



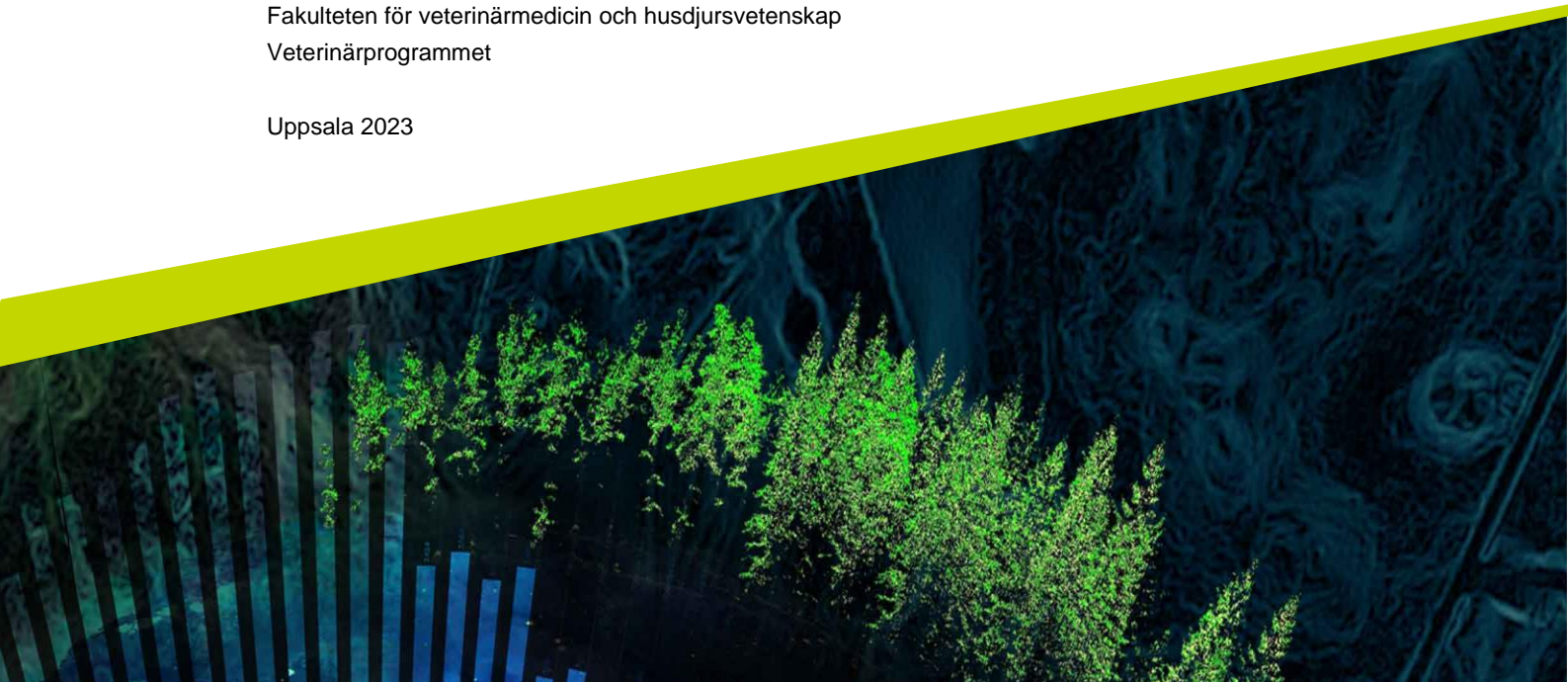
Anti-Müllerskt hormon (AMH) hos hanhund

Samband mellan avvikande testikelmorfologi,
hormonets distribution i testikelvävnaden och
koncentration i serum

August Rooth

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

Uppsala 2023



Anti-Müllerskt hormon hos hanhund. Samband mellan avvikande testikelmorfologi, hormonets distribution i testikelvävnaden och koncentration i serum.

Anti-Müllerian hormone in male dogs. The connection between abnormal testicular morphology, the distribution of the hormone in the testicular tissue and the hormonal serum concentration.

August Rooth

Handledare:	Bodil Ström Holst, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare:	Ida Hallberg, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Bitr. handledare:	Anna Svensson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator:	Jane Morrell, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2023
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

Nyckelord: Anti-Müllerskt hormon, AMH, Sertollicell, kryptorkism, immunohistokemi, testikelmorfologi, hanlig fertilitet hos hund

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Anti-Müllerskt hormon (AMH) är en av de första markörerna för hanlig könsutveckling i fosterstadiet hos däggdjur och fortsätter sedan att spela en stor roll för den hanliga fertiliteten. Hormonet produceras av testikelvävnadens Sertoliceller och bygger upp tubulära nätverk kallade seminiferösa tubuli, var spermatogenesisen äger rum. Hur uttrycket av AMH ser ut antas vara förknippat med Sertolicellens funktion och speglar därmed hur väl spermatogenesisen fungerar. AMH har hos ett flertal djurarter, däribland människa, häst och åsna, kunnat uppmätas i seminalplasma, men inte hos hund. En del av detta projekt har som fokus att studera AMH:s distribution i seminiferösa tubuli hos hund och sammankoppla utsöndringsmönstret med tubulis uppbyggnad och cellernas morfologi genom immunohistokemiska metoder.

I denna studie samlades testiklar och serum in från 22 hanhundar för etablerandet av en immunohistokemisk metod lämplig för studier av testikelvävnaden, varefter immunohistokemisk färgning av AMH i testikelvävnaden och analys av AMH i serum utfördes. Vävnaden bedömdes i ljusmikroskop där graden av immunohistokemisk infärgning och morfologin hos seminiferösa tubuli sammanvägdes och beskrevs, varefter resultatet jämfördes med serum AMH-koncentrationen hos respektive hund. Statistiskt signifikanta samband mellan ökad koncentration av serum AMH och onormal morfologi samt ökad immunohistokemisk infärgning av AMH i seminiferösa tubuli och förekomst av onormal morfologi kunde fastställas genom användande av Kruskal-Wallis test och Chi²-test. En högre halt AMH i både serum och seminiferösa tubuli kunde observeras hos alla förutom två av de hundar med onormal morfologi i form av avstannad spermatogenes eller Sertoli cell only-tubuli (SCO). Sammantaget har studien visat att det finns indikation att serum-AMH kan användas för att utvärdera en hanhunds testikulära morfologi och fertila förmåga, där höga nivåer av serum-AMH kan indikera en onormal morfologi och nedsatt fertilitet, men låga halter inte kan utesluta morfologiska förändringar.

Nyckelord: Anti-Müllerskt hormon, AMH, Sertolicell, kryptorkism, immunohistokemi, testikel-morfologi, hanlig fertilitet hund

Abstract

Anti-Müllerian hormone (AMH) is one of the first markers of male sex development in the fetal stage in mammals and continues to play a major role in the development of male fertility. The hormone is produced by the Sertoli cells of the testicular tissue, which builds a tubular network called seminiferous tubules, where spermatogenesis takes place. The expression of AMH is assumed to be associated with Sertoli cell function and thus is theorised to reflect how well spermatogenesis works. AMH has been measured in seminal plasma in several animal species, including humans, horses, and donkeys, but has not been possible in dogs. Part of this project focuses on studying the distribution of AMH in seminiferous tubules in dogs and connecting the secretion pattern of AMH with the structure of the tubules and the morphology of the cells through immunohistochemical staining methods.

In this study, testes and serum were collected from 22 male dogs for the establishment of an immunohistochemical method suitable for the study of the testicular tissue, after which immunohistochemical staining of AMH in the testicular tissue and analysis of AMH in serum were performed. The tissue was assessed under a light microscope, where the degree of immunohistochemical staining and the morphology of the seminiferous tubules were weighed together and described, after which the result was compared with the serum AMH concentration in the respective dog. Statistically significant relationships between the increased concentration of serum AMH and abnormal morphology as well as increased immunohistochemical staining of AMH in seminiferous tubules and occurrence of abnormal morphology could be established using Kruskal-Wallis's test and Chi² test. A higher level of AMH in both serum and seminiferous tubules was observed in all but two of the dogs with abnormal morphology in the form of arrested spermatogenesis or Sertoli cell only-tubules (SCO). Overall, the study showed an indication that serum AMH can be used to evaluate a dog's testicular morphology and fertility, where high levels of serum AMH can indicate an abnormal morphology and impaired fertility, but that low levels of AMH cannot rule out morphological changes.

Keywords: Anti-Müllerian hormone, AMH, Sertoli cell, cryptorchidism, immunohistochemistry, testicular morphology, male fertility dog

Innehållsförteckning

Förkortningar	9
1. Inledning	11
1.1 Hundens roll och vikten av en sund reproduktion	11
2. Litteraturöversikt	12
2.1 Hanlig reproduktionsfysiologi hos hund	12
2.1.1 Sertolicellen och dess funktion	13
2.1.2 Seminiferösa tubuli och dess funktion	15
2.1.3 Rete testis och dess funktion	16
2.1.4 Kryptorkism, tumörer och andra avvikelser	16
2.2 Anti-Müllerskt hormon	17
2.2.1 AMH:s funktion från foster fram till könsmognad	18
2.2.2 Hormonets inverkan på den hanliga fertiliteten	19
2.2.3 Kliniska applikationer för mätning av AMH	19
2.3 Antagandet om Sertolicellens terminala differentiering	20
2.3.1 Regression av Sertolicellens mognadsgrad	20
2.3.2 Möjligheten till åldersrelaterad regression av mognad hos Sertolicellen	22
2.4 Metoder för att studera anti-Müllerskt hormon	22
2.4.1 AMH Gen II-ELISA	22
2.4.2 Immunohistokemi	23
3. Material och metoder	26
3.1 Urval och material	26
3.2 Immunohistokemi	26
3.2.1 Etablering av immunohistokemiskt protokoll	26
3.2.2 Slutgiltigt immunohistokemisk protokoll	28
3.3 Mätning av AMH i serum	29
3.4 Bedömning av immunohistokemiska snitt	29
3.5 Statistiska metoder	31
3.6 Etiskt tillstånd	31
3.7 Litteratursökning	31
4. Resultat	32
4.1 Deltagande hundar	32
4.2 Bedömning av snitt	32

4.2.1 Morfologisk bedömning.....	32
4.2.2 Immunohistokemisk bedömning	35
4.2.3 Serum-AMH	38
5. Diskussion	41
5.1.1 Immunohistokemi.....	41
5.1.2 AMH i serum och seminiferösa tubuli	42
5.1.3 Sammanfattande ord	45
Referenser.....	46
Populärvetenskaplig sammanfattning	55
Tack	57
Bilaga 1: Immunohistokemiskt protokoll.....	58
Bilaga 2: Kruskal-Wallis, AMH vs förvaringstemperatur.....	59
Bilaga 3: Kruskal-Wallis, IHC vs morfologi	60
Bilaga 4: Kruskal-Wallis, AMH (ng/ml) vs. IHC	61
Bilaga 6: Chi2-test IHC vs. morfologi.....	62
Bilaga 7: Individual Value Plot, serum-AMH vs. genomsnittlig IHC-infärgning per individ.....	63
Bilaga 8: Individual Value plot, serum-AMH vs. testikelmorfologi.....	64
Bilaga 9: Tabell över IHC-styrka och antal preparat inom respektive kategori	65
Bilaga 10: Deskriptiv statistik	66

Förkortningar

ABC	Avidin-biotin-peroxidaskomplex
AMH	Anti-Müllerskt hormon
AR	Antigenhämtning/Antigen Retrieval
BTB	Blod-testisbarriären
DAB	Diaminobenzidin
FSH	Follikelstimulerande hormon
IHC	Immunohistokemi
KV	Institutionen för kliniska vetenskaper
LH	Luteiniserande hormon
RER	Kornigt endoplasmatiskt reticulum
SCO	Sertoli cell only-tubuli
SCT	Sertolicellstumör
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
UDS	Universitetsdjursjukhuset

1. Inledning

1.1 Hundens roll och vikten av en sund reproduktion

Hundens plats hos människan anses av många självklar. Hunden har följt människan i 10 000-tals år och har hållits för både sällskap och arbete. Människans och samhällets utveckling har lett till uppkomsten av en stor variation av raser genom selektiv avel på önskvärda egenskaper.

Förmågan att reproducera är en av de viktigaste egenskaperna hos samtliga flercelliga organismer. Rasavel hos våra husdjur, inklusive hunden, har i många fall fokuserat på andra egenskaper. Detta har lett till uppkomsten av en försämrad reproduktionsförmåga som kan ses hos både hon- och hanhund (Wildt *et al.* 1982; Leroy *et al.* 2015; Schrack *et al.* 2017).

Minskad genetisk diversitet hos avkomman som en följd av selektiv avel är vanligt, ofta på grund av att en och samma individ med en önskvärd egenskap används för att få fram många kullar, samt till följd av selektiv inavel för att bevara renheten hos en ras (Marelli *et al.* 2020). Reproduktionsrelaterade problem orsakade av osund avel och inavel inkluderar genetiskt betingad försämrad spermie-motilitet, sänkt spermieproduktion, förändrad spermie-morfologi, kryptorkism, ökad frekvens av dystoki, dystoki resulterande i kejsarsnitt hos brachycephala raser samt sänkt födelsevikt, kullstorlek och överlevnadsgrad hos avkomman (Bergström *et al.* 2006; Asher *et al.* 2009; England *et al.* 2010; Hollinshead & Hanlon 2017; Marelli *et al.* 2020).

Allt mer fokus läggs idag både inom veterinärmedicinsk forskning och inom kennelklubbarna på att få till en sundare hundavel och på att få bukt med de problem som århundraden av missgynnsam avel har gett upphov till. En del av arbetet och forskningen är fokuserad på hormoner och deras inverkan på utveckling av kön och upprätthållande av fertilitet, där Sertolicellen och dess produktion av signalsubstansen anti-Müllerskt hormon (AMH) spelar en viktig roll hos hanhund.

Syftet med följande arbete var att relatera avvikande morfologi till AMH-distributionen i testikelvävnaden samt till koncentrationen av AMH i serum.

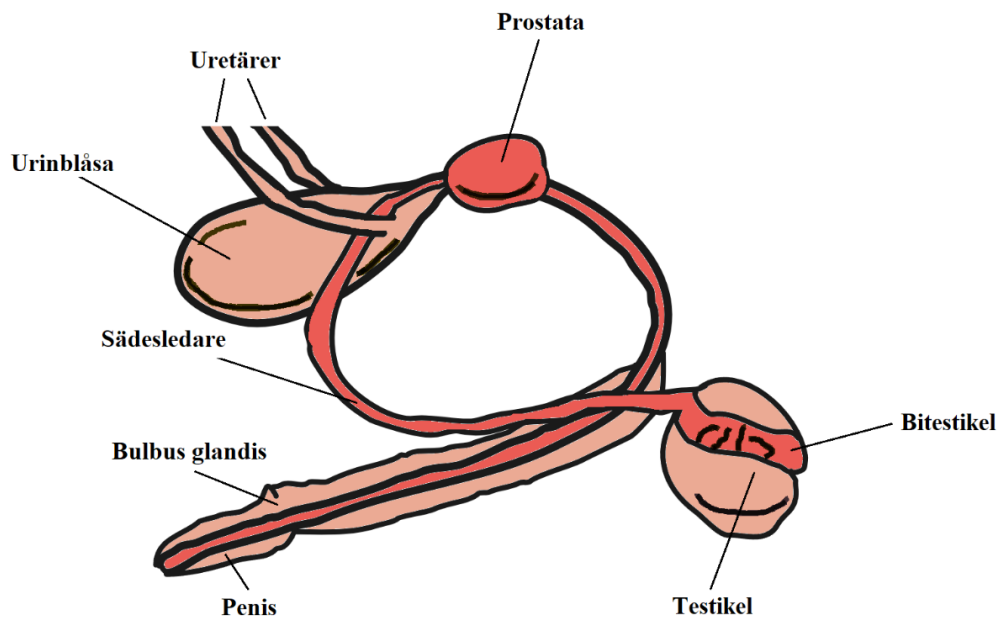
2. Litteraturöversikt

2.1 Hanlig reproduktionsfysiologi hos hund

De hanliga reproduktionsorganen kan delas upp i de externa och interna komponenterna. De yttre könsorganen innefattar penis och skrotum, medan de inre innefattar accessoriska könskörtlar, sädesledare, bitestiklar och testiklar (Gurung *et al.* 2022). Till de accessoriska könskörtlarna hör ampulla, bulbouretralkörtlarna, sädesblåsa och prostata, varav hund endast har prostata (se figur 1). De accessoriska könskörtlarna producerar och utsöndrar seminalplasma inför ejakulation och kombinerat med spermier kallas vätskan för sperma (Kareskoski & Katila 2008; Mantziaras 2020).

Seminalplasman möjliggör spermiers överlevnad i de honliga reproduktionsorganen genom att skapa en gynnsam miljö och ge näring till spermier (Reece & Rowe 2017). Hundens seminalplasma innehåller endast låga halter fruktos och hur hundens spermier förses med energi är inte helt utrett (Ponglowhapan *et al.* 2004). En hypotes är att utsöndring av monosackarider i vissa regioner i honliga genitalia kan spela en viktig roll för spermiers överlevnad efter ejakulation (Rigau *et al.* 2001).

