hydroxylgruppe und die 4,5-Androstenbindung im Haptenmolekül erhalten blieben (Abb.1). Durch Reaktion von 0.98 g Testosteron mit 1.07 g α-Aminoxyessigsäure Hemihydro-

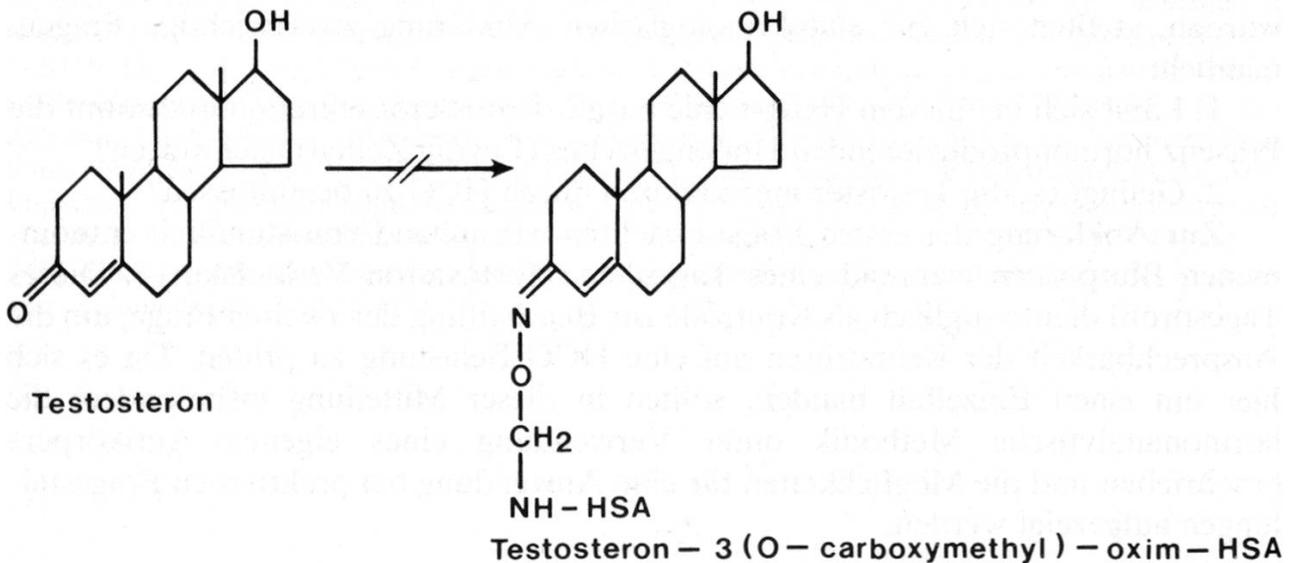


Abb. 1 Synthese von Testosteron-Immunogen. Die Koppelung des Steroids an humanes Serumalbumin erfolgt am Kohlenstoffatom C-3.

² O. Kleiner AG, Wohlen.

³ E. Merck, Darmstadt.

⁴ Difco Laboratories, Detroit.

⁵ Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.

⁶ Packard Instrument International, Zürich.

⁷ Koch-Light Laboratories, England.

⁸ Fluka AG, Buchs.

⁹ Radiochemical Centre, Amersham.

chlorid¹⁰ (A grade) in 150 ml Methanol und 15 ml 5%iger Natronlauge entstand Testosteron-3(O-carboxymethyl)-oxim.

Zur Steroid-Protein-Koppelung wurden 2.23 g des Oxim-Derivates und 2.86 ml Tri-n-Butylamin⁸ (12 mMol) in 90 ml Dioxan¹¹ aufgenommen und mit 0.63 ml Chlorameisensäureisobutylester⁸ (6 mMol) versehen. Dieses Gemisch kam anschliessend in eine Lösung von 7 g HSA in 180 ml H₂O, 120 ml Dioxan und 7 ml 1N NaOH. Nach Dialyse wurde das Steroid-Protein-Konjugat lyophilisiert.

