



AMH i serum och seminalplasma hos hund

- association till spermakvalitet

*AMH in serum and seminal plasma in dogs
- association with semen quality*

Hannah Olsson

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



AMH i serum och seminalplasma hos hund – association till spermakvalitet

AMH in serum and seminal plasma in dogs – association with semen quality

Hannah Olsson

Handledare:	Bodil Ström Holst, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare:	Ida Hallberg, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator:	Ragnvi Hagman, 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:	Hannah Olsson
Nyckelord:	AMH, Anti-Müllerskt hormon, hund, berner sennen, spermakvalitet, spermiemotilitet, spermiemorfologi

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Avdelningen för reproduktion

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/>.

☒ 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

Anti-Müllerskt hormon (AMH) har föreslagits som en biomarkör för spermakvalitet, eftersom hormonet produceras av sertolicellen som stödjer spermiernas utveckling. Förändringar i produktion av AMH antas kunna visa på nedsatt funktion i sertolicellen, och på så sätt nedsatt funktion i spermiutvecklingen. Hittills har ingen forskning om AMH som kvalitetsmarkör för sperma utförts på hundar. Som en del i ett större projekt undersöks i det här arbetet om koncentrationer av AMH i serum och seminalplasma kan kopplas till andra markörer för spermakvalitet. I den här studien utfördes en andrologisk undersökning inkluderande ett spermaprov och ett blodprov för hormonanalys på 65 hanhundar av rasen berner sennen. Multipel linjär regressionsanalys utfördes för att undersöka samband mellan koncentrationen av AMH och olika parametrar hos hundarna. Vi fann att koncentrationen av AMH i serum stiger med hundarnas ålder. Dessutom var AMH-koncentrationen kopplad till spermiemotilitet och andel spermier med defekt morfologi, och specifikt spermier med huvuddefekter. Högre koncentrationer av hormonet i serum var associerat med lägre motilitet och fler morfologiskt defekta spermier. Vi fann ingen koppling mellan koncentrationen av AMH i serum och testikelstorleken eller det totala antalet spermier per ejakulat. Hos 16 av hundarna undersöktes koncentrationen av AMH i seminalplasma, och hormonet var odetekterbart i alla 16 prover. Sammantaget finns indikationer på att koncentrationen av AMH i serum kan användas som markör för spermiemotilitet och andelen spermier med defekta huvudformer.

Nyckelord: AMH, Anti-Müllerskt hormon, hund, berner sennen, spermakvalitet, spermiemotilitet, spermiemorfologi

Abstract

Anti-Müllerian hormone (AMH) has been proposed as a biomarker for semen quality, since the hormone is produced by the Sertoli cell which also supports the development of sperm. Changes in production of AMH are suggested to predict decreased function in the Sertoli cell, and by that a decreased function in sperm development. To this date, there is no published research investigating if AMH could be used as a marker of quality of sperm in dogs. In the present study, as a part of a project investigating fertility in male Bernese mountain dogs, concentrations of AMH were measured in serum and seminal plasma and correlated to parameters of quality of sperm. In this study 65 male Bernese mountain dogs were andrologically examined, including semen sampling and a blood sample for hormone analysis. Multiple linear regression analysis was performed to analyse correlations between concentrations of AMH and various parameters in the dogs. We found that the AMH concentration increases with the age of the dogs. Concentration of AMH in serum was correlated to sperm motility and percentage of sperm with defect morphology, specifically defects in the head region of the sperm. High concentrations of AMH in serum was associated with lower percentage of motile sperm and higher percentage of defect sperm. We were not able to find any correlation between serum concentrations of AMH and testicular volume or total number of sperm per ejaculate. In 16 of the dogs concentrations of AMH were measured in seminal plasma, and the hormone was undetectable in all 16 samples. In conclusion there are indications that AMH could be used as a biomarker for sperm motility and percentage of sperms with defects in the head region.

Keywords: AMH, Anti-Müllerian hormone, dog, Bernese mountain dog, quality of sperm, motility of sperm, morphology of sperm

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	9
Figurförteckning	10
Förkortningar	11
1. Inledning	13
2. Litteraturoversikt	14
2.1. Hanlig reproduktionsfysiologi	14
2.1.1. Spermatogenesis.....	14
2.1.2. Hormonell reglering av spermatogenesis.....	15
2.1.3. Bitestikeln.....	15
2.1.4. Sertolicellen och blod-testis-barriären	16
2.2. Spermakvalitet hos hund	18
2.2.1. Vanliga defekter hos hund	18
2.2.2. Fertilitetsproblem hos berner sennen	19
2.3. AMH – Anti-Müllerskt hormon	19
2.3.1. Hormonets funktion hos hanar respektive honor i olika åldrar	20
2.3.2. Kliniska applikationer av AMH hos hund	22
2.3.3. Kunskap om kopplingen mellan AMH och spermakvalitet	22
3. Material och metoder	24
3.1. Studiepopulation	24
3.2. Provsamling och anamnesformulär	24
3.3. Provhantering och spermaanalys	25
3.4. Analys av AMH i serum och seminalplasma	26
3.5. Statistiska analyser	27
3.6. Etiskt tillstånd och litteratursökning	27
4. Resultat.....	28
4.1. Deskriptiv statistik	28
4.2. Deskriptiv statistik för testikelstorlek.....	29
4.3. Validering av testikelmätning	29
4.4. AMH i seminalplasma.....	31
4.5. AMH i serum	32

5. Diskussion.....	37
Referenser.....	41
Tack	46
Populärvetenskaplig sammanfattning	47
Bilaga 1.....	49
Bilaga 2.....	50
Bilaga 3.....	51
Bilaga 4.....	52
Bilaga 5.....	53

Tabellförteckning

Tabell 1. Deskriptiv statistik: anamnes och undersökning	28
Tabell 2. Deskriptiv statistik: spermiebedömning	28
Tabell 3. Deskriptiv statistik över testikelstorlek	29
Tabell 4. Variationskoefficient mellan olika personers mätningar	30
Tabell 5. Variationskoefficient mellan samma persons upprepade mätningar	30
Tabell 6. Data för de 16 hundar där koncentrationen av AMH mättes i seminalplasman	32
Tabell 7. Lista över deltagande kliniker och antalet provtagna hundar per klinik	50

Figurförteckning

Figur 1. Relationen mellan uppmätt diameter och uppskattad volym	31
Figur 2. Koncentration av AMH i serum (ng/ml)	33
Figur 3. Relationen mellan ålder och AMH-koncentration (ng/ml)	34
Figur 4. Relationen mellan testiklarnas storlek (diametern mätt i mm) och koncentrationen av AMH i serum (ng/ml)	34
Figur 5. Relationen mellan AMH-koncentration (ng/ml) och spermimotoilitet (%)	35
Figur 6. Relationen mellan AMH-koncentration (ng/ml) och andel spermier med normal morfologi (%).....	35
Figur 7. Relationen mellan AMH-koncentration (ng/ml) och andel spermier med defekta huvudformer (%).....	36
Figur 8. Relationen mellan AMH-koncentration (ng/ml) och totalantal spermier per ejakulat (miljarder)	36
Figur 9. Sambandet mellan andel spermier med normal morfologi (%) och koncentrationen av AMH i serum (ng/ml)	49
Figur 10. Formulär kring hundens hälsa och avelshistorik som ägaren fyllde i	51
Figur 11. Formulär för provtagningen som provtagande veterinär fyllde i	52
Figur 12. Sambandet mellan testikelns diameter, höjd respektive tjocklek och den uppskattade volymen. Höger testikel.	53
Figur 13. Sambandet mellan testikelns diameter, höjd respektive tjocklek och den uppskattade volymen. Vänster testikel.	53

Förkortningar

AMH	Anti-Müllerskt hormon
CV	Variationskoefficient, Coefficient of Variation
FSH	Follikel-stimulerande hormon
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
SShK	Svenska Sennenhundklubben
RAS	Rasspecifik avelsstrategi
TMB	Tetrametylbenzidin

1. Inledning

Hundar av rasen berner sennen har sedan en tid haft fertilitetsproblem och detta har uppmärksammats av rasklubben för sennenhundar (Svenska sennenhundklubben, SShK). Det här arbetet är ett delprojekt i en större genomgång av hanlig fruktsamhet i rasen som initierades av rasklubben, och här undersöks om ett hormon som produceras i testiklarna kan användas som markör för hanlig fertilitet. Hormonet heter Anti-Müllerskt hormon (AMH) och det börjar hos hanar produceras under fosterstadiet (Josso *et al.* 2001) då det inducerar regression av de Müllerska gångarna (Allard *et al.* 2000). AMH produceras av sertolicellerna i testiklarna och utsöndras i hög grad till blodet fram till puberteten då en mognad av sertolicellerna sker, varefter AMH-utsöndringen till stor del riktas om till lumen i tubuli seminiferi hos människa (Rey *et al.* 2003). AMH har föreslagits som potentiell biomarkör för hanlig fruktsamhet eftersom sertolicellen är helt avgörande för att spermier ska bildas (Sharpe *et al.* 2003) och AMH hos hanar endast produceras i sertolicellen (Rey *et al.* 2003). Flera studier på människa har påvisat samband mellan koncentrationen av AMH i seminalplasma och spermakvalitet, så som spermie-koncentration, totalt antal spermier och spermimotoilitet (Fujisawa *et al.* 2002; Mostafa *et al.* 2007; Andersen *et al.* 2016), och en studie har även påvisat ett samband mellan koncentrationen av AMH i serum och andel morfologiskt avvikande spermier (Aksglaede *et al.* 2018).

Till dags dato finns ingen publicerad forskning som relaterar koncentration av AMH, varken i serum eller seminalplasma, till spermakvalitet hos hund. Det finns inte heller någon publicerad forskning om uppmätta koncentrationer av AMH i seminalplasma hos hund. I denna studie undersöktes hanhundar av rasen berner sennen med avseende på koncentration av AMH i serum och, som pilotprojekt, i seminalplasma. Detta korrelerades till ett antal fruktsamhetsfaktorer, så som totalantalet spermier, andel spermier med avvikande morfologi, spermimorfologi och testikelstorlek.

Hypotesen som undersöktes i denna studie var att AMH kan fungera som en biomarkör associerad med spermakvalitet. Detta undersöktes genom att analysera om koncentrationen av AMH i serum eller seminalplasma var relaterad till totalt antal spermier, spermimotoilitet eller någon specifik morfologisk spermiedefekt. Dessutom undersöktes om hundens ålder, vikt eller testikelstorlek var relaterad till serumkoncentrationen av AMH.

2. Litteraturöversikt

2.1. Hanlig reproduktionsfysiologi

Spermier bildas i tubuli seminiferi i testiklarna och processen som leder till bildandet av mogna spermier kallas spermatogenes (Sjaastad *et al.* 2010). Spermatogonierna (stamcellerna till spermierna) ligger vid basallamina, alltså i ytterkanten, av tubuli seminiferi (Sjaastad *et al.* 2010). De omges av sertoliceller som ger stöd åt spermatogenesen, både mekaniskt stöd åt spermatozoerna som är under utveckling och näring till de färdiga spermatozoerna i lumen av tubuli seminiferi (Chłopik & Wysokińska 2020). Sertolicellerna är även viktiga för regleringen av spermatogenesen. I vävnaden runt tubuli seminiferi finns leydigceller som bland annat producerar de viktiga androgenerna, framför allt testosteron, som stimulerar produktionen av spermatozoer, samt har en viktig funktion för utvecklingen av hanliga könskaraktäristika (Sjaastad *et al.* 2010). Spermatozoerna transporteras sedan via tubuli till bitestikeln (epididymis), där mognad och lagning av spermatozoerna sker (Oettlé 1990). Vid kopulering och ejakulation transporteras spermatozoerna genom sädesledaren till uretra, där de blandas med näringsrika vätskor från de accessoriska könskörtlarna (Sjaastad *et al.* 2010). Hundar har en accessorisk könsörtel, prostatan. Spermierna och seminalplasma från de accessoriska könskörtlarna kallas sperma. Sperman deponeras i de honliga könsorganen (Sjaastad *et al.* 2010) och där sker en kapacitering av spermierna, vilket innebär den sista mognaden av spermien (Oettlé 1990).

2.1.1. Spermatogenesen

Spermatogenesen kan delas in i tre stadier: spermatocytogenes, spermiogenes och spermiering (Chłopik & Wysokińska 2020). Under spermatocytogenesen sker mitotisk delning av stamcellerna, spermatogonierna, som i slutänden ger upphov till spermier (Oettlé 1990). Spermatogonierna delar sig kontinuerligt och ger fram till puberteten upphov till två nya identiska spermatogonier (Sjaastad *et al.* 2010). Efter puberteten ger varje celldelning upphov till en ny spermatogonie och en primär spermatocyt. Den primära spermatocyten genomgår meios och bildar sekundära

spermatocyter, som sedan genomgår en andra meios vilket då ger upphov till spermatider (Oettlé 1990). Mognadsprocessen av spermatiderna kallas spermiogenes och innebär att spermatiderna genomgår morfologiskt viktiga utvecklingssteg (Oettlé 1990). Det sista steget, spermieringen, innebär att de mogna spermatiderna frigörs från mellanrummet mellan sertolicellerna till lumen av tubuli seminiferi, och blir då spermatozoer (Chłopik & Wysokińska 2020).