Testiklarna är de primära reproduktionsorganen hos hanar och ansvarar för produktionen av androgener, däribland testosteron, samt för produktionen av de hanliga gameterna, spermier, genom spermatogenes (Tiwana & Leslie 2022). Testikeln består av rete testis, seminiferösa tubuli samt interstitiell vävnad i form av stödjevävnad, blodkärl och Leydigceller som producerar testosteron. Seminiferösa tubuli är den vävnadstyp som upptar majoriteten av utrymmet i testikelvävnaden och stöts av trabeculae från *tunica albuginea*, som omger testikeln (Foley 2001; Bronson 2011; Gurung *et al.* 2022).



Figur 1: Hundens hanliga könsorgan, illustrerad av August Rooth.

2.1.1 Sertolicellen och dess funktion

Sertolicellens normala morfologi

Sertolicellen är en stor, trädliknande cell med långa cytoplasmiska grenar som omfamnar germinalcellerna (Russell & Peterson 1993). Cellens form och organellernas position varierar med djurslag och spermatogenesstadium (Lara *et al.* 2018). Den basala delen av cellen fäster i seminiferösa tubulis basalmembran och cellens apikala del sträcker sig mot seminiferösa tubulis lumen och omges av germinalceller. Cellens kärna återfinns nära basalmembranet (Nagano 1966).

Den mogna Sertolicellen har en stor, lätt triangelformad, eukromatisk nukleus med djupa invaginationer i det nukleära membranet och omges av vimentinintermediärfilament (França *et al.* 2016). Kärnans nukleol är förhållandevis stor och uppdelad i tre distinkta avdelningar (Schulze *et al.* 1976; França *et al.* 2016).

Omogna Sertoliceller bildar ett pseudostratifierat epitel och har en cellkärna som har ett mer avrundat utseende och saknar invaginationer, med en nukleol utan tripartit uppdelning (Schulze *et al.* 1976; Nistal *et al.* 1990). Den omogna Sertolicellens cytoplasma innehåller en stor mängd kornigt endoplasmiskt reticulum, små runda mitokondrier och uppvisar en generell avsaknad på *annulate lamellae*, Charcot Böttcher-kristaller och intercellulära junctions (Nistal *et al.* 1990).

Sertolicellens funktion

Sertolicellerna klassas som stödjeceller och ger näring och stöd genom sina förgreningar till germinalcellerna i basallamina och de mognande spermatocyterna (Griswold 1998; Bronson 2011; Chłopik & Wysokińska 2020). Varje Sertolicell

kan ge stöd och näring åt ett visst antal germinalceller. Hur många germinalceller varje Sertolicell kan försörja varierar från art till art, men några större variationer inom samma djurslag anses inte förekomma (Griswold 1998). Antalet germinalceller som varje Sertolicell kan ge stöd åt under de olika stegen av spermatogenesisen kallas för Sertolicellseffektivitet och har fastställts hos ett antal djurslag, däribland människa, gerbil och get, med antalen 30-50, 7-13 respektive cirka 40 germinalceller per Sertolicell, men till författaren av denna texts vetenskap har ingen liknande studie genomförts på hund (Russell & Peterson 1984; Leal *et al.* 2004; Yan *et al.* 2007). Antalet Sertoliceller i testikelvävnaden anses vara direkt relaterat till spermieproduktionen per dag hos den vuxna individen och att det utvecklas tillräckligt med Sertoliceller under fosterfasen är därmed viktigt för individens framtida fertilitet (Sharpe *et al.* 2003).

Sertolicellerna producerar ett antal specifika produkter, bland annat glykoproteiner, som tillsammans anses essentiella för spermatogenesisen och frisätter dessa till det adluminala utrymmet för att bilda en optimal miljö för de mognande spermerna (Reece & Rowe 2017). Glykoproteiner som bildas av Sertolicellerna kan delas in i fyra huvudkategorier baserat på deras huvudsakliga funktion, nämligen transport eller bioprotektiva glykoproteiner, proteas eller proteasinhibitorer, glykoproteiner som bildar basalmembranet mellan Sertolicellerna och de peritubulära cellerna samt regulatoriska glykoproteiner. Till bioprotektiva/transportglykoproteiner hör metalljontransportproteiner, så som transferrin och ceruloplasmin. Proteaser och proteasinhibitorer är viktiga för remodeleringsprocesser och förflyttningen av spermatocyter till det adluminala utrymmet (Griswold 1998). Sertolicellernas regulatoriska glykoproteiner har trots låg utsöndring en stor biokemisk inverkan. Till dessa hör tillväxtfaktorer och parakrina signalsubstanser, så som AMH och inhibin (Griswold 1998).

Spermiernas stamceller uttrycker inte receptorer för vare sig follikelstimulerande hormon (FSH) eller androgen, vilket tyder på att hormonens effekt på spermatogenesisen medieras av Sertolicellernas produktion av andra hormoner och ämnen som kan agera parakrint, autokrint eller endokrint (Sansone *et al.* 2019).

Könsognadsutlösta förändringar

Under puberteten genomgår Sertolicellen sin slutgiltiga differentiering och får en förändrad funktion och ett annat utseende. Cellerna förlorar sin proliferativa förmåga, intercellulära tight-junctions etableras och fokus går från celledelning till en spermatogenesisstödjande roll med en nedreglerad produktion och utsöndring av AMH till blodomloppet (Sharpe *et al.* 2003). Cellen får morfologiska förändringar, bland annat större, mer irreguljär nukleus samt en mer prominent nukleol (Sharpe *et al.* 2003)

Testosteron, FSH och thyroideahormon (T_3) spelar en viktig roll för mognaden av Sertolicellen (Sharpe *et al.* 2003). FSH stimulerar initialt en proliferation av

Sertolicellen men får i samverkan med T₃ cellerna att öka sitt uttryck av androgenreceptorer. Detta möjliggör en ökad inbindning av testosteron, vilket initierar mognad av Sertolicellen (Sharpe *et al.* 2003; Petersen & Söder 2006). T₃ är även själv viktig för en övergång från omogen till adult Sertolicell då hormonet motverkar FSHs proliferativa inverkan genom öka uttryck av protein som hämmar proliferation (Tarulli *et al.* 2012).

2.1.2 Seminiferösa tubuli och dess funktion

Seminiferösa tubuli byggs upp av Sertoliceller. Sertolicellernas ticht junctions bildar blod-testisbarriären (BTB) och delar upp seminiferösa tubuli i två avdelningar: Basala- och adluminala avdelningen (Reece & Rowe 2017). BTB är viktigt för spermatogenesisen i och med att den möjliggör bildandet av en optimal miljö för de mognande spermerna, samt skiljer spermerna från kroppens immunförsvar (Chłopik & Wysokińska 2020). Genom att skapa en immunologisk barriär separerar BTB kroppens immunförsvar från många germinalcellsspecifika antigen (O’Rand & Romrell 1977; Cheng & Mruk 2012). Utan en fungerande BTB kan antikroppar riktade mot spermiespecifika antigen bildas, vilket kan leda till infertilitet till följd av bland annat agglutination och en försämrad förmåga hos spermien att penetrera cervikala mukus (Francavilla 2007).

Seminiferösa tubuli har även en egen immunosuppressiv, antibakteriell och antiviral försvarsmekanism som verkar i synergi med BTB för att upprätthålla seminiferösa tubulis specifika immunstatus. Sertolicellen spelar en viktig roll i denna försvarsmekanism, bland annat genom frisättandet av molekyler som hämmar immunförsvarets respons på närvaron av kroppsegna antigen som uttrycks av germinalcellerna i den basala avdelningen. Mekanismerna bakom denna nedreglerande effekt är fortfarande inte helt utredd, men en studie utförd 2010 kunde fastställa att molekylerna som utsöndras från Sertolicellen utövar sin nedreglerande effekt på immunförsvaret genom att binda in direkt till T-celler (Mital *et al.* 2010).

Könsmognadsutlösta förändringar

Under könsmognaden sker en expansion av seminiferösa tubuli till följd av Sertolicellernas mognande och en förflyttning av germinalcellerna från det basala utrymmet till seminiferösa tubulis basallager, där de får en ökad meiotisk aktivitet och inleder spermatogenesisen. Hos hund inträffar detta vid cirka fyra månaders ålder (Sharpe *et al.* 2003; Cheng & Mruk 2015; Kasimanickam & Kasimanickam 2022).

Hanliga gameter (spermier) produceras genom spermatogenesis. Spermatogenesisen delas in i tre faser: spermatocytogenes, spermiogenes och spermiering. Samtliga steg äger rum i seminiferösa tubuli (Chłopik & Wysokińska 2020). Under den första fasan, spermatocytogenesisen, sker mitos av germinalcellerna, spermernas stamceller, varefter cellerna genomgår flera steg av celledelning för att till slut

bli haploida spermier (Nishimura & L'Hernault 2017; Chłopik & Wysokińska 2020). Under den andra fasen, spermiogenesen, som sker i seminiferösa tubuli adluminala utrymme, sker mognad av spermatiderna, en process i flera steg som medför ett flertal cellkärne- och cytoplasmatiska förändringar. Mognaden leder bland annat till uppkomsten av spermiers motila förmåga i form av en flagell (Nishimura & L'Hernault 2017). Den mognande gameten släpps under spermatogenesens tredje fas, spermieringen, ut i seminiferösa lumen från det adluminala utrymmet mellan sertolicellerna och blir en spermie (Nishimura & L'Hernault 2017; Chłopik & Wysokińska 2020).

2.1.3 Rete testis och dess funktion

Rete testis är ett intratestikulärt nätverk av hålrum och raka tubuli som tar emot innehållet från seminiferösa tubuli och sammanbinder seminiferösa tubuli med de efferenta kanalerna och bitestikeln (Reece & Rowe 2017; Kulibin & Malolina 2020). Seminiferösa tubuli härstammar från de embryonala testissträngarna medan rete testis härstammar från mesonephros och vävnadernas utveckling påbörjas under embryonalperioden och fortsätter postnalt (Kulibin & Malolina 2020, 2021).

Spermier produceras kontinuerligt i seminiferösa tubuli och transporteras genom rete testes för att genomgå mognad och lagras i bitestikeln (Reece & Rowe 2017). En publikation från 2020 beskriver förekomsten av Sertolicellsliknande celler i rete testis i både mogen och omogen vävnad som återfinns vid övergången mellan rete testis och seminiferösa tubuli. Dessa celler uttrycker specifika markörer för både Sertoliceller, i form av AMH, och för reteceller (PAX8) samt markörer som finns i både Sertoliceller och reteceller (SOX9) (Kulibin & Malolina 2020).

Kulibin & Malolina observerade 2021 att en del av dessa Sertoliliknande celler fortsatte att uttrycka PAX8, men ett minskat uttryck av AMH, under utvecklingen av rete testis. Samtliga celler producerade DMRT1, en markör som anses vara specifik för Sertoliceller. Författarna kunde dessutom observera celler positiva för samtliga tre markörer i rete testis hos postnatala möss. Cellernas utseende liknade den som icke-differentierade Sertoliceller hos prepubertala djur uppvisar. Den största skillnaden från vanliga Sertoliceller var att de Sertoliliknande cellerna behöll sin förmåga att dela sig efter födseln, en förmåga som Sertolicellerna förlorar allteftersom deras mognad fortskrider. Denna kvarstående förmåga till mitos anses vara viktig för möjliggörandet av vidareutvecklingen av rete testis postnalt (Kulibin & Malolina 2021).

2.1.4 Kryptorkism, tumörer och andra avvikelser

Begreppet "kryptorkism" beskriver en utvecklingsstörning hos det hanliga fostret där en komplett nedvandring av testiklarna i skrotum uteblir, och är en vanlig

utvecklingsstörning hos hund (Veronesi *et al.* 2009). Kryptorkida testiklar kan finnas i abdomen, inguinalringen eller inguinalkanalen och avvikelserna kan vara uni- eller bilateral. Unilateral kryptorkism är vanligast och förekommer i cirka 75 % av fallen (Romagnoli 1991; Veronesi *et al.* 2009). Prevalensen av kryptorkism hos hund ligger på 1-15 % och felet förekommer oftare hos små och inavlade hundar och drabbar oftare höger testikel (Romagnoli 1991; Veronesi *et al.* 2009).

Hos många djurarter, inklusive människa, sker nedvandringen prenatalt och diagnosen kryptorkism kan ställas direkt vid födseln. Hos hund är testiklarna vid födseln fortfarande kvar i abdomen och vandrar ner under de första levnadsveckorna. Testiklarna ska vara palpabla i skrotum vid sex till åtta veckors ålder för att det ska anses normalt (Romagnoli 1991).

Diagnosen kryptorkism ställs vanligen genom palpation och inspektion av skrotum och kan hos hund ställas definitivt först vid sex månaders ålder eftersom testiklarna kan vandra ner fram till denna ålder varefter inguinalkanalens slutning inträffar (Romagnoli 1991). Alternativa metoder för att diagnostisera och skilja på inguinal- och abdominal kryptorkism har föreslagits, exempelvis användande av ultraljudsundersökning och mätning av AMH i serum (Felumlee *et al.* 2012; Holst 2017; Khan *et al.* 2018).

Påverkan och följder av kryptorkism

Kryptorkism medför en påverkan på den testikulära vävnaden. Kryptorkida testiklar är mindre i storlek och har en mindre fast konsistens än normala skrotala testiklar (Veronesi *et al.* 2009). Vid histologiska undersökningar av kryptorkida testiklar kan Sertoli cell only-tubuli (SCO), det vill säga tubuli bestående av endast Sertoliceller och inga andra celltyper, eller total avsaknad av tubulistrukturer i testikelvävnaden observeras (Veronesi *et al.* 2009). Hos hund förekommer SCO-tubuli i kilformade segment eftersom hundens testikel är uppdelad i olika segment av bindvävshinnor (Foley 2001).

Fertiliteten är negativt påverkad hos kryptorkida hundar och bilateralt kryptorkida hundar anses inte vara fertila (Romagnoli 1991). Unilateralt kryptorkida hundar kan vara fertila i och med att de kan ha en normal skrotal testikel, men anses över lag ha en lägre fertilitet än icke-kryptorkida hundar (Romagnoli 1991; Veronesi *et al.* 2009). Kryptorkism orsakar hos hund även en försämrad Leydig-cellsfunktion med sänkt testosteronproduktion (Khan *et al.* 2018).

2.2 Anti-Müllerskt hormon

Anti-Müllerskt hormon, även kallat Müllerian Inhibiting Substance (MIS), tillhör familjen Transforming Growth Factor- β (TGF- β) och är ett glykoprotein som uttrycks i höga halter under embryots könsdifferentiering. Hormonet har identifierats som en av de tidigaste markörerna för Sertolicellsfunktion hos många djur-

arter, inklusive människa, men produceras även hos hondjur i äggstockarna (Josso *et al.* 2001; Grinspon & Rey 2010). Sex determining factor (SRY) genen och uttrycket av transkriptionsfaktor SOX9 hos Sertolicellerna anses ansvara för initieringen av utsöndringen av AMH (Petersen & Söder 2006; Sansone *et al.* 2019).

2.2.1 AMH:s funktion från foster fram till könsmognad

Hormonets funktion hos det hanliga fostret

Hos hanliga foster produceras AMH i testikelns Sertoliceller och utsöndras till blodomloppet i höga halter från och med embryots könsdifferentiering fram till genomgången pubertet, varefter utsöndring till blodet sjunker markant (Josso *et al.* 2001). Utsöndringen av hormonet initieras av ökade nivåer av FSH hos embryot som binder in till de omogna Sertolicellerna och stimulerar proliferation och en ökad transkription av AMH (Young *et al.* 2005).

Under den tidiga fosterutvecklingen bildar alla däggdjursfoster prekursorerna till både de honliga- och hanliga könsorganen, de Müllerska respektive Wolffska gångarna, vilka uttrycker receptorer för AMH under en viss period av fosterutvecklingen. Beroende på den hormonella inverkan fostret utsätts för utvecklas prekursorerna sedan vidare till könsens respektive gonader. Hos det hanliga fostret bildas testosteron och AMH (Cohen-Haguenauer *et al.* 1987; Rey *et al.* 2003). AMH binder in till receptorer i de Müllerska gångarna hos embryot, vilket initierar apoptos och tillbakautveckling av de Müllerska gångarna och signalerar starten av den hanliga könsutvecklingen. Utan inverkan från AMH utvecklas de Müllerska gångarna till de honliga tubulära könsorganen (Cohen-Haguenauer *et al.* 1987). Omogna Sertoliceller utsöndrar mer AMH över basallagret in i blodcirkulationen än till seminiferösa tubuli (Isikoglu *et al.* 2006).

Hormonets funktion hos det könsmogna handjuret

Serumkoncentrationen av AMH sjunker markant efter könsmognad hos ett flertal däggdjur, däribland människa, häst och hund (Vigier *et al.* 1983; Ball *et al.* 2008; Kasimanickam & Kasimanickam 2022). Den markanta sänkningen av serum-AMH i samband med puberteten har hos människa kunnat kopplas till dels en mognad av Sertolicellerna, dels en förstärkning av blodtestisbarriären med tight-junctions. Dessa förändringar leder till att frisättningen av AMH riktas om från blodomloppet till seminiferösa tubulis lumen, varför höga halter AMH kan uppmätas i seminalplasman hos könsmogna män, samt hos hästar och åsnor (Fénichel *et al.* 1999; Claes *et al.* 2013; Holst *et al.* 2020). En studie utförd av Hallberg *et al.* (2022) med fokus på AMH-koncentrationen i seminalplasman hos hund visar att till skillnad från övriga studerade djurarter var koncentrationen AMH i seminalplasma hos hund under detektionsgränsen.