e) Gewinnung der Antikörper

Für die Immunisierung zur Erzeugung von Antikörpern standen uns 2 weibliche Zwergziegen zur Verfügung. Die Immunisierung wurde wie folgt ausgeführt: 2 mg Antigen wurden in 2.5 ml 0.95%iger NaCl gelöst und mit 2.5 ml komplettem Freundschens Adjuvans⁴ emulgiert. Diese Emulsion verabreichten wir, verteilt auf 5 Injektionsstellen, einmal wöchentlich während 5 Wochen subcutan. Die erste Blutentnahme aus der V. jugularis erfolgte 6 Wochen nach Immunisierungsbeginn. Booster-Injektionen zur Erhöhung des Antikörpertiters wurden monatlich in gleicher Weise wie oben angegeben durchgeführt. Nachimpfung und Blutentnahme erfolgten in 10tägigen Abständen. Von den beiden geimpften Ziegen zeigte ein Tier (Ziege Nr. 72) eine bessere immunogene Antwort und wurde deshalb zur Antiserumgewinnung herangezogen. Den höchsten Antikörpertiter stellten wir im Serum nach der 11. Blutentnahme fest. Diesen Antikörper 72/11 verwendeten wir fortan für die Hormonanalyse.

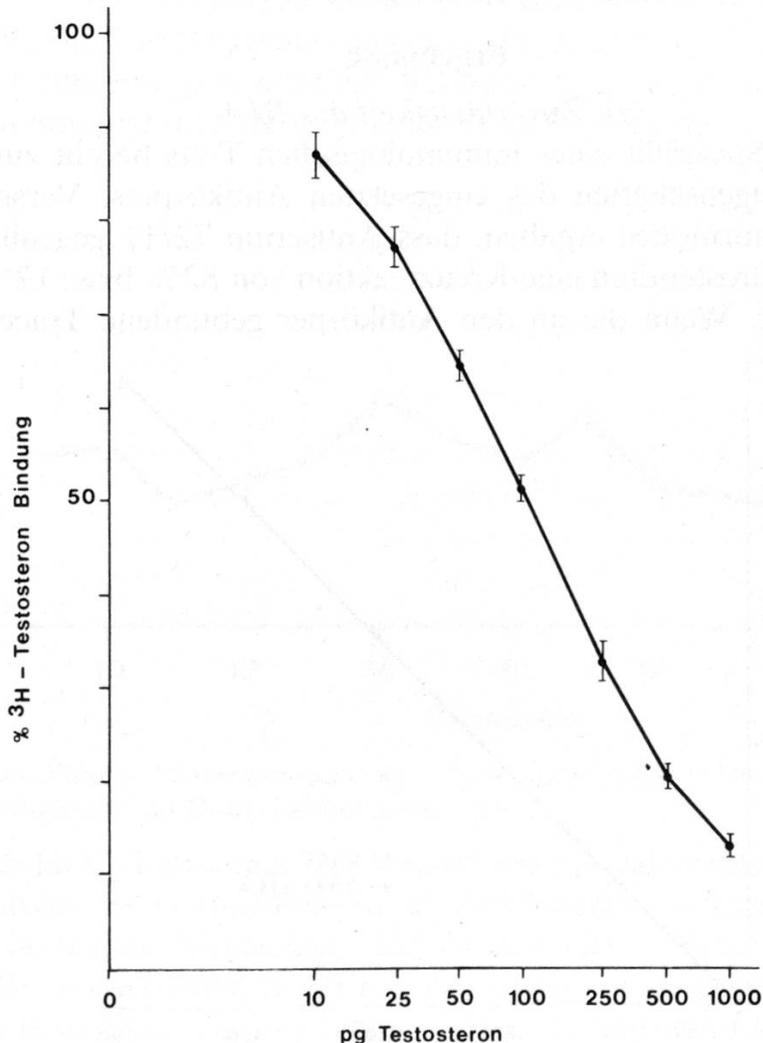


Abb. 2 Testosteron-Standardkurve mit Antiserum 72/11 in einer Verdünnung von 1:4500: $\bar{x} \pm s$ (n = 10).

¹⁰ Calbiochem, San Diego.

