



Testosterons betydelse för hanhundens fertilitet

– kan analys av dess serumkoncentration bidra till fertilitetsdiagnostik?

*The importance of testosterone in the fertility of the male dog
– can evaluation of its concentration in serum assist in fertility diagnostics?*

Stina Wallander

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2021



Testosterons betydelse för hanhundens fertilitet – kan analys av dess serumkoncentration bidra till fertilitetsdiagnostik?

*The importance of testosterone in the fertility of the male dog
– can evaluation of its concentration in serum assist in fertility diagnostics?*

Stina Wallander

Handledare: Bodil Ström Holst, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Bitr. handledare: Ida Hallberg, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Eva Axné, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: A2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0869

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2021

Omslagsbild: Stina Wallander

Nyckelord: Testosteron, SHBG, FAI, CPSE, spermier, fertilitet

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

X JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Vid avel av hundar är det viktigt med en god fruktsamhet för att få en bred avelsbas. För utvärdering av fertilitet hos handhudar används ofta analys av ejakulat. I denna studie analyseras även serumkoncentration av testosteron för att se om det är en koppling mellan den och spermakvaliteten eller en hanhunds fertilitet. Testosteron är hanars främsta könshormon och har setts påverka exempelvis spermiebildning, libido och förmåga att ejakulera. Mycket diskussion har förts kring om testosteron i serum kan användas i fertilitetsdiagnostiken, vilket här undersöks. Som komplement till testosteron analyseras även bärarproteinet sex hormone binding globuline (SHBG) som binder till testosteron och gör den bundna fraktionen inaktiv. Genom detta räknas ett free androgen index (FAI) ut, vilket ger en uppskattning av den fria fraktionen och därmed biologiskt aktiva koncentrationen testosteron. Även koncentrationen canine prostate specific esterase (CPSE) som utsöndras av prostata har mätts i serum. Detta då prostata är ett av testosterons främsta mål och en ökad halt av motsvarande prostatamarkör hos människa visat sig korrelera med en ökad mängd fritt testosteron.

Studiepopulationen bestod av 65 intakta hanhundar i varierande ålder av rasen berner sennen. Detta är en ras som upplever fruktsamhetsproblem i sin avel. Blodprov, spermaprov och en andrologisk undersökning gjordes vid ett och samma tillfälle.

Vid analys av resultaten sågs ett signifikant samband mellan sjunkande FAI och stigande ålder, mellan CPSE och förekomst av erytrocyter i ejakulerat samt mellan ökad halt CPSE och stigande ålder. 63 av hundarna hade CPSE-koncentrationer som tyder på att de har en prostataförstoring. Inga hormoner var i denna studie signifikant relaterade till spermiedefekter. Slutsats som dras är att FAI är ett potentiellt värdefullt mått att använda sig av vid analyser av testosteron i serum, samt att denna studiepopulation troligtvis är överrepresenterad avseende prostatapatologier. För vidare analyser bör prostatastudier av berner sennen kompletteras med en ultraljudundersökning av prostata.

Nyckelord: Testosteron, SHBG, FAI, CPSE, prostata, fertilitet, hund

Abstract

To maintain a healthy selection for breeding, it's important that dogs have a good fertility. To evaluate the male dog's fertility a sperm sample is usually collected and analyzed. In this study a blood sample for analysis of concentration of testosterone in serum has also been collected. These samples have been analyzed to evaluate if any correlation between hormones in serum and semen quality can be found, or if the hormone seems to affect the male dog's fertility in other ways.

Testosterone is the most important sex hormone of the male and has been known to affect the production of sperm, the ability to ejaculate and libido. In the blood stream testosterone is to some extent bound to carrier-proteins, the most important being sex hormone binding globulin (SHBG). Measurements of SHBG helps evaluate the free fraction of testosterone. Testosterone has a big impact on the function of the prostate, and to evaluate the prostate canine prostate specific esterase (CPSE) has also been measured in serum. The prostate also affects the sperm since it constitutes the main volume of the ejaculate.

The population of the study consisted of 65 Bernese mountain dogs of various ages. Bernese mountain dogs have decreasing number of pregnant bitches after mating and the breed club is therefore motivated to evaluate the breed's fertility. Blood and semen samples were collected from each dog, the owner answered questions about each individual's health, and an andrological evaluation was made.

A significant correlation was found between the free fraction of testosterone and age, and between CPSE and both semen containing erythrocytes and increasing age. No significant results could be found when comparing analytes in the blood with sperm defects. Sixty-three of the dogs had CPSE concentrations indicating an enlarged prostate. The non-bound testosterone fraction seems to be a promising measurement and should be considered for use in further studies. If further analyses are to be done in the breed considering their prostate-health, an ultrasound could be of interest.

Keywords: Testosterone, SHBG, FAI, CPSE, prostate, fertility, canine

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	9
Figurförteckning	10
Förkortningar	11
1. Inledning	13
1.1. Problembeskrivning	14
1.2. Syfte och frågeställning	14
1.3. Översikt av studien	14
2. Litteraturstudie	15
2.1. Spermatogenes	15
2.1.1. Hormonell reglering av spermatogenesisen	17
2.1.2. Berner sennen	20
3. Material och metod	21
3.1. Litteratursökning	21
3.2. Rekrytering av deltagare	21
3.2.1. Studiepopulation	21
3.3. Provinsamling	21
3.3.1. Anamnestiska uppgifter	21
3.3.2. Spermaprover	22
3.3.3. Blodprover	22
3.4. Analys av prover	22
3.4.1. Testosteron	22
3.4.2. SHBG	23
3.4.3. CPSE	23
3.5. Bearbetning av data	23
4. Resultat	24
4.1. Deltagande hundar	24
4.2. Spermakvalitet	25
4.3. Testosteron och SHBG-koncentrationer	26

4.4. CPSE	29
5. Diskussion.....	32
6. Slutsats.....	35
Referenser.....	36
Tack	41
Populärvetenskaplig sammanfattning	42
Bilaga 1.....	44

Tabellförteckning

TABELL 1 - NORMALVÄRDEN EJAKULAT HUND. FELDMAN & NELSON 2003.....	16
TABELL 2 - DESKRIPTIV STATISTIK SPERMAKVALITET.....	25
TABELL 3 - DESKRIPTIV STATISTIK TESTOSTERON	26
TABELL 4 - DESKRIPTIV STATISTIK SHBG I ÅLDERSKATEGORIER.....	28
TABELL 5 - DESKRIPTIV STATISTIK FAI	29
TABELL 6 - DESKRIPTIV STATISTIK CPSE I ÅLDERSKATEGORIER.....	30

Figurförteckning

FIGUR 1 – SPERMATOGENES. STINA WALLANDER.....	15
FIGUR 2 - HORMONELL REGLERING HANHUND. STINA WALLANDER.....	17
FIGUR 3 - HISTOGRAM ÅLDERSFÖRDELNING FÖR STUDIEPOPULATIONEN.....	24
FIGUR 4 - SPERMIER FRÅN BERNER SENNEN HUND I WILLIAMSFÄRGNING. FOTO: ANGUS LAU. .	25
FIGUR 5 - HISTOGRAM FÄRG EJAKULAT HOS STUDIENS 65 HUNDAR. VITT/GRÅTT ÄR NORMAL FÄRG FÖR ETT EJAKULAT.	26
FIGUR 6 - SPRIDNINGSDIAGRAM MED REGRESSIONSLINJE ÖVER INDIVIDERNAS ENSKILDA TESTOSTERONKONCENTRATION SAMT NORMALT ANTAL SPERMIER. RELATIONEN ÄR INTE SIGNIFIKANT.	27
FIGUR 7 - HISTOGRAM TESTOSTERON HOS STUDIEPOPULATIONEN.....	27
FIGUR 8 - HISTOGRAM SHBG FÖR DE INGÅENDE HUNDARNA I STUDIEN	28
FIGUR 9 - HISTOGRAM FAI FÖR DE INGÅENDE HUNDARNA I STUDIEN.....	29
FIGUR 10 - HISTOGRAM CPSE FÖR DE INGÅENDE HUNDARNA I STUDIEN	31

Förkortningar

BPH	Benign prostatahyperplasi
CPSE	Canine prostate specific esterase
FAI	Free androgen index
FSH	Follikelstimulerande hormon
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
LH	Luteiniserande hormon
SHBG	Sex hormone bindning globulin
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
SShK	Svenska sennenhundklubben
UDS	Universitetsdjursjukhuset

1. Inledning

Vid hundavel har rasklubbar olika fokus i sitt avelsarbete, till exempel minskad risk för sjukdomar, specifika mentala kvaliteter eller exteriöra drag. Hos vissa raser har avelsarbetet för sunda hundar komplicerats på grund av nedsatt fertilitet (förmågan till fortplantning), då det är grunden till att få avkommor. En komplett bild av fertilitet är svårt att få i en studie då många faktorer hos både tik och hane spelar in vid parning och fortplantning. För att uppskatta en individs fertilitet söks därför ofta svar i mer lättmätta parametrar, exempelvis en hanes spermakvalitet, libido och förmåga till parning. För att i denna studie utvärdera delar av hanlig fruktsamhet kommer analys av ejakulat med hänsyn till framför allt spermiers morfologi, motilitet samt koncentration att genomföras (Oehninger & Ombelet 2019).

Testosteron är hanens viktigaste könshormon och bidrar till bland annat libido, spermieutvecklingen och muskelmassa (Zirkin 1998; Walker 2010). Testosteron stimulerar tillväxt och funktion hos hundens enda accessoriska könskörtel prostata (Alukal & Lepor 2016). Prostatan bidrar med sekret till sperman vid ejakulation och därmed till spermiers överlevnad i tiken (England *et al.* 2013). Testosteron bildas av leydigcellerna i testis, och blir på så sätt ett indirekt delmått på testis välmående (Sjaastad *et al.* 2016).

I denna studie analyseras koncentration av testosteron i serum hos hanhundar för att se om detta kan ge klarhet i fertilitetsproblem eller bidra till en förståelse för problemens omfattning. Hypotesen är att testosteron har en påverkan på fertilitet.

Utmaningen med att mäta testosterons koncentration är att det har en pulsatil utsöndring över dygnet (Martins *et al.* 2006), samt är bundet till olika bärarproteiner (Hammes *et al.* 2005; Hammond 2011). Koncentrationen varierar också mellan blod och lokalt i t.ex. testis. Som komplement till analys av serumtestosteron har samlingen av sperman kommenterats som ett mått på hanens libido, samt testikelvolym och konsistens utvärderats. I denna studie analyseras också bärarproteinet sex hormone binding globuline (SHBG), som binder hårt till testosteron och är testosterons främsta bärarprotein, för att se hur mycket testosteron som är fritt respektive bundet (Hammes *et al.* 2005; Hammond 2011). Detta ger ett free androgen index (FAI). Då testosteron även har inverkan på prostata har studien mätt koncentrationen canine prostate specific esterase (CPSE) i serum, som i tidigare studier har setts vara positivt korrelerat med storleken av prostata och förekomst av benign

prostatahyperplasi (BPH) (Bell *et al.* 1995; Wolf *et al.* 2012; Holst *et al.* 2017; Pinheiro *et al.* 2017).