2.1.2. Hormonell reglering av spermatogenesen

Den hormonella regleringen av det reproduktiva systemet sker via hypotalamus-hypofys-gonad-axeln (Sjaastad *et al.* 2010). I hypotalamus bildas Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), som transporteras via blodkärl direkt till hypofysen, där GnRH stimulerar bildandet av FSH och LH (Chłopik & Wysokińska 2020). De två hormonerna stimulerar i sin tur gonaderna och kontrollerar spermatogenesen (Oettlé 1990). LH stimulerar bildandet av androgener, framför allt testosteron, i Leydigcellerna (Petersen & Söder 2006). FSH tillsammans med testosteron är viktigt för spermatogenes (Sjaastad *et al.* 2010) och för sertolicellernas funktion (Chłopik & Wysokińska 2020). FSH, LH och androgenerna har en negativ feedback-verkan på produktionen av GnRH i hypotalamus, vilket innebär att höga nivåer av FSH, LH eller testosteron gör att hypotalamus minskar produktionen av GnRH (Sjaastad *et al.* 2010). Sertolicellerna producerar även aktivin och inhibin som påverkar utsöndringen av just FSH, där aktivin ökar utsöndringen av FSH och inhibin utövar negativ feedback på FSH-utsöndringen (Chłopik & Wysokińska 2020). Produktionen av aktivin respektive inhibin styrs av vilka steg av spermatogenesen sertolicellen för tillfället bistår.

2.1.3. Bitestikeln

Bitestikeln är viktig för mognaden av spermier (Chłopik & Wysokińska 2020). Spermien är inte motil och har inte förmågan att befrukta ett ägg när den antrar bitestikeln, utan först efter mognaden blir spermien motil och befruktningsduglig (Oettlé 1990). Ännu en viktig utveckling av spermien som sker i bitestikeln är att den proximala droppen som många gånger är en rest efter spermiogenesen migrerar distalt längs mittstycket för att slutligen försvinna (Chłopik & Wysokińska 2020). En hög andel proximala droppar på spermier i ejakulatet anses bero på morfologiska defekter på spermier, alltså defekter som uppkommer i testikeln (Rao *et al.* 1980), men också för snabb passage genom bitestikeln (Oettlé 1990). Dessutom packas kromatinet i kärnan ännu tätare under passagen genom bitestikeln, vilket gör spermiehuvudet mer kompakt (Chłopik & Wysokińska 2020). Spermiers livskraftighet bevaras i bitestikeln genom att minska dess metaboliska hastighet (Dacheux *et al.* 2016).

Bitestikeln har tre anatomiska regioner: caput, corpus och cauda epididymis och hos hundar tar det cirka 15 dagar för en spermie att passera bitestikeln (Chłopik & Wysokińska 2020). Bitestikeln har även en viktig funktion i att förvara spermier (Dacheux *et al.* 2016). Bitestikelfunktionen, framförallt förmågan att mogna spermier, är beroende av androgener (Oettlé 1990). Bitestikeln skapar en så fördelaktig miljö för spermier att de kan överleva flera dagar i bitestikeln även efter individens död (Dacheux *et al.* 2016).

2.1.4. Sertolicellen och blod-testis-barriären

Sertolicellen upptäcktes i mitten av 1800-talet av Enrico Sertoli (Petersen & Söder 2006). Sertolicellen är den första cellen som differentierar i den hanliga fetala gonaden, och börjar producera AMH för att initiera regression av förlagan till de hanliga könsorganen: Müllerska gångarna. AMH-genen är en av de första som uttrycks efter att sertolicellen differentierat (Sharpe *et al.* 2003). Tidigare har testiklarna ansetts vara inaktiva innan puberteten, men denna uppfattning har ändrats (Lukas-Croisier *et al.* 2003). Under prepubertalperioden är sertolicellerna visserligen omogna men de prolifererar i hög grad (Petersen & Söder 2006). Det finns en korrelation mellan koncentration av AMH i serum och antal fungerande sertoliceller hos prepubertala möss, och AMH antas kunna användas som ett mått på sertolicellernas proliferation hos prepubertala möss (Lukas-Croisier *et al.* 2003). Hos människa prolifererar sertolicellen under fosterstadiet, postnalt och under puberteten, men antalet sertoliceller verkar vara konstant under vuxenlivet (Cortes *et al.* 1987). Man anser att mogna sertoliceller (dvs. efter puberteten) saknar proliferativ kapacitet (Steinberger & Steinberger 1971; Oettlé 1990). Därför är det viktigt för god fertilitet att lyckas bilda tillräcklig mängd sertoliceller under den prepubertala tiden, när sertolicellerna fortfarande delar sig (Petersen & Söder 2006). När proliferationen sker är olika beroende på art; hos gnagare sker all proliferation av sertolicellerna kring fostertiden och neonatalt, medan hos rhesusapor sker den största delen av proliferation peripubertalt (Sharpe *et al.* 2003). Sammanlagda data verkar visa att de flesta arter har två proliferationsstadier; fetal/neonatal respektive peripubertalt, även om ena stadiet dominerar mer hos vissa arter och det fetala/neonatala stadiet är viktigast hos de flesta arter.

FSH stimulerar proliferation av sertolicellerna och även tyroidea-hormoner påverkar sertolicellerna, mest troligt genom interaktioner med FSH-receptorn (Petersen & Söder 2006). Hypothyroidism under den prepubertala perioden ger fler sertoliceller och större testiklar postpubertalt (Van Haaster *et al.* 1992), sannolikt som en konsekvens av att prepubertal hypothyroidism förlänger den proliferativa fasen (Sharpe *et al.* 2003). Ökade nivåer av T3 prepubertalt leder till motsatsen, det vill säga avstannad proliferation och tidigare mognad av sertolicellerna, mindre testiklar och lägre totalantal spermier (Petersen & Söder 2006).

Differentiering, eller så kallad funktionell mognad, av sertolicellen sker under puberteten, och testosteron (men även FSH) är viktigt för mognaden (Sharpe *et al.* 2003). Mognaden innebär att tight junctions bildas mellan sertolicellerna så att blod-testis-barriären upprättas (Petersen & Söder 2006), men också förlust av proliferativ förmåga och förändrad funktion hos cellerna (Sharpe *et al.* 2003). Blod-testis-barriären innebär att en barriär mellan blodkärl och tubuli seminiferi bildas, vilket möjliggör bildandet av optimala förhållanden för spermatogenesen i tubuli seminiferi (Chłopik & Wysokińska 2020). Den mogna sertolicellen reglerar alltså hur näringsämnen och tillväxtfaktorer flödar till de utvecklande spermatozoerna (Petersen & Söder 2006). Namnet till trots är den viktigaste gränsen den mellan de diploida (spermatogonier och spermatocyter) och de haploida könscellerna (spermatider och spermatozoer), och förutom att reglera flödet av näringsämnen skyddar barriären de haploida könscellerna från kroppens immunsystem. Utan, eller vid skada av, blod-testis-barriären finns risken att individen bildar autoantikroppar mot sina egna spermier, vilket kan leda till infertilitet (Oettlé 1990).

FSH är även viktigt för funktionen hos den mogna sertolicellen då hormonet påverkar dess proteinproduktion och i förlängningen spermatogenesen (Petersen & Söder 2006). Män som saknar receptorer för FSH på sertoliceller har mindre testiklar och har lägre totalantal spermier och högre andel morfologiskt defekta spermier (Tapanainen *et al.* 1997). Hastigheten och kvaliteten på spermatogenesen bestäms av antalet sertoliceller och deras funktion (Petersen & Söder 2006). En sertolicell stödjer ett visst, artspecifikt antal utvecklande könsceller, vilket innebär att antalet sertoliceller bestämmer antal producerade spermier och är helt avgörande för att spermier ska utvecklas (Sharpe *et al.* 2003; Petersen & Söder 2006). Testikelstorleken används ofta som ett grovt mått på antalet sertoliceller (Petersen & Söder 2006).

Den mogna sertolicellen har en parakrin roll, där tillväxtfaktorer och näringsämnen utsöndras antingen apikalt för att påverka de utvecklande spermatozoerna, eller basalt för att påverka celler i interstitiet (leydigceller) (Petersen & Söder 2006). Inhibin B har föreslagits som indikator på antalet sertoliceller, men nivåerna påverkas även av spermatogenesen, varför det inte är användbart som biomarkör för spermakvalitet hos den enskilde individen, utan snarare i så fall på populationsnivå (Sharpe *et al.* 2003). Istället föreslås en rad andra proteiner som biomarkör för antal och funktionell mognad av sertolicellen, och AMH är en av dem. Under puberteten (dvs. vid mognaden av sertolicellerna) sjunker AMH-produktionen och utsöndringen till blodet drastiskt hos människa och kvarvarande höga nivåer av AMH i blodet efter puberteten kan indikera omogna sertoliceller (Sharpe *et al.* 2003). Koncentrationen av AMH i serum hos människa skulle kunna avspegla hur testosteron inverkar på sertolicellen, där högre testosteronkoncentration ger lägre koncentration av AMH (Young *et al.* 1999).

2.2. Spermakvalitet hos hund

Det tar ungefär 61 dagar för en spermatogonie att utvecklas till en färdig spermie hos hund (Amann 1989). Sperman har lägre volym, lägre koncentration spermier och högre andel abnormala spermier kring åldern för könsmognaden jämfört med hos den vuxna hunden (Oettlé 1990). Författaren beskriver att seminalplasma är en del av sperman som till största delen består av sekret från prostata, men till viss del även innehåller sekretioner från bitestikeln och ductus deferens. Seminalplasman är normalt sett färglös, svagt sur och innehåller många proteolytiska enzymer. Oettlé (1990) menar att hundars sperma varierar stort i sammansättning, mycket på grund av de många olika raserna, men spermakompositionen kan också variera mycket mellan individer och samma individs olika ejakulat. Hundar ejakulerar sperman i tre fraktioner: första fraktionen som ofta är liten mängd, 0,5 ml, och har klar färg; andra fraktionen som till största delen innehåller spermatozoer, har gråvit färg, ofta 1-2 ml; och tredje fraktionen som är färglös eller klar, och har stor volym, ungefär 10 ml (Oettlé 1990). Första och tredje fraktionens sekretioner kommer från prostata (England *et al.* 1990), medan andra fraktionen alltså består av spermatozoer som har lagrats i bitestikeln (Oettlé 1990). Volymen av ejakulatet varierar mellan 0,5 och 15 ml beroende på hundens storlek (Oettlé 1990). Ejakulatets färg är normalt sett olika nyanser av gråvitt enligt Oettlé (1990), medan rosaröd missfärgning ansågs innebära inblandning av röda blodkroppar.

För att spermiemorfologin ska anses vara normal bör 60 % av spermerna ha normal morfologi (Oettlé 1993) och minst 60 -70 % av spermerna bör vara motila för att det ska anses normalt (Oettlé 1990).

Både undernäring och fetma inverkar negativt på spermatogenesisen, och feber kan orsaka dålig spermakvalitet (Oettlé 1990). Epididymit kan visa sig som leukospermi, färre antal spermier och/eller azospermi.

2.2.1. Vanliga defekter hos hund

Olika typer av morfologiska spermiedefekter hos hund enligt Oettlé (1990):

- Abnormaliteter i akrosomen
 - Ökad densitet
 - ”Ridges” eller cystor i akrosomen
 - Oregelbundet fördelat akrosomalt material
 - Patologisk eller fysiologisk nedbrytning av akrosomen
- Huvudfel
 - Makro- eller mikrocefali
 - Päronformat huvud
 - Kärnsäcksbildning
 - ”Ridge” eller dubbla kärnor
 - Dubbla huvuden

- Bizarra huvudformer
- Smala huvuden
- Huvud-bas-defekter
- Dekondensation av kärnan
- Lösa huvuden
- Mittstycksdefekter
 - Cytoplasmatiske droppar, proximala droppar
 - Distala droppar
 - Rupturerat mittstycke
 - Böjt mittstycke
- Svansdefekter
 - Ihoprullade svansar
 - Dubbla svansar
- Agglutination av spermier

Främmande celler som kan ses i ejakulatet är makrofager, spermiogenetiska celler, leukocyter och epitelceller (Oettlé 1990).

Azoospermi är benämningen på avsaknad av spermier i ejakulatet (World Health Organization 2010; Tesi *et al.* 2018). Oligozoospermi innebär att ejakulatet innehåller färre spermier än vad som anses normalt (World Health Organization 2010). Astenoospermi innebär att andelen motila spermier är under gränsen för det normala och teratoospermi är benämningen på tillstånd då andelen morfologiskt defekta spermier är över gränsen för det normala (World Health Organization 2010).

2.2.2. Fertilitetsproblem hos berner sennen

SShK har i sin Rasspecifika Avelsstrategi (RAS) satt upp ett mål om att nå minskade reproduktionsproblem inom rasen (Svenska Sennenhundklubbens avelsråd 2018). Enligt rapporten får berner sennen små kullar, drygt fem valpar per kull, vilket är relativt litet antal för en hund av denna storlek. Dessutom har rasen en låg dräktighetsprocent, ca 65 %, där förväntad dräktighetsprocent bör vara 10–15 procentenheter högre enligt rapporten.

2.3. AMH – Anti-Müllerskt hormon

AMH tillhör TGF-beta-familjen (transforming growth factor-beta-familjen), och produceras av somatiska celler i gonaderna, sertoliceller hos hanar (i testiklarna) respektive granulosa-celler hos honor (i äggstockarna) (Josso & di Clemente 1999). AMH är ett dimeriskt glykoprotein (Rey *et al.* 2003). Namnet AMH befästes som det mest använda istället för andra benämningar som MIS (Müllerian Inhibiting Substance) och MIF (Müllerian Inhibiting Factor) i en artikel av Josso *et al.* (1993).