¹¹ Fisher Scientific Company, Fair Lawn, N.J.

f) Radioimmunoassay (RIA)

Das radioimmunologische Messverfahren stützt sich in etwas abgeänderter Form auf die von *Smith* und *Hafs* [10] beschriebene Methode. Die im Doppelansatz mit 3 ml Diäthyläther versehenen Plasmaproben von 0.1 ml Inhalt wurden während 30 Minuten auf einer Schüttelmaschine¹² geschüttelt und anschliessend zentrifugiert. Nach Einfrieren der wässrigen Phase im Gefrierschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnte die überstehende organische Phase in Assay-Röhrchen dekantiert und im Wasserbad bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingengt werden. Anschliessend wurden die Testosteronextrakte in 0.5 ml Gelatinepuffer aufgenommen und während 30 Minuten im Wasserbad ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) stengelassen. Nach Zugabe von je 0.1 ml Antiserum und Tracer inkubierten wir die Proben bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht. Die Antikörperverdünnung war so angesetzt, dass von 9000 cpm (ca. 31 pg) 45–50% des Tracers gebunden wurden. Die Trennung des freien von dem an den Antikörper gebundenen Testosteron geschah durch Zugabe von 0.2 ml einer auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten 0.25% igen Kohlesuspension. Nach Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge (ca. 3000 rpm) wurde der Überstand zur Bestimmung der Radioaktivität in Zählküvetten mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit abgekippt. Die quantitative Auswertung der Proteinbindungsreaktion erfolgte anhand von Standardkurven, bei denen die prozentuale Bindung gegen den Logarithmus zugegebener Hormonmengen aufgetragen wird (Abb. 2). Die Standardpunkte erstreckten sich über einen Bereich von 0 bis 1.0 ng Testosteron. Zur Überprüfung des Assay-Systems dienten folgende Zuverlässigkeitskriterien: Spezifität, Empfindlichkeit, Genauigkeit und Präzision [1].

Ergebnisse

a) Zuverlässigkeit des RIA

Spezifität: Die Spezifität eines immunologischen Tests beruht zur Hauptsache auf den Bindungseigenschaften des eingesetzten Antikörpers. Versuche mit verschiedenen Steroidhormonen ergaben, dass Antiserum 72/11 gegenüber Dihydrotestosteron und Androstendion eine Kreuzreaktion von 82% bzw. 12% zeigte.

Empfindlichkeit: Wenn die an den Antikörper gebundene Tracermenge ohne

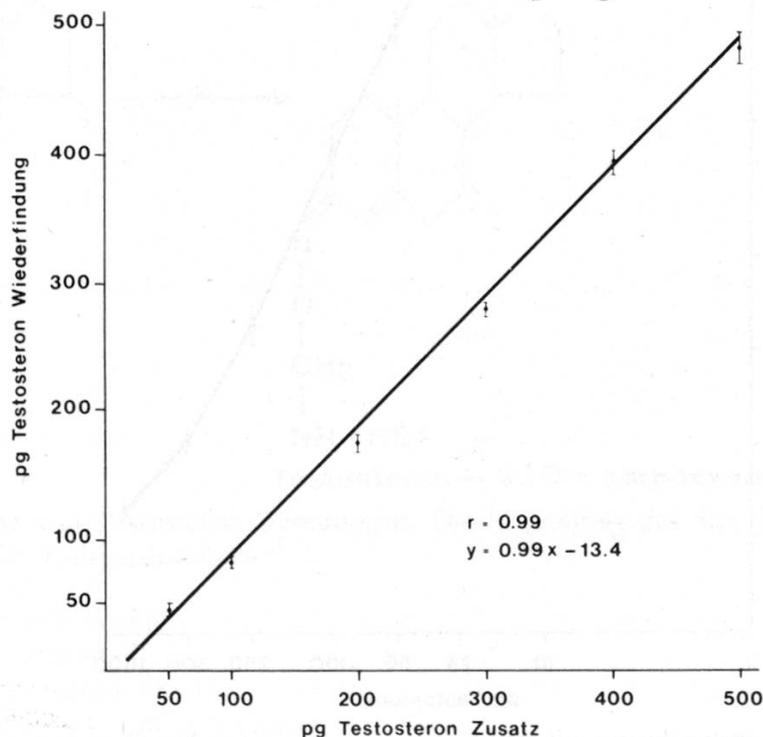


Abb. 3 Wiederfindungsraten von bekannten aus Kälberplasma extrahierten Testosteronmengen. Wiederfindung und Zusatz von Hormon sind miteinander positiv korreliert; $\bar{x} \pm s$ ($n = 4$).