1.1. Problembeskrivning

Den här studien är en del av ett större projekt på Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) som undersöker fertilitet hos hundar ur olika aspekter baserat på rasen berner sennen. Projektet initierades av Svenska Sennenhundklubben (SShK) efter att de hade identifierat problem inom rasen med tikar som går tomma, små kullstorlekar, en hög andel kejsarsnitt och ökad frekvens dödfödda valpar. Det övergripande syftet är att utvärdera olika verktyg för diagnostik av hanlig fruktsamhet samt att ta reda på omfattning och typ av fruktsamhetsproblemen hos berner sennen och deras patogenes.

1.2. Syfte och frågeställning

Syftet med denna studie är att utvärdera olika verktyg för diagnostik av hanlig fruktsamhet, samt att ta reda på om några korrelationer går att se mellan testosteron och andra uppmätta parametrar som exempelvis spermakvalitet. Som komplement till testosteron har även SHBG och CPSE-koncentrationen mätts i serum samt FAI räknats ut. Frågeställningar för att svara på syftet är:

- Finns det någon korrelation mellan spermakvaliteten och koncentrationen av testosteron, CPSE och SHBG i serum, eller kvoten FAI?
- Kan testosteron, CPSE och SHBG användas som komplement vid undersökning av fertilitet?

1.3. Översikt av studien

Som bakgrund till den aktuella studien presenteras först en litteraturstudie. Spermieproduktion samt grundläggande anatomi beskrivs kortfattat. Den hormonella regleringen beskrivs på ett grundläggande plan. Sedan följer en beskrivning av aktuell forskning inom de delar studien ska analysera. Efter det följer material och metod där tillvägagångssätt av studien förklaras. Resultatavsnittet går igenom de resultat som studien producerat. Sist diskuteras studiens resultat baserat på tidigare genomgången litteratur och syftet och frågeställningarna besvaras.

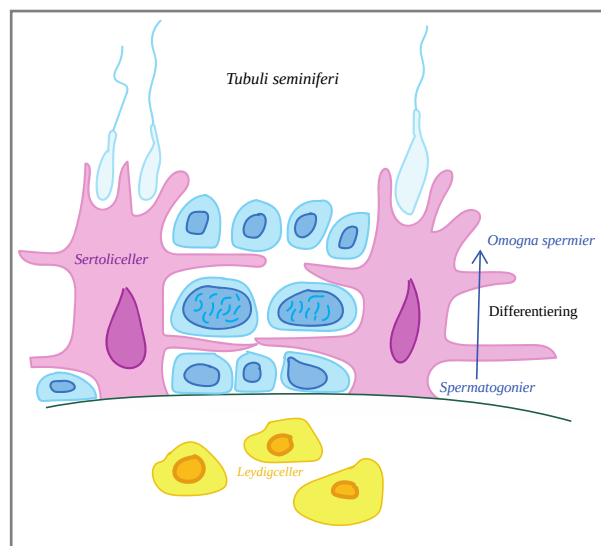
2. Litteraturstudie

2.1. Spermatogenes

En analys av ett spermaprov ger en indirekt bild av hur spermieproduktionen går till. Denna spermiebildande process kallas spermatogenesen och huvuddelen av den sker i testikeln. Spermatogenesen hos hund delas in i åtta stadier, från spermatogonium (odifferentierade könsceller) till färdig spermie. Den tar i genomsnitt 62 dagar, med en mindre variation mellan raser. I *testis* finns *tubuli seminiferi* i vilka spermier utvecklas från spermatogonier till spermier genom flertalet steg. Spermatogonierna bildas i *testis* fram tills könsmodnad då de börjar differentieras till spermier genom både meiotisk och mitotisk delning. De två viktigaste celltyperna för spermatogenesen i *testis* är leydig- och sertoliceller. Sertoliceller omger lumen i *tubuli seminiferi* och deltar direkt i spermatogoniernas utveckling till spermier. Leydigceller är lokaliserade till interstitiet där de producerar det hanliga könshormonet testosteron. Testosteron i sin tur stimulerar sertolicellerna och spermatogenesen samt är avgörande för vissa steg i densamma. Perifert reglerar testosteron könskaraktäristiska drag hos handjur (Sjaastad *et al.* 2016; Kolster 2018).

Från *tubuli seminiferi* förflyttas sedan spermerna genom *epididymis* för lagring och slutlig modnad innan de förs vidare vid ejakulation. Denna transport tar ca en till två veckor (Sjaastad *et al.* 2016; Kolster 2018).

En mogen spermie består av ett huvud (där arvsmassan finns), en svans, ett mittstycke och en akrosom. Den är omgiven av ett spermie-membran som består av



Figur 1. Spermatogenes. Stina Wallander.

ett lipidlager och fungerar som ett skydd för spermien under transporten till ägget (Sjaastad *et al.* 2016; Kolster 2018).

Spermiekoncentrationen samt volymen av ett ejakulat är direkt korrelerade till hundens storlek, där större hund ger större volym samt högre koncentration av spermier. Defekter som förekommer hos hund är huvuddefekter, akrosomdefekter, mittstycksdefekter och svansdefekter (Tesi *et al.* 2018).

Äldre hundar (>84 mån gamla) har visats ha lägre proportion normala spermier än yngre hundar (Hesser *et al.* 2017; Tesi *et al.* 2018). Det är framför allt mittstycksdefekter som har konstaterats vara vanligare hos äldre än hos yngre individer (Tesi *et al.* 2018). Totalantalet spermier och volym tycks inte påverkas av hög ålder (Tesi *et al.* 2018), medan delade resultat setts angående ålderspåverkan på motilitet (Hesser *et al.* 2017; Tesi *et al.* 2018). Inget signifikant samband har konstaterats mellan ålder och förmåga till att göra en tik dräktig (Tesi *et al.* 2018).

En hanhunds ejakulering delas in i tre steg. Första fraktionen ejakuleras vid påstigning av tiken och utgörs av klar prostatavätska. Andra fraktionen består av spermier och brukar ha en vit- eller gråaktig färg, medan den tredje fraktionen återigen är prostatavätska (Feldman & Nelson 2003). Prostatavätskans syfte är bland annat att bidra till optimalt pH för spermier i uterus och påverkar därigenom spermernas överlevnadsförmåga (Feldman & Nelson 2003; England *et al.* 2013). Normalt pH i prostatavätska är i snitt 6,8 och färgen genomskinligt klar (Feldman & Nelson 2003). I tabell 1 presenteras normalvärden för hanhundsejakulat.

Tabell 1. Normalvärden ejakulat hund. Översatt från Feldman & Nelson 2003.

Normalvärden hanhundsejakulat	
Totalantal spermier	>200 miljoner
Motilitet (framåt)	>70 %
Morfologiskt normala spermier	>70 %
Färg	Vit, icke genomskinlig

2.1.1. Hormonell reglering av spermatogenesisen

I hypothalamus bildas gonadotropin releasing hormone (GnRH) som stimulerar främre hypofysen till att producera och frisläppa follikelstimulerande hormon (FSH) och luteiniserande hormon (LH). FSH stimulerar i sin tur sertoliceller i *testis* till produktionen av spermier samt inhibin som ger negativ feedback på hypofysens utsöndring av FSH. LH stimulerar leydigceller till att producera testosteron som i sin tur stimulerar sertolicellerna och spermatogenesisen samt ger effekt på perifera organ via blodet och negativ feedback till hypofysens produktion av LH och FSH samt på hypothalamus utsöndring av GnRH (Sjaastad *et al.* 2016).

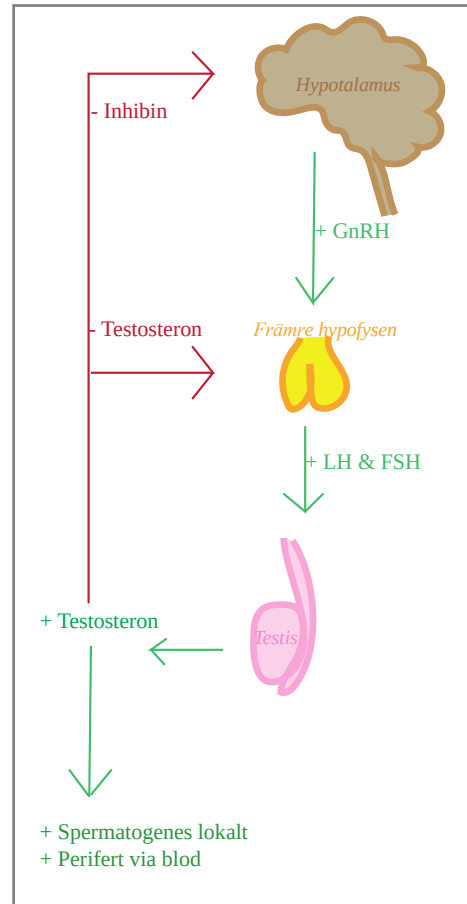
Testosteron

Testosteron har en avgörande roll i bildandet av spermier och upprätthållande av spermatogenesisen, och behövs för att stegen genom sertolicellerna ska fungera fullt ut (Zirkin 1998; Walker 2010). Det behövs också för libido, förmågan att ejakulera och typiska hanliga könskaraktäristiska drag (Sjaastad *et al.* 2016; Kolster 2018).

Prostatan står för den största volymen av ejakulatet hos hund och är direkt påverkad av testosteron och dess metaboliter gällande tillväxt och funktion (Alukal & Lepor 2016). Hos män är vanliga symtom på testosteronbrist infertilitet, minskad sexuell aktivitet och svårigheter att ejakulera. Även män som ligger i det lägre intervallet för normala testosteronnivåer i serum kan ha symtom (García-Cruz & Alcaraz 2020).

I en studie sågs en signifikant lägre serumkoncentration av testosteron hos infertila jämfört med fertila hanhundar, även om testosteronkoncentrationen bedömdes vara inom normalvariation hos de båda grupperna. Hos de infertila hade också *testis* subjektivt en mjukare konsistens, koncentrationen spermier och deras motilitet var lägre, liksom andelen spermier med intakt cellmembran (de Souza *et al.* 2015).

Testosteronkoncentration i serum varierar under dygnet genom en pulsatil utsöndring (Souza *et al.* 2004; Martins *et al.* 2006), däremot har ingen säsongsvariation setts hos hund (Martins *et al.* 2006). Beroende på studie och analysmetod, när på dygnet provet är taget och andra variabler kan genomsnittskoncentrationen av testosteron i serum tolkas olika, men har hos hund tidigare i två olika studier setts



Figur 2. Hormonell reglering hanhund.
Stina Wallander

vara $1,9 \pm 0,4$ nmol/L (Dalmazzo *et al.* 2019) och $4,5 \pm 1,7$ nmol/L till $6,9 \pm 3,5$ nmol/L (Martins *et al.* 2006). För att få ett representativt värde av testosteronkoncentrationen i blod rekommenderas två morgonprover (García-Cruz & Alcaraz 2020).