2.3.1. Hormonets funktion hos hanar respektive honor i olika åldrar

Reproduktiva strukturer börjar utvecklas tidigt under fostrets utveckling (Sjaastad *et al.* 2010). Alla foster bildar både Wolfska gångar som sedan blir hanliga könsorgan, och Müllerska gångar som sedan blir honliga könsorgan (Rey *et al.* 2003). SRY-genen i Y-kromosomen styr gonaderna till att bli testiklar (Berta *et al.* 1990) och när de mognar börjar de bilda testosteron och AMH (Sjaastad *et al.* 2010). AMH påverkar de Müllerska gångarna att tillbakabildas tidigt i fosterstadiet hos hanliga foster, och hormonet är uppkallat efter denna första kända funktion hos foster (Josso *et al.* 2013). Vid avsaknad av de testikulära hormonerna testosteron och AMH, eller receptorer för hormonerna på målorganen, utvecklar fostret honliga inre och yttre genitalia (oavsett genetiskt kön) (Rey *et al.* 1999). Hos alla foster bildas receptorer för AMH i de Müllerska gångarna under en viss tid i fosterstadiet, men eftersom AMH bara bildas i testiklarna hos hanar under den tiden är det bara hos hanarna som Müllerska gångarna tillbakabildas (Rey *et al.* 2003). Reglering av produktion av AMH under fosterstadiet är viktig, så att endast hanar producerar hormonet under perioden då de Müllerska gångarna är mottagliga för hormonet (Josso *et al.* 2001).

Hanar

AMH börjar produceras tidigt i differentierande sertoliceller (dvs tidigt under fosterstadiet) hos hanar (Josso & di Clemente 1999). Efter att sertolicellen differentierats och befäst gonadens utveckling till testikel är AMH-genen en av de första som aktiveras (Petersen & Söder 2006). Regressionen av de Müllerska gångarna sker genom att AMH initierar apoptos av cellerna i de Müllerska gångarna (Allard *et al.* 2000). Regleringen av tillbakabildandet av de Müllerska gångarna är okomplicerad, endast liganden AMH och en receptor (AMH-typ II-receptorn) är involverade (Mishina *et al.* 1996). Produktionen av AMH är hög fram till puberteten hos människa (Josso & di Clemente 1999) och efter puberteten minskar produktionen av AMH (Josso *et al.* 2001). Under puberteten sker en mognad av sertolicellerna som hos människa bland annat innefattar en minskning av AMH-sekretion (Rey *et al.* 1993). I de tubuli seminiferi som först får meiotisk aktivitet i germinalcellerna upphör också AMH-produktionen först (Rey *et al.* 1996). Vid mognaden av sertolicellerna förstärks blod-testis-barriären med tight junctions, och frisättningen av AMH koncentreras därmed snarare mot lumen än basallamina, varför koncentrationen av AMH är högre i seminalplasma än serum hos postpubertala män (Fénichel *et al.* 1999). Den minskade produktionen av AMH i serum skulle kunna användas för att förutspå pubertetens start hos människa (Al-Attar *et al.* 1997). Även AMH-koncentrationen i serum hos tjurar sjunker vid puberteten (Rota *et al.* 2002). Ökade intratestikulära nivåer av testosteron sammanfaller i puberteten med nedregleringen av AMH-koncentration i serum (Young *et al.* 1999). Nedregleringen av AMH sker

innan koncentrationen av testosteron har stigit i serum, vilket befäster att det är det intratestikulära testosteronet som är viktigt för den minskade produktionen av AMH (Al-Attar *et al.* 1997). Samma studie visade att även meiotisk aktivitet bland germinalcellerna nedreglerar AMH-produktionen och att FSH ökar produktionen av AMH, både genom direkt ökad produktion och genom stimulering av proliferation av sertoliceller. Möss som genmanipulerats att inte producera FSH har innan puberteten lägre koncentration av AMH i serum, färre antal sertoliceller och mindre testikelvolym (Lukas-Croisier *et al.* 2003). Testosteron och meiotisk aktivitet i germinalcellerna nedreglerar alltså produktionen av AMH, medan FSH har en uppre-
glerande funktion (Rey 1998). Ytterligare studier beskriver att FSH stimulerar proliferation av sertoliceller, och att AMH-produktionen är som högst vid celledelning av sertoliceller (Rey 1998). Studier på möss har visat att sertolicellerna inte har receptorer för androgener förrän efter födseln, varför testosteron hos foster, som kan vara lika höga koncentrationer som under puberteten, inte påverkar AMH-produktionen (Al-Attar *et al.* 1997). AMH har en roll i att reglera Leydigcellernas proliferation och därmed androgensyntes (Al-Attar *et al.* 1997). Hos han-möss som producerar väldigt höga nivåer av AMH ses utvecklade Wolfska gångar och honliga externa genitalia, vilket är ett tecken på brist på testosteron, och avsaknad av Müllerska gångar, vilket antyder att AMH har inducerat tillbakabildning av de honliga interna könsorganen (Mishina *et al.* 1996). Dessa resultat kan bero på att höga nivåer av AMH nedreglerar produktionen av testosteron. AMH (tillsammans med testosteron) har visat sig värdefullt i diagnostiken kring intersex-personer, där analys av hormonet kan användas för att skilja mellan abnormal testikulär utveckling, dissocierad tubulär-interstitiell testikulär funktion och insensitivitet i målorgan (Rey *et al.* 1999). Koncentrationen av AMH i serum har sedan tidigare använts för att påvisa funktionell testikelvävnad, även i de fall inga palpabla gonader kan påvisas (Rey *et al.* 1999).

Honor

AMH produceras av granulosa-celler i äggstockarna (Josso & di Clemente 1999). Hormonet produceras i grova drag i låg grad från strax efter födseln till menopaus hos människa (Josso *et al.* 2001). Studier har visat att AMH-produktionen är större i små (pre-antrala) folliklar än i stora (antrala, utvecklade) folliklar (Fanchin *et al.* 2005a) och koncentrationen av AMH i serum är positivt korrelerat till antalet små antrala folliklar i äggstockarna (Fanchin *et al.* 2005b). Det sistnämnda kan användas som en markör för att förutsäga ovarialreserven (Rey *et al.* 2003). Höga koncentrationer av AMH i serum kan också användas diagnostiskt, som indikation på polycystiska äggstockar och granulosa-cellstumörer (Rey *et al.* 2003).

2.3.2. Kliniska applikationer av AMH hos hund

AMH kan användas vid undersökning för att utreda om en individ har gonader eller inte. Det kan exempelvis handla om misstänkt kvarvarande äggstocksrester efter kastration, eller en upphittad hund utan palpabla gonader. En tik som har detekterbara koncentrationer av AMH i serum har med stor sannolikhet äggstockar eller äggstocksrester (Turna Yilmaz *et al.* 2015; Alm & Holst 2018). Odetekterbara koncentrationer av AMH är dock svårare att tolka som ensam parameter, eftersom även intakta tikar kan ha odetekterbara koncentrationer av AMH (Alm & Holst 2018). Kryptorkida hanhundar har signifikant högre koncentration av AMH i serum jämfört med hanar med skrotala testiklar (Hornakova *et al.* 2017), och odetekterbara koncentrationer av AMH tyder på avsaknad av testikelvävnad (Holst 2017).

För att diagnostisera testikeltumörer hos hanhundar kan AMH användas då individer med sertolicellstumörer har signifikant högre koncentration av AMH i serum jämfört med friska, intakta hanhundar och hundar med annan testikelpatologi (Holst & Dreimanis 2015). Tidigare studier har visat att AMH uttrycks i hög grad i sertolicellstumörer (Banco *et al.* 2012).

2.3.3. Kunskap om kopplingen mellan AMH och spermakvalitet

Hos människa

Flertalet studier har utförts på kopplingen mellan AMH och spermakvalitet hos människa. Ett fåtal har undersökt samband mellan koncentrationen av AMH i serum och parametrar för spermakvalitet, de flesta har undersökt korrelation mellan AMH-koncentrationen i seminalplasman och spermakvalitet.

Hög koncentration av AMH i serum har associerats med högre andel morfologiskt defekta spermier (Aksglaede *et al.* 2018). Testikelvolymen var större i gruppen med högst koncentration av AMH i serum, och högre AMH-koncentration var också korrelerat till lägre kroppsvikt och lägre BMI (Aksglaede *et al.* 2018). En studie fann inget samband mellan koncentrationen av AMH i serum och spermakvalitet (Kucera *et al.* 2016). En tredje studie menar att koncentrationen av AMH i serum var lägre hos män med nedsatt spermakvalitet (Goulis *et al.* 2008).

Hos människa har det beskrivits ett positivt samband mellan koncentrationen av AMH i seminalplasman och spermie-koncentrationen, totalt antal spermier i ejakulatet och spermimotoilitet (Andersen *et al.* 2016). Ännu en studie fann positivt samband mellan AMH-koncentrationen i seminalplasma och testikelvolym, totalantal spermier och andel motila spermier (Mostafa *et al.* 2007). Samma studie fann en negativ korrelation mellan AMH i seminalplasma och andel morfologiskt avvikande spermier. En tredje studie fann också positivt samband mellan koncentrationen av AMH i seminalplasma och testikelvolym och spermie-koncentration, samt signifikant lägre AMH i seminalplasman hos män med oligozoospermi (Fu-

jisawa *et al.* 2002). Ännu en studie har visat att män med oligozoospermi har signifikant lägre koncentration av AMH i seminalplasman (Kucera *et al.* 2016). Ytterligare en studie har visat att män med normal sperma har signifikant högre koncentration av AMH i seminalplasma jämfört med män med subfertilitet (Fénichel *et al.* 1999).

Andra djurslag

AMH är mätbart i både serum och seminalplasma hos häst och åsna (Claes *et al.* 2013; Holst *et al.* 2020). Studien om hästar inkluderade ingen jämförelse med spermakvalitet, men det gjorde studien om åsnor. De studerade förändringar runt puberteten och påvisade inget samband mellan koncentrationen av AMH i serum eller seminalplasma och spermakvalitet, utöver en positiv korrelation mellan koncentrationen av AMH i serum vid puberteten och testikelstorlek hos djuren i vuxen ålder (Holst *et al.* 2020). AMH har även påvisats i seminalplasma hos galt, men inte heller den studien gjorde någon jämförelse med spermakvalitet och koncentration av AMH (Josso *et al.* 1979). Hittills finns ingen litteratur publicerad, som undersöker AMH och dess eventuella koppling till spermakvalitet hos hund.

3. Material och metoder

3.1. Studiepopulation

I den här studien undersöktes 65 hanhundar av rasen berner sennen med avseende på deras fruktsamhet. Åldersspannet på deltagande hundar var 16–134 månader. Både avelshannar och hanar som inte har gått i avel deltog. Hundarna tilldelades varsin bokstavskod; A-Ö, samt AA, AB, AC osv. när alfabetet hade tagit slut.

Hundarna rekryterades till studien genom annonsering via en egen hemsida på SLU, sociala medier (en egen Facebookgrupp startades för projektet, samt annonsering i olika grupper riktade till berner sennenhundägare) och en annons i Sennenbladet. Studien initierades i samarbete med rasklubben för berner sennen, SShK.

Insamling av prover startade i mars 2020 och pågick fram till sista oktober 2020. I Uppsala provtogs 23 av de 65 hundarna. Veterinärkliniker runt om i landet tillfrågades att delta i provinsamlingen för att underlätta för de djurägare som inte kunde ta sig till Uppsala. Totalt var 16 veterinärer med i provinsamlingen. Se bilaga 2 för lista över deltagande kliniker. Alla deltagande veterinärer fick information om projektet, remiss till provsamlingen (se bilaga 3 och 4) och ett provtagningskit. Andrologisk undersökning (inklusive mätning av testikelstorlek), blodprovstagning samt initial bedömning av spermaprovet (ejakulatets färg och volym, samt spermie-motiliteten) gjordes av provtagande veterinär innan proverna och ifylld remiss skickades med postgång till Spermalab på SLU för spermaanalys (se underrubrik ”provhantering och spermaanalys”).

3.2. Provsamling och anamnesformulär

Från varje hund samlades spermaprov och blodprov. En andrologisk undersökning och hullbedömning utfördes på varje hund, och respektive djurägare svarade på ett kortfattat frågeformulär om hundens hälsa och avelshistorik (se bilaga 3).

Målsättningen var att ha en löpande teasertik med vid spermasamlingen, vilket skedde i 64 av de 65 hundarnas spermasamlingar. I de flesta fall hade djurägare till hanar i projektet möjlighet att ta med en löpande tik själva (antingen egen eller

någon de kände) och i enstaka fall bistod deltagare i projektet med att rekrytera löpande tik vid provtagningar i Uppsala (antingen undervisningshundar på SLU eller genom annonsering i grupper på Facebook som riktar sig till veterinärstudenter och/eller bostadsområdet för SLU-studenter). Hanar som deltog i projektet tilläts lukta på teasertiken för att underlätta spermasamlingen. Andra och delar av tredje spermafraktionen samlades genom manuell stimulering av penis, total uppsamlad volym varierade mellan 0,5–35,5 ml.

Blodprov togs med vacutainersystem eller öppen kanyl, 1 EDTA och 2–3 serumrör samlades.