¹² Gerhardt LS 20, Auer Bittmann Soulié AG, Zürich.

Anwesenheit von Testosteron als 100% angenommen wurde, lag die untere Grenze der Empfindlichkeit, definiert als die kleinste Menge, die sich von Null unterscheiden lässt, bei 10 pg/Röhrchen ($p < 0.05$).

Genauigkeit: Die Genauigkeit des Messverfahrens wurde durch die Wiederfindung von bekannten Mengen Testosteron ermittelt (cold recovery), die zu 1 ml Kälberplasma (Leerwert, blank) zugegeben worden waren. Nach Korrektur des Leerwertes waren die wiedergefundenen und die zugegebenen Hormonmengen miteinander positiv korreliert (Abb. 3). In 5 verschiedenen Assays konnten von 50 pg und 250 pg Hormonzusatz durchschnittlich $88.5 \pm 3.1\%$ wiedergefunden werden.

Präzision: Die Präzision der radioimmunologischen Methodik wird anhand von Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten einer bekannten Pool-Probe errechnet; diese betragen in unserem Fall 6.6% bei 10 Doppelbestimmungen im gleichen Assay bzw. 19.4% bei Doppelbestimmungen in 5 verschiedenen Assays.

b) Testosteron-Verlaufskurven

Tagesprofil: Die Testosteronkonzentration im peripheren Plasma zeigte im Verlauf des Tages eine nur geringgradige Schwankungstendenz (Abb. 4). Die Werte lagen zwischen minimal 0.35 ng/ml und maximal 0.85 ng/ml.

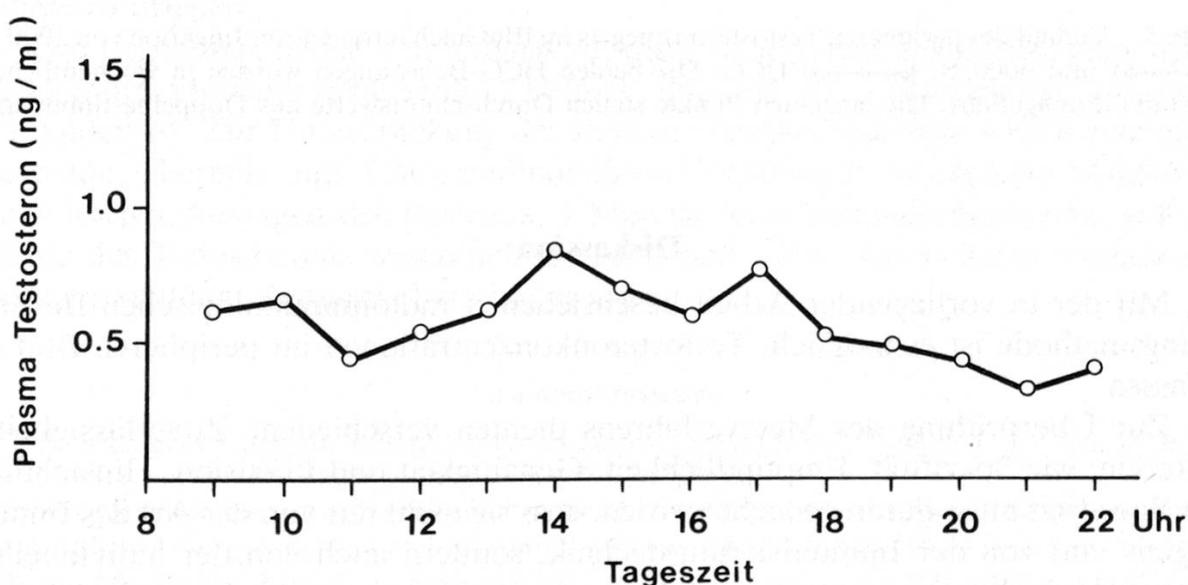


Abb. 4 Periphere Plasma-Testosteronwerte zu verschiedenen Tageszeiten. Die einzelnen Punkte stellen Durchschnittswerte aus Doppelbestimmungen dar.