Testosteron återfinns också i olika koncentrationer lokalt i kroppen, framför allt tros den intratestikulära testosteronkoncentrationen ha betydelse för spermatogenesis, och den har enligt studier visat sig vara 70-100ggr så hög som perifert cirkulerande koncentration (Huhtaniemi 2018). En högre intratestikulär testosteronkoncentration har setts i flera studier och hos olika djurslag, men också att den höga testosteronkoncentrationen inte behövs för ett upprätthållande av spermatogenesisen (Zirkin 1998). Hos möss har effekter av sänkt intratestikulärt testosteron syns först när halten hamnat $< 5,1$ % jämfört med normala värden. Först då har spermatogenesisens normala förlopp hämmats (O'Donnell *et al.* 1996).

Hos hund har det inte påvisats någon signifikant korrelation mellan serumtestosteron och intratestikulär testosteronkoncentration. Serumkoncentrationen testosteron verkar inte heller vara relaterad till spermie kvaliteten (Souza *et al.* 2004). I studier på män har däremot olika resultat presenterats, både studier där ingen korrelation mellan fritt testosteron i serum och koncentration av testosteron i *testis* setts (Jarow *et al.* 2005) och studier som visat motsatsen (Meeker *et al.* 2007). Däremot diskuteras det om testosteron påverkar spermiers motilitet, antingen genom parakrin effekt på sertolicellerna i *testis* eller via feedback på GnRH (Meeker *et al.* 2007).

Testosteron och andra androgener transporteras med olika proteiner. SHBG är det bärarprotein som ansvarar för större delen av testosterons transport och distribution i kroppen. Det bildas till största del i levern men också av sertolicellerna i *testis*. SHBG binder specifikt, med hög affinitet och påverkar därmed testosteronets effekt då det ej binder in till övriga testosteronreceptorer i kroppen. Den fria fraktionen testosteron räknas därmed som biologiskt aktiv (Hammes *et al.* 2005; Hammond 2011; Keevil & Adaway 2019). Hos män har analys av testosteronkoncentration i kombination med SHBG-koncentration gett en bra grund för att tolka gonadal status (Rastrelli *et al.* 2018). En hög halt SHBG har setts ge symtom på androgenbrist, oberoende av den totala mängden testosteron (Keevil & Adaway 2019). I *testis* och *epididymis* har SHBG i sig självt setts ha inverkan på mognad och reglering av spermatogenesisen (Hammond 2011). Det har också i en studie av män med adult onset hypogonadism förts fram att SHBG även verkar påverka testosterons negativa feedback på hypofysen (Winters 2020). Hos hund har ett samband visats mellan uttrycket av SHBG-receptorer i *testis* och flera kvaliteter hos spermerna (Dalmazzo *et al.* 2019). Det har inte setts något samband mellan serumhalt av SHBG och intratestikulära nivåer SHBG (Heráček *et al.* 2018).

Faktorer som kan påverkar hormonkoncentrationer/sperma

Studier på människa avseende body mass index (BMI) och androgener visade att ett högre BMI är associerat med lägre halter av både testosteron och SHBG (Meeker *et al.* 2007; Pugeat *et al.* 2010), men ett högre FAI (Meeker *et al.* 2007).

Sperma påverkas negativt av övervikt genom lägre spermavolym, lägre spermieantal/koncentration, lägre vitalitet och mindre andel normal morfologi. Hos underviktiga har även andelen normala spermier rapporterats lägre (Salas-Huetos *et al.* 2020).

Ålder påverkar koncentrationen testosteron hos män, där en minskning på ca 30 % ses mellan åldern 40-90 år. Detta betyder att symtom av lågt testosteron är vanligare i högre ålder då den fria fraktionen blir lägre (Ramachandran *et al.* 2019). Samtidigt har SHBG setts stiga med ålder, vilket gör att FAI blir ytterligare lägre (Araujo & Wittert 2011).

CPSE

Andra orsaker som kan påverka spermiernas förmåga till befruktning är förändringar i prostata. Prostata är hundens enda accessoriska könskörtel och bidrar vid ejakulering med seminalplasma och utgör den största volymen av ejakulatet (Christensen 2018). Prostatafraktionen tycks ha betydelse för spermiers förmåga att binda till uterus epitel och är viktigt för spermiers förmåga till överlevnad och befruktning i tikens uterus (England *et al.* 2013).

Förekomst av prostatopatologier som BPH, prostatit, abscesser, cystor, tumörer och metaplasier beräknas vara ca 1 % hos hanhundar. Av dessa är BPH vanligast förekommande, följt av prostatit. BPH är en godartad förstoring av prostata som inte behöver ge några kliniska tecken. Stora hundar är, med undantag för neoplasier, mer drabbade av prostatopatologier och förekomsten är högre hos vissa specifika raser (Wolf *et al.* 2012; Polisca *et al.* 2016), däribland berner sennen (Polisca *et al.* 2016). Stora raser är även överrepresenterade avseende prostatopatologier utan kliniska tecken, som BPH och i vissa fall asymtomatisk prostatit (Polisca *et al.* 2016). BPH har setts vara vanligare hos äldre hundar (Krakowski *et al.* 2015; Flores *et al.* 2017) och prostatas vikt, BPH och minskad mängd ejakulat har visats signifikant korrelerat med ökad ålder vid studier av hanhundars prostata (Berry *et al.* 1986). Av hundar som söker vård för infertilitet har 4,6% en underliggande prostatopatologi (Polisca *et al.* 2016). Alla prostatopatologier kan ge förändrad prostatavätska med exempelvis hematospermi. BPH kan även utan kliniska tecken påverka prostatavätskan och vara underliggande för andra prostatopatologier (Lévy *et al.* 2014).

Spermier är känsliga för oxidativ stress och pH-förändringar och BPH kan ge förändringar i prostatavätska som ger ökat antal spermier med DNA-fragmentering, ökad halt av morfologiska defekter och minskad mitokondriell aktivitet (Krakowski *et al.* 2015; Flores *et al.* 2017). Ejakulat hos hundar med BPH innehåller spermier med lägre hastighet, motilitet och lägre andel spermier med funktionella membran.

Spermiekoncentrationen har också setts vara lägre. Detta har varit positivt korrelerat med förhöjd halt glukos i seminalplasma samt serumnivå av testosteron (Aquino-Cortez *et al.* 2017).

Hos människor har en högre halt reaktiva oxidanter och lägre halt antioxidanter förekommit hos individer med BPH (Aydin *et al.* 2006; Aryal *et al.* 2007). Hypotesen har varit att detta leder till en högre oxidativ skada i prostata vilket ökar risk för carcinogena förändringar (Aydin *et al.* 2006). Det torde även påverka prostata-sekretet och i sin tur även spermakvalitet.

Andra parametrar i seminalplasman som setts påverka spermiers befruktningsförmåga negativt är ökad mängd glukos i seminalplasma (som även ger ökad oxidativ stress) (Ding *et al.* 2015), och ökad mängd av leukocyter (Erenpreiss *et al.* 2002).

För att utvärdera prostata kan förutom palpation rektalt och ultraljud CPSE mätas i serum. Det är ett icke-invasivt ingrepp som visat god korrelation mellan prostatas storlek och CPSE halt i serum. Ett högre värde på CPSE innebär en större prostata, samt har setts vara hög vid BPH i flera studier (Bell *et al.* 1995; Wolf *et al.* 2012; Holst *et al.* 2017; Pinheiro *et al.* 2017). CPSE är bra för tidig diagnostik/diagnostik av BPH (Lévy *et al.* 2014).

I humanstudier kan ett liknande mätvärde för människa, prostate specific antigen (PSA), användas som markör i serum för att uppskatta den biologiskt aktiva fraktionen testosteron. PSA bildas när det är hög aktivitet i prostatan. Då prostatas aktivitet regleras av testosteron (hög andel fritt testosteron ger hög aktivitet i prostatan vilket bidrar till ökad halt PSA i blod) blir ett lågt PSA-värde en indikator på att testosteron ej finns fritt i så hög utsträckning. Prostatan är testosteronets främsta mål (förutom lokalt i *testis*). PSA påverkas dock också av andra faktorer vilket gör att dess koncentration kan påverkas av flera faktorer än prostata (Rastrelli *et al.* 2013).

2.1.2. Berner sennen

Berner sennen är en ras som började avlas på under 1950-talet i Sverige. Ursprungligen är det en gårdshund som använts till vakt och drag. Inom rasen finns många sjukdomar beskrivna och livslängd är i snitt 5,5 år. Inom rasen ses problem med små kullar och låg dräktighetsprocent. Enligt rasspecifik avelsstrategi (RAS) är första prioritering av viktiga kort- och långsiktiga mål att avla för en förbättrad fertilitet inom rasen, då detta ger en bredare avelsgrund till att prioritera för andra hälsoaspekter (Svenska Sennenhundklubbens avelsråd 2018). Hos hanhundar i rasen ses även ökad morbiditet av prostataorsaker jämfört med andra raser (Agria försäkringsdata –Rasstatistik 2018).

3. Material och metod

3.1. Litteratursökning

Relevant litteratur har inhämtats via databasen Pubmed med sökningar: "testosterone levels infertility", "testosterone SHBG fertility", "spermatogenesis SHBG testosterone", "testosterone fertility male", "CPSE", "testosterone prostate". Vidare har källor hittats från andra artiklars referenslistor.

3.2. Rekrytering av deltagare

Studien annonserades i samarbete med Svenska sennenhundklubben via sociala medier och SLUs hemsida. Djurägarna fick anmäla sitt intresse för deltagande till en mejladress som skapats för projektet. På UDS i Uppsala gjordes större delen av insamlingen, men prover togs även på 14 andra kliniker i landet där veterinärer med utbildning för spermasamling fanns. Rekryteringen startade under mars 2020 och prover togs i mars till och med oktober 2020.

3.2.1. Studiepopulation

Inklusionskriterier för deltagande i studien var okastrerade berner sennen hanar äldre än 16 mån, både som gått i avel och inte.

3.3. Provinsamling

Provinsamlingen bestod av tre olika delar: anamnestiska uppgifter, spermaprov och blodprov.

3.3.1. Anamnestiska uppgifter

Vid besöket på kliniken fick djurägaren fylla i ett dokument (bilaga 1) med information om hundens hälsostatus. Där inkluderades information om djurets identitet,

om hundens eventuella sjukdomshistorik samt tidigare behandlingar. Frågor rörande urinering och defekering ingick då detta kan vara tecken på sjukdom i framför allt prostata vilket kan vara av stor vikt vid analys av sperma.

Provtagande veterinär eller assistent fyllde i uppgifter om djurets identitet samt mätte testiklarnas storlek, palperade prostata rektalt (om nåbar) för att bedöma storlek, konsistens och eventuell smärtreaktion. Se bilaga 1 för protokoll. Hullbedömning gjordes enligt body conditioning score (BCS) med en niogradig skala och vikt i kg antecknades.