Sänkningen av AMH i serum i samband med puberteten är markant, men är inte plötslig, utan sker gradvis (Sharpe *et al.* 2003). Chemes *et al.* (2008) kunde med immunohistokemi observera en avsaknad av androgenreceptorer hos omogna Sertoliceller. Under puberteten ökar uttrycket av androgenreceptorer hos Sertolicellerna, vilket leder till att mängden AMH som utsöndras från cellerna ut i blodströmmen minskar (Domain *et al.* 2022). I samband med att uttrycket av androgenreceptorer ökar får androgener, så som testosteron, en negativ korrelation med AMH, där serum-AMH minskar när serumtestosteronhalterna ökar (Rey 1998). Detta är en följd av en ökad produktion och inbindning av testosteron till Sertolicellerna, men för att nedregleringen ska ske krävs också en samtida ökad förekomst av meiotiska germinalceller (Rey 1998; Domain *et al.* 2022).

2.2.2 Hormonets inverkan på den hanliga fertiliteten

Sertolicellerna har en etablerad roll som stödjecell för de meiotiska germinalcellerna och förser dem med nutrition och skydd och spelar därmed en viktig roll för fertiliteten, men åsikterna om AMH:s inverkan på fertiliteten är omdiskuterad (Domain *et al.* 2022). AMH har både autokrina och parakrina egenskaper genom inbindning till receptorn AMH-II, vilket lett till hypoteser om hormonets involvering i spermatogenesisen (Aksglæde *et al.* 2018). Vad hormonet spelar för roll för spermatogenesisen är dock fortfarande inte helt utrett.

Racine *et al.* (1998) beskriver att AMH minskar uttrycket av LH-receptorer på Leydigcellerna, vilket innebär att ju högre nivå av AMH, desto mindre testosteron produceras och utsöndras från Leydigcellerna. Testosteron är viktigt för spermatogenesisen (Culty *et al.* 2018). Höga nivåer av serum-AMH kan därmed teoretiskt medföra en sänkt spermieproduktion och fertilitet, men det är omdiskuterat. Vid studier av testiklar tagna från deslorelinbehandlade hundar har man kunnat observera att läkemedlets inducerade LH-okänslighet i testikelvävnaden leder till att Sertolicellerna uppvisar ett mer omoget utseende och återupptar produktion och utsöndring av AMH (Balogh *et al.* 2021). I samband med deslorelinbehandling upphör även spermatogenesisen och seminiferösa tubuli atrofierar (Junaidi *et al.* 2009).

Hos hund har Domain *et al.* (2022) kunnat fastställa att det finns en negativ korrelation mellan total motilitet, progressiv motilitet och normal morfologi hos spermier och serum-AMH och drar slutsatsen att en ökning av serum-AMH kan reflektera abnorm Sertolicellsfunktion hos hund.

2.2.3 Kliniska applikationer för mätning av AMH

Det finns ett flertal studier som beskriver möjliga kliniska applikationer av att mäta AMH i serum. Banco *et al.* (2012) beskriver att koncentrationen av serum-AMH stiger i samband med utvecklandet av Sertolicellstumörer (SCT) och AMH kan

därför användas som ett effektivt verktyg för diagnostisering av tumörtyper genom analys av hormonet i serum (Holst & Dreimanis 2015). Serummatning kan även användas för att utvärdera Disorders of Sexual Development (DSD) hos individer med tvetydiga externa genitalia samt kryptorkism hos hund (Pecile *et al.* 2021; Walter *et al.* 2022).

Hos både han- och hondjur kan AMH användas som markör för att utvärdera förekomst av gonadvävnad eftersom AMH även produceras i äggstockens granulosa-celler. Uppmätbara AMH-koncentrationer hos både hanhund och tik tyder på förekomst av gonadvävnad och kan exempelvis användas för att utvärdera förekomst av aktiv äggstocksvävnad hos kastrerade tikar (Turna Yilmaz *et al.* 2015; Holst 2017; Alm & Holst 2018).

Hos människa har serum-AMH hos kvinnor fått större fokus inom fertilitetsforskningen och kan effektivt användas för att utvärdera äggstocksreserven hos fertila kvinnor, beräkna ungefärlig tid kvar till insättande av klimakteriet, bedöma allvarlighetsgraden för tillstånd så som Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) samt grad av återgång till fertilitet hos kvinnor efter kemoterapi-behandling (Li *et al.* 2021; Tehrani *et al.* 2022).

Hormonet kan hos hund även ses som en potentiell biomarkör för fertilitet hos både tik och hanhund. Hormonets serumkoncentration verkar vara positivt korrelerad med nedsatt motilitet och huvuddefekter hos spermier från vuxna hanhundar, medan det hos tik är positivt korrelerat med kullstorlek (Hollinshead *et al.* 2017; Hallberg *et al.* 2022). Samspelet mellan AMH och infertilitet hos hanhund är fortfarande inte helt utrett, men studier visar att korrelation finns (Balogh *et al.* 2021).

2.3 Antagandet om Sertolicellens terminala differentiering

Antagandet att den adulta Sertolicellen förlorar sin förmåga att dela sig har sitt ursprung hos cellens upptäcktsman Enrico Sertoli som 1865 beskrev upptäckten av en spindelliknande cell som saknade förmågan att dela sig (Sertoli 1865). Sertolicellens mognad och slutdifferentiering har länge tagits som ett faktum hugget i sten, men under de senaste åren har det blivit allt mer omdiskuterat.

2.3.1 Regression av Sertolicellens mognadsgrad

Det finns ett flertal fastställda patologiska processer som kan orsaka en ”regression” av Sertolicellens mognadsgrad och kan ge upphov till uttryck av markörer förenade med den prepubertala Sertolicellen. Exempel på sådana processer är SCO-tubuli och SCT (Steger 1999; Banco *et al.* 2012).

Steger (1999) beskriver upptäckten av adulta Sertoliceller som uttrycker cellmarkörerna AMH, CK18 och M2A-antigen. Samtliga markörer anses vara förenade med den omogna Sertolicellen och uppvisar en tidsmässig ordning i när deras uttryck nedregleras under mognaden, med en initial nedreglering av CK18, följt av M2A och sist AMH. Uttrycket av dessa markörer måste upphöra för en fungerande spermatogenes. Olika patologiska tillstånd i testikelvävnaden kan få AMH och CK18 att återuttryckas, men inte M2A, vars upphörda uttryck anses utgöra en terminal punkt mellan den prepubertala- och adulta Sertolicellen. Med detta i åtanke föreslår författaren att Sertoliceller som uttrycker AMH efter puberteten, men som saknar M2A-antigen, är adulta som reverterat i differentieringsgrad och återfått AMH-uttrycket (Steger 1999).

Steger (1999) beskriver även en beroenderelation mellan spermatogenesen och Sertolicellerna och att en fungerande spermatogenes krävs för att upprätthålla Sertolicellernas differentiering och att adulta Sertoliceller krävs för att spermatogenesen ska upprätthållas. Utan en fungerande spermatogenes reverterar Sertolicellen till ett mer omoget stadium och uttrycker bland annat AMH och CK18.

En senare studie fokuserad på Sertoliceller hos åldrande råttor observerade en funktionsförlust som påverkade både Sertoli- och germinalcellerna. Detta tyder på nödvändigheten av den tvåvägskommunikation som germinalcellerna och Sertolicellerna har under spermatogenesen och att en förlust av kommunikationen leder till en regression av båda celltyper (Syed & Hecht 2001).

I en annan studie studerades knock-out möss och författarna kunde i studien observera att Sertoliceller i SCO-tubuli återupptar produktionen av AMH. Dessa Sertoliceller uttryckte fortfarande androgenreceptorer och författarna drog slutsatsen att Sertolicellerna befann sig i ett ”intermediärtillstånd” med en viss regression av mognadsgrad. Återupptaget verkade dock inte induceras av en frånvaro av germinalceller då AMH i många fall uttrycktes i högre grad i tubuli med förekomst av meiotiska och postmeiotiska germinalceller (Behr *et al.* 2007).

Sertolicellen efter puberteten behåller sin kärna, uttrycker fortfarande ovanliga gener och proteiner associerade med proliferation och behåller även en förmåga till DNA-reparation som inte är karaktäristisk för slutdifferentierade celler, exempelvis keratocyter. Detta anses av Haverfield *et al.* (2015) vara ett bevis mot att den adulta Sertolicellen är terminalt differentierad.

Gonadotropins inverkan på Sertolicellens mognadsgrad

Sertolicellernas mognad påverkas av närvaron, men framför allt avsaknaden, av gonadotropin. Under förhållanden med låga koncentrationer av fritt gonadotropin återfår Sertolicellen uttrycket av markörer och protein som är förenade med en mer omogen Sertolicell, däribland prolifererande cell nuclear antigen (PCNA), och teoretiseras även återfå en viss grad av proliferativ förmåga (Tarulli *et al.* 2012).

2.3.2 Möjligheten till åldersrelaterad regression av mognad hos Sertolicellen

Hos det åldrande däggdjuret genomgår seminiferösa tubuli en rad förändringar som medför en partiell eller total regression samtidigt som stora delar av germinalcellslagret går förlorat och spermatogenesen avstannar (Syed & Hecht 2001). Förlusten av germinalceller leder till uppkomsten av degenererade tubuli bestående av enbart Sertoliceller (SCO) (Paniagua *et al.* 1985). Uppkomsten av SCO kan dels hänföras till en minskad produktion av testosteron, dels till ett minskat uttryck av för germinalcellerna viktiga substanser från Sertolicellen, bland annat clusterin och transferrin (Syed & Hecht 2001).

Med ökad ålder sker även en försämring av Leydigcellernas funktion, vilket leder till en sänkt testosteronproduktion. Denna försämring orsakas av en defekt i gonadotropinkontrollen av Leydigcellen samt inre förändringar i cellerna, vilket leder till färre Leydigceller i vävnaden på grund av apoptos samt en försämrad inverkan från LH på Leydigcellerna (Huhtaniemi & Teerds 2018).

I en studie utförd 1985 beskrivs förekomsten av åldersrelaterade morfologiska förändringar hos den humana Sertolicellen, så som uppkomst av morfologi associerad till omogna Sertoliceller, och inkluderar en mer avrundad kärna och en ökad mängd cytofilament. Dessa fynd bedöms tyda på att Sertolicellerna genomgått en regression till ett mer omoget stadium (Schulze & Schulze 1981). Samma slutsats drogs i en senare studie där liknande morfologiska förändringar hos adulta Sertoliceller beskrivs. Dessa Sertoliceller var mer differentierade i jämförelse med prepubertala Sertoliceller, men uppvisade morfologiska tecken associerade med omogna Sertoliceller i form av en mer avrundad cellkärna utan välutvecklad nukleol, ett mindre RER samt avsaknad av *annulate lamellae*. Författarna anger att dessa immaturliknande Sertoliceller även kan ses hos unga individer men att de är väldigt ovanliga och slutsatsen är att deras uppkomst och utbredning i den åldrande testikelvävnaden beror på en regression av mognadsgrad (Paniagua *et al.* 1985).

2.4 Metoder för att studera anti-Müllerskt hormon

2.4.1 AMH Gen II-ELISA

Det finns idag kommersiella kit för mätning av AMH från 14 olika tillverkare (Ferguson *et al.* 2020), däribland AMH Gen II-ELISA som är den mest använda metoden för analys av AMH (Li *et al.* 2021). Ett problem inom AMH-forskningen är en avsaknad av kliniska referensintervall för AMH hos människa och olika djurslag, vilket försvårar jämförelse mellan de tillgängliga kiten (Li *et al.* 2021). WHO arbetar för närvarande med att ta fram en referensreagent för AMH som kan

användas för att ta fram jämförbara referensvärden för de olika kiten (Ferguson *et al.* 2020).

Användandet av ELISA för analysering av AMH beskrevs första gången i tre studier utförda 1990 (Baker *et al.* 1990; Hudson *et al.* 1990; Josso *et al.* 1990). Metoden har sedan dess genomgått flera steg av utveckling och 2010 lanserades AMH Gen II-ELISA (Kumar *et al.* 2010). AMH Gen II-ELISA är en enzymatiskt förstärkt två-site immunoassay som använder sig av monoklonala antikroppar som riktar sig mot epitoper i både den aktiva delen av AMH-molekylen och i den region som ofta klyvs av (van Helden & Weiskirchen 2015; Groome *et al.* 2011). I och med detta kan man med metoden mäta den totala mängden hormon i provet, både de klivna, icke-kovalenta associerade komplexen (AMHN,C) och den kompletta AMH-molekylen (proAMH) (Gassner & Jung 2014).

Metoden har en del nackdelar. I och med att AMH Gen II-ELISA är en manuellt utförd teknik så karaktäriseras den av en hög grad av variation i analysresultat, även inom samma laboratorium (Hyldgaard *et al.* 2015; van Helden & Weiskirchen 2015). Gen II-ELISA har även haft en del problem med komplementinterferens på grund av att capture-antikropparna som används binder till serumkomplementfaktor C1q och det sker en aggregering, vilket kan ge upphov till analysfel (Gassner & Jung 2014; Li *et al.* 2021). Komplementinterferensen påverkas av variation i spädning av lösningar och förvaringsförhållanden och är som högst vid analys av färsk serumprov med högre innehåll av komplementfaktorer och kan leda till upp till 70% lägre serum-AMH koncentration än den reella koncentrationen (Gassner & Jung 2014; Li *et al.* 2021). För att motverka felkällan med komplementinterferens har tillverkaren introducerat ett pre-mixing protokoll, vilket minskat påverkan från komplementfaktorerna (Li *et al.* 2021). En annan källa till felaktigt höga serumvärden är förekomsten av heterofila antikroppar som interfererar genom att binda till analysantikropparna som används i Gen II-ELISA (Bergman *et al.* 2019).

Förvaringen av serumproven kan även påverka resultatet. Rey *et al.* (1993) kunde i serum från människa uppmäta en signifikant ökning av AMH när författaren jämförde färsk serumprov med serumprov som förvarats i -20°C.-Morse & Ora (2016) studerade långtidsförvaring av AMH-serum i -80°C och kom fram till att ingen signifikant skillnad i AMH-koncentration mellan färskt serum och serum förvarat på detta sätt kunde observeras.

2.4.2 Immunohistokemi

Immunohistokemi (IHC) är en metod som används för att detektera och lokalisera proteiner och antigen i fixerade vävnader genom utnyttjandet av specifika bindningssites hos antikroppar och antigen (Bilinska *et al.* 2018; Magaki *et al.* 2019). Efter infärgning kan målproteinets utbredning studeras i ljusmikroskop (Magaki *et al.* 2019).

Majoriteten av publicerade studier använder sig av 3-5 µm tjocka preparatsnitt för ändamålet (Steger *et al.* 1996; Ball *et al.* 2008; Holst & Dreimanis 2015; Magaki *et al.* 2019; Balogh *et al.* 2021; Pecile *et al.* 2021; Kasimanickam & Kasimanickam 2022). Risken för artefakter i form av färgstråk från motfärgning ökar desto tjockare snitten som används är, men även resultatet från immunohistokemi kan påverkas negativt av tjockare vävnader och sannolikheten för falskt positiva resultat ökar med snittets tjocklek. För IHC i de flesta vävnader rekommenderas generellt en tjocklek på 4 µm (Magaki *et al.* 2019).

Första steget i IHC utgörs normalt av antigenhämtning (antigen retrieval/AR) för att exponera antigen som maskeras av fixeringsmetoden och för att underlätta för antikropparna att binda till sitt målprotein (Yong *et al.* 2014). AR bryter de korslänkade proteinbindningar som uppstår vid fixering av materialet (Magaki *et al.* 2019). Genom användande av antigenhämtning kan tröskeln för detektion av antigen sänkas och högre spädningskoncentrationer möjliggörs, vilket ökar specificiteten hos inbindningarna (D'Amico *et al.* 2009).

Antigenhämtning kan göras kemiskt, fysiskt eller genom en kombination av dessa metoder. Fysisk AR kan utgöras av värmebehandling och ultraljud medan kemisk AR kan bestå av enzymdigerering eller genom användande av denatureringsmedel. Oftast används metoderna i kombination (Magaki *et al.* 2019).

Efter AR utförs moment för att minska ospecifik inbindning av antikroppar och bakgrundsinfärgning som försvårar bedömning. Bakgrundsinfärgning kan bero på användande av en polyklonal antikropp som binder in ospecifikt eller av en endogen peroxidasaktivitet i cellerna (D'Amico *et al.* 2009). Ospecifik inbindning av antikroppar kan minskas genom användande av ett blockerande serum från samma djurslag som primärantikroppen är producerad i. Endogen peroxidasaktivitet kan hämmas genom att preparaten sänks ner i väteperoxid före inkubering med primär antikropp (D'Amico *et al.* 2009; Magaki *et al.* 2019).

Som primär antikropp kan både mono- och polyklonala antikroppar användas, men med fördel används en monoklonal antikropp då de polyklonala kan binda till multipla epitoper (D'Amico *et al.* 2009). Initialt rekommenderas den spädningskoncentration som tillverkaren av antikroppen anger, men spädningskoncentrationen kan anpassas för att få till en lämpligt stark infärgning av preparaten (Magaki *et al.* 2019).