Effekt nach HCG-Belastung: Der Verlauf des Testosteronspiegels vor und nach einer intravenösen HCG-Injektion ist in Abbildung 5 dargestellt. Daraus geht hervor, dass in beiden Versuchen, die zeitlich eine Woche auseinanderliegen, sowohl 3000 IE als auch 6000 IE HCG eine rasche Zunahme des peripheren Testosterongehaltes bewirkten. Zudem ist ersichtlich, dass die Androgenkonzentration 25–30 Minuten nach der HCG-Verabreichung signifikant ansteigt: die Testosteronwerte liegen bis 20 Minuten nach der HCG-Belastung um durchschnittlich 0.45 ng/ml, erhöhen sich nach weiteren 20 Minuten auf maximal 2.70 ng/ml Blutplasma und fallen erst nach mehr als 2 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau ab.

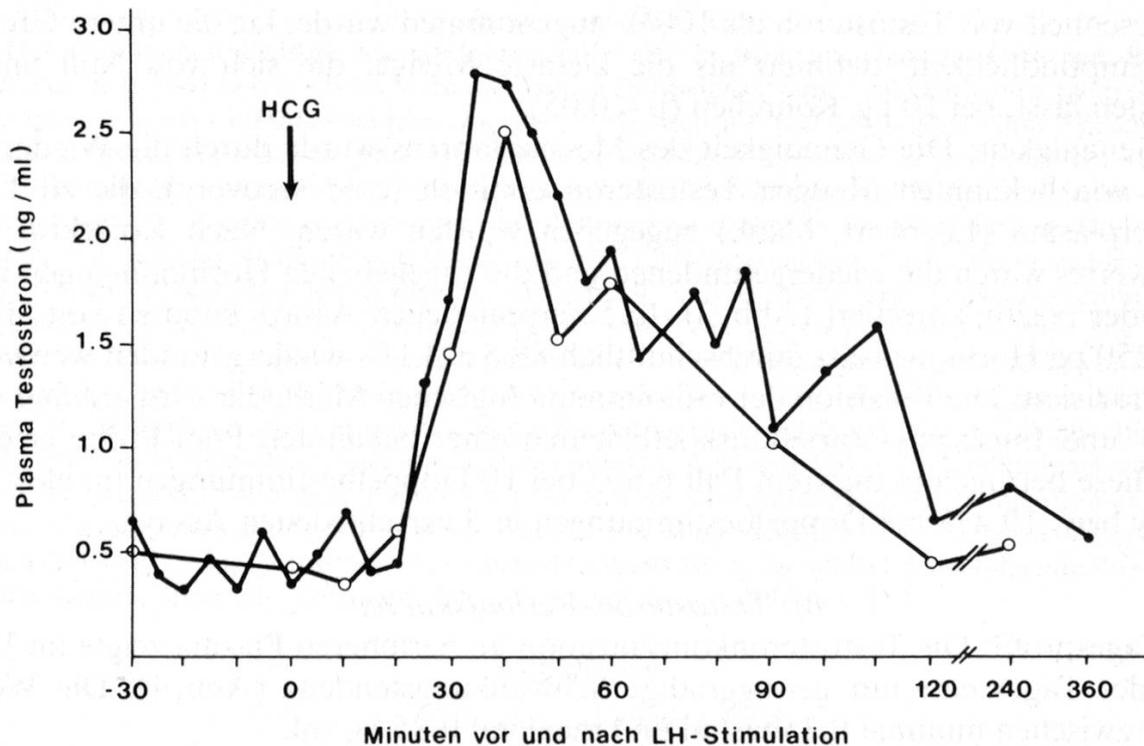


Abb. 5 Verlauf des peripheren Testosteronspiegels im Blut nach intravenöser Injektion von 3000 IE (○—○) und 6000 IE (●—●) HCG. Die beiden HCG-Belastungen wurden in wöchentlichem Abstand durchgeführt. Die einzelnen Punkte stellen Durchschnittswerte aus Doppelbestimmungen dar.

Diskussion

Mit der in vorliegender Arbeit beschriebenen radioimmunologischen Bestimmungsmethode ist es möglich, Testosteronkonzentrationen im peripheren Blut zu erfassen.