3.3.2. Spermaprover

Spermasamling utfördes av legitimerad veterinär. Närvaro av löptik eftersträvades och uppnåddes på alla provtagningar utom en. Hanen och tiken hälsade och sedan stimulerades hanen manuellt medan han fick lukta på tiken. Sperman samlades i en uppvärmd behållare, alla tre fraktionerna tillsammans. Direkt bedömdes volym, färg och motilitet via mikroskopering i nära anslutning till ejakulering. Om hanen inte visade intresse eller var svårsamlad byttes vid några tillfällen tik eller miljö. Notering om samlingen gjordes.

Efter samlingen analyserades sperman av BMA-personal på spermalab på laboratoriet på institutionen för kliniska vetenskaper på SLU, Uppsala. Sperman centrifugerades och alikvoter av seminalplasman förvarades i -80 gradig frys i väntan på analys.

3.3.3. Blodprover

Efter samling av sperma togs blodprov av assistent eller veterinär. Blodproven togs från venöst blod i provrör utan tillsats för serum, samt i provrör med EDTA.

Dessa centrifugerades efter minst 20 min i en hastighet av 3500v/min i 10 min. Serum och plasma pipetterades till kryorör och blodkroppar från EDTA-röret till ett separat kryorör. Rören förvarades i -80 frys fram till analys.

3.4. Analys av prover

När alla prover var insamlade genomfördes analyser vid samma tillfälle för respektive analyt.

3.4.1. Testosteron

För analys av testosteron i serum användes Immulite 200XPi immunoassay system. För att räkna ut FAI användes resultatet från SHBG-mätningarna och kvoten av testosteron/SHBG räknades ut. Testets lägsta analyserbara värde var 0,69 nmol/L.

Fyra prover fick $<0,69\text{nmol/L}$ som resultat och har vid beräkning bestämts till $0,35\text{nmol/L}$.

3.4.2. SHBG

För analys av SHBG i serum användes Canine sex hormone binding globuline (SHBG) ELISA kit, en kvantitativ sandwich ELISA analys. Mätområdet för denna analys är $0,001\text{nmol/L} - 200\text{nmol/L}$. Fem prover späddes efter en första körning med maxresultat. Dessa fick sedan ett exakt värde över 200nmol/L , eller ett högre maxvärde. Tre prover kördes i andra omgången och kunde därför inte analyseras om och fick $>200\text{nmol/L}$ som värde. Dessa har vid beräkning getts maxvärdet (600nmol/L eller 200nmol/L beroende på spädning).

3.4.3. CPSE

SpeedTM CPSE in clinic immunoassay reader från Virbac BVT användes för analys av CPSE i serum. Detta gav en kvantitativ uppskattning av CPSE i serum. Maskinen använder LIF: laser induced fluorescens. Detta snabbtest har i jämförelser med motsvarande ELISA-test visat sig vara bra överensstämmande (se bilaga 2). Maxvärde för analysen var 500ng/mL . De prover som fått detta resultat har vid beräkning använts inkluderats som 500ng/mL . Tolkningssvärden enligt tillverkaren tillhörande testet var $<50\text{ng/mL}$: osannolikt BPH, $50-70\text{ng/mL}$: svårtolkad, $>70\text{ng/mL}$: troligt BPH.

3.5. Bearbetning av data

För statistisk bearbetning av data användes excel och minitab. Metoden som användes för att utvärdera effekt av testosteron samt testosterons effekt på spermaparametrar samt CPSE var stegvis linjär regression med variabler som i univariat regression hade $p < 0,2$. Därefter har de högsta p-värdena stegvis tagits bort ur modellen. Resultat med p-värde $< 0,05$ i den slutliga modellen betraktades som signifikanta.

Analys av CPSE kompletterades med binär logistisk regressionsanalys där testets maxvärde ($>500\text{ng/mL}$) sattes som 1 och värden mindre än detta sattes som 0.

När endast deskriptiv statistik av olika faktorer presenteras används medelvärde, medelfel, standardavvikelse, minsta värdet, median och maximala värdet.

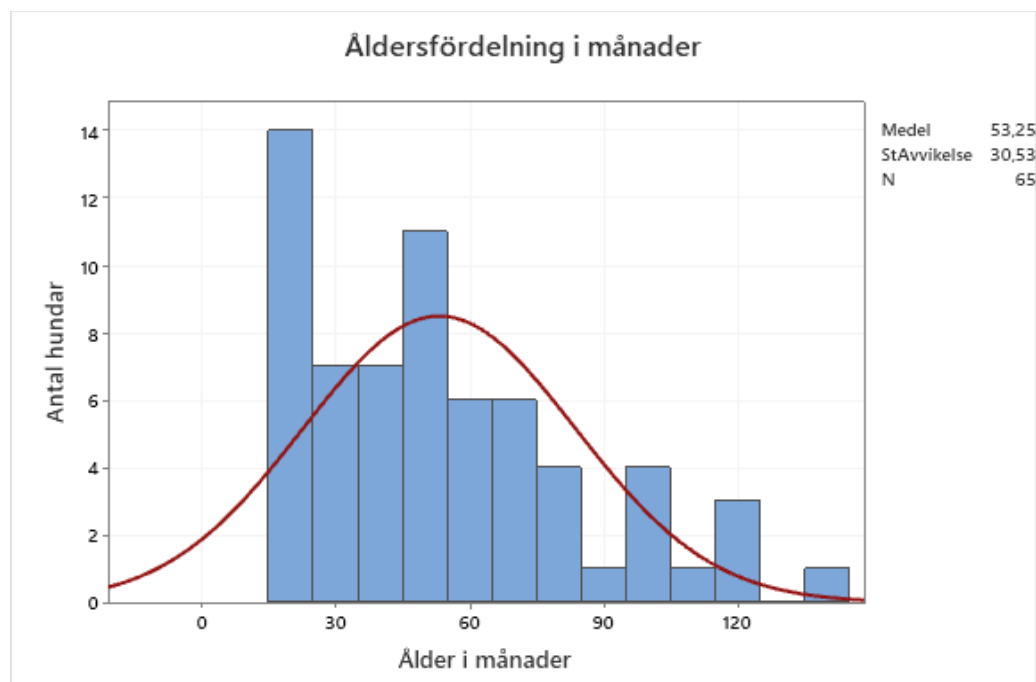
Studiepopulationen delades in i åldersgrupper baserat på ålder i månader för att se om några skillnader gick att skönja.

4. Resultat

4.1. Deltagande hundar

I studien deltog 65 hundar av rasen berner sennen i åldersintervallet 17 – 134 mån (se fördelning i figur 4 nedan). Av dessa hade 16 inte gått i avel och resterande 49 tidigare parats. Av dessa 49 hade 8 inte fått några valpar och resterande fått avkomor. Provtagning skedde i flera olika delar av Sverige och hundarna var bosatta i närheten av dessa. Tjugofem provtagningar genomfördes på UDS i Uppsala, resterande 40 på olika kliniker i Gävle, Göteborg, Hudiksvall, Hässleholm, Jönköping, Karlstad, Linköping, Lyckeby, Piteå, Skellefteå, Stockholm, Umeå, Västerås och på Gotland. Sju av hundarna var importerade (från Finland, Ungern, Tjeckien och Norge), resterande var svenskfödda.

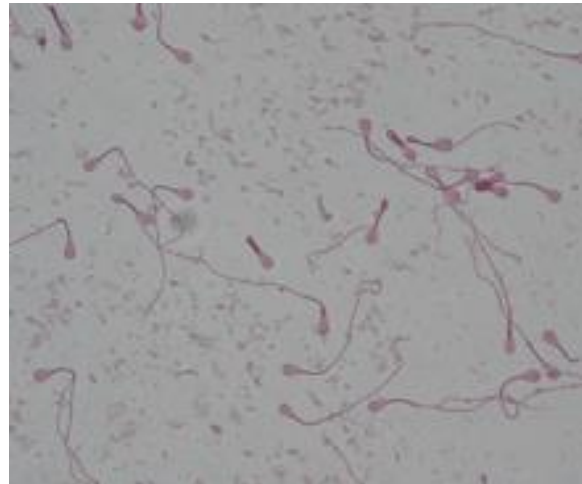
BCS varierade mellan 3 och 7, median var 5. Vikt varierade mellan 35kg och 58,1kg, median 50kg. Inga signifikanta korrelationer med BCS eller vikt sågs för någon annan variabel.



Figur 3. Histogram åldersfördelning för studiepopulationen.

4.2. Spermakvalitet

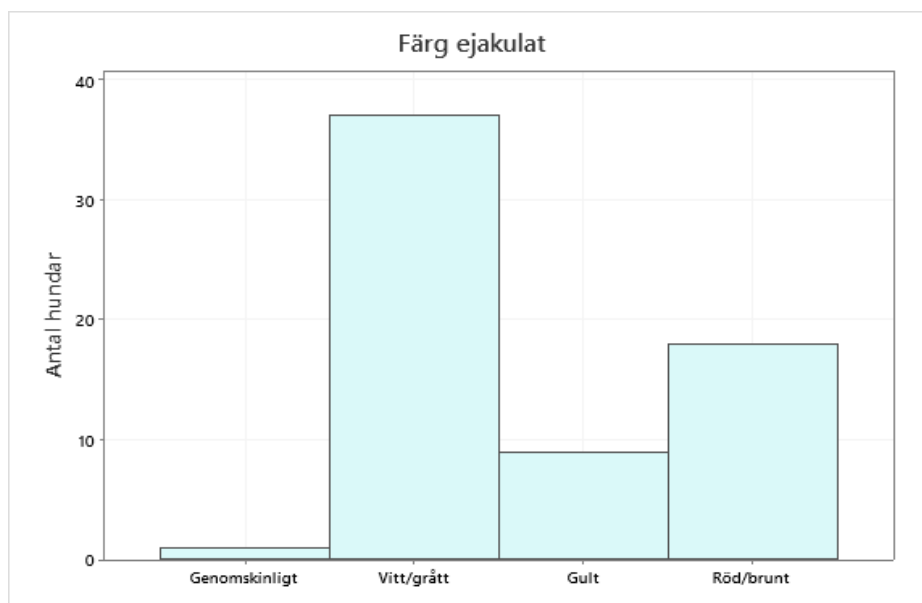
I tabell 2 presenteras deskriptiv statistik av studiepopulationens spermakvalitet. Fördelning av färg på ejakulatet presenteras i Figur 5. Figur 4 är ett foto från mikroskopering av ett spermaprov från en av de deltagande hundarna.



Figur 4. Spermier från berner sennen hund i Willem'sfärgning. Foto: Angus Lau.

Tabell 2. Deskriptiv statistik spermakvalitet.