För att kunna visualisera inbindningen av den primära antikroppen används markörer (labels) som kan appliceras direkt eller indirekt (D'Amico *et al.* 2009). Den direkta märkningsmetoden utgörs av att den primära antikroppen märks, medan den sekundära utgår från användning av en sekundär färdigmärkt antikropp som binder in till den primära (Magaki *et al.* 2019). Det finns ett flertal olika markörer som kan användas för detta ändamål, exempelvis Horseradish peroxidase (HRP), som efter reaktion med diaminobenzidin (DAB) ger upphov till en brunaktig färg som kan ses i ljusmikroskop (Sakanaka *et al.* 1987; Wisdom 2009).

Positiv och negativ kontroll bör som rutin utföras vid IHC för att försäkra att metoden fungerar som tänkt. Positiv kontroll består av vävnadsprov där proteinet man vill undersöka med säkerhet uttrycks medan negativ utgörs av en vävnad där proteinet inte uttrycks. Utöver dessa behövs även en negativ kontroll med den positiva vävnaden som genomgår samtliga steg, men inkuberas utan primär antikropp (Lin & Chen 2014; Magaki *et al.* 2019)

3. Material och metoder

3.1 Urval och material

Deltagande hundar i studien utgjordes av hanhundar som inkom för kastration till Universitetsdjursjukhuset (UDS), AniCura Regionsjukhuset Bagarmossen, Gnesta Veterinärpraktik samt Uppsala Veterinärmottagning. Från en hund togs testiklar med godkännande från djurägaren efter avlivning vid UDS. Bland dessa fanns inbokade normalkastrationer och kastration till följd av kryptorkism eller annat testikulärt lidande. I samband med kastration inhämtades godkännande från djurägare samt ett blodprov för mätning av AMH i serum.

Efter utförd kastration avlägsnades samtliga hinnor runt testikel och bitestikel, som sedan först skars longitudinellt och därefter horisontellt så att varje enskild vävnadsbit inte översteg 1 cm³ i storlek. Den snittade testikelvävnaden placerades sedan i 10 % formalin, alternativt 4 % formaldehyd, i minst 48 timmar i rumstemperatur innan preparering för histologi.

Blodprovsrören centrifugerades för att separera serum och erythrocyter. Serumet placerades direkt i anslutning till centrifugeringen i en -80 °C frys. Sju av de 21 serumprov som inhämtades kom från mindre kliniker utan möjlighet till förvaring i -80 °C och förvaring skedde innan upphämtning i stället i frys inställd på -18 till -20 °C, varefter de förvarades i -80 °C.

3.2 Immunohistokemi

3.2.1 Etablering av immunohistokemiskt protokoll

Tidigare publicerade immunohistokemiska studier har utgått från användandet av en primär och sekundär antikropp framställd i kanin (Banco *et al.* 2012; Balogh *et al.* 2021). Dessa antikroppar är idag inte längre tillgängliga på marknaden och har ersatts av antikroppar framställda i mus. Som en följd av detta behövde en lämplig antikroppsspädning fastställas som fullgott illustrerar AMH-distributionen i den studerade vävnaden utan ospecifik inbindning av den primära antikroppen till den blockerande antikroppen. För att komma fram till en lämplig antikroppsspädning

gjordes seriella försök med olika spädningar. Alla preparat genomgick samma procedur utöver ändringar i antikroppsspädning, motfärgningstid med hematoxylin och DAB-tid. Försöken utfördes på negativ kontroll och testikelvävnad.

AMH-antikroppsspädning

AMH-antikroppsförsöksspädningarna bestod av 1:100, 1:200, 1:500 och 1:1000 och gjordes för både normalserum och primär AMH-antikropp.

1:100 gav en för kraftig immunohistokemisk infärgning av preparaten och gjorde snitten svårbedömda i ljusmikroskop. Preparatglasen som genomgått immunohistokemi med spädningen 1:200 färgades in starkt. Den starka infärgningen av de bundna AMH-antikropparna gav upphov till vissa svårigheter att särskilja cellerna i seminiferösa tubuli från varandra på grund av uttraderade cellmembranens detaljer, men bedömdes fortfarande godtyckligt urskiljbara. Glasen med spädningen 1:500 hade mer distinkt urskiljbara celler än 1:200, samt en bättre illustrerad fördelning av AMH i Sertolicellerna. Spädningen 1:1000 gav liknande infärgning som 1:500 och cellerna var lättare att skilja från varandra, men den immunohistokemiska reaktionen var dock svag, vilket resulterande i svårigheter att bedöma AMH-distributionen i preparaten. Med hänsyn till dessa resultat valdes antikroppsspädningarna 1:200 och 1:500 för resterande preparat i studien. Ingen immunohistokemisk reaktion kunde påvisas i den negativa kontrollen.

Motfärgningstid

Tre olika tidsangivelser testades för motfärgningstid med Meyers hematoxylin, en (1), tre respektive åtta minuter för att utvärdera motfärgningens påverkan på den immunohistokemiska infärgningen.

Snitten som färgats med hematoxylin i åtta minuter blev svårbedömda till följd av att färgen ansamlades i områden i preparaten, vilket gav upphov till ett oklart snitt. Snitten som färgats i en minut gav en svag hematoxylininfärgning, vilket gjorde det svårt att särskilja och bedöma olika celltyper i snitten. Snitten som färgades i tre minuter gav ett godtyckligt resultat där samtliga celltyper gick att bedöma och ingen påtaglig påverkan på immunohistokemin kunde observeras. Tre minuter sattes som standard för resterande preparat i studien.

DAB-tid

De två DAB-tidsangivelser som testades var tre och fem minuter baserat rekommendationer från Bilinska *et al.* (2018) på tre till fem minuter och interna laboratorierutiner på tre minuter.

Fem minuter DAB gav en väldigt stark infärgning av den immunohistokemiska reaktionen, vilket försvårade bedömningen av preparaten. Tre minuter gav en stark infärgning, men tillräckligt svag för att inte påverka bedömningen och valdes därför som tidsangivelse för resterande preparat.

Antigenhämtning

Metoden för antigenhämtning anpassades från det av Bilinska *et al.* (2018) föreslagna användandet av mikrovågsugn (åtta minuter, 700W) till ett 95 °C vattenbad, där preparaten fick stå nedsänkta i en behållare med citratbuffert. Användandet av varmvarmvattenbad för antigenhämtning beskrivs av Banco *et al.* (2012) som en lyckad metod för antigenhämtning.

Tjocklek på preparatsnitt

För att få till en bra tillförlitlighet med tillgängliga redskap på KV:s laboratorium sattes en standardtjocklek på 6 µm per snitt.

3.2.2 Slutgiltigt immunohistokemisk protokoll

Testikelvävnaden preparerades för immunohistokemi genom utskärning av seriella sektioner som lämnades in till Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF); Enheten för patologi vid Sveriges lantbruksuniversitet för paraffininbäddning enligt konventionella metoder.

Sektioner med en tjocklek på 6 µm skars ut från paraffinblocken och deparaffinerades i xylen och rehydrerades genom seriell nedsänkning i 100 %, 95 % och 70 % etanol. Antigenhämtning utfördes genom nedsänkning av preparaten i en behållare med citratbuffert (pH 6.0) i 95 °C vattenbad i 30 minuter. Preparaten tvättades sedan i Trisbuffert (TBS) och behandlades med 0,3 % väteperoxid (H₂O₂) i metanol (CH₃OH) i 15 minuter för att därefter återigen tvättas med TBS.

För att blockera ospecifik bindning inkuberades sektionerna med normalt musserum i 20 minuter i rumstemperatur. Som primär antikropp användes mus-IgG (VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit, Peroxidase (Mouse IgG); PK-6102) utspädd i 1:200 och 1:500 och preparaten inkuberades med den primära antikroppen i 24 timmar i 4 °C. Samtidigt som inkubering med primär antikropp genomfördes negativ kontroll på varje preparatglas genom att ersätta den primära antikroppen med TBS eller normalt musserum. Efter inkubering i 24 timmar tvättades glaset med TBS. Preparatglaset täcktes med den sekundära biotinylerade antikroppen (Horse Anti-Mouse IgG Antibody (H + L) BA-2000-1.5, Vector Laboratories) utspädd 1:200 och tilläts reagera med preparaten i 60 minuter i rumstemperatur. Preparaten tvättades därefter med TBS.

Preparaten färgades immunohistokemiskt med ett Avidin-biotin-peroxidaskomplex (ABC) från ett kommersiellt immunoperoxidaskit (VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP kit (Standard) PK-6100, Vector Laboratories). ABC-reaktionen utfördes enligt tillverkarens instruktioner och reaktionen visualiserades med DAB och motfärgades med Meyers Hematoxylin. Preparaten dehydrerades genom en seriell nedsänkning i 70 %, 80 %, 90 % och 100 % etanol. Slutligen tvättades preparatglaset med xylen och försågs med täckglas.

Som negativ kontroll användes muskelvävnad från en avlivad hund vars kropp donerats till undervisning. Som positiv kontroll användes ovarievävnad donerat från en hund som genomgick ovarieektomi på UDS.

3.3 Mätning av AMH i serum

Mätning av AMH i serum genomfördes genom användande av en AMH Gen II-ELISA utförd av laboratoriepersonal på kliniskt kemiska laboratoriet på UDS.

3.4 Bedömning av immunohistokemiska snitt

De immunohistokemiska snitten studerades och bedömdes under ljusmikroskop med avseende på normal morfologi och AMH-distribution enligt följande metodik:

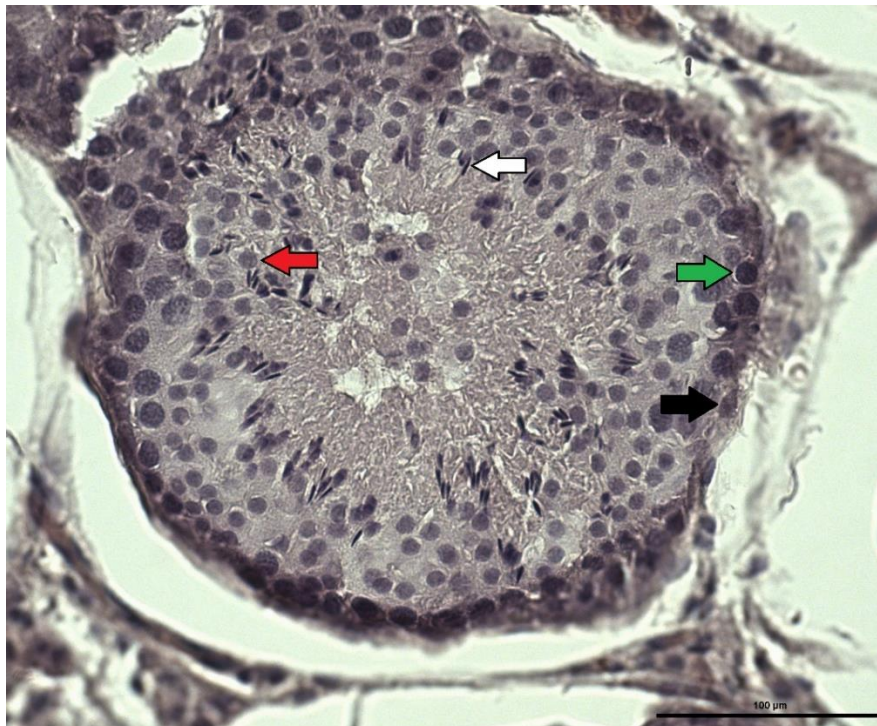
Preparaten blindades genom att id-markering på preparatglasen täcktes med papper och försågs med en slumpmässig siffra mellan 1 och 44. Efter blindning utfördes ett randomiserat val av preparatglas som sedan genomgick en morfologisk bedömning där cellernas utseende, typ och mängd bedömdes. Varje snitt studerades först med ljusmikroskop i 4x förstoring för att få en överblick av snittet och för att identifiera eventuella avvikande områden. Därefter höjdes förstoringen till 40x och hela snittet studerades för att få en helhetsbild av samtliga tubuli. Efter att en helhetsbild inhämtats slumpades 20 olika fält och antalet normala tubuli med avseende på normal tubulimorfologi räknades och cellernas utseende, celltyp och mängd beskrevs.

Endast tubuli som var snittade så att hela lumen kunde observeras bedömdes och räknades. Celltyperna delades in i kategorierna Sertolicell, germinalcell, rund spermatid och avlång spermatid (se figur 2) och dess närvaro eller frånvaro i tubuli noterades i ett separat dokument. Ett tubuli bedömdes som normalt om >16 av studerade tubuli uppvisade normal morfologi, som mestadels normal om 14 till 16 tubuli uppvisade normal morfologi och som onormal om <14 tubuli uppvisade normal morfologi. En total avsaknad av alla övriga celltyper utöver Sertoliceller beskrevs som SCO-tubuli.

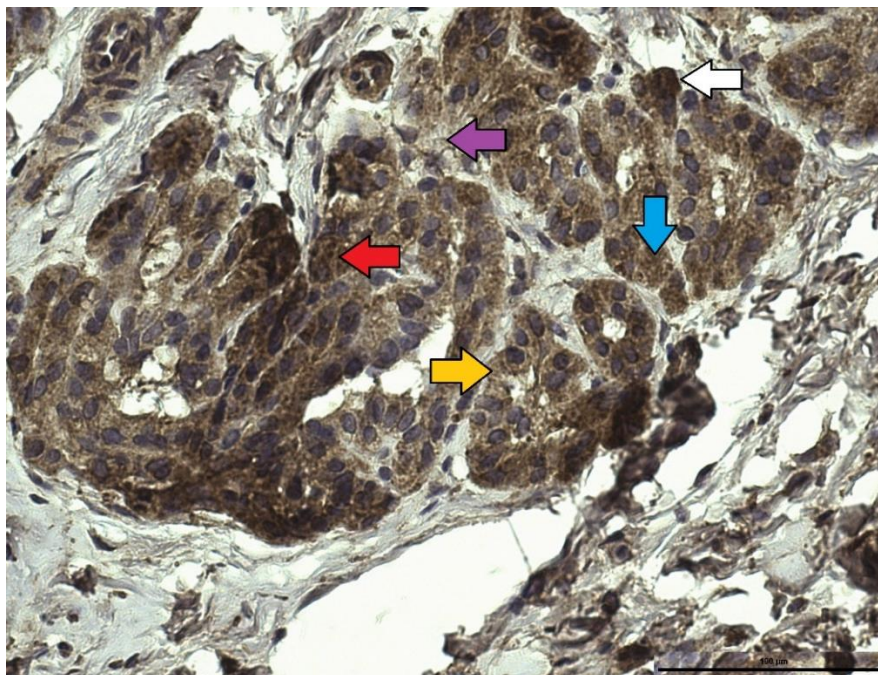
Efter att samtliga snitt studerats togs lappen bort och resultatet avkodades i ett separat dokument. Efter avkodningen jämfördes resultaten från testikelpreparat tillhörande samma individ och bedömdes med hänseende till förekomsten av skillnad i morfologi, celltyp och mängd hos respektive testikel för att få en helhetsbild av individens fertila förmåga.

Processen upprepades sedan för bedömning av AMH-distribution i de immunohistokemiskt färgade snitten för spädningsarna 1:200 och 1:500. Mängden AMH bedömdes genom utvärdering av infärgning och graderades enligt en femsiffrig

skala: 1 (svag), 2 (svag-medel), 3 (medel), 4 (medel-kraftig) och 5 (kraftig) enligt exempel i figur 3.



Figur 2: Seminiferöst tubuli med normal morfologi. Vit pil = Avlång spermatid. Röd pil = Rund spermatid. Grön pil = Germinalcell. Svart pil = Sertolicellkärna



Figur 3: Ovarievävnad, positiv kontroll. Lila pil = 1. Gul pil = 2. Blå pil = 3. Röd pil = 4. Vit pil = 5

3.5 Statistiska metoder

För statistiska beräkningar användes Kruskal-Wallis test för jämförelser mellan serum-AMH och tubulimorfologi, serum-AMH och den immunohistokemiska reaktionen och infärgningsgraden av AMH i seminiferösa tubuli och Chi²-test för jämförelser mellan IHC-infärgningsgrad och tubulimorfologi i Minitab. För att kunna göra en jämförelse mellan serum-AMH och den immunohistokemiska infärgningsgraden togs ett medelvärde fram för varje hunds testikelpar, där ett medelvärde på 4-5 räknades som kraftig och 1-3 räknades som svag. För att kunna göra en jämförelse mellan serum-AMH och testikelvävnadsmorfologi för varje individ togs ett medelvärde av räknade normala tubuli fram, där över 30 normala tubuli räknades som normal. Kruskal-Wallis test användes även för att jämföra AMH-koncentrationen mellan serumprov som under 2-10 dagar förvarats i en -18 till -20 °C frys innan förflyttning till -80°C och de serumprov som konstant förvarats i -80 °C.

Resultat med $p < 0,05$ bedömdes som statistiskt signifikanta. Eftersom framtagna värden utgörs av icke-normalfördelade värden används medianvärde och interkvartilavstånd (IQR) i redovisningen av resultaten.

3.6 Etiskt tillstånd

Detta examensarbete är en del av ett större forskningsprojekt om AMH hos hund med etiskt tillstånd godkänt av Uppsala djurförsöksetiska nämnd, diarienummer 5.8.18-17395/2018. Samtliga djurägare vars djur deltog i studien har lämnat skriftligt medgivande att deras djur kan delta i studien.