Zur Überprüfung des Messverfahrens dienten verschiedene Zuverlässigkeitskriterien, wie Spezifität, Empfindlichkeit, Genauigkeit und Präzision. Hinsichtlich der Spezifität muss daran gedacht werden, dass sie nicht nur von der Art des Immunogens und von der Immunisierungstechnik, sondern auch von der individuellen immunologischen Reaktionslage des Versuchstieres bestimmt wird. Damit lässt sich erklären, dass die Kreuzreaktionen unseres Antikörpers mit Dihydrotestosteron und Androstendion mit Angaben aus der Literatur nur zum Teil übereinstimmen [3, 5, 7, 8]. Die Empfindlichkeit der Standardkurve, die unter anderem von der Affinität des Antiserums, von der Tracer- und Antikörpermenge sowie vom Inkubationsvolumen abhängt, beträgt in unserem System 10 pg bei einem Vertrauensbereich von 95%. Unter Berücksichtigung des Reagentienleerwertes (blank) von durchschnittlich 23.0 ± 1.8 pg, gelten 25 pg als untere Grenze der Assay-Empfindlichkeit. Die Überprüfung der Genauigkeit und Präzision führte in jeder Hinsicht zu einem positiven Ergebnis. Insbesondere machte die konstant hohe Tracer-Extraktionsausbeute von $>93\%$ eine Korrektur für Extraktionsverluste überflüssig. Die Handhabung der derzeitigen Methode bietet nun die Möglichkeit, die Steroid-

Hormon-Bestimmung im grösseren Rahmen durchzuführen, so dass ca. 300 Proben pro Woche von 1 Person bearbeitet werden können.

Über tageszeitabhängige Änderungen der peripheren Testosteronkonzentration beim Hengst liegen verschiedene Arbeiten vor [3, 4, 5, 9], hingegen fehlen entsprechende Untersuchungen beim kryptorchiden Tier. Gestützt auf die Befunde von *Ganjam* und *Kenney* [7], die bei Hengsten und Kryptorchiden keinen unterschiedlichen peripheren Testosterongehalt beobachten konnten, haben wir die basalen Hormonwerte unseres Probanden mit denjenigen geschlechts gesunder Hengste verglichen und dabei eine gute Übereinstimmung festgestellt [4]. Ob bei Kryptorchiden, ähnlich wie bei Hengsten [2, 5, 9], diurnale und saisonale Testosteronfluktuationen vorkommen, bleibt noch abzuklären. Der Anstieg des Testosteronspiegels im Blut von durchschnittlich 0.45 ng/ml auf maximal 2.70 ng/ml etwa 40 Minuten nach der HCG-Injektion deckt sich mit den Angaben von *Cox et al.* [3] sowie *Cox* und *Williams* [4]. Im Gegensatz zu diesen Autoren, die für den HCG-Stimulationstest eine Dosis von 12 000 IE HCG wählten, zeigen unsere Resultate, dass die Verabreichung von 3000 IE bzw. 6000 IE HCG ebenfalls zu einer aussagekräftigen Testosteronzunahme führt. Es wäre jedoch voreilig, anhand eines Einzelfalles über Fragen der optimalen Dosierung und des bestmöglichen Zeitpunktes der Blutentnahme zu urteilen.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bei unserem Patienten hormonproduzierendes Hodengewebe (evtl. Ektopie), das auf HCG-Stimulation anspricht, vorhanden ist. Zur Unterdrückung des starken Geschlechtstriebes wurde eine langdauernde Therapie mit Chlormadinonacetat¹³ (10 mg p. os täglich) eingeleitet. Nach letzten Aussagen des Besitzers, 3 Monate nach Behandlungsbeginn, soll die Libido des Tieres bereits wesentlich reduziert sein. Über den weiteren Verlauf soll zu einem späteren Zeitpunkt berichtet werden.

Zusammenfassung

Es wird über einen zur Kastration eingelieferten Hengst (Pony) berichtet, bei dem weder im Leistenkanal noch in der Bauchhöhle Hoden gefunden wurden.

Mit der empfindlichen radioimmunologischen Methode, die eingehend beschrieben wird, konnte der periphere Testosterongehalt im Blut sowohl unbelastet als auch unter HCG-Belastung bestimmt werden. Anhand der Ergebnisse kann gefolgert werden, dass der Patient hormonproduzierendes Hodengewebe (Leydig-Zellen) besitzt. Zur Unterdrückung der starken Libido wurde eine Therapie mit Chlormadinonacetat (Synchrosin®) eingeleitet.