Variabel	N	Medel	Medelfel	StAvvikelse	Min	Median	Max
Motilitet %	65	62,7	3,2	25,4	0	75	98
Totalantal spermier miljarder	65	1,0	0,1	0,8	0	1,0	3,6
Normal andel spermier %	65	48,8	3,2	26,2	0	50,5	87,5



Figur 5. Histogram färg ejakulat hos studiens 65 hundar. Vitt/grått är normal färg för ett ejakulat.

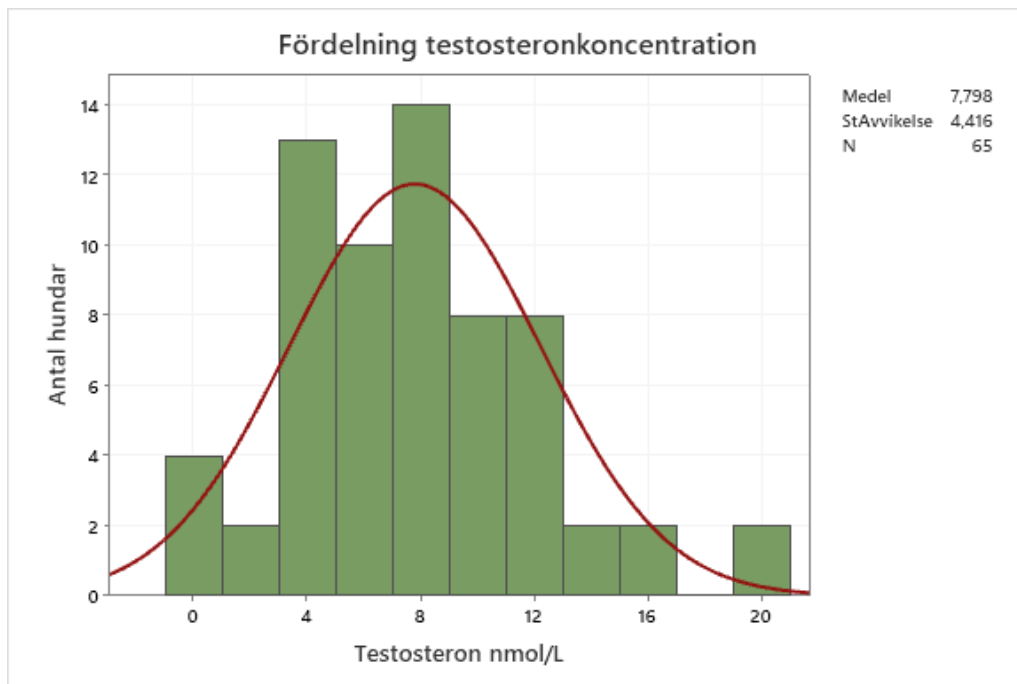
4.3. Testosteron och SHBG-koncentrationer

Koncentrationen av testosteron totalt samt fördelat i olika åldersgrupper presenteras i tabell 3. I figur 6 visas en fördelning i ett histogram. I denna studie var inte testosteronkoncentration statistiskt signifikant korrelerad med någon annan variabel vid regressionsanalyser där flera faktorer var medräknade. Figur 7 visar ett exempel på ett spridningsdiagram som gjorts för att jämföra olika faktorer korrelerat med testosteronkoncentration, detta exempel visar andel normala spermier.

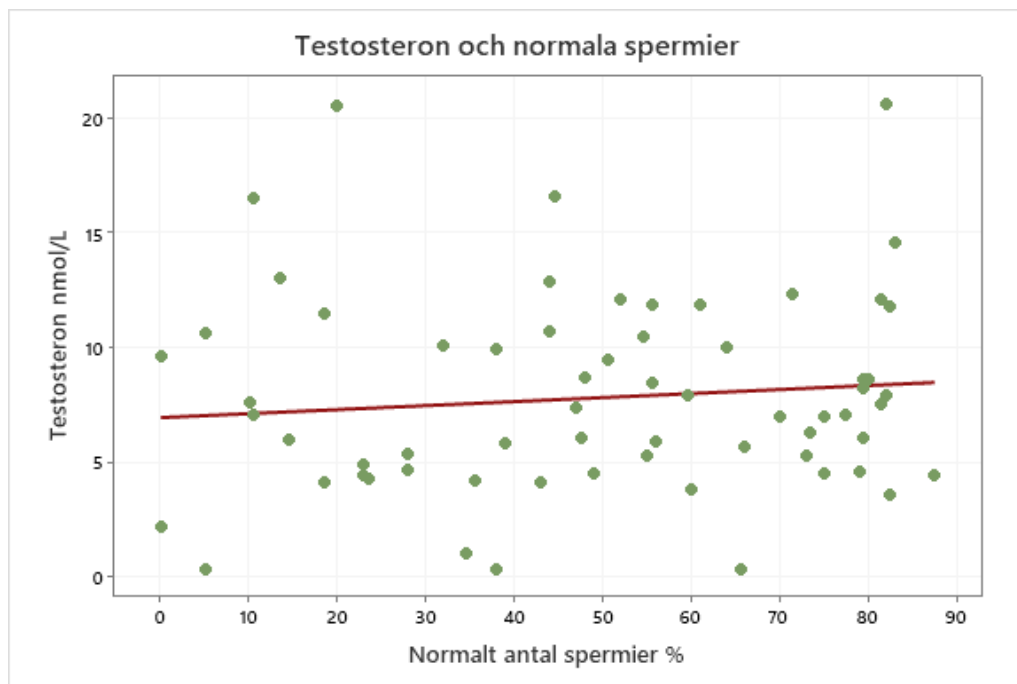
Fyra hundar hade lägsta mätbara värde på analysmetoden, <0,69nmol/L. Tre av dessa var >85 mån och hade tidigare parat och fått valpar.

Tabell 3. Deskriptiv statistik testosteron.

Variabel	N	Me- del	Me- delfel	StAv- vikelse	Min	Me- dian	Max
Testosteron nmol/L	65	7,80	0,55	4,42	0,35	7,10	20,60
0-24 mån Testosteron nmol/L	14	9,51	1,05	3,94	4,50	8,60	20,60
25-84 mån Testosteron nmol/L	41	7,57	0,58	3,72	0,35	7,00	16,60
>85 mån Testosteron nmol/L	10	6,33	2,19	6,94	0,35	5,05	20,50



Figur 7. Histogram testosteron hos studiepopulationen.

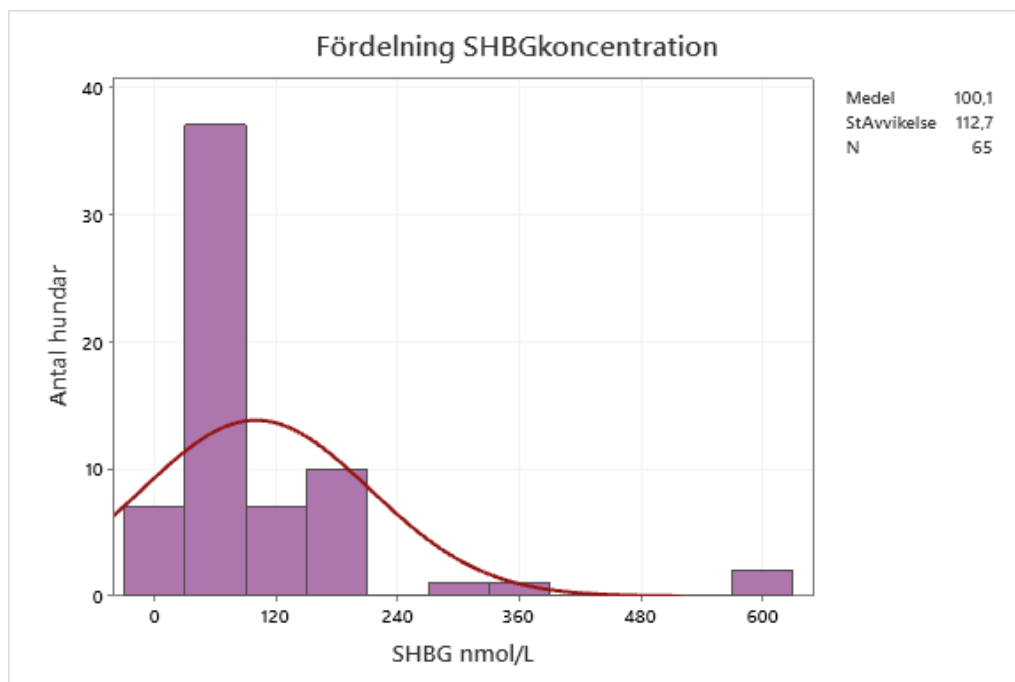


Figur 6. Spridningsdiagram med regressionslinje över individernas enskilda testosteronkoncentration samt normalt antal spermier. Relationen är inte signifikant.

I tabell 4 visas koncentrationen SHBG för hela studiepopulationen samt indelat i ålderskategorier. I figur 8 visas fördelningen med ett histogram. Inga signifikanta korrelationer mellan SHBG och någon annan variabel sågs i denna studie.

Tabell 4. Deskriptiv statistik SHBG i ålderskategorier.

Variabel	N	Mean	Medel-fel	StAv-vikelse	Min	Me-dian	Max
SHBG nmol/L	65	100,1	14,0	112,7	16,5	54,0	600,0
0-24mån	14	88,8	17,1	63,8	22,4	54,0	197,8
SHBG nmol/L							
25-84mån	41	96,2	16,3	104,2	18,9	56,7	600,0
SHBG nmol/L							
>85mån	10	132,1	59,0	186,5	16,5	45,1	600,0
SHBG nmol/L							

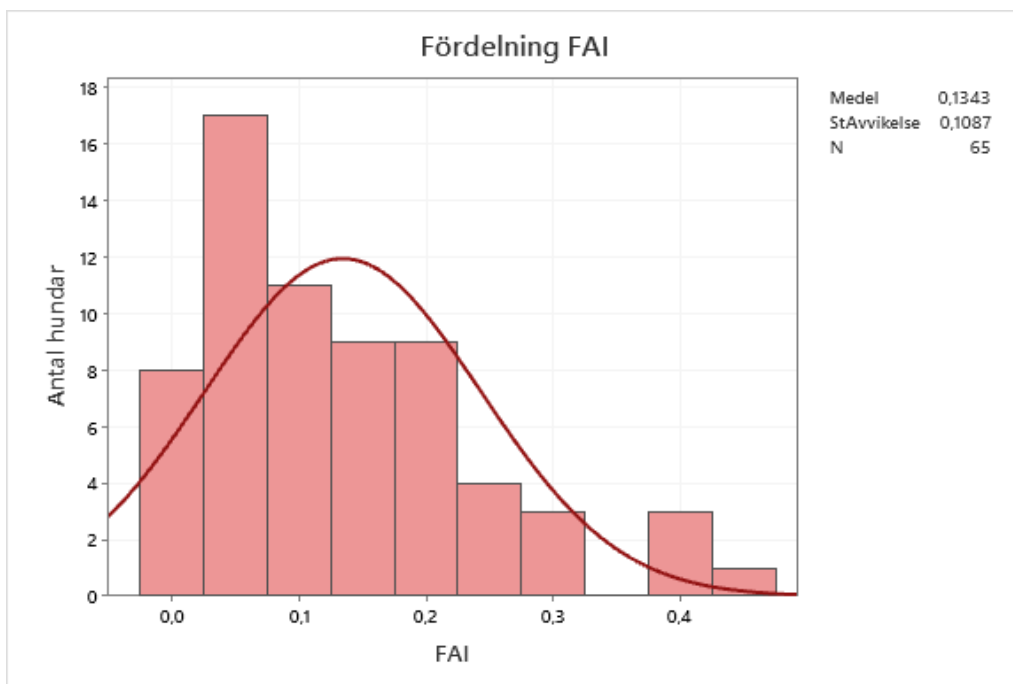


Figur 8. Histogram SHBG för de ingående hundarna i studien.