Den andrologiska undersökningen bestod av rektal palpation av prostata och mätning av testiklarna (se remiss i bilaga 4). Testiklarna mättes var och en för sig i tre dimensioner (diameter – d, höjd – h, tjocklek – t), samt båda testiklarnas gemensamma diameter. Utifrån dessa mått uppskattades testiklarnas volym enligt formeln för volymberäkning av ellipsoid: $V=(d*h*t*\pi)/6$ för både höger och vänster testikel, vilka sedan adderades för en uppskattad volym av båda testiklarna. Åtta av hundarna användes för validering av mätmetoden. De mättes av två eller tre personer varav tre hundar även mättes tre gånger av samma person. Mätningarna utfördes blindat, där varje person inte kunde se resultatet av föregående mätningar. I de fall då samma person mätte samma hunds testiklar tre gånger tilläts viss tid passera mellan mätningarna (5–10 min), och personen hade inte tillgång till anteckningarna från tidigare mätningar. Från de upprepade mätningarna beräknades en variationskoefficient (CV, coefficient of variation) för mätningarna för respektive hund enligt formeln $CV=\text{standardavvikelse}/\text{medelvärde}$.

3.3. Provhantering och spermaanalys

Spermaprovet bedömdes okulärt avseende färg och volym. Direkt efter provsamlingen gjordes en manuell bedömning av spermiemotiliteten på ett uppvärmt objektglas med ett fas-kontrast-mikroskop. Sedan gjordes släta utstryk och vallutstryk från råsperman. Några droppar sperma (≥ 4 , tills Formol-Saline-lösningen såg mättad ut) konserverades i buffrad formalin, och 500 mikroliter råsperma sparades i $+8^{\circ}\text{C}$. Alla spermaprover analyserades sedan på Spermalab på SLU enligt nedan.

Det släta utstryket färgades enligt Williamsfärgning och spermiehuvudena bedömdes, 500 spermier räknades och defekter (typ och antal) noterades. Vallutstryket färgades enligt Papanicolaoufärgning och där bedömdes förekomst av övriga celler (leukocyter, erytrocyter, epitelceller, båtceller, spermiogenetiska celler och degenererade pyknotiska celler). Svansfel bedömdes från en droppe av Formolsaline, 200 spermier räknades och typ och antal av defekter noterades. Spermiekoncentrationen bedömdes i spädning 1:100 i Bürkerkammare. Antalet defekta spermier räknades och utifrån det beräknades andelen spermier med normal morfologi.

Kvarvarande sperma centrifugerades i 3000 x g i 10 minuter. Supernatanten, dvs. seminalplasman, fördelades jämnt i 4 stycken 2 ml kryorör (märkta med nummer 1–4, namn, kod). I de fall den volymen överskred 8 ml seminalplasma sparades överskottet i lämpligt antal kryorör (märktes med namn, kod och ”extra seminalplasma”). Pelleten med spermier fördes över till ett 2 ml kryorör (märkt med nr 5, namn och kod). Kryorören förvarades frysta i -84° C i väntan på analys.

Blodproverna centrifugerades i 3500 x g i 10 minuter. Från EDTA-röret överfördes supernatanten, dvs. blodplasman, till ett 2 ml kryorör (märkt med nr 7, namn och kod), och pelleten med blodkroppar till ett 2 ml kryorör (märkt med nr 6, namn och kod). Från serumrören överfördes supernatanten, dvs. serumet, till 4 stycken 2 ml kryorör (märkta med nr 8–11, namn och kod). Kryorören förvarades frysta i -84° C i väntan på analys.

3.4. Analys av AMH i serum och seminalplasma

Koncentrationen av AMH mättes i serum och seminalplasma med en sandwich-ELISA (AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter), enligt medföljande manual. Brunnarna i ELISA-plattan är belagda med anti-AMH-antikroppar, till vilka AMH-molekylerna binds. Efter ett antal steg med tvätt av provet tillsätts en anti-AMH-detektionsantikropp för att påvisa mängden AMH, och mängden AMH mättes sedan genom att avläsa absorbansen i proven vid vissa våglängder.

ELISAn utfördes enligt följande. Reagenser och prover tilläts anta rumstemperatur och blandades försiktigt men väl innan arbetet påbörjades. Tvättlösningen späddes 1:10 med avjoniserat vatten. Kalibratorer, kontroller och prover analyserades i duplikat. Totalt 65 serumprover analyserades. 2 av serumproverna visade omätbart höga koncentrationer av AMH och späddes därför 1:2, varefter mätbara värden uppmättes. Totalt 16 seminalplasmaprover analyserades.

Alla kalibratorer, kontroller och prover bereddades med AMH Gen II Assay Buffer, spädning 1:6, vilket innebar att 60 mikroliter av kontroller, kalibratorer och prover blandades med 300 mikroliter buffert vardera. Detta blandades väl med hjälp av en vortex.

Till varje brunn på ELISA-plattan tillsattes 120 mikroliter av de uppblandade kalibratorerna, kontrollerna och proverna. Plattan inkuberades sedan i rumstemperatur under skakning vid 700 rpm i en timme.

Varje brunn tvättades sedan fem gånger med en automatisk mikrotiterplattettvättmaskin.

Till varje brunn tillsattes 100 mikroliter antikropp-biotin-konjugatlösning med en precisionspipett. Brunnarna inkuberades sedan under skakning vid 700 rpm i rumstemperatur i en timme. Brunnarna tvättades igen enligt ovan beskrivet sätt.

Till varje brunn tillsattes 100 mikroliter streptavidin-enzym-konjugatlösning med en precisionspipett. Brunnarna inkuberades sedan under skakning vid 700 rpm i rumstemperatur i 30 minuter. Brunnarna tvättades igen enligt ovan beskrivet sätt.

Till varje brunn tillsattes 100 mikroliter TMB-kromogenlösning (tetrametylbenzidin-kromogen-lösning, färgsubstratet) med en precisionspipett. TMB-kromogenlösningen undveks noggsamt att utsättas för solljus. Brunnarna inkuberades under skakning vid 700 rpm vid rumstemperatur. Inkubationstiden var 4–6 minuter, exakt tid för inkubering avgjordes utefter färgutvecklingen, då omgivningens temperatur kan påverka färgutvecklingen. Tidmätningen startades då TMB-kromatogenlösningen tillsattes till de första brunnarna.

Till varje brunn tillsattes 100 mikroliter stopplösning med en precisionspipett i samma ordning och med samma hastighet som tillsatsen av TMB-kromatogenlösningen.

Absorbansen i brunnarna avlästes direkt efter att stopplösningen tillsatts. Koncentrationen av AMH beräknades genom att beräkna medelabsorbansen för varje kalibrator, kontroll och prov. Logaritmen av medelvärdena ritades upp längs y-axeln och relaterades till AMH-koncentrationen i ng/ml längs x-axeln i ett diagram med hjälp av kubisk regressions-kurvanpassning. Värdet multiplicerades med spädningsfaktorn i de fall provet hade späts.

3.5. Statistiska analyser

Datan från studien analyserades med multivariabel linjär regression, där variabler med $p > 0,2$ stegvis togs bort. Resultat med $p < 0,05$ bedömdes som signifikanta.

3.6. Etiskt tillstånd och litteratursökning

Etiskt tillstånd för studien erhöles från Uppsala djurförsöksetiska nämnd, diarie-nummer 5.8.18-17395/2018. Alla djurägare gav skriftligt medgivande till att delta med sin eller sina hundar i studien.

För litteraturstudien har databaserna pubmed och google scholar använts. Olika kombinationer av sökorden "AMH", "sperm quality", "canine", "dog", "seminal plasma", "epididymal function" användes för att generera träffar på lämpliga artiklar. Intressanta källor till artiklarna som hittades på ovan nämnda sätt användes också till litteraturstudien.

4. Resultat

4.1. Deskriptiv statistik

Nedan presenteras data från anamnes, undersökning och spermiebedömning som undersökts eller använts i den här studien. Hundarnas ålder, vikt, hull (nio-gradig skala) och ejakulatets volym presenteras i tabell 1. Två hundar saknade uppgift om hullbedömning. Totalt antal spermier per ejakulat, bedömning av andel motila spermier, andel morfologiskt normala spermier, och andel morfologiskt defekta spermier fördelat i grupperna huvudfel, mittstyckefel och svansfel presenteras i tabell 2. Två av hundarna hade inga eller för få spermier för att kunna göra korrekt bedömning av motilitet och morfologi, och ytterligare två hundar hade för få spermier för att göra en korrekt bedömning av motiliteten. Dessa saknas därför i bedömningen.

Tabell 1. Deskriptiv statistik: anamnes och undersökning

Variabel	N	Medel-värde	Standard-avvikelse	Min	Median	Max
Ålder vid provtagning (månad)	65	53,3	30,5	16,0	48,0	137,0
Vikt (kg)	65	49,4	4,9	35,0	50,0	58,1
Hull (1-9)	63	5,1	0,9	3,0	5,0	9,0
Volym ejakulat (ml)	65	9,1	6,6	0,5	8,0	35,5

Tabell 2. Deskriptiv statistik: spermiebedömning

Variabel	N	Medel-värde	Standard-avvikelse	Min	Median	Max
Totalantal spermier (miljarder)	65	1,03	0,82	0,0	0,97	3,65
Bedömning motilitet spermier (%)	61	65,95	21,91	5,0	75,0	98,0
Normala medeltal (%)	63	50,21	24,43	10,0	50,5	87,5
Totala huvudfel (%)	63	15,08	13,64	3,9	9,9	69,5
Totala mittstyckefel (%)	63	17,44	16,36	2,0	10,5	79,5
Totala svansfel (%)	63	25,96	19,63	2,0	22,6	82,0

4.2. Deskriptiv statistik för testikelstorlek

Nedan redovisas hundarnas uppmätta testikelstorlek och beräknade testikelvolym.

Tabell 3. Deskriptiv statistik över testikelstorlek

Variabel	N	Medel-värde	Standard-avvikelse	Min	Median	Max
Diameter (båda) (mm)	64	55,6	12,7	36,0	52,5	110,0
Diameter sin (mm)	65	28,9	7,8	19,0	27,0	60,0
Diameter dx (mm)	65	28,6	8,4	19,0	26,0	70,0
Höjd sin (mm)	65	34,3	11,4	20,0	30,0	70,0
Höjd dx (mm)	65	34,3	12,6	18,0	30,0	70,0
Tjocklek sin (mm)	65	44,5	10,5	19,0	45,0	65,0
Tjocklek dx (mm)	65	44,8	10,6	20,0	45,0	65,0
Uppskattad total volym (cm ³)	65	47,6	30,7	18,0	37,3	161,8
Uppskattad volym SIN (cm ³)	65	23,2	13,2	9,1	19,6	77,4
Uppskattad volym DX (cm ³)	65	24,4	18,7	8,4	18,3	99,6

4.3. Validering av testikelmätning

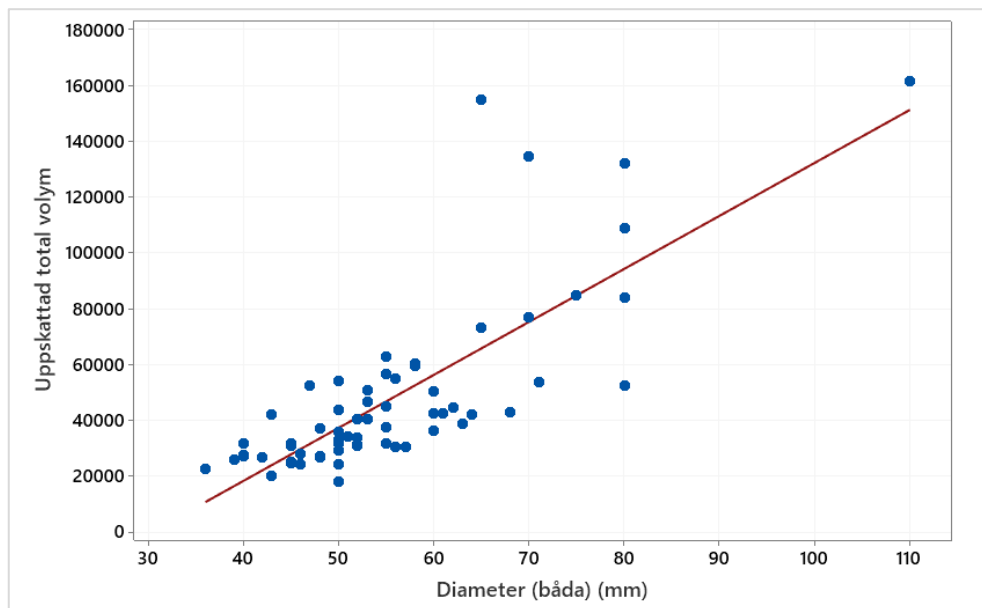
Nedan presenteras resultaten från validering av metoden (skjutmått) för hur hundarnas testiklar mättes. Hund A, AM, AO, AP och AQ mättes av två olika personer. Hund AW, AX och AY mättes av tre olika personer. Hund AW, AX och AY mättes dessutom tre gånger av samma person. När två eller tre personer gjorde mätningarna var variationskoefficienten 1,2–33,9 % för uppskattad total testikelvolym och 0–18 % för testiklarnas diameter (tabell 4). När en person gjorde tre upprepade mätningar var variationskoefficienten 5–16,8 % för uppskattad total testikelvolym och 1,9–9,1 % för testiklarnas diameter (tabell 5). Diametern av båda testiklarna bedöms ha det tydligaste sambandet med total uppskattad volym, jämfört med övriga de testikelmåtten höjd och tjocklek (se bilaga 5). Sambandet mellan uppskattad volym och båda testiklarnas diameter är signifikant ($p < 0,001$) och visas i figur 1.