3.7 Litteratursökning

För litteraturstudien har PubMed och Google Scholar brukats och kombinationer av sökorden "AMH", "Fertility", "Testicle Morphology", "Immunohistochemistry testis", "Male dog reproductive organs" har använts för att generera lämpliga träffar. Källor som använts i artiklar funna genom användandet av dessa sökord och som ansetts relevanta för arbetet har även använts.

4. Resultat

4.1 Deltagande hundar

Sammanlagt deltog 22 hundar i studien, med ett totalt antal av 44 testiklar och 21 serumprov. Testiklar samlades från sex blandrashundar, två fransk bulldog, två cocker spaniel, två labrador retriever, en siberian husky, en berner sennen, en staffordshire bullterrier, en irish softcoated wheaten terrier, en greyhound, en hollandse herdershond (korth), en flatcoated retriever, en american bulldog, en podengo portugues (cerdoso/pequeno) samt en rottweiler. Samtliga hundar kom från området runt Mälardalen och hundarnas ålder varierade mellan sju månader och åtta år.

18 av hundarna var inbokade för normalkastration, två för kastration på grund av inguinal kryptorkism, en på grund av juvenila testiklar och en kastrerades efter avlivning med djurägarens godkännande. Två av hundarna, en siberian husky och en podengo portugues, var tidigare behandlade med deslorelin, men information om huruvida när den kemiska kastreringen genomfördes och om chippen fortfarande hade effekt vid den kirurgiska kastrationen saknades i hundarnas respektive journaler. Podengon var dessutom högersidigt inguinalt kryptorkid.

4.2 Bedömning av snitt

4.2.1 Morfologisk bedömning

Av samtliga 44 preparat bedömdes 21 st (47,7 %) som normala med normal uppbyggnad av seminiferösa tubuli med samtliga celltyper närvarande och en normal spermatogenes. 5 st (11 %) bedömdes som mestadels normala, men hade enstaka seminiferösa tubuli som uppvisade avvikande morfologi i form av avstannad spermatogenes och en avsaknad av avlånga spermatider samt färdiga spermier.

Resterande 18 st (41,3 %) uppvisade varierande grad av onormal morfologi. Av de onormala uppvisade 11 st (64,7 %) tecken på avstannad spermatogenes med en avsaknad av avlånga spermatider och färdiga spermier i lumen. Dessa tubuli hade

fortfarande germinalceller och runda spermatider och linjerades av Sertoliceller. Fyra av preparaten (23,5 %) hade endast SCO-tubuli med en total avsaknad av övriga celltyper, varav två kom från hundar som inkommit för normalkastration, en från en hund med juvenila testiklar och en från en inguinalt kryptorkid testikel. Två preparat (11,7 %) var av ”mixed type” och hade enstaka SCO-tubuli och övriga tubuli uppvisade tecken på avstannad spermatogenes med en avsaknad av avlånga spermatider och färdiga spermier i lumen men hade runda spermatider och germinalceller.

Tabell 1: Anamnes och morfologisk förändring

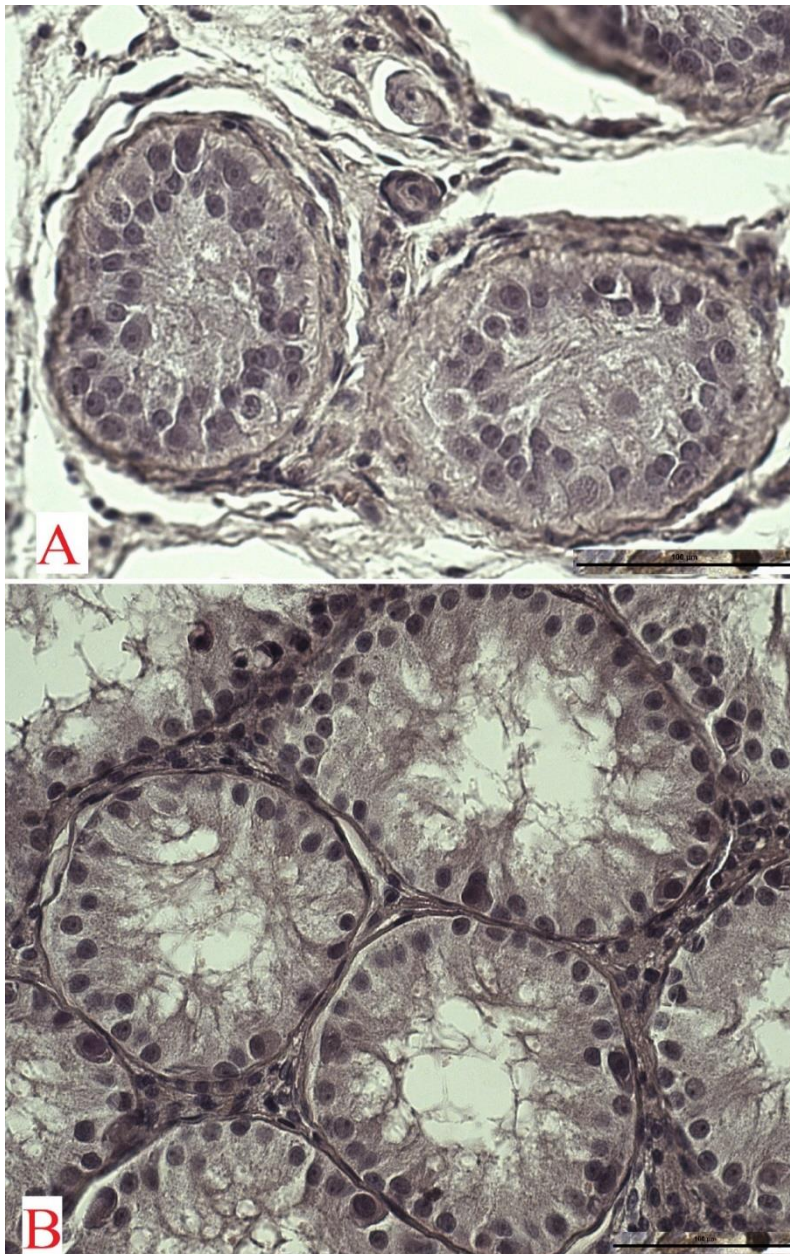
	Normal	Enstaka avvikande tubuli	Avstannad spermatogenes	SCO-tubuli	“Mixed-type”	Totalt
Normalkastration (NK)	21	5	7	2	1	36
Deslorelin	0	0	2	0	0	2
Juvenila testiklar	0	0	1	1	0	2
Kryptorkism	0	0	1	1	0	3
Annan anledning	0	0	0	0	1	1
Totalt	21 (47,7 %)	5 (11 %)	11 (25 %)	4 (9 %)	2 (4,5 %)	44 (100 %)

Samtliga preparat med normal morfologi kom från hundar vars testiklar opererats bort vid inbokad normalkastration. Av de som bedömdes som mestadels normala kom samtliga från normalkastrationer och hade enligt journal inte behandlats med någon form av kemisk kastrering tidigare. De preparat som bedömts som onormala kom från hundar med olika anamnes, där sju kom från hundar som inkommit för normalkastration, två från hundar som behandlats med deslorelin, en från en hund med juvenila testiklar och en skrotal testikel från en hund med enkelsidig inguinal kryptorkism, se tabell 1.

Av de testiklar med enbart SCO-tubuli kom en från en hund som kastrerats på grund av ensidig inguinal kryptorkism, två från en hund som genomgått normalkastration och en från en hund som kastrerats på grund av juvenila testiklar. Hundarnas ålder och ras varierade. Hunden med juvenila testiklar var en blandras (f. mars 2022), de två som inkommit för normalkastration tillhörde raserna cocker spaniel (f. 2018) respektive rottweiler (f. mars 2022). Den inguinalt kryptorkida hunden var av rasen podengo portugues (cerdoso/pequeno) och var född 2020.

Av de som uppvisade ”mixed-type” med både SCO-tubuli och avstannad spermatogenes kom en från en hund som genomgått normalkastration och en från en hund vars kropp donerats till forskning efter avlivning av annan anledning. Dessa testiklar kom från en cocker spaniel (f. 2021) och en berner sennen (f. 2021).

Av de testiklar som uppvisade avstannad spermatogenes kom nio från hundar som genomgått normalkastration, varav två av hundarna tidigare behandlats med deslorelin, en från en hund som genomgått kastration till följd av juvenila testiklar samt en skrotal testikel från en hund med inguinal kryptorkism. Hundarna som inkommit för normalkastration i denna kategori bestod av en cocker spaniel (f. 2021), en berner sennen (f. 2021), två labrador retriever (f. 2020 respektive 2021), en staffordshire bullterrier (f. 2019) och en flatcoated retriever (f. 2020). De hundar som tidigare behandlats med deslorelin var av rasen podengo portuges (cerdoso/pequeno) (f. 2020) och siberian husky (f. 2014). Den juvenila testikeln var från en blandras (f. mars 2022) och den skrotala testikeln från en kryptorkid var från en staffordshire bullterrier (f. 2019).



Figur 4: Morfologisk bild, HE-färgning.

A=Avstannad spermatogenes och avsaknad av avlånga spermatiser.

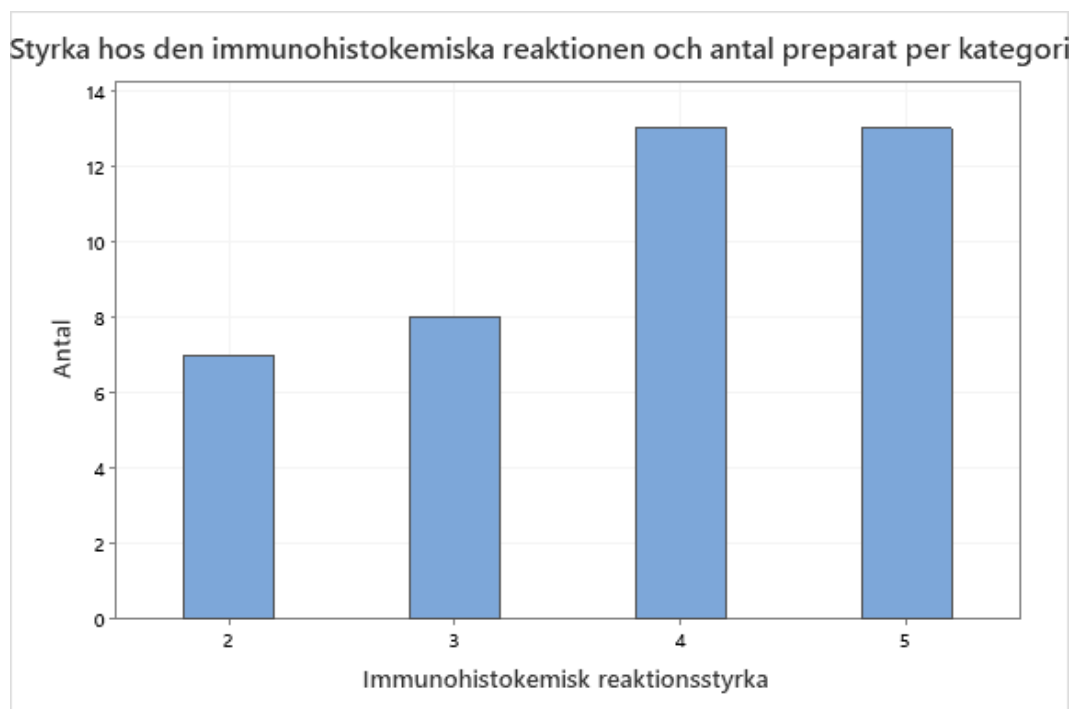
B = SCO-tubuli

4.2.2 Immunohistokemisk bedömning

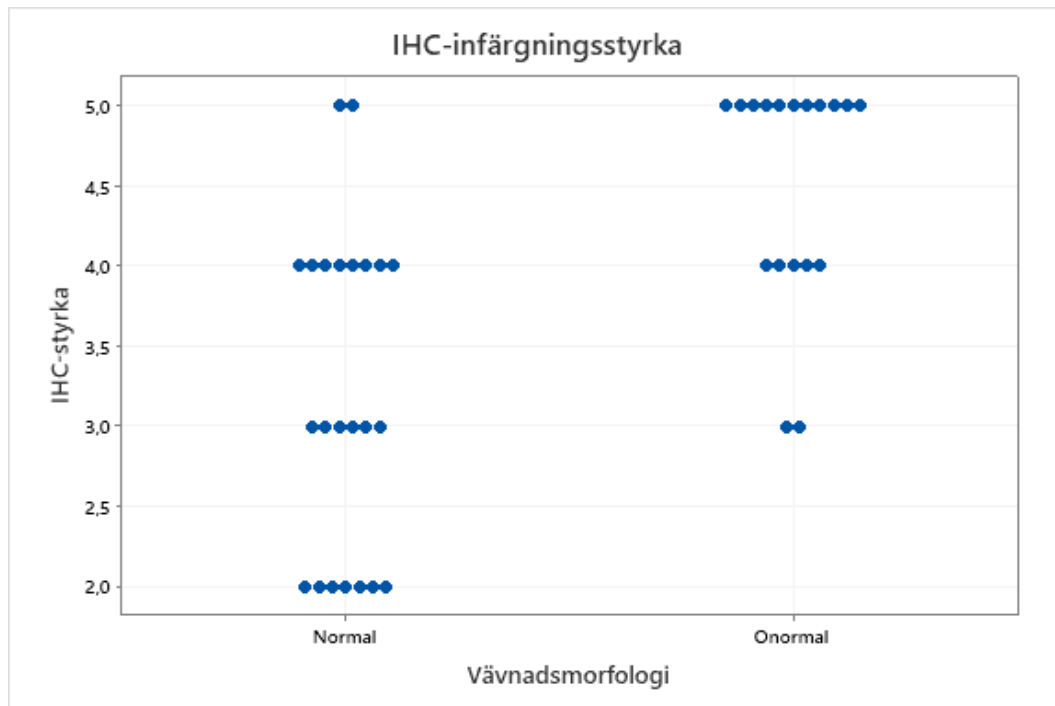
Inget av de 44 preparaten uppvisade svag AMH-infärgning, 6 (13,6 %) uppvisade svag-måttlig infärgning, åtta (18,2 %) uppvisade måttlig infärgning, 13 (29,5 %) måttlig-kraftig och 13 (29,5 %) kraftig AMH-infärgning (för illustrering av fördelning, se tabell 2, figur 5 och 6). Fyra (9 %) av preparaten uppvisade varierande AMH-koncentration mellan tubuli i samma snitt, med spann på grad 2-4, 2-4, 2-5 respektive 3-4 i bedömningsskalan. Det var ett signifikant samband mellan immunohistokemisk infärgning och onormal testikelmorfologi ($p = 0,004$).

Tabell 2. Immunohistokemisk bedömning av testiklar efter morfologityp.

Morfologi \ Gradering	Normal	Enstaka avvikande tubuli	Avstannad spermatogenes	SCO-tubuli	“Mixed -type”
1	0	0	0	0	0
2	6	0	0	0	0
3	4	2	2	0	0
4	5	3	4	0	1
5	2	0	5	5	1
Variерande	4	0	0	0	0
Totalt	21 (47,7 %)	5 (11,4 %)	11 (25 %)	5 (11,4 %)	2 (4,5 %)



Figur 5: Fördelning av snitt med styrkan hos den immunohistokemiska infärgning av AMH

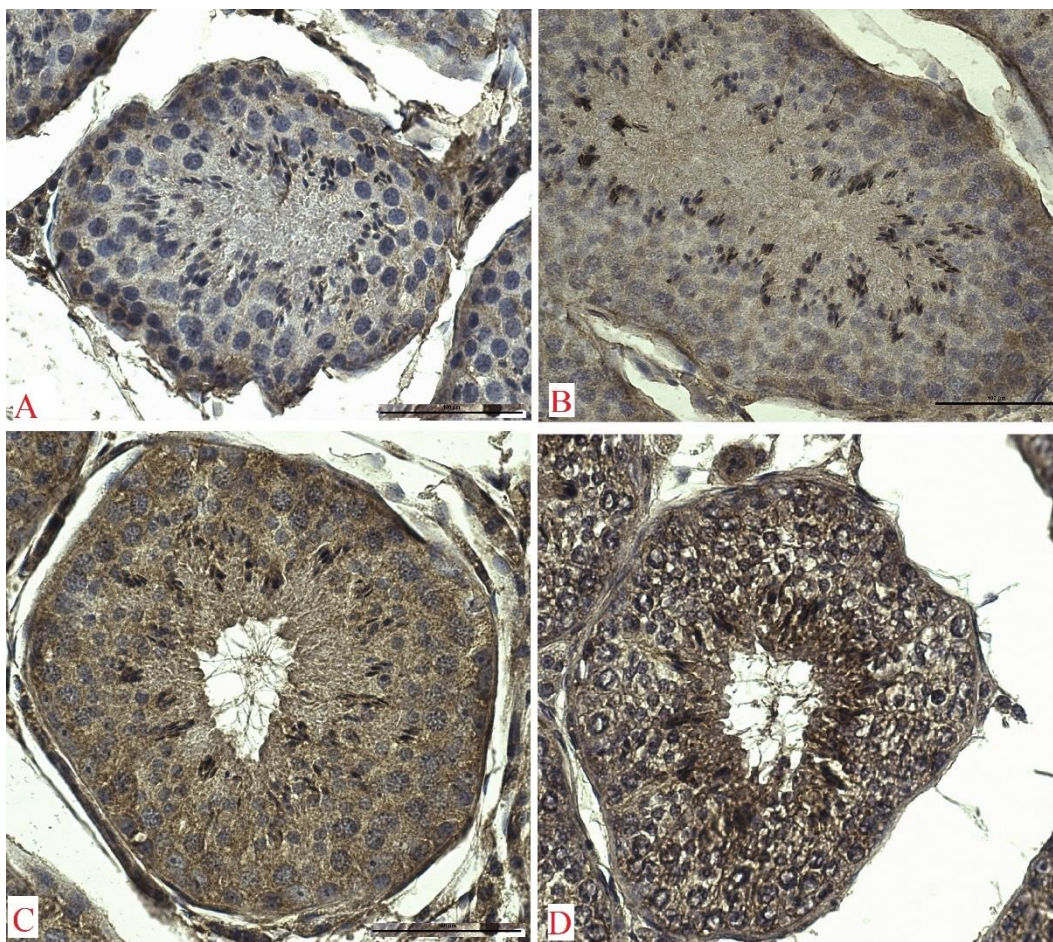


Figur 6: Fördelning av immunohistokemisk infäringsstyrka efter den morfologiska grupperingen "normal" och "onormal" morfologi

Immunohistokemisk bedömning av normala tubuli

I de preparat vars seminiferösa tubuli uppvisade normal morfologi sågs i majoriteten av snitten en starkare infärgning perifert i tubuli i Sertolicellernas cytoplasma samt mer centralt mot lumen. I tubulis centrala delar sågs en högre koncentration AMH i anslutning till de avlånga spermatiderna, medan de runda spermatiderna omgavs av en lägre grad av infärgning (se figur 7).