I tabell 5 visas resultat av fördelning FAI. I figur 9 visas fördelningen med ett histogram. I denna studie sågs en signifikant korrelation mellan sjunkande FAI och stigande ålder (p-värde 0,02). FAI var inte signifikant korrelerat med någon annan variabel.

Tabell 5. Deskriptiv statistik FAI.

Variabel	N	Mean	Medelfel	StAvvikelse	Min	Median	Max
FAI	65	0,1344	0,0135	0,1087	0,0050	0,1150	0,4300
0-24 mån FAI	14	0,1633	0,0289	0,1082	0,0420	0,1961	0,4114
25-84 mån FAI	41	0,1348	0,0161	0,1033	0,0050	0,1199	0,4175
>85 mån FAI	10	0,0917	0,0403	0,1276	0,0072	0,0466	0,4298



Figur 9. Histogram FAI för de ingående hundarna i studien.

4.4. CPSE

Av 65 hundar fick 36 en koncentration över maxvärdet för mätmetoden (>500 ng/mL). Enligt snabbtestets medföljande instruktion hamnade 2 hundar i intervallet för osannolik BPH, 3 hundar i intervallet för svårtolkat resultat och resterande 60

hundar i intervallet för sannolik BPH, med en spridning på 80,12ng/mL till >500 ng/mL.

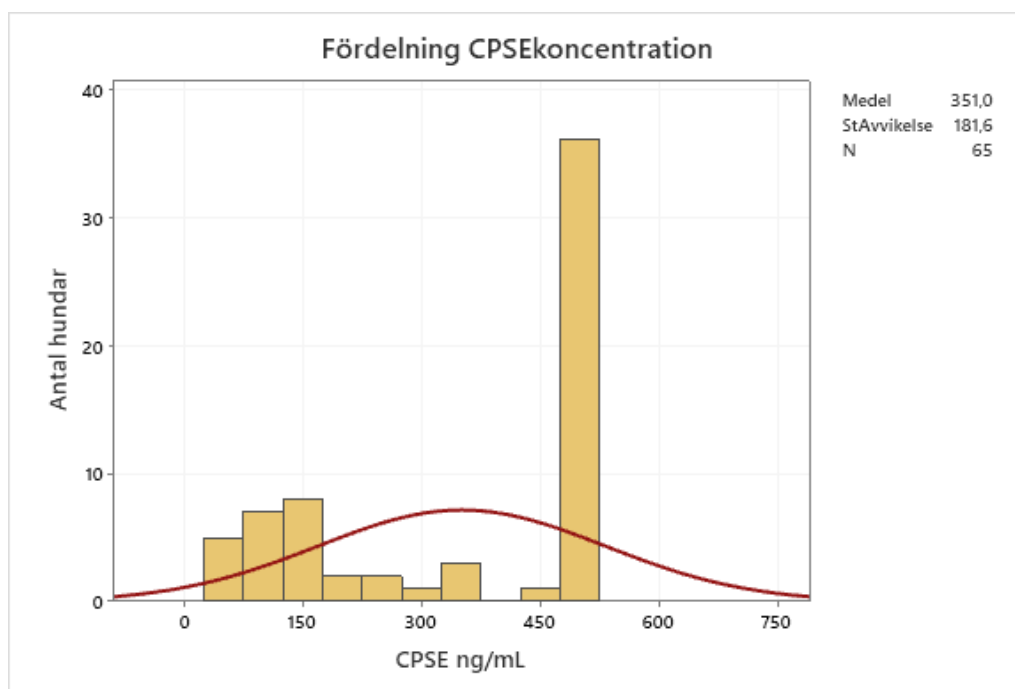
När populationen delas in i 3 åldersgrupper enligt 0-24 mån, 25-84 mån, >85 mån delas medelvärden av deras resultat på CPSE in enligt tabell 6. Vid binär logistisk regressionsanalys av resultaten fås ett en signifikant korrelation mellan CPSE och stigande ålder med $p=0,001$.

Hos de hundar med erytrocyter i sperman sågs en signifikant korrelation med CPSE ($p=0,001$).

CPSE korrelerade inte signifikant med någon uppmätt spermievariabel eller annan faktor som exempelvis leukocyter.

Tabell 6. Deskriptiv statistik CPSE i ålderskategorier.

Variabel	N	Mean	SE Mean	StAvvikelse	Min	Median	Max	Andel med maxvärde
CPSE ng/mL	65	351,0	22,5	181,6	42,8	500,0	500,0	55, 40%
0-24 mån CPSE ng/mL	14	156,8	34,7	129,8	42,8	118,2	500,0	1, 7%
25-50 mån CPSE ng/mL	20	350,4	42,8	191,5	64,5	500,0	500,0	12, 60%
51-84 mån CPSE ng/mL	21	427,1	29,4	134,9	137,6	500,0	500,0	15, 71%
>85 CPSE ng/mL	10	464,2	24,3	76,8	289,9	500,0	500,0	8, 80%



Figur 10. Histogram CPSE för de ingående hundarna i studien.

5. Diskussion

I denna studie har korrelation mellan spermaparametrar och hormonkoncentrationer i blod hos berner sennen undersökts. Fördelar med att endast en ras ingår i studiepopulationen är att exempelvis skillnader i medellivslängd, storlek och eventuella andra rasskillnader inte behöver tas i åtanke vid analys av provsvar. Det finns också information om rasen samt vanligt förekommande sjukdomar vilket kan hjälpa vid tolkning av provsvar. Detta gör att analyserna i sig får större plats och det mer homogena materialet gör att mindre skillnader lättare kan upptäckas. Däremot fås en mer representativ bild av hundsläktet i stort när flera raser ingår. Skillnader mellan storlek, raser och liknande kan ses och dras slutsatser ifrån. I detta fall där många olika analyser görs på samma hund bedöms användandet av en enskild ras som positivt. Rekryteringen av deltagarna har skett genom att intresserade djurägare självmant har sökt sig till projektet. Detta kan göra att studiepopulationen påverkas genom att exempelvis djurägare med hundar som har upplevt problem vid tidigare parningar vill delta, alternativt att djurägare med mål att para sina hundar söker sig till studien. I studien deltog tidigare parade hundar med dräktighet som resultat samt hanar utan dräktighet vid tidigare parning. Även hundar som aldrig gått i avel. Det kan vara en viktig aspekt att ta i åtanke vid tolkning av resultatet.

Testosteron mättes i denna studie vid endast ett tillfälle vilket påverkar analys-svaret då testosteron visat sig ha en stor variation över dygnet (Souza *et al.* 2004; Martins *et al.* 2006). Detta kan ha lett till att testosteronkoncentrationen inte är helt pålitlig i dessa mätningar och att studien därför inte får motsvarande resultat som tidigare studier fått vid jämförelse av samband mellan spermakvalitet och testosteronkoncentration. I denna studie fanns inte den praktiska möjligheten att ta flera testosteronprover per hund, samt att den kliniska relevansen sjunker ju svårare insamlingen blir.

Testosteron har tidigare kopplats till libido (Sjaastad *et al.* 2016; Kolster 2018), i vår studie kunde vi dock inte se detta i multivariabel analys. Kanske kan testosteron i serum i sig påverka fertilitet och libido på det sättet att hanen visar mer/mindre intresse för tiken. Däremot hade alla hundar i denna studie förmåga till ejakulering vilket tyder på att om testosteronkoncentration i serum ska ha en så stor påverkan att parning inte kan genomföras bör det ligga lägre än hos de hundar som ingick. Troligtvis finns det andra mer betydande faktorer än libido kopplat till testosteronkoncentration som påverkar en hunds fertilitet baserat på denna studie.

SHBG-koncentrationen i serum har hos människa i andra studier setts stiga med ökande ålder (Araujo & Wittert 2011), vilket inte var signifikant i denna studie. På samma sätt har testosteron setts sjunka med stigande ålder (Ramachandran *et al.* 2019), men inte heller detta var signifikant i denna studie. Detta kan bero på fördelning av ålder hos studiepopulationen, där det proportionellt ingick färre äldre än yngre hundar. Om studiepopulationen innehållit fler äldre individer kanske det resultatet skulle vara signifikant. Detta blir dock ett problem i just denna studiepopulation som utgörs av en ras som har en kortare levnadslängd jämfört med andra raser och det inte finns en lika stor äldre generation att tillgå.

Serumtestosteron motsvarar inte alltid intratestikulär testosteronkoncentration vilket är det som man i första hand tror påverkar spermatogenesis (Huhtaniemi 2018). I denna studie går inte några signifikanta skillnader att se hos spermerna baserat på vare sig testosteronhalt eller SHBG i serum. Troligt motsvarar inte dessa värdet i testikeln vilket i första hand ser ut att påverka spermatogenesisen.

Hur testosteron ska bedömas debatteras (mäta som endast fritt VS bundet, endast det fria som är aktivt osv)(Goldman *et al.* 2017). I denna studie mättes SHBG framförallt med syfte att se om FAI ger ett mer tillförlitligt resultat än testosteron för sig. Då sjunkande FAI var det enda värde som visade sig vara signifikant korrelerat med stigande ålder, samtidigt som testosteron och SHBG för sig endast visade tendenser dras slutsatsen att FAI kan vara ett mer tillförlitligt värde att utgå ifrån vid analys av testosteron i serum.

För att försöka få ett mer relevant värde av testosteron även med endast ett provtagningstillfälle räknades i denna studie även FAI, då SHBG tros vara mer konstant än testosteronkoncentration. Sammantaget ses ändå tendensen att den fria halten samt den totala halten testosteron sjunker med stigande ålder. Huruvida den påverkar fertiliteten eller spermerna är i denna studie inte klarlagt.