Tabell 4. Variationskoefficient mellan olika personers mätningar

Hund	Uppskattad total volym (cm ³)	Standard-avvikelse, total volym (cm ³)	Medelvärde, total volym (cm ³)	CV (%)	Diameter (båda) (mm)	Standard-avvikelse, diameter båda (mm)	Medelvärde, diameter båda (mm)	CV (%)
A	25	1,5	26	5,8	62	9,9	55	18
	27				48			
AM	44	0,5	44	1,2	60	1,4	61	2,3
	44				62			
AO	31	6,9	26	26,3	45	0	45	0
	21				45			
AP	60	7,2	55	13	58	2,1	56,5	3,8
	50				55			
AQ	44	4,5	41	11	50	1,4	51	2,8
	37				52			
AW	50	9,2	46	19,9	50	5,3	48	11
	35				42			
	52				52			
AX	41	11,0	33	33,9	54	5,5	48,3	11,4
	37				48			
	20				43			
AY	40	6,4	33	19,3	59	6,2	54	11,6
	28				47			
	30				56			

Tabell 5. Variationskoefficient mellan samma persons upprepade mätningar

Hund	Uppskattad total volym (cm ³)	Standard-avvikelse, total volym (cm ³)	Medelvärde, total volym (cm ³)	CV (%)	Diameter (båda) (mm)	Standard-avvikelse, diameter båda (mm)	Medelvärde, diameter båda (mm)	CV i %
AW	52	7,3	44	16,8	52	1	52	1,9
	39				51			
	41				53			
AX	20	1,3	20	6,6	43	2	43	4,7
	19				45			
	22				41			
AY	30	1,5	29	5	56	4,6	50,7	9,1
	28				48			
	30				48			



Figur 1. Relationen mellan uppmätt diameter och uppskattad volym. Linjen är en regressionslinje. Sambandet är statistiskt signifikant.

4.4. AMH i seminalplasma

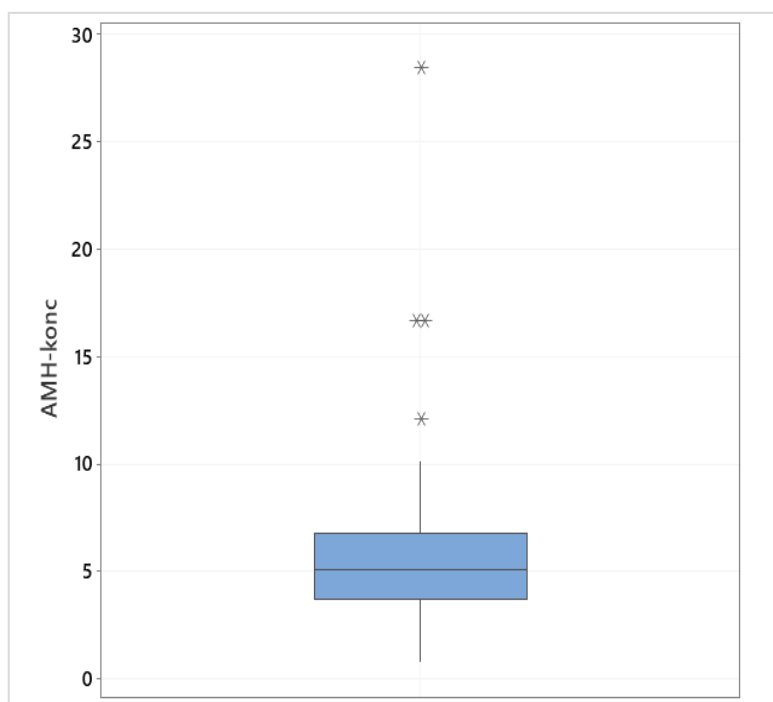
Hos 16 hundar med varierande ålder och spermakvalitet mättes koncentrationen av AMH i seminalplasman. Hos alla 16 hundar var koncentrationen av AMH i seminalplasman odetekterbar ($<0,2$ ng/ml). I tabell 6 redovisas data för dessa 16 hundar.

Tabell 6. Data för de 16 hundar där koncentrationen av AMH mättes i seminalplasman

Hund	Konc. AMH i serum (ng/ml)	Provtagen i Uppsala (ja/nej)	Ålder (månader)	Volym ejakulat (ml)	Totalantal spermier (miljarder)	Motilitet (%)	Normal morfo-logi (%)
D	9,18	ja	33	4,5	1,28	90	59,5
P	16,71	ja	104	3	0,15	5	10,5
X	4,03	nej	18	6	0,73	20	39
Y	2,8	nej	33	4,5	1,82	50	32
Z	8,04	ja	47	13	0,09	15	49
Å	3,89	ja	118	3	0,22	50	20
Ä	28,48	nej	56	4	0	-	-
AB	5,73	nej	36	8	3,02	85	47,5
AD	6,02	nej	66	27	0,51	70	44,5
AF	4,29	nej	65	9,5	2,07	60	83
AI	4,49	ja	47	7	1,15	75	44
AW	3,79	ja	78	7	1,77	70	35,5
AY	4,09	ja	17	4	0,92	80	77,5
BE	6,78	nej	19	1	0,32	80	79,5
BF	7,5	nej	40	3,4	1,55	60	34,5
BG	6,33	nej	41	2,8	1,46	70	80

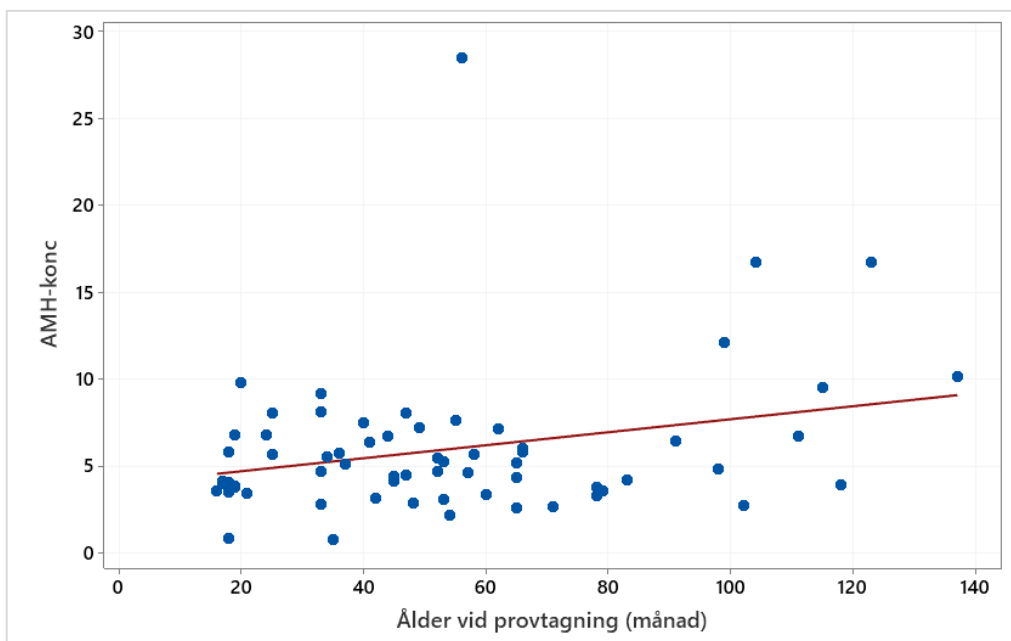
4.5. AMH i serum

AMH var mätbart i serum hos alla 65 hundar. Medelvärde var 5,932 ng/ml, medianen var 5,09 ng/ml, lägsta koncentrationen var 0,77 ng/ml och högsta koncentrationen var 28,48 ng/ml (figur 2).

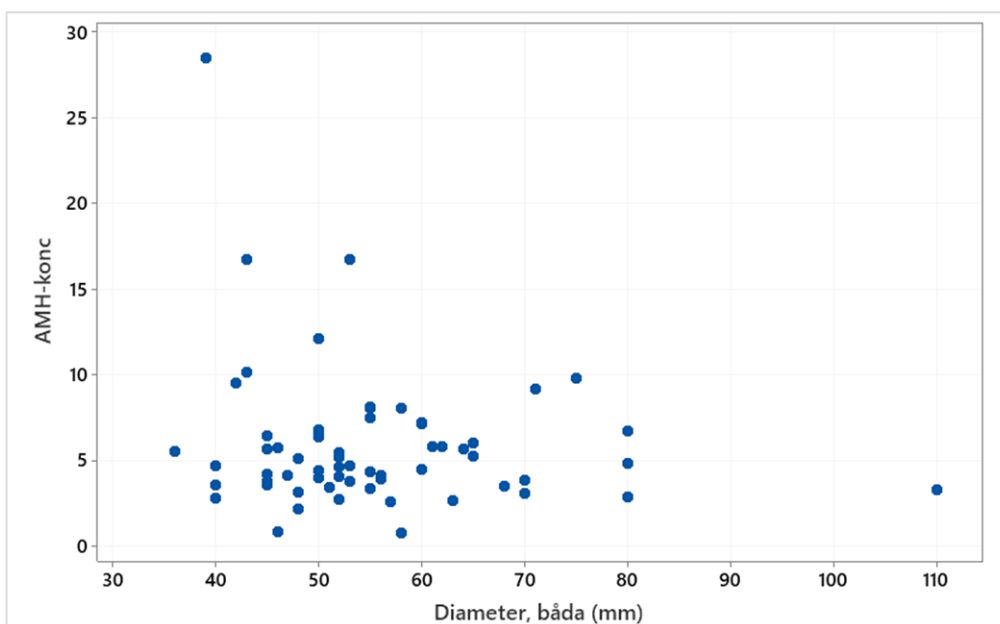


Figur 2. Koncentration av AMH i serum (ng/ml).

Koncentrationen av AMH i serum var signifikant associerat med hundens ålder ($p=0,02$). Även förekomst av erythrocyter i ejakulatet hade ett statistiskt signifikant samband med koncentrationen av AMH i serum ($p=0,03$), men den stora spridningen i av värden i grafen medförde att grafen var svårtolkad. I den här studien fanns inget signifikant samband mellan ejakulatets färg, hundens vikt, eller testiklarnas konsistens eller storlek (figur 4) och koncentrationen av AMH i serum.

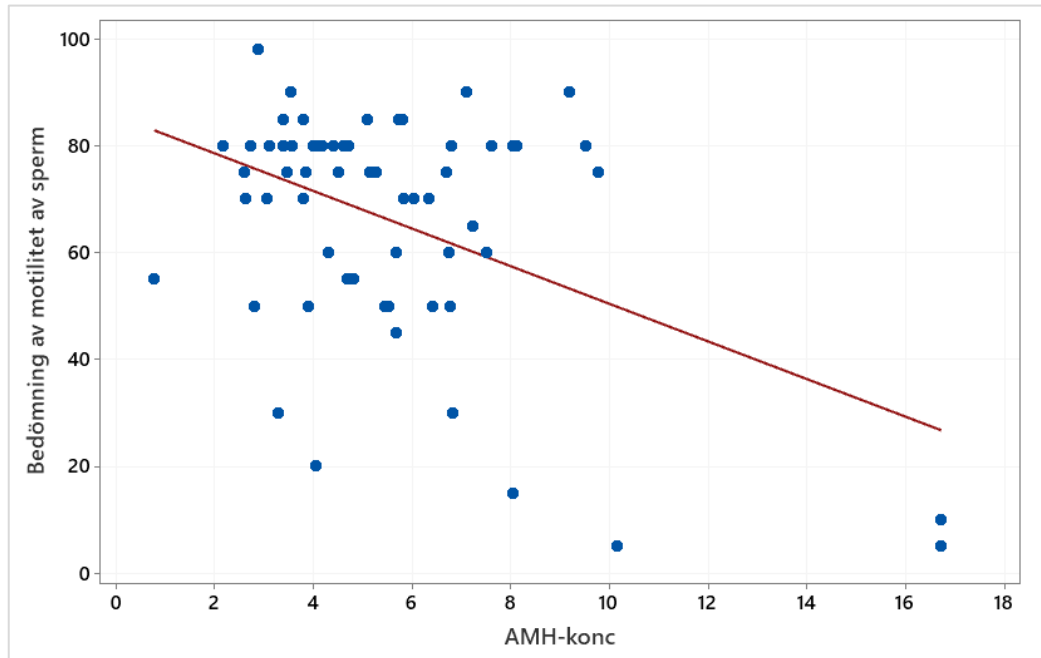


Figur 3. Relationen mellan ålder och AMH-koncentration (ng/ml). Linjen representerar en regressionslinje för datan. Sambandet var statistiskt signifikant

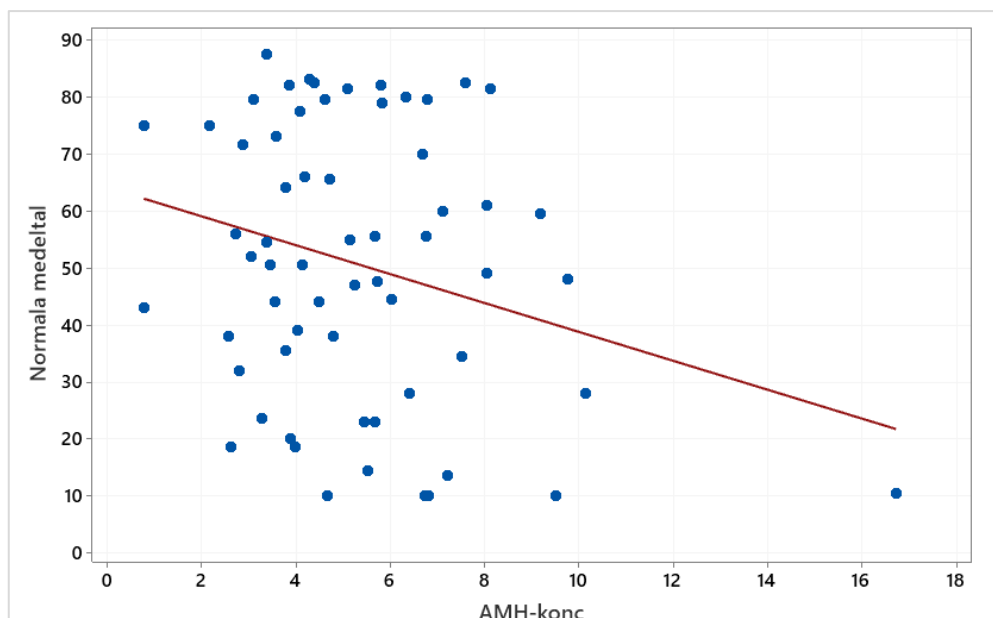


Figur 4. Relationen mellan testiklarnas storlek (diametern mätt i mm) och koncentrationen av AMH i serum (ng/ml). Sambandet var inte signifikant.