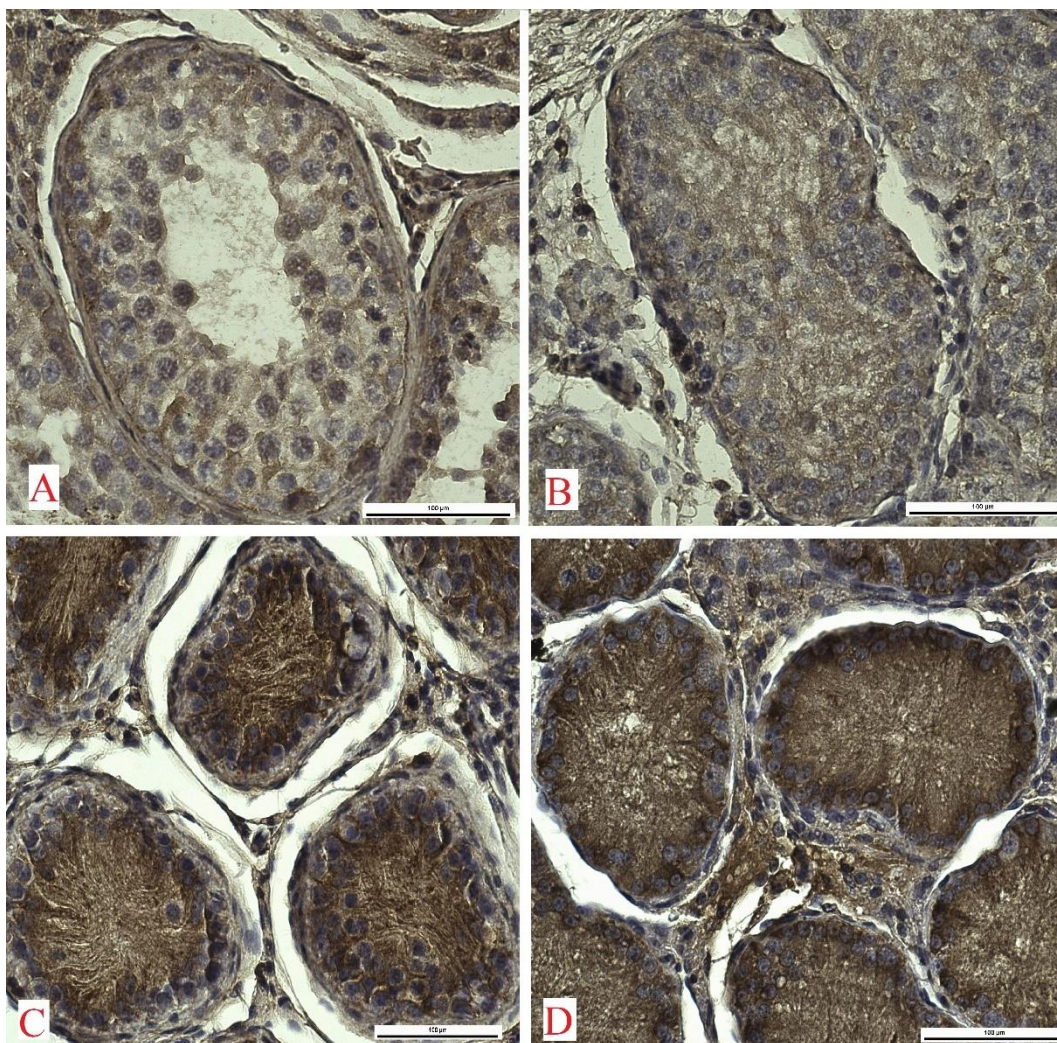
Den hund med IHC-infärgning grad fem som avvek från resterande hundar med förhöjt serum-AMH hade normal morfologi, men uppvisade en varierande grad av immunohistokemisk infärgning i tubuli mellan de två testiklarna, varav den vänstra bedömdes som grad två till fem och den högra grad fem. Ett genomsnittligt resultat räknades ut för den vänstra testikeln och räknades sedan ihop med resultatet från den högra och snittet bedömdes därefter som kraftigt infärgat och tilldelades infäringsgraden fem.



Figur 7: Immunohistokemisk infärgning. A = 2, B = 3, C = 4, D = 5.

Immunohistokemisk bedömning av onormala tubuli

I de tubuli som endast bestod av SCO sågs en kraftig infärgning homogent i både Sertolicellerna och seminiferösa tubulis lumen i samtliga tubuli, se exempel i figur 7. Av de 11 tubuli som bedömdes ha avstannad spermatogenes kunde en varierande grad av AMH-koncentration observeras. Två preparat uppvisade måttlig infärgning, fyra måttlig-kraftig infärgning och fem kraftig infärgning. Hur AMH var distribuerat i tubuli skiljde sig lindrigt mellan preparatsnitten oavsett infärgningsgrad, men var i de flesta fall överensstämmande mellan tubuli inom samma preparat. En del preparat uppvisade en måttlig infärgning i lumen med en kraftigare infärgning i Sertolicellernas cytoplasma nära cellkärnan, men majoriteten uppvisade kraftig AMH-infärgning i lumen och i Sertolicellens cytoplasma, med en lindrigt svagare infärgning runt de runda spermatiderna. De två "mixed-type" seminiferösa tubuli uppvisade måttlig-kraftig respektive kraftig infärgning med en distribution som liknade den som sågs hos tubuli med avstannad spermatogenes. För exempel, se figur 8.



Figur 8: A = Avstannad spermatogenes, svag-måttlig infärgning. B = Avstannad spermatogenes, måttlig-kraftig infärgning. C = SCO-tubuli, kraftig infärgning. D = SCO-tubuli, kraftig infärgning.

4.2.3 Serum-AMH

Mediankoncentrationen av AMH i serum hos de 21 hundar vilka serum hämtats var 9,6 ng/ml (IQR 5,45-53). Av hundarna vars testikelvävnad bedömts som morfologiskt normal låg alla förutom två på en serumkoncentration på <10 ng/ml och hade en mediankoncentration på 7,2 ng/ml (3,45-10,5). De två hundar vars koncentration översteg 10 ng/ml låg på 11,4 ng/ml respektive 20,6 ng/ml. Hundarna vars testiklar bedömts som mestadels normala med enbart enstaka avvikande tubuli hade en mediankoncentration på 5,05 ng/ml (3,47-7,6).

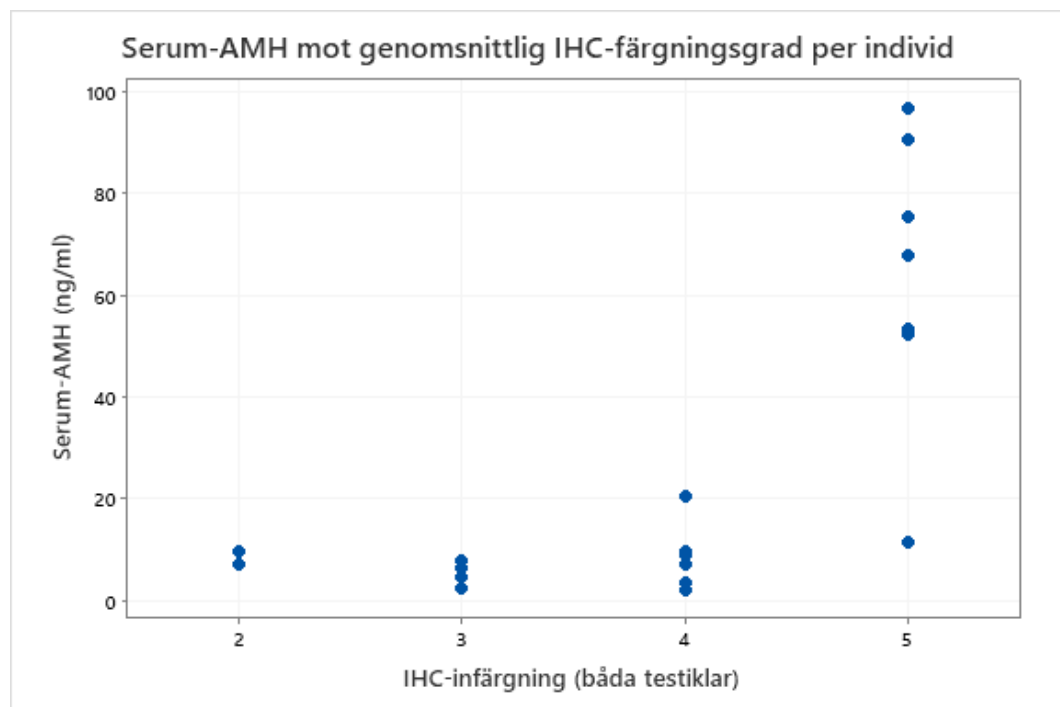
Av de hundar vars testikelvävnad bedömts som onormal var serum-AMH kraftigt förhöjt hos alla utom två hundar, vilka uppvisade avstannad spermatogenes. Hundar med onormal seminiferöst tubulimorfologi hade signifikant högre koncentrationer serum-AMH än hundar med normal testikelmorfologi ($p = 0,001$).

Mediankoncentrationen av AMH i serum hos de med onormal testikelvävnad låg på 53,3 ng/ml (31,0-83,1). De fyra hundar som uppvisade SCO-tubuli hade en

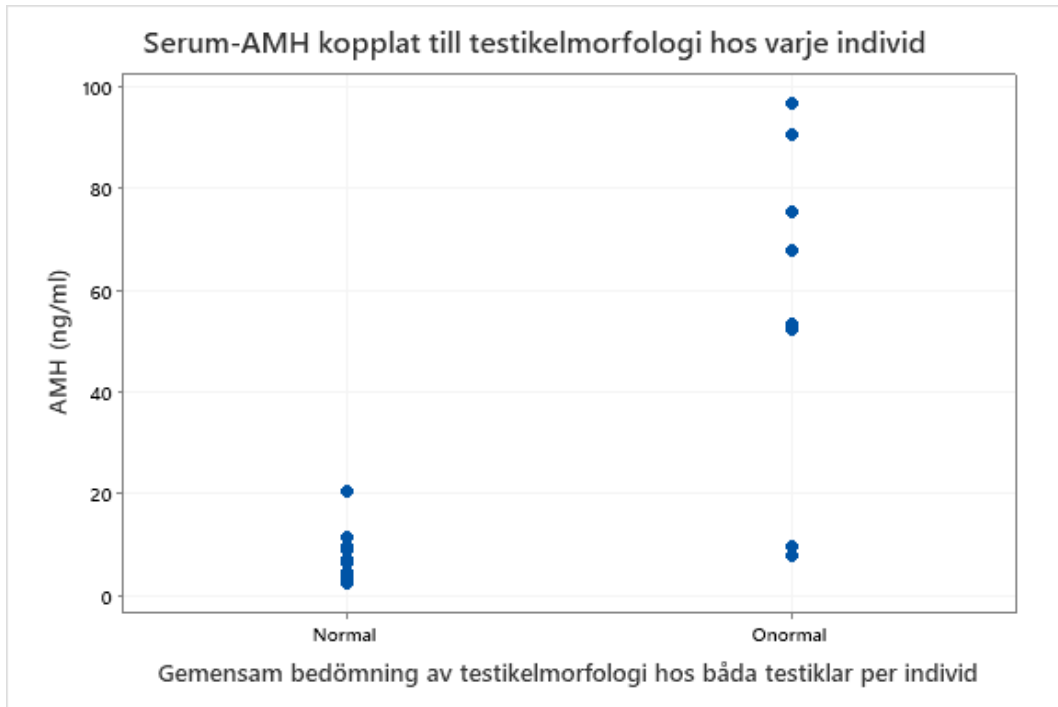
mediankoncentration på 64,4 (52,0-91,4). Från en av de fyra hundarna med SCO-tubuli uppmättes den högsta serumkoncentration i analysen, 96,7 ng/ml, från hunden med juvenila testiklar. De hundar som uppvisat avstannad spermatogenes hade en mediankoncentration på 60,6 ng/ml (8,0-86,9). Från en av de två hundarna med "mixed type"-morfologi fanns serumprov tillgängligt och med koncentration på 68,0 ng/ml, se figur 9 och 10.

Sex av de sju serumprov som hade förvarats kortare tid i frys inställd på -18 till -20°C kom från hundar med en normal testikelmorfologi. Koncentrationen AMH i dessa serumprover var 4,5-11,4 ng/ml, och skilde sig inte från dem från de övriga hundar med normal testikelmorfologi vars serumprov placerats direkt i -80 °C. Koncentrationen var 9,7 ng/ml i provet från hunden med onormal morfologi. Det var inget signifikant samband mellan proverna som förvarats i -18 till -20°C och höjda serum AMH-värden ($p = 0,475$).

För den immunohistokemiska infärgningsgraden togs ett medelvärde fram för varje hunds testikelpar. Detta medelvärde jämfördes med serum-AMH för hunden med ett Kruskal-Wallis test. Det var ett signifikant samband mellan koncentrationen serum-AMH och infärgningsgraden av AMH i seminiferösa tubuli ($p = 0,003$).



Figur 9: Serum AMH-koncentration i jämförelse med genomsnittlig IHC-infärgning hos varje individ.



Figur 10: Gemensam morfologisk bedömning av båda gonader hos varje individ i förhållande till serum-AMH.

5. Diskussion

Detta examensarbete utgjorde ett första steg i etablerandet av IHC som metod för att studera AMH vid institutionen för kliniska vetenskaper på SLU och har gett viktig information om AMH och dess distribution i testikeln hos hund. Hundar med onormal testikelmorfologi hade signifikant högre AMH-koncentration i serum och kraftigare uttryck av AMH i seminiferösa tubuli än hundar med normal testikelvävnad.

5.1.1 Immunohistokemi

Det immunohistokemiska protokollet som togs fram för denna studie byggde mycket på det som Bilinska *et al.* (2018) tagit fram, men anpassades för att passa interna rutiner och tillgängliga resurser på KV-lab. En sådan anpassning som gjordes var gällande antigenhämtningen. I Bilinskas publikation rekommenderades användandet av en mikrovågsugn för att utföra antigenhämtningen, men i en immunohistokemisk studie utförd av Banco *et al.* (2012) hade författarna valt att sänka ner preparaten i en behållare med citratbuffert som sedan sänktes ner i ett 95 °C vattenbad för antigenhämtning. Denna metod ansågs i examensarbetets planeringsstadium lämpligare att använda i och med att KV-lab hade tillgång till ett varmvattenbad, men ingen lämplig mikrovågsugn. Jag anser att metoden lämpar sig väl för antigenhämtning och ger ett fullgott resultat. Slutsatsen att användande av mikrovågsugn inte är en nödvändighet för studier av AMH genom immunohistokemi kan dras, även om många senare publicerade studier använder sig av mikrovågsugn för ändamålet.

Vad gäller motfärgningstiden med hematoxylin som användes så hade det varit möjligt att det kunde blivit lättare att bedöma IHC-reaktionen vid högre antikropps-spädningar om kortare hematoxylinfärgningstid hade använts. Jag bedömer ändå att valet att anpassa färgningstiden till tre minuter som vältänkt eftersom ett av målen för denna studie bestod av att studera AMH:s distribution i seminiferösa tubuli och dess celltyper. Vid för svag hematoxylinfärgning hade möjligheten att särskilja celltyperna från varandra försvårats avsevärt, vilket hade kommit att påverka resultatet av studien.

En rekommendation gällande färgning av preparaten inför eventuella framtida studier som använder sig av metoden är att prova att även eosinfärga de immunohistokemiskt färgade preparaten. Detta för att se om det skulle bli enklare att

urskilja cytoplasman mellan cellerna i seminiferösa tubuli, vilket eventuellt skulle medföra högre säkerhet vid bedömning av AMH:s distribution i cellerna.