Mätningarna av CPSE-koncentrationen avviker från förväntat resultat. Då många hundar hade högre än mätbart värde med använd mätmetod blir resultaten något svårtolkade. Resultaten innebär också att 63 av studiens 65 hundar har eller misstänks ha BPH. Det kan bero på fel på testet eller genomförandet, men mest troligt är att testet med dess resultat är sant vilket gör att studiepopulationen blir mer intressant. Studiepopulationen består av berner sennen vilket är en ras som har visat sig vara överrepresenterad i förekomst av BPH och andra prostataproblem (Agria försäkringsdata –Rasstatistik 2018). Det behöver inte ge kliniska tecken vilket kan förklara att endast 2 av 65 har nämnt eventuella kliniska tecken i anamnestagandet. Om resultaten tas för sanna bör slutsats dras att BPH hos berner sennen troligtvis är vanligt förekommande. Då få verkar få kliniska tecken, samt att inga tydliga kopplingar ses till nedsatt fertilitet får vidare undersökningar svara på huruvida det är ett problem som rasen påverkas märkbart av. Då rasen har andra sjukdomar att ta hänsyn till inom aveln i nuläget kanske BPH är något som får stå tillbaka till förmån för en större avelsdatas.

Likt tidigare studier ses här att stigande ålder ger en ökad koncentration CPSE. Ett mer signifikant p-värde sågs vid korrelation av CPSE och förekomst av erythrocyter i sperma. I en hanhunds förhud finns ofta leukocyter vilket kan kontaminera ett ejakulat vid samling. Erythrocyter kanske däremot oftare kommer endast från prostata vilket kan förklara det signifikanta värdet i studien.

Sammantaget öppnar detta för vidare undersökningar av prostata hos berner sennen, där ultraljud vore en intressant mätmetod. Kanske har berner sennen normalt en högre koncentration CPSE i blod och kan inte jämföras med referensintervall för andra raser. Kanske är det en ras som generellt åldras tidigare än andra raser och då kan BPH ses som en "normal" åldersförändring hos just dessa.

Inga signifikanta resultat sågs avseende vikt eller hullbedömning korrelerat med någon av de mätta nivåerna i serum.

Gällande spermakvalitet var motilitet och morfologi sett till denna studiepopulationens medelvärde lägre än normalt. Stora variationer sågs inom studiepopulationen. Andelen normala spermier låg i snitt på <50%, där ett normalt ejakulat bör ha >70 % normala spermier. Ingen signifikant korrelation fanns mellan andelen normala spermier och testosteron, SHBG, FAI eller koncentration CPSE, även om vissa mönster framkom vid enklare jämförelse när endast plottar de olika faktorerna.

6. Slutsats

Sammanfattningsvis konstateras att FAI korrelerar signifikant med ålder till skillnad från testosteron och SHBG för sig. Detta innebär att FAI eventuellt kan tolkas som ett mer säkert mätvärde än testosteron och SHBG var för sig, dock säger det lite om mätmetodens värde för utvärdering av fritt testosteron eftersom inga studier är gjorda på det. CPSE ses stiga signifikant hos hundar med ökad ålder samt finnas i högre koncentration i serum vid förekomst av erytrocyter i ejakulatet.

Inga signifikanta resultat ses avseende korrelationer mellan testosteron, SHBG, FAI eller CPSE och spermakvalitet. En större studiepopulation hade eventuellt kunnat ge signifikanta resultat, alternativt en jämförande analys med en studiepopulation bestående av en annan ras.

Berner sennen har enligt data från Agria visat sig oftare än andra raser ha problem med sin prostata. I studien sågs höga värden av CPSE hos flertalet hundar, vilket bör tolkas som att prostatopatologier som BPH finns i ökad förekomst hos denna ras jämfört med hundar generellt. Detta har visats i tidigare studier. Även om få av hundarna i studien hade symtom av sin prostata kan det vara ett besvär som kommer förvärras med vidare avel för rasen. Ultraljudsundersökningar av prostatan rekommenderas i studier över prostata för att få säkrare data att analysera.

I denna studie finns inte tillräckligt stöd för att motivera analyser av CPSE, testosteron, SHBG och FAI för att utvärdera en hanhunds fertilitet. Vidare studier av faktorer relaterade till hanhundars fertilitet är viktiga för att möjliggöra en bred avelsbas.

Referenser

- Agria försäkringsdata – Rasstatistik (2018). *Berner Sennenhund*. Agria Breed Profiles Veterinärvård 2011-2016
- Alukal, J.P. & Lepor, H. (2016). Testosterone deficiency and the prostate. *Urologic Clinics of North America*, vol. 43 (2), ss. 203–208 (Hypogonadism)
- Aquino-Cortez, A., Pinheiro, B.Q., Silva, H., Lima, D., Silva, T., Souza, M.B., Viana, D.A., Xavier Júnior, F., Evangelista, J., Brandão, F.Z. & Silva, L. (2017). Serum testosterone, sperm quality, cytological, physicochemical and biochemical characteristics of the prostatic fraction of dogs with prostatomegaly. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, vol. 52 (6), ss. 998–1003
- Araujo, A.B. & Wittert, G.A. (2011). Endocrinology of the aging male. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 25 (2), ss. 303–319
- Aryal, M., Pandeya, A., Bas, B.K., Lamsal, M., Majhi, S., Pandit, R., Agrawal, C.S., Gautam, N. & Baral, N. (2007). Oxidative stress in patients with benign prostate hyperplasia. *JNMA; Journal of the Nepal Medical Association*, vol. 46 (167), ss. 103–106
- Aydin, A., Arsova-Sarafinovska, Z., Sayal, A., Eken, A., Erdem, O., Erten, K., Ozgök, Y. & Dimovski, A. (2006). Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clinical Biochemistry*, vol. 39 (2), ss. 176–179
- Bell, F.W., Klausner, J.S., Hayden, D.W., Lund, E.M., Liebenstein, B.B., Feeney, D.A., Johnston, S.D., Shivers, J.L., Ewing, C.M. & Isaacs, W.B. (1995). Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 9 (3), ss. 149–153
- Berry, S.J., Coffey, D.S. & Ewing, L.L. (1986). Effects of aging on prostate growth in beagles. *The American Journal of Physiology*, vol. 250 (6 Pt 2), ss. R1039-1046
- Christensen, B.W. (2018). Canine prostate disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 48 (4), ss. 701–719 (Small Animal Theriogenology)
- Dalmazzo, A., Losano, J.D.A., Angrimani, D.S.R., Pereira, I.V.A., Goissis, M.D., Francischini, M.C.P., Lopes, E., Minazaki, C.K., Blank, M.H., Cogliati, B., Pereira, R.J.G., Barnabe, V.H. & Nichi, M. (2019). Immunolocalisation and expression of oxytocin

- receptors and sex hormone-binding globulin in the testis and epididymis of dogs: correlation with sperm function. *Reproduction, Fertility, and Development*, vol. 31 (9), ss. 1434–1443
- Ding, G.-L., Liu, Y., Liu, M.-E., Pan, J.-X., Guo, M.-X., Sheng, J.-Z. & Huang, H.-F. (2015). The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology*, vol. 17 (6), ss. 948–953
- England, G.C.W., Russo, M. & Freeman, S.L. (2013). The bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions. *The Veterinary Journal*, vol. 195 (2), ss. 179–184
- Erenpreiss, J., Hlevicka, S., Zalkalns, J. & Erenpreisa, J. (2002). Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *Journal of Andrology*, vol. 23 (5), ss. 717–723
- Feldman, E.C. & Nelson, R.W. (2003). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Elsevier Health Sciences.
- Flores, R.B., Angrimani, D., Rui, B.R., Brito, M.M., Abreu, R.A. & Vannucchi, C.I. (2017). The influence of benign prostatic hyperplasia on sperm morphological features and sperm DNA integrity in dogs. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, vol. 52 Suppl 2, ss. 310–315
- García-Cruz, E. & Alcaraz, A. (2020). Síndrome de déficit de testosterona: diagnóstico y tratamiento. *Actas Urológicas Españolas*, vol. 44 (5), ss. 294–300 (Medicina sexual del varón Ibero-Americano: cirugía protésica, hipogonadismo e infertilidad)
- Goldman, A.L., Bhasin, S., Wu, F.C.W., Krishna, M., Matsumoto, A.M. & Jasuja, R. (2017). A reappraisal of testosterone's binding in circulation: physiological and clinical implications. *Endocrine Reviews*, vol. 38 (4), ss. 302–324
- Hammes, A., Andreassen, T.K., Spoelgen, R., Raila, J., Hubner, N., Schulz, H., Metzger, J., Schweigert, F.J., Lupp, P.B., Nykjaer, A. & Willnow, T.E. (2005). Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell*, vol. 122 (5), ss. 751–762
- Hammond, G.L. (2011). Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biology of Reproduction*, vol. 85 (3), ss. 431–441
- Heráček, J., Sobotka, V., Kolátorová, L., Kočárek, J. & Hampl, R. (2018). Serum and intratesticular sex steroids in azoospermic men: how do they correlate? *Physiological Research*, vol. 67 (Suppl 3), ss. S521–S524
- Hesser, A., Darr, C., Gonzales, K., Power, H., Scanlan, T., Thompson, J., Love, C., Christensen, B. & Meyers, S. (2017). Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility. *Theriogenology*, vol. 87, ss. 115–123
- Holst, B.S., Holmroos, E., Friling, L., Hanås, S., Langborg, L.-M., Franko, M.A. & Hansson, K. (2017). The association between the serum concentration of canine prostate specific esterase (CPSE) and the size of the canine prostate. *Theriogenology*, vol. 93, ss. 33–39

- Huhtaniemi, I. (2018). Mechanisms in endocrinology: Hormonal regulation of spermatogenesis: mutant mice challenging old paradigms. *European Journal of Endocrinology*, vol. 179 (3), ss. R143–R150
- Jarow, J.P., Wright, W.W., Brown, T.R., Yan, X. & Zirkin, B.R. (2005). Bioactivity of androgens within the testes and serum of normal men. *Journal of Andrology*, vol. 26 (3), ss. 343–348
- Keevil, B.G. & Adaway, J. (2019). Assessment of free testosterone concentration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 190, ss. 207–211
- Kolster, K.A. (2018). Evaluation of canine sperm and management of semen disorders. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, vol. 48 (4), ss. 533–545
- Krakowski, L., Wąchocka, A., Brodzki, P., Wrona, Z., Piech, T., Wawron, W. & Chałabis-Mazurek, A. (2015). Sperm quality and selected biochemical parameters of seminal fluid in dogs with benign prostatic hyperplasia. *Animal Reproduction Science*, vol. 160, ss. 120–125
- Lévy, X., Nizański, W., von Heimendahl, A. & Mimouni, P. (2014). Diagnosis of common prostatic conditions in dogs: an update. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, vol. 49 Suppl 2, ss. 50–57
- Martins, M.I.M., Souza, F.F. de, Oba, E. & Lopes, M.D. (2006). The effect of season on serum testosterone concentrations in dogs. *Theriogenology*, vol. 66 (6), ss. 1603–1605 (Basic and Applied Research on Domestic, Exotic and Endangered Carnivores)
- Meeker, J.D., Godfrey-Bailey, L. & Hauser, R. (2007). Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *Journal of Andrology*, vol. 28 (3), ss. 397–406
- O'Donnell, L., McLachlan, R.I., Wreford, N.G., de Kretser, D.M. & Robertson, D.M. (1996). Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, vol. 55 (4), ss. 895–901
- Oehninger, S. & Ombelet, W. (2019). Limits of current male fertility testing. *Fertility and Sterility*, vol. 111 (5), ss. 835–841
- Pinheiro, D., Machado, J., Viegas, C., Baptista, C., Bastos, E., Magalhães, J., Pires, M.A., Cardoso, L. & Martins-Bessa, A. (2017). Evaluation of biomarker canine-prostate specific arginine esterase (CPSE) for the diagnosis of benign prostatic hyperplasia. *BMC Veterinary Research*, vol. 13 (1), s. 76
- Polisca, A., Troisi, A., Fontaine, E., Menchetti, L. & Fontbonne, A. (2016). A retrospective study of canine prostatic diseases from 2002 to 2009 at the Alfort Veterinary College in France. *Theriogenology*, vol. 85 (5), ss. 835–840