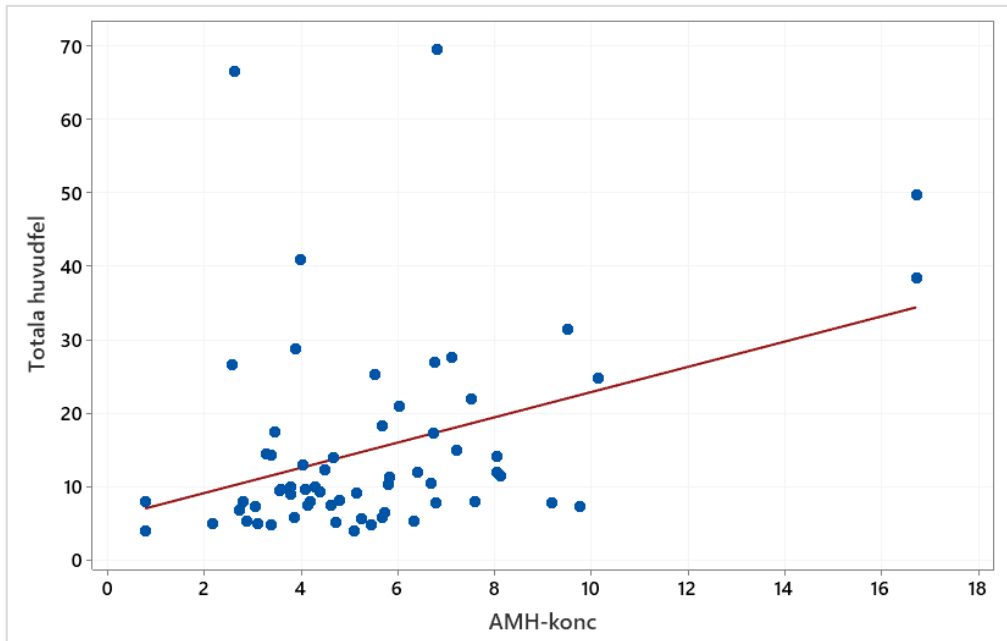
Koncentrationen av AMH är associerad med spermiemotiliteten ($p < 0,001$, figur 5), andel morfologiskt normala spermier ($p = 0,016$, figur 6) och andel spermier med defekta huvuden ($p = 0,003$, figur 7).



Figur 5. Relationen mellan AMH-koncentration (ng/ml) och spermiemotilitet (%). Linjen representerar en regressionslinje. Sambandet var statistiskt signifikant

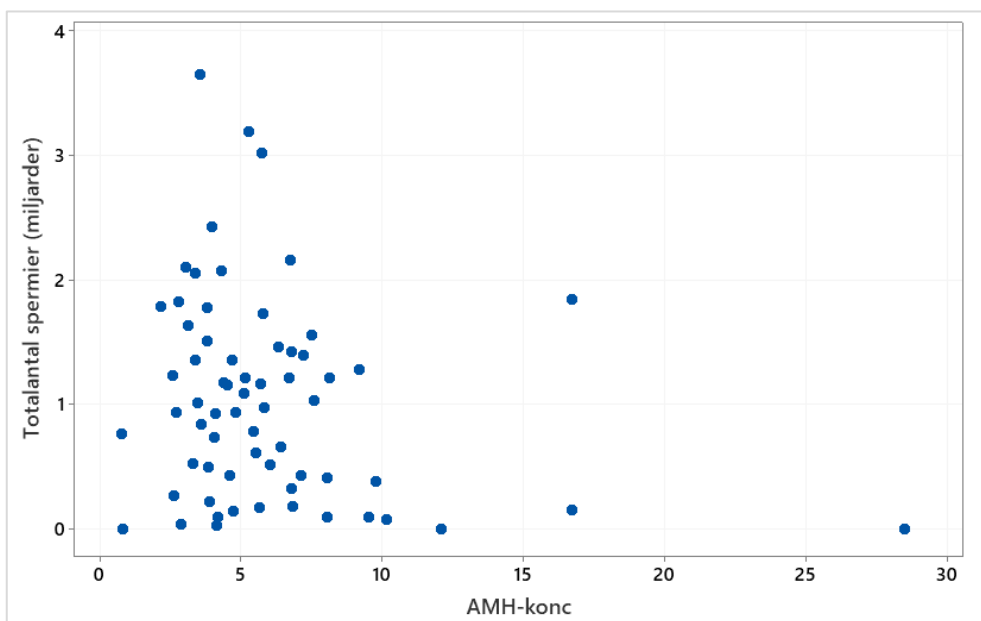


Figur 6. Relationen mellan AMH-koncentration (ng/ml) och andel spermier med normal morfologi (%). Linjen representerar regressionslinjen, sambandet var statistiskt signifikant (se inverterade grafen i bilaga 1, där sambandet tydligare kan visualiseras).



Figur 7. Relationen mellan AMH-koncentration (ng/ml) och andel spermier med defekta huvudformer (%). Sambandet var statistiskt signifikant

I den här studien fanns inget signifikant samband mellan koncentrationen av AMH i serum och totala antalet spermier per ejakulat ($p=0,07$, figur 8), andelen spermier med mittstycksdefekter ($p=0,60$) eller andelen spermier med svansdefekter ($p=0,27$).



Figur 8. Relationen mellan AMH-koncentration (ng/ml) och totalantal spermier per ejakulat (miljarder). Sambandet var inte statistiskt signifikant.

5. Diskussion

I den här studien hade hundarna liknande koncentration av AMH i serum (medelvärde 5,9 ng/ml) som tidigare uppmätts hos hanhundar (median 5,1 ng/ml hos friska kontrollhundar) med samma ELISA-metod (Holst & Dreimanis 2015). Endast fem hundar hade en koncentration av AMH över 10 ng/ml, och alla dessa bedömdes ha dålig spermakvalitet, med få eller inga spermier i ejakulatet och hög andel defekta eller imotila spermier. Även de två hundarna med allra lägst koncentration av AMH (0,77 respektive 0,79 ng/ml) hade liknande dålig spermakvalitet, vilket skulle kunna föra tankarna mot att både för låg och för hög koncentration av AMH i serum indikerar dålig spermakvalitet. Det finns dock resultat som talar emot denna teori, till exempel att den hund med tredje lägst koncentration av AMH (2,17 ng/ml) hade mycket god spermakvalitet (högt totalt antal spermier, hög motilitet och hög andel morfologiskt normala spermier), och att det finns stor variation av spermakvalitet med allt från dålig till bra spermakvalitet hos övriga hundar. Den statistiska metod som användes kan endast påvisa linjära samband, varför ett eventuellt samband där både för hög och för låg koncentration av AMH i serum indikerar dålig spermakvalitet inte kan visas vara signifikant i den här studien.

Koncentrationen av AMH i serum har i en tidigare studie på människa visats ha samband med andel spermier med normal morfologi (Aksglaede *et al.* 2018). De fann att högre koncentration av AMH i serum var kopplat till teratozoospermi (lägre andel spermier med normal morfologi), vilket stämmer överens med datan i den här studien (signifikant samband mellan högre koncentration av AMH i serum och lägre andel spermier med normal morfologi). Vi har dessutom funnit att just defekter på spermiehuvudena är korrelerat till koncentrationen av AMH. Hittills finns ingen publicerad studie som står att finna som kopplar AMH till en specifik defekt. En teoretisk tanke är att sertolicellernas funktion är mycket viktig vid utvecklingen av spermiehuvudet eftersom sertolicellen är delaktig i spermiogenesen, varför detta samband kan anses vara rimligt. Vi har i den här studien även visat att motiliteten har ett signifikant samband med koncentrationen av AMH i serum. Vi fann att astenozoospermi (låg andel motila spermier) är kopplat till högre koncentration av AMH i serum. Det finns studier som har påvisat sambandet mellan astenozoospermi och AMH, men då mellan astenozoospermi och låg koncentration av AMH i seminalplasma (Mostafa *et al.* 2007; Andersen *et al.* 2016). Datat analyserades med

multivariabel analys varför även signifikanta samband som inte är visuellt synliga i graferna kunde påvisas.

Åldern på hundarna visades i vår studie signifikant påverka koncentrationen av AMH i serum, stigande ålder tenderar att ge högre koncentrationer av AMH. Kanhända sker en tillbakagång till ett mer omoget stadie hos sertolicellerna ju äldre hunden blir. Hög koncentration av AMH i serum kan vara ett tecken på omogna sertoliceller (Rey *et al.* 1993), vilket skulle kunna vara förklaringen till den låga spermakvaliteten hos individerna med hög koncentration av hormonet i vår studie. Omogna sertoliceller torde kunna vara en förklaring till lågt totalantal spermier, låg andel motila spermier och hög andel defekta spermier, eftersom en omogen sertolicell borde ha nedsatt förmåga att producera normala spermier. Kanske kan det vara kopplat till en eventuell åldersrelaterad sjunkande koncentration av testosteron, som då slutar hämma produktionen av AMH (Rey *et al.* 1993), men mer forskning behövs för att kunna fastställa ett sådant samband hos hund.

Med stigande ålder kan en viss försämring av spermakvaliteten förväntas. Med hjälp av den statistiska metod som användes i studien (multipel linjär regression) kunde den koppling som ses mellan nedsatt spermakvalitet avseende tidigare nämnda parametrar och högre AMH-koncentration visas vara statistiskt signifikant, även utöver den koppling som både spermakvalitet och koncentration av AMH i serum har till åldern.

Kopplingen mellan AMH och förekomst av erythrocyter i sperman var statistiskt signifikant. Grafen var dock svårtolkad på grund av att de tre individer med högst AMH-koncentration alla var i gruppen utan förekomst av erythrocyter i sperman, och utan dessa tre individer fanns ingen skillnad i AMH-koncentration mellan de båda grupperna. För att vidare undersöka den eventuella kopplingen mellan erythrocyter i sperma och serumkoncentrationen av AMH krävs vidare studier.

Inför arbetet fanns en hypotes om att koncentrationen av AMH skulle gå att koppla till det totala antalet spermier per ejakulat och testikelvolymen. Inget av detta har dock visats ha ett signifikant samband med AMH-koncentrationen. En tendens till högre totalt antal spermier per ejakulat kunde ses i samband med lägre koncentration av AMH i serum. Den litteratur som finns sedan tidigare har visat ett samband mellan högre koncentration av AMH i seminalplasma och högre totalantal spermier i ejakulatet (Mostafa *et al.* 2007; Andersen *et al.* 2016; Kucera *et al.* 2016), men det finns inget samband i litteraturen mellan det totala antalet spermier och koncentrationen av AMH i serum. Det finns även en tendens till att mindre testikelvolym är korrelerat till högre koncentration av AMH i serum, men detta var alltså inte statistiskt signifikant. Dessutom hade det varit motsägelsefulla data jämfört med tidigare studier, där hög koncentration av AMH i serum är korrelerat till större testiklar hos åsna och människa (Aksglaede *et al.* 2018; Holst *et al.* 2020).

En anledning till att vi inte kunde se tydligare samband mellan koncentrationen av AMH i serum och testikelstorlek kan bero på den mätmetod vi använde. Till

exempel upplevs den hund med de uppmätt största testiklarna i studien ha normalstora testiklar, och det stora måttet beror troligtvis på den enskilda mätningen (utförd på annan klinik) snarare än abnormt stora testiklar. I vissa lägen finns inte möjlighet att mäta testikelvolym med exempelvis ultraljud, som förmodligen är bästa metoden för att mäta testikelvolym i dagsläget, och den här studien inbegrep därför en mindre pilotstudie för att utvärdera tillförlitligheten mellan olika mätningar som utförts med hjälp av skjutmått. Variationskoefficienten var högre vid jämförelser mellan de uppskattade volymerna än när de uppmätta diametrarna granskades, vilket tyder på att diameter-måttet är mer jämförbart mellan olika mätare och mättillfällen än vad en uppskattad volym är. Det finns ett tydligt linjärt samband mellan den uppskattade volymen och diametermåttet, som inte är lika tydligt för höjd- respektive tjockleksmåttet (se bilaga 5), varför en mätning av testiklarnas diameter (enskild testikel och/eller båda testiklarna) förefaller vara det enklaste måttet för att uppskatta testikelstorleken.