En annan skillnad från tidigare publicerade studier som använt sig av IHC för att studera testikelvävnad var tjockleken på de histologiska snitt som framställdes. I denna studie beslutade vi att använda oss av 6 µm tjocka snitt då tillförlitligheten att reguljärt få fram tunnare snitt med redskapen som fanns till hands ansågs som osäker och att resultatet fortfarande bedömdes bli godtyckligt med 6 µm tjocka snitt. Magaki *et al.* (2019) beskriver att risken för artefakter i form av färgstråk vid färgning ökar desto tjockare snitten som används är, vilket överensstämmer med vad som observerats i denna studie. Förekomsten färgstråksartefakter varierade mellan preparaten som studerades, men i majoriteten av preparaten förekom färgartefakter, vilket i vissa fall försvårade bedömningen av vävnadens morfologi. Det är även möjligt att användandet av tjockare preparatsnitt än vad som generellt rekommenderas till kan ha påverkat resultatet i denna studie med en eventuellt ökad frekvens av falskt positiva IHC-resultat samt en ökad svårighet att göra korrekta morfologiska bedömningar.

5.1.2 AMH i serum och seminiferösa tubuli

AMH hos hund

Produktion och frisättning av AMH från Sertolicellerna påvisades hos postpubertala hundar, i både normala och onormala seminiferösa tubuli. Ett antal andra studier har kunnat uppmäta AMH med testikulärt ursprung, bland annat hos könsmogna män, samt hos hästar och åsnor (Fénichel *et al.* 1999; Claes *et al.* 2013; Holst *et al.* 2020). Till skillnad övriga studerade arter så understiger AMH i seminalplasman hos hund mätbara värden vid användande av AMH-ELISA Gen II, ett fynd som beskrivs av Hallberg *et al.* (2022). Hallberg väcker med sitt fynd frågeställningen om det är möjligt att hundar inte producerar och frisätter AMH från Sertolicellerna till seminalplasman på samma sätt som det har observerats hos andra djurarter. Den starka AMH-infärgning som observerats i seminiferösa tubulis lumen i denna studie visar att frisättning av hormonet sker och tyder på att AMH borde finnas tillsammans med spermierna i ejakulatet, även hos hund.

Mer forskning om varför hormonet inte är uppmätbart i seminalplasma behöver göras, men det skulle teoretiskt kunna bero på att hunden AMH bryts ner snabbare än hos andra djurarter, att metoden som använts av Hallberg *et al.* (2022) för att mäta AMH i seminalplasma inte fungerar för ändamålet eller att hormonet späds ut för mycket av seminalvätskan för att kunna uppmätas med den valda metoden.

Vid den immunohistokemiska bedömningen av snitten sågs en ökad infärgning perifert i tubuli i Sertolicellens cytoplasma, en observation som kan ses som väntad i och med att det är Sertolicellen som producerar hormonet. Att infärgningen däremot var svag runt de runda spermatiderna men kraftigare runt de avlånga var

intressant och skulle kunna tyda på att de runda spermatiderna saknar receptorer för AMH och att receptorerna börjar uttryckas först när spermatiderna blivit avlånga spermatider. Framtida studier inom området skulle förslagsvis kunna fokusera på användandet av IHC och antikroppar riktade mot receptorn AMH-II för att utvärdera om de avlånga spermatiderna, men inte de runda, uttrycker receptortypen.

Slutsatsen är att vidare forskning inom arten behövs för att studera hur hormonet påverkar hundens spermimognad samt vad som händer med hormonet fram till ejakulation eftersom det understiger uppmätbara värden i seminalplasman.

Deslorelin's påverkan på AMH

Balogh *et al.* (2021) kunde i sin studie observera en inducerad LH-okänslighet och ökad produktion av AMH i Sertolicellerna hos hundar som kemiskt kastrerats med deslorelin och Junaidi *et al.* (2009) beskriver att seminiferösa tubuli genomgår förändringar efter behandling med deslorelin i form av upphörd spermatogenes och atrofi av tubuli. Två av hundarna som deltog i detta examensarbete hade enligt journaluppgifter behandlats med deslorelin och de testiklar som låg i skrotum hade onormal morfologi med avstannad spermatogenes och en ökad infärgning av AMH i seminiferösa tubuli samt förhöjda serum AMH-värden, vilket styrker det både Junaidi *et al.* och Balogh *et al.* kom fram till.

Dessvärre saknas information om de i denna studie deltagande deslorelin-behandlade hundarna gällande hur länge de hade varit kemiskt kastrerade och om hormonchippen fortfarande hade effekt vid det kirurgiska kastrationstillfället. Detta medför svårigheter att dra några konkreta slutsatser kring vad som orsakat de observerade förändringarna, men oavsett så uppvisar båda hundarnas testikelvävnader förändringar förenliga med vad som kan förväntas att ses efter deslorelinbehandling.

Klinisk bedömning av testiklar

Samtliga testiklar från hundar som inkom för normalkastration bedömdes preoperativt av ingreppsutförande veterinär som normala. Ingen testikel bedömdes ha avvikande konsistens eller form och hundarna hade enligt journalerna ej uppvisat några för djurägarna uppenbara tecken på nedsatt fertilitet, så som nedsatt könsdrift. Av de arton hundar som inkom för normalkastration uppvisade sex hundar onormal morfologi vid den histomorfologiska bedömningen, varav en hund hade enkelsidigt onormal morfologi. Samtliga onormala som inkom för normalkastration hade en ökad infärgning av AMH i seminiferösa tubuli i jämfört med tubuli med normal morfologi, men endast fyra av dessa hade förhöjda serum AMH-koncentrationer. Utöver detta hade även tre hundar som inkom för normalkastration och som bedömdes som utan anmärkning innan kastration en lindrigt onormal morfologi med enstaka tubuli som uppvisade avstannad spermatogenes. Resultatet visar på de svårigheter som den praktiserande veterinären ställs inför när det gäller att göra en

korrekt bedömning om testiklarnas funktionalitet baserat endast på en yttre bedömning av skrotum. Sammantaget behövs flera faktorer vägas in för att en veterinär i klinisk miljö ska kunna göra en korrekt bedömning av en hanhunds fertilitet, exempelvis spermaprov.

Testikelmorfologi relaterat till serum-AMH och immunohistokemiskt resultat

Av de 44 testiklar som insamlats till detta examensarbete uppvisade 18 st (41,3 %) en avvikande morfologi i varierande grad, och av dessa kom 13 st från individer med förhöjda serum-AMH nivåer.

Av de sex hundar vars båda testiklar bedömts som morfologiskt onormala och inkom för normalkastration hade 75 % serum AMH-koncentrationer på >10 ng/ml och 78 % av samtliga med onormal testikelvävnadsmorfologi hade AMH på >10 ng/ml. Endast två av dessa testikelmorfologiskt avvikande hundar hade en serumnivå på under 10 ng/ml. De två individer vars testiklar uppvisade onormal morfologi, men inte hade någon höjning av serum-AMH var samma individer som uppvisade lägst immunohistokemisk infärgningsgrad av de testiklarna som bedömts som onormala. Det går inte att med resultaten från studien dra några slutsatser om varför dessa testiklar uppvisar en onormal morfologi i form av avstannad spermatogenes, men kan bero på icke-fungerande spermatogenes av annan orsak än dysfunktionella Sertoliceller, exempelvis påverkan på spermiernas germinalceller eller problem med androgenproduktionen, även om inga morfologiska bevis på detta kunnat observeras i denna studie. Det kan även vara möjligt att dessa hundars testiklar är i början av en degenerationsprocess, varför förhöjt serum-AMH och infärgningsgrad i tubuli ännu inte kan observeras.

Androgenproduktionsproblem är som ovan nämnt också en möjlighet anledning till morfologiska förändringar eftersom sänkt testosteronproduktion har kunnat härledas till bland annat sänkt spermieproduktion. Testosteron har en negativ korrelation med AMH postpubertalt och en sänkt testosteronproduktion leder till en ökning i produktionen av AMH (Rey 1998). Som en följd av sänkt spermie- och testosteronproduktion ses en degeneration av seminiferösa tubuli och en uppkomst av SCO-tubuli. Sertolicellerna i SCO-tubuli uttrycker stora mängder AMH till seminiferösa tubulis lumen (Behr *et al.* 2007), vilket tydligt kunnat ses i de SCO-tubuli som studerats i detta examensarbete, med en kraftig IHC-infärgning i samtliga SCO-tubuli. I denna studie kan ett statistiskt samband mellan onormal seminiferös tubulimorfologi och både ökning av serum-AMH och frisättning till tubuli fastställas och samtliga testiklar med avvikande spermieproduktion oavsett orsak visade en ökad immunoreaktivitet av AMH i seminiferösa lumen.

Möjlig felkälla vid analys av serum-AMH

En möjlig felkälla för de framtagna serumvärdena är hur vissa av proven förvarades innan analys. Sju av de 21 serumprov som inhämtades kom från mindre kliniker

utan möjlighet till förvaring i -80 °C och förvarades innan upphämtning i stället i frys inställd på -18 till -20 °C.

En viss risk för förhöjda AMH-värden finns i och med att Rey *et al.* (1993) kunnat uppmäta en signifikant ökning av AMH efter förvaring i -20 °C under en längre tid. Serumproverna i denna studie förvarades i -18 till 20 °C i en till två veckor innan de frös ner till -80 °C och då inga av serumproven uppvisade någon avvikande ökning i AMH-koncentration bedöms eventuell påverkan endast som lindrig.

5.1.3 Sammanfattande ord

Sammanfattat belyser resultatet från examensarbetet möjligheten att använda AMH i serum som ett diagnostiskt verktyg och markör för att bedöma en hanhunds fertilitet, vilket tidigare diskuterats i ett flertal studier (Steger *et al.* 1996; Holst 2017; Balogh *et al.* 2021; Domain *et al.* 2022; Hallberg *et al.* 2022).

I denna studie sågs ett signifikant samband mellan förhöjt serum-AMH, immunohistokemisk infärgning av AMH i tubuli och morfologiska förändringar i testikelvävnaden som kan leda till eller orsakar nedsatt fertilitet. Med andra ord kan ett högt serum-AMH signalera om onormal testikulär morfologi och nedsatt fertilitet, men ett lågt AMH-värde kan inte utesluta onormal morfologi i testikelvävnaden och därtill en försämrad fertilitet.

Framtida studier inom området föreslås exempelvis handla om ålderns inverkan på morfologin och hur det påverkar serum-AMH och immunohistokemisk infärgning i tubuli genom användandet av testiklar från individer med större variation i ålder. En annan möjlig immunohistokemisk studie skulle kunna inrikta sig på AMH-II-receptorn och vilka celler i seminiferösa tubuli som uttrycker receptortypen för att utreda om avlånga, men inte runda, spermatider uttrycker denna. Vidare forskning behövs även för att ta reda på vad som händer med AMH från utsöndring från Sertolicellen till seminiferösa tubuli fram till ejakulation för att fastställa var det tar vägen.

Referenser

- Aksglæde, 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>
- 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>
- Asher, L., Diesel, G., Summers, J.F., McGreevy, P.D. & Collins, L.M. (2009). Inherited defects in pedigree dogs. Part 1: Disorders related to breed standards. *The Veterinary Journal*, 182 (3), 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.08.033>
- Baker, M.L., Metcalfe, S.A. & Hutson, J.M. (1990). Serum levels of Mullerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years, as determined by enzyme immunoassay*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 70 (1), 11–15. <https://doi.org/10.1210/jcem-70-1-11>
- Ball, B.A., Conley, A.J., Grundy, S.A., Sabeur, K. & Liu, I.K.M. (2008). Expression of anti-Müllerian hormone (AMH) in the equine testis. *Theriogenology*, 69 (5), 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.11.009>
- Balogh, O., Somoskői, B., Kollár, E., Kowalewski, M.P., Gram, A., Reichler, I.M., Klein, R., Kawate, N., Mester, L., Walter, B. & Müller, L. (2021). Anti-Müllerian hormone, testosterone, and insulin-like peptide 3 as biomarkers of Sertoli and Leydig cell function during deslorelin-induced testicular downregulation in the dog. *Theriogenology*, 175, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.08.017>
- 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>
- Behr, R., Sackett, S.D., Bochkis, I.M., Le, P.P. & Kaestner, K.H. (2007). Impaired male fertility and atrophy of seminiferous tubules caused by haploinsufficiency for Foxa3. *Developmental Biology*, 306 (2), 636–645. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.525>
- Bergman, D., Larsson, A., Hansson-Hamlin, H. & Ström Holst, B. (2019). Investigation of interference from canine anti-mouse antibodies in hormone immunoassays. *Veterinary Clinical Pathology*, 48 (S1), 59–69. <https://doi.org/10.1111/vcp.12764>
- Bergström, A., Nødtvedt, A., Lagerstedt, A.-S. & Egenvall, A. (2006). Incidence and breed predilection for dystocia and risk factors for cesarean section in a Swedish

population of insured dogs. *Veterinary Surgery*, 35 (8), 786–791.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2006.00223.x>

- Bilinska, B., Hejmej, A. & Kotula-Balak, M. (2018). Preparation of testicular samples for histology and immunohistochemistry. I: Alves, M.G. & Oliveira, P.F. (red.) *Sertoli Cells*. New York, NY: Springer New York. 17–36. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7698-0_3
- Bronson, R. (2011). Biology of the male reproductive tract: its cellular and morphological considerations. *American Journal of Reproductive Immunology*, 65 (3), 212–219.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00944.x>
- Chemes, H.E., Rey, R.A., Nistal, M., Regadera, J., Musse, M., González-Peramato, P. & Serrano, Á. (2008). Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93 (11), 4408–4412. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0915>
- Cheng, C. & Mruk, D.D. (2015). Biochemistry of Sertoli cell/germ cell junctions, germ cell transport, and spermiation in the seminiferous epithelium. I: Griswold, M.D. *Sertoli Cell Biology*. 2nd ed., Elsevier. 333–383. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417047-6.00012-0>
- Cheng, C.Y. & Mruk, D.D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*, 64 (1), 16–64.
<https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>
- 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>
- Cohen-Haguenaer, O., Picard, J.Y., Mattéi, M.G., Serero, S., Nguyen, V.C., de Tand, M.F., Guerrier, D., Hors-Cayla, M.C., Josso, N. & Frézal, J. (1987). Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 44 (1), 2–6. <https://doi.org/10.1159/000132332>
- Culty, M., Papadopoulos, V. & Zirkin, B. (2018). Leydig cells: Fetal to aged testes. I: Skinner, M.K. *Encyclopedia of Reproduction*. 2nd ed., Elsevier. 39–41.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64360-X>
- D’Amico, F., Skarmoutsou, E. & Stivala, F. (2009). State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of Immunological Methods*, 341 (1–2), 1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.007>
- Domain, G., Buczkowska, J., Kalak, P., Wydooghe, E., Banchi, P., Pascottini, O.B., Nizański, W. & Van Soom, A. (2022). Serum anti-Müllerian hormone: A potential semen quality biomarker in stud dogs? *Animals*, 12 (3), 323.
<https://doi.org/10.3390/ani12030323>

- England, G.C.W., Phillips, L. & Freeman, S.L. (2010). Heritability of semen characteristics in dogs. *Theriogenology*, 74 (7), 1136–1140. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.012>
- Felumlee, A.E., Reichle, J.K., Hecht, S., Penninck, D., Zekas, L., Dietze Yeager, A., Goggin, J.M. & Lowry, J. (2012). Use of ultrasound to locate retained testes in dogs and cats: Location of retained testes. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 53 (5), 581–585. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2011.01943.x>
- 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>
- Ferguson, J., Hockley, J., Rigsby, P. & Burns, C. (2020). Establishment of a WHO reference reagent for anti-Müllerian hormone. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18 (1), 86. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00641-9>
- Foley, G.L. (2001). Overview of male reproductive pathology. *Toxicologic Pathology*, 29 (1), 49–63. <https://doi.org/10.1080/019262301301418856>
- França, L.R., Hess, R.A., Dufour, J.M., Hofmann, M.C. & Griswold, M.D. (2016). The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, 4 (2), 189–212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>
- Francavilla, F. (2007). Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Frontiers in Bioscience*, 12 (8–12), 2890. <https://doi.org/10.2741/2280>
- Gassner, D. & Jung, R. (2014). First fully automated immunoassay for anti-Müllerian hormone. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52 (8), 1143–1152. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0022>
- Grinson, R.P. & Rey, R.A. (2010). Anti-Müllerian hormone and Sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. *Hormone Research in Paediatrics*, 73 (2), 81–92. <https://doi.org/10.1159/000277140>
- Griswold, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9 (4), 411–416. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0203>
- Groome, N.P., Cranfield, M., Themmen, A.P.N., Savjani, G.V. & Mehta, K. (2011). *Immunological assay and antibodies for anti-Müllerian hormone*. [Patent] Fullerton, CA, US: Beckman Coulter Inc. <https://patents.google.com/patent/US7897350B2/en>
- Gurung, P., Yetiskul, E. & Jialal, I. (2022). *Physiology, Male Reproductive System*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. PMID: 30860700.
- Hallberg, I., Olsson, H., Lau, A., Snell, A., Wallander, S. & Holst, B. (2022). Association between anti-Müllerian hormone and semen quality in dogs. *Proceedings of ISCFR-EVSSAR 2020+2*, June 30th- July 2nd, 2022 – Milan, Italy. 41. <https://www.evssar.org/wp-content/uploads/2022/05/ISCFR-EVSSAR-20202-program-May-19th-2022.pdf>