Résumé

L'auteur rapporte sur le cas d'un étalon (pony) hospitalisé pour castration chez lequel on n'a pas trouvé de testicules ni dans le canal inguinal, ni dans la cavité abdominale.

Par une méthode sensible, la radioimmunologie décrite en détail, on a déterminé la teneur en testostérone dans le sang circulant aussi bien avant qu'après la stimulation par une gonadotrophine. On peut déduire des résultats obtenus que ce mâle possédait du tissu testiculaire (cellules de Leydig) produisant de l'hormone. Pour inhiber une libido excessive on a appliqué une thérapeutique à base de Synchrosine® (acétate de chlormadinon).

¹³ Synchrosin®, Veterinaria AG, Zürich.

Riassunto

Si riferisce della castrazione di uno stallone (pony) ricoverato nella clinica, nel quale non sono stati trovati testicoli nè nel canale inguinale nè nella cavità addominale.

Con il sensibile metodo radioimmunologico, che viene descritto in dettaglio, si determinava il contenuto in testosterone del sangue periferico sia prima che dopo stimolazione con gonadotropina. Sulla base dei risultati si poteva concludere che l'animale possedeva un tessuto testicolare (cellule di Leydig) produttore di ormoni. Per ridurre l'eccessiva libido è stata messa in atto una terapia a base di Clormadinone acetato (Synchrosin®).

Summary

This is a report about a Pony stallion admitted for castration whose testicles could be found neither in the inguinal canal nor in the abdomen.

By the sensitive radioimmunological method described in detail, testosterone could be measured in the peripheral blood before and after HCG stimulation. Our results indicate that the patient has testicular tissue (Leydig cells) producing hormone. To suppress the marked libido a therapy with chlormadinonacetate (Synchrosin®) was initiated.

Literatur

- [1] *Abraham G. E.*: Radioimmunoassay of steroids in biological materials. In: Radioimmunoassay and related procedures in medicine, Vol. II. International Atomic Energy Agency, Vienna, 3–29 (1974). – [2] *Berndtson W. E., Pickett B. W. and Nett T. M.*: Reproductive physiology of the stallion. *J. Reprod. Fert.* 39, 115–118 (1974). – [3] *Cox J. E., Williams J. H., Rowe P. H. and Smith J. A.*: Testosterone in normal, cryptorchid and castrated male horses. *Equine Vet. J.* 5, 85–90 (1973). – [4] *Cox J. E. and Williams J. H.*: Some aspects of the reproductive endocrinology of the stallion and cryptorchid. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23, 75–79 (1975). – [5] *Enbergs H., Küpper G. und Sommer .*: Testosteronkonzentrationen im Serum von Warmblut-Zuchthengsten unter normalen und Belastungsbedingungen. *Zuchthyg.* 12, 49–57 (1977). – [6] *Erlanger B. F., Beiser S. M., Borek F., Edel F. and Lieberman S.*: The preparations of steroid-protein conjugates to elicit antihormonal antibodies. In: *Methods in immunology and immunochemistry*, Vol 1. Eds C. A. Williams and M. W. Chase, Academic Press, New York, 144–151 (1967). – [7] *Ganjam V. K. and Kenney R. M.*: Androgens and oestrogens in normal and cryptorchid stallions. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23, 67–73 (1975). – [8] *Rao P. L. and Moore P. H.*: Synthesis of new steroid haptens for radioimmunoassay. Part I. 15-Carboxyethylmercaptotestosterone-bovine serum albumin conjugate. Measurement of testosterone in male plasma without chromatography. *Steroids* 28, 110–113 (1976). – [9] *Sharma O. P.*: Diurnal variations of plasma testosterone in stallions. *Biol. Reprod.* 15, 158–162 (1976). – [10] *Smith O. W. and Hafs H. D.*: Competitive protein binding and radioimmunoassay for testosterone in bulls and rabbits; blood serum testosterone after injection of LH or prolactin in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142, 804–810 (1973).

Danksagung: Frl. U. Buck und Herrn T. Weibel danken wir für die geschätzte Mithilfe bei den Laborarbeiten.