Av de 16 hundar som undersöktes med avseende på AMH i seminalplasma hade ingen detekterbara koncentrationer. De 16 hundar som testades i den här studien valdes med så stor spridning som möjligt med avseende på ålder, ejakulerad volym, totalt antal spermier, spermimotoilitet och andel spermier med normal morfologi för att minska risken att någon kategori av hund (exempelvis ung eller äldre, bra eller dålig spermimotoilitet, lågt eller högt totalt antal spermier) missas, och resultatet anses därför vara tillförlitligt för den här studiepopulationen åtminstone. Då det inte finns någon litteratur publicerad sedan tidigare som undersöker koncentrationen av AMH i seminalplasma hos hund kan inga jämförelser göras med den här studiens resultat. Det verkar sannerligen som att hundar av rasen berner sennen inte utsöndrar AMH i seminalplasman, och sannolikt innebär det att inga hundar gör det, men studier bör göras på fler hundraser för att helt säkert kunna säga något om förekomsten av AMH i seminalplasma. Det finns en viss risk att mängden AMH i seminalplasman späds ut av den stora volymen prostatavätska, som även kan variera mycket mellan individer, varför eventuella framtida studier i området förslagsvis endast bör samla den andra fraktionen av ejakulatet för att säkerställa att eventuell AMH i seminalplasman kan detekteras.

Om det är så att hundar inte har samma omdirigering av AMH-utsöndring till seminalplasman under puberteten som till exempel människa (Fénichel *et al.* 1999) eller åsna (Holst *et al.* 2020) så skulle det kunna innebära att AMH som biomarkör för spermakvalitet är ännu bättre hos just hund än människa. Dels eftersom det torde bli ett tydligare eller enklare samband mellan spermakvaliteten och hormonnivån då hormonet utsöndras till en kroppsvätska istället för två, vilket ger ett tydligare samband till mängden producerat hormon, speciellt som studier har visat att det inte finns något samband mellan koncentrationen av AMH i serum och seminalplasma

hos människa (Fénichel *et al.* 1999). Dels behöver man hos hund endast ta ett blodprov, istället för att samla sperma, för att mäta hormonkoncentrationen och på så sätt få en uppfattning om spermakvaliteten.

Att studien enbart inbegriper en hundras, bernese sennenhund, kan göra det svårt att veta om det vi har hittat är sant för hundar generellt eller bara för rasen. Att en fysiologisk funktion förekommer i endast en hundras och inte alla typer av hundar är dock ett ovanligt fenomen och förefaller inte sannolikt. Att bara använda data från en hundras kan också ses som en stor fördel för studien, eftersom resultaten då troligen är mer likriktade och på så sätt enklare att tolka. En felkälla i studien kan vara att dataöverföringen till det dokument som sedan används för analyser av datan kan vara felaktig på grund av den mänskliga faktorn. Detta undveks genom att flera personer inom projektet dubbelkollade datan.

Det finns teorier i litteraturen om att koncentrationen av AMH i serum under den prepubertala perioden kan ”föresäga” individens spermakvalitet i framtiden, eftersom AMH produceras i högst grad när sertoliceller prolifererar och det har visats att prepubertal AMH-koncentration kan förutspå antalet sertoliceller postpubertalt (Rey *et al.* 2003; Petersen & Söder 2006). Tanken är att åtminstone det totala antalet spermier per ejakulat i viss mån ska kunna förutspås. Teorin har mig veterligen bara testats på åsna, och då kunde inget samband påvisas (Holst *et al.* 2020). Det skulle vara intressant att testa en sådan hypotes på en hundpopulation, eftersom det skulle kunna underlätta urval av potentiella avelshannar med god spermakvalitet tidigare i livet. Det hade även kunnat vara intressant att undersöka kopplingen mellan koncentrationen av AMH och testosteron (eller FAI – free androgen index) hos hundar. Sjunker testosteron eller FAI med åldern och är det då kopplat till en stigande AMH-koncentration och nedsatt spermakvalitet?

Sammanfattningsvis har den här studien kunnat visa att koncentrationen av AMH i serum har ett samband med vissa parametrar för spermakvalitet. Högre koncentration av AMH kunde kopplas samman med lägre andel motila spermier, högre andel spermier med defekt morfologi och högre andel spermier med just huvuddefekter. Dessutom ökade koncentrationen av AMH med åldern på hundarna i studiepopulationen. Dessa resultat var i linje med den hypotes som sattes upp, med undantagen att vi inte kunde påvisa signifikant samband mellan AMH-koncentrationen och det totala antalet spermier per ejakulat eller testiklarnas storlek. Slutligen kunde studien även visa att AMH inte var mätbart i seminalplasman hos någon av de hundar vi undersökte med avseende på detta.

Referenser

- Aksglaede, L., Olesen, I.A., Carlsen, E., Petersen, J.H., Juul, A. & Jørgensen, N. (2018). Serum concentration of anti-Müllerian hormone is not associated with semen quality. *Andrology*, 6 (2), 286–292. <https://doi.org/10.1111/andr.12456>
- Al-Attar, L., Noël, K., Dutertre, M., Belville, C., Forest, M.G., Burgoyne, P.S., Josso, N. & Rey, R. (1997). Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *The Journal of Clinical Investigation*, 100 (6), 1335–1343. <https://doi.org/10.1172/JCI119653>
- Allard, S., Adin, P., Gouedard, L., Clemente, N. di, Josso, N., Orgebin-Crist, M.C., Picard, J.Y. & Xavier, F. (2000). Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Development*, 127 (15), 3349–3360
- Alm, H. & Holst, B.S. (2018). Identifying ovarian tissue in the bitch using anti-Müllerian hormone (AMH) or luteinizing hormone (LH). *Theriogenology*, 106, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.028>
- Amann, R.P. (1989). Structure and function of the normal testis and epididymis. *Journal of the American College of Toxicology*, 8 (3), 457–471. <https://doi.org/10.3109/10915818909014532>
- Andersen, J.M., Herning, H., Witczak, O. & Haugen, T.B. (2016). Anti-Müllerian hormone in seminal plasma and serum: association with sperm count and sperm motility. *Human Reproduction*, 31 (8), 1662–1667. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew121>
- Banco, B., Veronesi, M.C., Giudice, C., Rota, A. & Grieco, V. (2012). Immunohistochemical evaluation of the expression of Anti-Müllerian hormone in mature, immature and neoplastic canine Sertoli cells. *Journal of Comparative Pathology*, 146 (1), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.03.011>
- Berta, P., Hawkins, J.B., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N. & Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348 (6300), 448–450. <https://doi.org/10.1038/348448a0>
- Chłopik, A. & Wysokińska, A. (2020). Canine spermatozoa - What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 55 (2), 113–126. <https://doi.org/10.1111/rda.13596>
- Claes, A., Ball, B.A., Almeida, J., Corbin, C.J. & Conley, A.J. (2013). Serum anti-Müllerian hormone concentrations in stallions: Developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings. *Theriogenology*, 79 (9), 1229–1235. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.03.019>

- Cortes, D., Müller, J. & Skakkebaek, N.E. (1987). Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *International Journal of Andrology*, 10 (4), 589–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00358.x>
- Dacheux, J.-L., Dacheux, F. & Druart, X. (2016). Epididymal protein markers and fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.034>
- England, G.C., Allen, W.E. & Middleton, D.J. (1990). An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Research in Veterinary Science*, 49 (1), 66–70
- Fanchin, R., Louafi, N., Méndez Lozano, D.H., Frydman, N., Frydman, R. & Taieb, J. (2005a). Per-follicle measurements indicate that anti-Müllerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertility and Sterility*, 84 (1), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.01.115>
- Fanchin, R., Taieb, J., Lozano, D.H.M., Ducot, B., Frydman, R. & Bouyer, J. (2005b). High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Human Reproduction*, 20 (4), 923–927. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh688>
- Fénichel, P., Rey, R., Poggioli, S., Donzeau, M., Chevallier, D. & Pointis, G. (1999). Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction*, 14 (8), 2020–2024. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.8.2020>
- Fujisawa, M., Yamasaki, T., Okada, H. & Kamidono, S. (2002). The significance of anti-Müllerian hormone concentration in seminal plasma for spermatogenesis. *Human Reproduction*, 17 (4), 968–970. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.4.968>
- Goulis, D.G., Iliadou, P.K., Tsametis, C., Gerou, S., Tarlatzis, B.C., Bontis, I.N. & Papadimas, I. (2008). Serum anti-Müllerian hormone levels differentiate control from subfertile men but not men with different causes of subfertility. *Gynecological Endocrinology*, 24 (3), 158–160. <https://doi.org/10.1080/09513590701672314>
- Holst, B., Panzani, D., Camillo, F., Svensson, A. & Rota, A. (2020). Anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations are maximal at puberty in male donkeys and secretion is redirected from the blood stream to seminal plasma. *Animal Reproduction Science*, 218, 106484. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106484>
- Holst, B.S. (2017). Diagnostic possibilities from a serum sample - Clinical value of new methods within small animal reproduction, with focus on anti-Müllerian hormone. *Reproduction in Domestic Animals*, 52 (S2), 303–309. <https://doi.org/10.1111/rda.12856>
- Holst, B.S. & Dreimanis, U. (2015). Anti-Müllerian hormone: a potentially useful biomarker for the diagnosis of canine Sertoli cell tumours. *BMC Veterinary Research*, 11. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0487-5>
- Hornakova, L., Vrbovska, T., Pavl'ak, M., Valencakova-Agyagosova, A., Halo, M. & Hajurka, J. (2017). The evaluation of blood concentrations of testosterone, 17 β -oestradiol and anti-Müllerian hormone in dogs with cryptorchidism and testicular tumours. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 20 (4), 677–685. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2017-0085>

- Josso, N., Cate, R.L., Picard, J.-Y., Vigier, B., di Clemente, N., Wilson, C., Imbeaud, S., Pepinsky, R.B., Guerrier, D., Boussin, L., Legeai, L. & Carré-Eusèbe, D. (1993). Anti-müllerian hormone: the Jost factor. I: Bardin, C.W. (red.) *Recent Progress in Hormone Research*. Academic Press, 1–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-571148-7.50005-1>
- Josso, N. & di Clemente, N. (1999). TGF- β family members and gonadal development. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 10 (6), 216–222. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(99\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(99)00155-1)
- Josso, N., di Clemente, N. & Gouédard, L. (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179 (1), 25–32. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00467-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00467-1)
- Josso, N., Picard, J.Y., Dacheux, J.L. & Courot, M. (1979). Detection of anti-Müllerian activity in boar rete testis fluid. *Reproduction*, 57 (2), 397–400. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0570397>
- Josso, N., Rey, R.A. & Picard, J.-Y. (2013-12-08). Anti-Müllerian hormone: a valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. *International Journal of Endocrinology*. [Review Article]. <https://doi.org/10.1155/2013/674105>
- Kucera, R., Ulcova-Gallova, Z., Windrichova, J., Losan, P. & Topolcan, O. (2016). Anti-Müllerian hormone in serum and seminal plasma in comparison with other male fertility parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62 (3), 223–226. <https://doi.org/10.3109/19396368.2016.1161864>
- Lukas-Croisier, C., Lasala, C., Nicaud, J., Bedecarrás, P., Kumar, T.R., Dutertre, M., Matzuk, M.M., Picard, J.-Y., Josso, N. & Rey, R. (2003). Follicle-stimulating hormone increases testicular anti-Müllerian hormone (AMH) production through Sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene. *Molecular Endocrinology*, 17 (4), 550–561. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0186>
- Mishina, Y., Rey, R., Finegold, M.J., Matzuk, M.M., Josso, N., Cate, R.L. & Behringer, R.R. (1996). Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes & Development*, 10 (20), 2577–2587. <https://doi.org/10.1101/gad.10.20.2577>
- Mostafa, T., Amer, M.K., Abdel-Malak, G., Nsser, T.A., Zohdy, W., Ashour, S., El-Gayar, D. & Awad, H.H. (2007). Seminal plasma anti-Müllerian hormone level correlates with semen parameters but does not predict success of testicular sperm extraction (TESE). *Asian Journal of Andrology*, 9 (2), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00252.x>
- Oettlé, E.E. (1990). *Sperm abnormalities in the dog : a light and electron microscopic study*. Diss. University of Cape Town. <https://open.uct.ac.za/handle/11427/27179> [2020-11-16]
- Oettlé, E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 47, 257–260
- Petersen, C. & Söder, O. (2006). The sertoli cell – a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research in Paediatrics*, 66 (4), 153–161. <https://doi.org/10.1159/000094142>

- Rao, A.R., Bane, A. & Gustafsson, B.K. (1980). Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology*, 14 (1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(80\)90129-6](https://doi.org/10.1016/0093-691x(80)90129-6)
- Rey, R. (1998). Endocrine, paracrine and cellular regulation of postnatal anti-müllerian hormone secretion by sertoli cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 9 (7), 271–276. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(98\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(98)00069-1)
- Rey, R., al-Attar, L., Louis, F., Jaubert, F., Barbet, P., Nihoul-Fékété, C., Chaussain, J.L. & Josso, N. (1996). Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-müllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *The American Journal of Pathology*, 148 (5), 1689–1698
- Rey, R., Lordereau-Richard, I., Carel, J.C., Barbet, P., Cate, R.L., Roger, M., Chaussain, J.L. & Josso, N. (1993). Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 77 (5), 1220–1226. <https://doi.org/10.1210/jcem.77.5.8077315>
- Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C. & Bedecarrás, P. (2003). AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 211 (1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.09.007>
- Rey, R.A., Belville, C., Nihoul-Fékété, C., Michel-Calemard, L., Forest, M.G., Lahlou, N., Jaubert, F., Mowszowicz, I., David, M., Saka, N., Bouvattier, C., Bertrand, A.-M., Lecointre, C., Soskin, S., Cabrol, S., Crosnier, H., Léger, J., Lortat-Jacob, S., Nicolino, M., Rabl, W., Toledo, S.P.A., Baş, F., Gompel, A., Czernichow, P., Chatelain, P., Rappaport, R., Morel, Y. & Josso, N. (1999). Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84 (2), 627–631. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.2.5507>
- Rota, A., Ballarin, C., Vigier, B., Cozzi, B. & Rey, R. (2002). Age dependent changes in plasma anti-Müllerian hormone concentrations in the bovine male, female, and free-martin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 129 (1), 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(02\)00514-2](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00514-2)
- Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C. & Fisher, J.S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125 (6), 769–784. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769>
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2nd ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Steinberger, A. & Steinberger, E. (1971). Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biology of Reproduction*, 4 (1), 84–87. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/4.1.84>
- Svenska Sennenhundklubbens avelsråd (2018). *Rasspecifik avelsstrategi (RAS) för Berner Sennen*.
- Tapanainen, J.S., Aittomäki, K., Min, J., Vaskivuo, T. & Huhtaniemi, I.T. (1997). Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nature Genetics*, 15 (2), 205–206. <https://doi.org/10.1038/ng0297-205>