- Pugeat, M., Nader, N., Hogeveen, K., Raverot, G., Déchaud, H. & Grenot, C. (2010). Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver: drugs and the metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 316 (1), ss. 53–59
- Ramachandran, S., Hackett, G.I. & Strange, R.C. (2019). Sex hormone binding globulin: a review of its interactions with testosterone and age, and its impact on mortality in men with type 2 diabetes. *Sexual Medicine Reviews*, vol. 7 (4), ss. 669–678
- Rastrelli, G., Corona, G., Cipriani, S., Mannucci, E. & Maggi, M. (2018). Sex hormone-binding globulin is associated with androgen deficiency features independently of total testosterone. *Clinical Endocrinology*, vol. 88 (4), ss. 556–564
- Rastrelli, G., Corona, G., Vignozzi, L., Maseroli, E., Silverii, A., Monami, M., Mannucci, E., Forti, G. & Maggi, M. (2013). Serum PSA as a predictor of testosterone deficiency. *The Journal of Sexual Medicine*, vol. 10 (10), ss. 2518–2528
- Salas-Huetos, A., Maghsoumi-Norouzabad, L., James, E.R., Carrell, D.T., Aston, K.I., Jenkins, T.G., Becerra-Tomás, N., Javid, A.Z., Abed, R., Torres, P.J., Luque, E.M., Ramírez, N.D., Martini, A.C. & Salas-Salvadó, J. (2020). Male adiposity, sperm parameters and reproductive hormones: An updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Obesity Reviews*, vol. n/a (n/a). DOI: <https://doi.org/10.1111/obr.13082>
- Sjaastad, Ø.V., Hove, K. & Sand, O. (2016). *Physiology of Domestic Animals*. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Souza, F.F. de, Leme, D.P., Uechi, E., Trinca, L.A. & Lopes, M.D. (2004). Evaluation testicular fine needle aspiration cytology and serum testosterone levels in dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, vol. 41 (2), ss. 98–105 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Universidade de São Paulo.
- de Souza, M.B., England, G.C.W., Mota Filho, A.C., Ackermann, C.L., Sousa, C.V.S., de Carvalho, G.G., Silva, H.V.R., Pinto, J.N., Linhares, J.C.S., Oba, E. & da Silva, L.D.M. (2015). Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. *Theriogenology*, vol. 84 (5), ss. 805–810
- Svenska Sennenhundklubbens avelsråd (2018). *Rasspecifik avelsstrategi RAS för Berner Sennen*. Svenska kennelklubben hundägarnas riksorganisation. Tillgänglig: <https://www.skk.se/globalassets/dokument/rasdokument/ras-berner-sennenhund.pdf> [2020-11-30]
- Tesi, M., Sabatini, C., Vannozzi, I., Di Petta, G., Panzani, D., Camillo, F. & Rota, A. (2018). Variables affecting semen quality and its relation to fertility in the dog: A retrospective study. *Theriogenology*, vol. 118, ss. 34–39
- Walker, W.H. (2010). Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 365 (1546), ss. 1557–1569

- Wolf, K., Kayacelebi, H., Urhausen, C., Piechotta, M., Mischke, R., Kramer, S., Einspanier, A., Oei, C.H.Y. & Günzel-Apel, A. (2012). Testicular steroids, prolactin, relaxin and prostate gland markers in peripheral blood and seminal plasma of normal dogs and dogs with prostatic hyperplasia. *Reproduction in Domestic Animals = Zucht-hygiene*, vol. 47 Suppl 6, ss. 243–246
- Zirkin, B.R. (1998). Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 9 (4), ss. 417–421

Tack

Tack till handledare Bodil och biträdande handledare Ida som bidragit mycket och stöttat till utförandet av denna studie. Också tack till mina medstudenter i projektet. Framförallt ett stort tack till djurägare och hundar som ställt upp och deltagit i projektet.

Populärvetenskaplig sammanfattning

När hundar parar sig och tiken inte blir dräktig kan det bero på flera orsaker. För att ta reda på varför kan olika undersökningar av tiken respektive hanhunden göras. Gällande hanhunden brukar det göras en analys av sperman för att se om spermerna rör sig normalt, ser normala ut och finns i tillräcklig mängd. Det innebär att en veterinär manuellt stimulerar hanhunden för att samla sperma. I denna studie undersöks om analyser i blodprov kan ge kompletterande information eller att analyserna för sig själva kan hjälpa till att avgöra hur fertil en hanhund är.

Testosteron är hanliga däggdjurs viktigaste könshormon och bidrar till att bilda nya spermier, att bygga muskelmassa, att ge sexuell drift och förmågan att ejakulera. Testosteron finns i blodet där det cirkulerar och binder in till olika ställen i kroppen för att ge dessa förmågor, framför allt till testikeln och prostatan. Det kan vara bundet till ett bärarprotein, sex hormone bindning globuline (SHBG), som binder testosteron och därmed hindrar det att utgöra sin effekt i kroppen. För att veta hur stor del av testosteron i blod som är bundet respektive fritt kan man dela blodets koncentration av testosteron med blodets koncentration av SHBG, då får man ett free androgen index (FAI) (Hammes *et al.* 2005; Hammond 2011).

Prostata bidrar till ejakulatet genom att producera prostatavätska som blandas med spermier och tillsammans utgör sperman. Prostata är ett av testosterons främsta mål och bidrar till dess tillväxt och funktion. För att utvärdera hur prostata mår kan canine prostate specific esterase (CPSE), som bildas när prostata växer (Holst *et al.* 2017), mätas i blod.

I denna studie undersöktes om testosteron i blod kan användas för att utvärdera en hanhunds fertilitet. För att räkna ut den fria delen testosteron i blod, den aktiva delen, mättes också SHBG. För att få ett mått på prostatas välmående mättes CPSE. I ett spermaprov analyserades spermerna och detta jämfördes sedan med hanhundarnas testosteron-, SHBG- och CPSE-koncentration i blod för att leta samband.

Studiepopulationen utgjordes av 65 hanhundar av rasen berner sennen i olika åldrar. Djurägarna lämnade uppgifter om hälsostatus, sperma samlades och blodprov togs vid ett och samma tillfälle. Veterinär eller assistent mätte storleken på och undersökte hundarnas testiklar samt palperade prostata.

Enligt denna studie fanns det inte några säkra tecken på att testosteron i blod är kopplat till fertiliteten. Däremot har forskning sedan innan visat att en alldeles för låg koncentration testosteron ger upphörd produktion av spermier (O'Donnell *et al.*

1996), men så låga nivåer fanns inte hos hundarna som ingick i denna studie. I denna studie sågs med säkerhet att den obundna delen testosteron blir lägre med åldern, vilket kan påverka äldre hanhundar om testosteronkoncentrationen blir tillräckligt låg. CPSE sågs stiga med åldern, vilket betyder att prostatan blir större hos okastrerade hanhundar när de blir äldre. Att prostata blir större påverkar prostatavätskan och den delen av sperman som utgörs av densamma. Det har man tidigare sett påverkar spermierna negativt. Andra studier har visat samband mellan specifika kvaliteter hos spermierna och koncentrationen av testosteron och CPSE i blod (Krawski *et al.* 2015; Flores *et al.* 2017). Liknande effekter kunde anas i denna studie, men dessa kunde inte säkerställas matematiskt.

Slutsatsen som dras från denna studie är att mätning av testosteron i blod inte bidrar till att utvärdera en hanes fertilitet. Däremot kan studien fastslå att det kan vara bättre att använda sig av den obundna koncentrationen testosteron än den totala koncentrationen när en hanhunds testosteronkoncentration ska utvärderas.

Bilaga 1



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper
Projekt: Fruktsamhet hos Berner-sennen hanar

REMISS

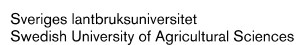
Uppgifter om Provtagningen (fylls i av veterinären)

Datum för provtagning:	Namn på hund (journaletikett):
Provmaterial: Spermaprov Serumrör EDTA-rör	ID:
Volym ejakulat:	Bedömning av motilitet av spermier i mikroskop (%):
Färg ejakulat:	Övriga anteckningar (ex om problem vid samling) :
Hull (1-9):	Vikt:
Klinisk undersökning (efter spermasamling): Palpation testiklar; diameter (båda): _____ dia sin: _____ dia dx: _____ höjd sin: _____ höjd dx: _____ tjocklek sin: _____ tjocklek dx: _____ konsistens sin: _____ konsistens dx: _____ (mjuk, normal, hård, annat) Palpation prostata; Smärtar Ja Nej Avvikande konsistens Ja Nej Symmetri Ja Nej Storlek Ja Nej	
Provtagare:	Telefon:
Veterinärklinik:	Ort:
_____ [Ort och Datum] [Underskrift] [Namnförtydligande/Stämpel]	

Proverna skickas till SLU, KV-lab Box 7054, 750 07 Uppsala
Ref: "Fruktsamhet hos Berner sennen hanar"

Kontaktinformation:
Bodil Ström Holst
Ida Hallberg

2 (2)

**PROVTAGNINGSPERSON - REMISS**

Registrerat namn (kallas):	Reg. Nr:
Chipnummer eller tatuering:	Född:
Avelshistorik: Aldrig gått i avel Planerad att gå i avel i framtiden Har gått i avel: Tidigare parade tikar, antal: _____ Lämnat kullar, antal: _____ Antal valpar, totalt: _____	Behandlad med hormonpreparat (t.ex kemisk kastrering): Ja, datum: _____ preparat: _____ Nej
Specifika hälsofrågor: Problem med urinering (kissar länge, blod, droppar urin): Ja, Nej Problem med avföring (platt avföring, svårt att bajsas, blod): Ja, Nej Övrigt: _____	Behandling historik: Aldrig behandlad med läkemedel Behandlad med fästingprofylax senaste 12 månaderna Typ: _____ Datum: _____ Annan läkemedelsbehandling Typ: _____ Datum: _____
Övrig information (t.ex gällande avelshistorik, medicinsk historik):	

Kontaktinformation:
Bodil Ström Holst
Ida Hallberg
hanhundsforskning@slu.se

1 (2)