- 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*, 118, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.018>
- Turna Yilmaz, Ö., Toydemir, T.S.F., Kirsan, I., Gunay Ucmak, Z. & Caliskan Karacam, E. (2015). Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool for ovarian remnant syndrome in bitches. *Veterinary Research Communications*, 39 (3), 159–162. <https://doi.org/10.1007/s11259-015-9639-0>
- Van Haaster, L.H., De Jong, F.H., Docter, R. & De Rooij, D.G. (1992). The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*, 131 (3), 1574–1576. <https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1505485>
- World Health Organization (red.) (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva: World Health Organization.
- Young, J., Rey, R., Couzinet, B., Chanson, P., Josso, N. & Schaison, G. (1999). Antimüllerian hormone in patients with hypogonadotropic hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84 (8), 2696–2699. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.8.5972>

Tack

Tack till mina fina handledare för all hjälp och stöttning. Och till mina medstudenter i projektet som har gjort arbetet så mycket roligare. Ett stort tack till personalen på Spermalab på SLU för bra stöd. Framför allt vill jag rikta ett stort tack till alla underbara hundar och deras ägare som deltog i studien! Ert stora engagemang och vilja är det som har gjort den här studien till vad den har blivit! Tack!

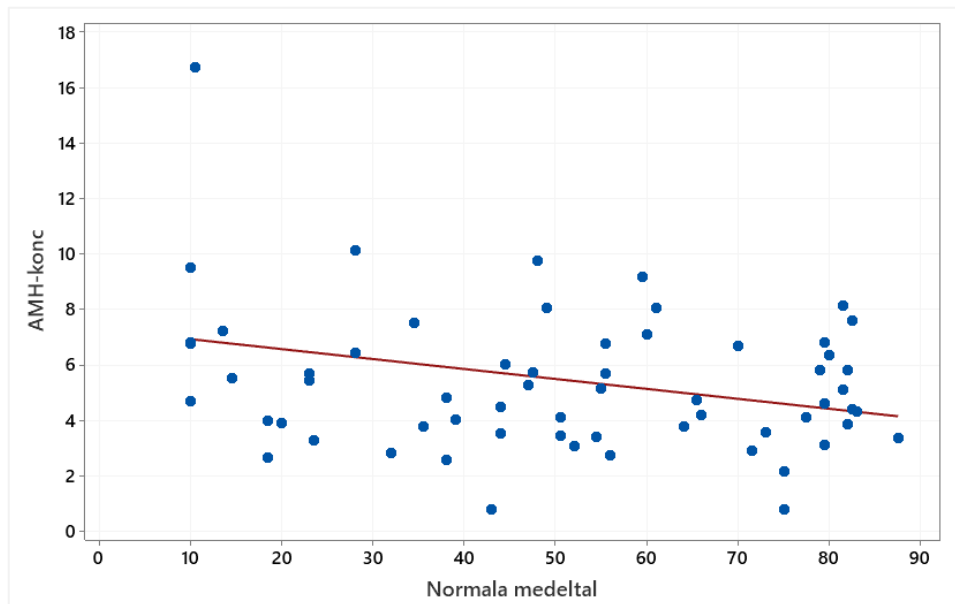
Populärvetenskaplig sammanfattning

Det här examensarbetet är ett delprojekt i en större undersökning om fruktsamheten hos hanhundar av rasen berner sennen. Rasklubben för sennenhundar har uppmärksammat att rasen har vissa problem med att många kullar har relativt få valpar med tanke på rasens storlek, och att många parningar inte resulterar i någon dräktighet. Därför kontaktade de SLU med en förfrågan om universitetet kunde genomföra forskning kring fruktsamheten hos rasen, vilket resulterade i ett större projekt som det här arbetet är en del av. I det här arbetet undersöks om ett hormon som heter Anti-Müllerskt hormon (AMH) kan användas som en markör för att bedöma en hanhunds fertilitet, och på så sätt lättare kunna avgöra en hanhunds möjlighet att bli pappa. AMH är ett hormon som i fosterstadiet hjälper till att styra det hanliga fostret till att bli just hane genom att förhindra de honliga könsorganen att utvecklas. Senare under livet produceras hormonet hos både honor och hanar i äggstockarna respektive testiklarna, och hormonet frisätts till viss del ut i blodbanan vilket gör att vi kan mäta koncentrationen av hormonet med ett blodprov. Hos kvinnor kan det användas för att ge en uppskattning hur många ägg kvinnan har kvar. Hos hanar har användandet varit mer begränsat, men man hoppas att AMH kan användas som en markör för produktionen av spermier eftersom det produceras av samma celltyp som hjälper till att forma och ge näring till spermernas utveckling. Tidigare studier har visat att hormonet även utsöndras i seminalplasman (som är den vätska som bär spermier) hos många arter, däribland människan. Hos män har ett flertal studier kunnat visa ett samband mellan koncentrationen av AMH i seminalplasman och olika tecken på spermakvalitet, så som antalet spermier, hur bra de simmar och olika defekter på spermernas utseende. Färre studier relaterar hormonets koncentration i blodet till dessa kvalitetstecken. Än så länge finns det ingen publicerad studie som undersöker dessa samband hos hund. I den här studien undersöks just därför om det finns någon koppling mellan koncentrationen av AMH i blodet eller seminalplasman och spermakvalitet även hos hund.

Vi undersökte 65 hanhundar av rasen berner sennen. Ägarna till hundarna fick svara på ett kortfattat hälsoformulär, hundarna undersöktes och de fick lämna spermavprov och blodprov. Sperman undersöktes sedan visuellt och i mikroskop. Vi mätte koncentrationen av AMH i blodproverna från hundarna, och i 16 av hundarnas spermavprov. Vi relaterade datan från undersökningen av spermier till koncentrationen av hormonet i blodet.

Ingen av proverna där hormon-koncentrationen mättes i seminalplasman hade koncentrationer som gick att mäta. Det tyder på att hundar inte utsöndrar hormonet till seminalplasman så som till exempel människor gör. När vi relaterade datan från koncentrationerna av hormonet i blodet med spermieundersökningen fann vi intressanta samband. Om koncentrationen av AMH i blodet var högre hade hundens spermier sämre rörlighet och fler defekter i utseendet. Framförallt ökade felaktigheter i utseendet på spermernas huvuden. Dessutom fann vi att koncentrationen av hormonet stiger med hundens ålder. Sammanfattningsvis har vi hittat indikationer på att mätning av koncentrationen av hormonet AMH kan ge en fingervisning av hundens spermakvalitet, men fortsatt forskning behövs för att bekräfta det här sambandet.

Bilaga 1



Figur 9. Sambandet mellan andel spermier med normal morfologi (%) och koncentrationen av AMH i serum (ng/ml)

Bilaga 2

Tabell 7. Lista över deltagande kliniker och antalet provtagna hundar per klinik

Veterinärklinik	Stad	Antal provtagna hundar
Universitetsdjursjukhuset, 2 deltagande veterinärer	Uppsala	23
Ulvby Smådjursklinik	Karlstad	2
Karlskrona Djurklinik	Lyckeby	5
Distriktsveterinärerna Gotland	Roma	1
Djurklinik i Skellefteå	Skellefteå	2
Aros Veterinärcentrum	Västerås	5
Hälsinge Smådjursklinik	Hudiksvall	6
Anicura Jägarvallens Djursjukhus	Linköping	3
Göteborgs Djurklinik	Göteborg	2
Gävle djurklinik	Gävle	1
Jönköpings smådjursklinik	Jönköping	10
Djurkliniken i Umeå	Umeå	1
Anicura Bagarmossen	Stockholm	1
Anicura Hässleholm	Hässleholm	1
PetVet Sweden	Piteå	2

Bilaga 3



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

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

PROVTAGNINGSPERSON - REMISS

Information om hunden (fylls i av ägaren)

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 bajsar, 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):	

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

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

1 (2)

Figur 10. Formulär kring hundens hälsa och avelshistorik som ägaren fyllde i

Bilaga 4



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; Smärta ☐ Ja ☐ Nej Avvikande konsistens ☐ Ja ☐ Nej Symmetri ☐ Ja ☐ Nej Storlek ☐ Ja ☐ Nej	
Provtagare:	Telefon:
Veterinärklinik:	Ort:
[Ort och Datum]	[Underskrift]
[Namnförtydligande/Stämpel]	

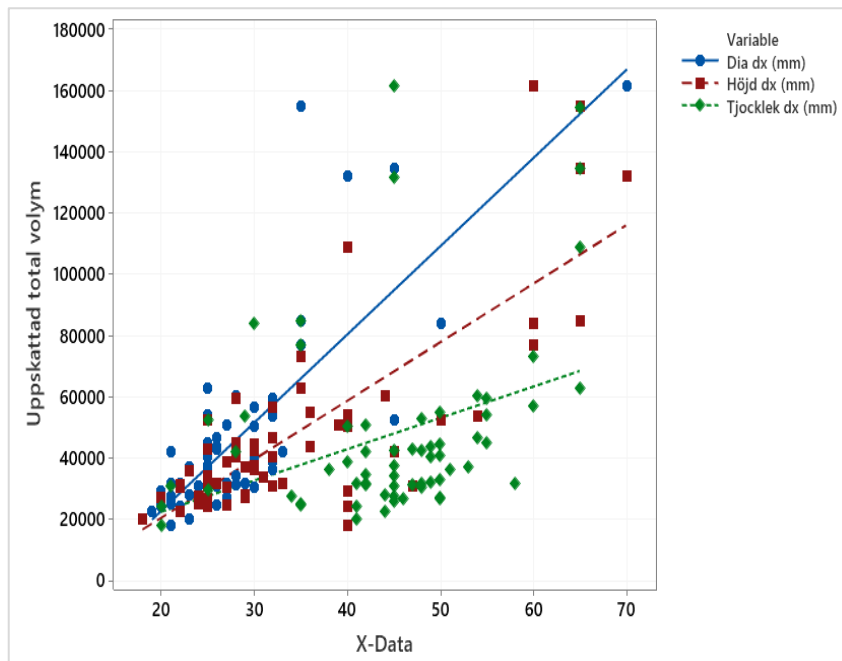
Proverna skickas till SLU, KV-lab Box 7054, 750 07 Uppsala
Ref: "Fruktsamhet hos Berner sennen hanar"

Kontaktinformation:
Bodil Ström Holst
Ida Hallberg

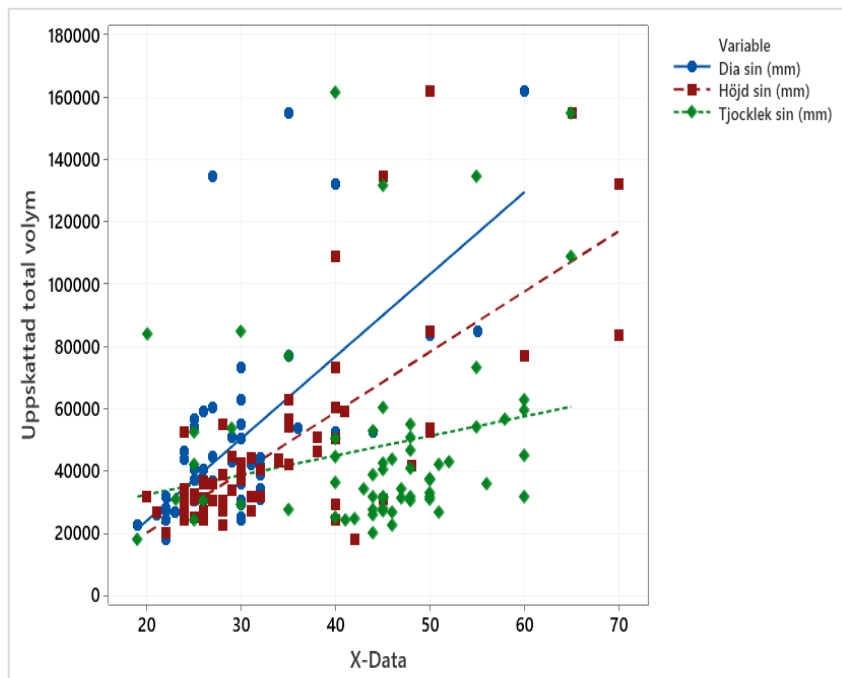
2 (2)

Figur 11. Formulär för provtagningen som provtagande veterinär fyllde i

Bilaga 5



Figur 12. Sambandet mellan testikelns diameter (blåa prickar), höjd (röda fyrkanter) respektive tjocklek (gröna romber) och den uppskattade volymen. Höger testikel.



Figur 13. Sambandet mellan testikelns diameter (blåa prickar), höjd (röda fyrkanter) respektive tjocklek (gröna romber) och den uppskattade volymen. Vänster testikel.