- Haverfield, J.T., Stanton, P.G. & Meachem, S.J. (2015). Adult Sertoli cell differentiation status in humans. I: Griswold, M.D. *Sertoli Cell Biology*. 2nd ed., Elsevier. 409–436. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417047-6.00014-4>
- van Helden, J. & Weiskirchen, R. (2015). Performance of the two new fully automated anti-Müllerian hormone immunoassays compared with the clinical standard assay. *Human Reproduction*, 30 (8), 1918–1926. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev127>
- Hollinshead, F., Walker, C. & Hanlon, D. (2017). Determination of the normal reference interval for anti-Müllerian hormone (AMH) in bitches and use of AMH as a potential predictor of litter size. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 35–40. <https://doi.org/10.1111/rda.12822>
- Hollinshead, F.K. & Hanlon, D.W. (2017). Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology*, 101, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.021>
- Holst, B. (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, 303–309. <https://doi.org/10.1111/rda.12856>
- 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. & Dreimanis, U. (2015). Anti-Müllerian hormone: a potentially useful biomarker for the diagnosis of canine Sertoli cell tumours. *BMC Veterinary Research*, 11 (1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0487-5>
- Hudson, P.L., Dougas, I., Donahoe, P.K., Cate, R.L., Epstein, J., Pepinsky, R.B. & Maclaughlin, D.T. (1990). An immunoassay to detect human Mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 70 (1), 16–22. <https://doi.org/10.1210/jcem-70-1-16>
- Huhtaniemi, I. & Teerds, K. (2018). Leydig cells. I: Skinner, M.K. *Encyclopedia of Reproduction*. 2nd ed., Elsevier. 30–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64558-0>
- Hyldgaard, J., Bor, P., Ingerslev, H.J. & Tørring, N. (2015). Comparison of two different methods for measuring anti-Mullerian hormone in a clinical series. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13 (1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0101-5>
- Isikoglu, M., Ozgur, K., Oehninger, S., Ozdem, S. & Seleker, M. (2006). Serum anti-Müllerian hormone levels do not predict the efficiency of testicular sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *Gynecological Endocrinology*, 22 (5), 256–260. <https://doi.org/10.1080/09513590600624366>
- Josso, N., di Clemente, N. & Gouédard, L. (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179 (1–2), 25–32. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00467-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00467-1)

- Josso, N., Legeai, L., Forest, M.G., Chaussain, J.-L. & Brauner, R. (1990). An Enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: A new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 70 (1), 23–27. <https://doi.org/10.1210/jcem-70-1-23>
- Junaidi, A., Williamson, P., Trigg, T., Cummins, J. & Martin, G. (2009). Morphological study of the effects of the GnRH superagonist deslorelin on the canine testis and prostate gland. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 (5), 757–763. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01066.x>
- Kareskoski, M. & Katila, T. (2008). Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*, 107 (3-4), 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.013>
- Kasimanickam, V.R. & Kasimanickam, R.K. (2022). Sertoli, Leydig, and spermatogonial cells' specific gene and protein expressions as dog testes evolve from immature into mature states. *Animals*, 12 (3), 271. <https://doi.org/10.3390/ani12030271>
- Khan, F.A., Gartley, C.J. & Khanam, A. (2018). Canine cryptorchidism: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, 53 (6), 1263–1270. <https://doi.org/10.1111/rda.13231>
- Kulibin, A.Yu. & Malolina, E.A. (2020). Formation of the rete testis during mouse embryonic development. *Developmental Dynamics*, 249 (12), 1486–1499. <https://doi.org/10.1002/dvdy.242>
- Kulibin, A.Yu. & Malolina, E.A. (2021). The rete testis: Development and role in testis function. *Russian Journal of Developmental Biology*, 52 (6), 370–378. <https://doi.org/10.1134/S1062360421060072>
- Kumar, A., Kalra, B., Patel, A., McDavid, L. & Roudebush, W.E. (2010). Development of a second generation anti-Müllerian hormone (AMH) ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 362 (1–2), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.08.011>
- Lara, N. de L. e M., Avelar, G.F. de, Costa, G.M.J., Lacerda, S.M. dos S.N., Hess, R.A. & França, L.R. de (2018). Cell–cell interactions—structural. I: Skinner, M.K *Encyclopedia of Reproduction*. 2nd ed., Elsevier. 68–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64564-6>
- Leal, M.C., Becker-Silva, S.C., Chiarini-Garcia, H. & França, L.R. (2004). Sertoli cell efficiency and daily sperm production in goats (*Capra hircus*). *Animal Reproduction*, 1 (1), 122-128. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a608cf7783717068b4815>
- Leroy, G., Phocas, F., Hedan, B., Verrier, E. & Rognon, X. (2015). Inbreeding impact on litter size and survival in selected canine breeds. *The Veterinary Journal*, 203 (1), 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.11.008>
- Li, H.W.R., Robertson, D.M., Burns, C. & Ledger, W.L. (2021). Challenges in measuring AMH in the clinical setting. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 691432. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.691432>

- Lin, F. & Chen, Z. (2014). Standardization of diagnostic immunohistochemistry: Literature review and Geisinger experience. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138 (12), 1564–1577. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0074-RA>
- Magaki, S., Hojat, S.A., Wei, B., So, A. & Yong, W.H. (2019). An introduction to the performance of immunohistochemistry. I: Yong, W.H. (red.) *Biobanking*. New York, NY: Springer New York. 289–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Mantziaras, G. (2020). Imaging of the male reproductive tract: Not so easy as it looks like. *Theriogenology*, 150, 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.009>
- Marelli, S.P., Beccaglia, M., Bagnato, A. & Strillacci, M.G. (2020). Canine fertility: The consequences of selection for special traits. *Reproduction in Domestic Animals*, 55 (S2), 4–9. <https://doi.org/10.1111/rda.13586>
- Mital, P., Kaur, G. & Dufour, J.M. (2010). Immunoprotective Sertoli cells: making allogeneic and xenogeneic transplantation feasible. *Reproduction*, 139 (3), 495–504. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0384>
- Morse, H. & Ora, I. (2016). Reliability of AMH in Serum after long-term storage at -80°C and an extended thawing episode. *Annals of Clinical and Laboratory Research*, 4 (1). <https://doi.org/10.21767/2386-5180.100061>
- Nagano, T. (1966). Some observations on the fine structure of the sertoli cell in the human testis. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 73 (1), 89–106. <https://doi.org/10.1007/BF00348468>
- Nishimura, H. & L'Hernault, S.W. (2017). Spermatogenesis. *Current Biology*, 27 (18), R988–R994. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.067>
- Nistal, M., Jimenez, F. & Paniagua, R. (1990). Sertoli cell types in the Sertoli-cell-only syndrome: relationships between Sertoli cell morphology and aetiology. *Histopathology*, 16 (2), 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1990.tb01086.x>
- O'Rand, M.G. & Romrell, L.J. (1977). Appearance of cell surface auto- and isoantigens during spermatogenesis in the rabbit. *Developmental Biology*, 55 (2), 347–358. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90178-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90178-6)
- Paniagua, R., Amat, P., Nistal, M. & Martin, A. (1985). Ultrastructural changes in Sertoli cells in ageing humans. *International Journal of Andrology*, 8 (4), 295–312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1985.tb00843.x>
- Pecile, A., Groppetti, D., Pizzi, G., Banco, B., Bronzo, V., Giudice, C. & Grieco, V. (2021). Immunohistochemical insights into a hidden pathology: Canine cryptorchidism. *Theriogenology*, 176, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.011>
- 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>
- Ponglowhapan, S., Essén-Gustavsson, B. & Linde Forsberg, C. (2004). Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen.

Theriogenology, 62 (8), 1498–1517.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.014>

- Racine, C., Rey, R., Forest, M.G., Louis, F., Ferré, A., Huhtaniemi, I., Josso, N. & di Clemente, N. (1998). Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (2), 594–599.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.594>
- Reece, W. & Rowe, E. (2017). *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*, 5th ed., Wiley Blackwell.
- 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., 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 (1–2), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.09.007>
- Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T., Peña, A. & Rodríguez-Gil, J.E. (2001). Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56 (5), 801–815. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00609-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00609-4)
- Romagnoli, S.E. (1991). Canine cryptorchidism. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21 (3), 533–544. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50059-0](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50059-0)
- Russell, L.D. & Peterson, R.N. (1984). Determination of the elongate spermatid\p=n-\Sertolicell ratio in various mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70 (2), 635–41. <https://doi:10.1530/jrf.0.0700635>
- Sakanaka, M., Shibasaki, T. & Lederis, K. (1987). Improved fixation and cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine intensification for immunohistochemical demonstration of corticotropin-releasing factor in rat brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 35 (2), 207–212. <https://doi.org/10.1177/35.2.3491848>
- Sansone, A., Kliesch, S., Isidori, A.M. & Schlatt, S. (2019). AMH and INSL3 in testicular and extragonadal pathophysiology: what do we know? *Andrology*, 7 (2), 131–138. <https://doi.org/10.1111/andr.12597>
- Schrack, J., Dolf, G., Reichler, I.M. & Schelling, C. (2017). Factors influencing litter size and puppy losses in the Entlebucher Mountain dog. *Theriogenology*, 95, 163–170.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.004>

- Schulze, C., Holstein, A.F., Schirren, C. & Körner, F. (1976). On the morphology of the human Sertoli cells under normal conditions and in patients with impaired fertility. *Andrologia*, 8 (2), 167–178. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1976.tb02128.x>
- Schulze, W. & Schulze, C. (1981). Multinucleate Sertoli cells in aged human testis. *Cell and Tissue Research*, 217 (2). <https://doi.org/10.1007/BF00233579>
- Sertoli E. (1865). Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. *Il Morgagni*, 7: 31–40.
- Sharpe, R., McKinnell, C., Kivlin, C. & Fisher, J. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 769–784. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250769>
- Steger, K. (1999). Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Human Reproduction*, 14 (1), 136–143. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.1.136>
- Steger, K., Rey, R., Kliesch, S., Louis, F., Schleicher, G. & Bergmann, M. (1996). Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *International Journal of Andrology*, 19 (2), 122–128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00448.x>
- Syed, V. & Hecht, N.B. (2001). Selective loss of Sertoli cell and germ cell function leads to a disruption in Sertoli cell-germ cell communication during aging in the Brown Norway rat. *Biology of Reproduction*, 64 (1), 107–112. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.107>
- Tarulli, G.A., Stanton, P.G. & Meachem, S.J. (2012). Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biology of Reproduction*, 87 (1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095091>
- Tehrani, F.R., Firouzi, F. & Behboudi-Gandevani, S. (2022). Investigating the clinical utility of the anti-Müllerian hormone testing for the prediction of age at menopause and assessment of functional ovarian reserve: A practical approach and recent updates. *Aging and Disease*, 13 (2), 10
- Tiwana, M.S. & Leslie, S.W. (2022). Anatomy, abdomen and pelvis, testicle. I: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470201/> [2022-10-24]
- 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>
- Veronesi, M.C., Riccardi, E., Rota, A. & Grieco, V. (2009). Characteristics of cryptic/ectopic and contralateral scrotal testes in dogs between 1 and 2 years of age. *Theriogenology*, 72 (7), 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.016>
- Vigier, B., Tran, D., Buisson, F. du M. du, Heyman, Y. & Josso, N. (1983). Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-Müllerian hormone. *Reproduction*, 69 (1), 207–214. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690207>

- Walter, B., Flock, U., Leykam, C., Otdorff, C., Simmet, K., Hecht, W., Kempker, L., Aupperle-Lellbach, H. & Reese, S. (2022). Serum anti-Müllerian hormone concentration as a diagnostic tool to identify testicular tissue in canine disorders of sexual development. *Domestic Animal Endocrinology*, 78, 106654. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106654>
- Wildt, D.E., Baas, E.J., Chakraborty, P.K., Wolfle, T.L. & Stewart, A.P. (1982). Influence of inbreeding on reproductive performance, ejaculate quality and testicular volume in the dog. *Theriogenology*, 17 (4), 445-52. [https://doi: 10.1016/0093-691x\(82\)90026-7](https://doi: 10.1016/0093-691x(82)90026-7)
- Wisdom, G.B. (2009). Horseradish Peroxidase Labeling of IgG Antibody. I: Walker, J.M. (ed.) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_66
- Yan, H.H.N., Mruk, D.D., Lee, W.M. & Cheng, C.Y. (2007). Ectoplasmic specialization: a friend or a foe of spermatogenesis? *BioEssays*, 29 (1), 36–48. <https://doi.org/10.1002/bies.20513>
- Yong, W.H., Dry, S.M. & Shabihkhani, M. (2014). A practical approach to clinical and research biobanking. I: Day, C.E. (red.) *Histopathology*. New York, NY: Springer New York. 137–162. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2_8
- Young, J., Chanson, P., Salenave, S., Noël, M., Brailly, S., O’Flaherty, M., Schaison, G. & Rey, R. (2005). Testicular anti-Müllerian hormone secretion is stimulated by recombinant human FSH in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90 (2), 724–728. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0542>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Anti-Müllerskt hormon (AMH) är ett hormon som är viktigt för utvecklingen av det hanliga könet i fosterstadiet genom att förhindra utvecklandet av de honliga könsorganen. Hormonet finns dock hos både hanar och honor och produceras i hanens Sertoliceller i testiklarna och honornas granulosaaceller i äggstockarna och frisätts delvis till blodet, varför hormonet kan mätas med hjälp av blodprov. Hos hanar pågår forskning för att se hur man kan använda sig av hormonet för att bedöma fruktsamhet hos hanen och man hoppas att man ska kunna använda sig av AMH som en markör för detta eftersom hormonet produceras av samma celler som agerar stödjecell och ger näring till spermerna under deras initiala utveckling. Det finns många frågetecken runt Sertolicellen och forskning pågår för att fastställa cellens roll och inverkan på den hanliga fertiliteten.

Detta arbete är en del av ett större projekt om hanlig fertilitet vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) och grundar sig till del på fynden från ett tidigare examensarbete som redovisades i januari 2022. I det examensarbetet beskrevs att till skillnad från situationen i många andra djurarter så understeg AMH i seminalplasma från hund uppmätbara nivåer. Hormonet anses viktigt för spermernas mognad då det utsöndras till den vätska som spermerna finns i och dess koncentration har förknippats med spermakvaliteten hos människa. AMH-koncentrationen i både seminalvätska och blod ses även som ett tecken på normal cellfunktion hos Sertolicellerna som producerar hormonet i testiklarna.

Fyndet väckte därför frågeställningen om hundar producerar och frisätter AMH på samma sätt som andra däggdjur.

I denna studie samlade vi in testiklar från 22 hundar och analyserade AMH i blod hos 21 av dessa. Vi använde också en metod kallad immunohistokemi, som använder sig av märkta och färgade antikroppar riktade mot AMH, för att med ljusmikroskop kunna utvärdera AMH:s distribution i testikelvävnaden. Resultaten från de två metoderna jämfördes med varandra.

Vi fann att det var ett samband mellan höga koncentrationer av hormonet i både blod och testikelvävnad och en onormal testikelvävnad. Detta innebär att om man uppmäter höga värden av AMH i blodet hos en hanhund så är det sannolikt att hunden har en förändrad testikelvävnad och därmed en nedsatt fruktsamhet. Dock kan en låg AMH-koncentration i blodet inte utesluta en onormal testikelvävnad och nedsatt fruktsamhet.

Sammanfattningsvis har detta examensarbete visat att det finns potential för att använda sig av AMH för att utvärdera en hanhunds fruktsamhet och att det kan ge en ledtråd om hur testikelvävnaden ser ut.

Tack

Ett stort tack till mina fantastiska handledare och den tålmodiga personalen på KV:s laboratorium för all hjälp och stöttning. Ännu ett tack riktas till de kliniker som ställt upp och deltagit i insamlandet av testiklar till studien och till de hundar och hundägare som varit villiga att ställa upp för forskningens skull.

Bilaga 1: Immunohistokemiskt protokoll

Dag 1

Xylen 1
10 min
Xylen 2
10 min
Etanol 100% 1
10 min
Etanol 100% 2
10 min
Etanol 95% 1
5 min
Etanol 95% 2
5 min
Etanol 70% 1
5 min
Citratbuffert i 95°C
30 min
TBS 1
5 min
TBS 2
5 min
0,3% Väteperoxid (H₂O₂) i metanol
15 min
TBS 1
5 min
TBS 2
5 min
TBS 3
5 min
Imm-Edge Pen
<ul style="list-style-type: none"> Torka av glaset försiktigt, ej på preparaten Använd Imm-Edge pennan för att cirkla preparaten
5% Serum i rumstemperatur
20 min
Skaka av överflödigt vätska, torka kanterna
Inkubera med primär antikropp i 4 °C över natten
<ul style="list-style-type: none"> En med normal mouse IgG och en med primär AK 100 mikroliter/snitt
Utför negativ kontroll med TBS och normalt serum
<ul style="list-style-type: none"> 100 mikroliter/snitt På en slide: Ett preparat med normal mouse IgG och ett med primär antikropp

Dag 2

TBS 1
5 min
TBS 2
5 min
TBS 3
5 min
Inkubera med sekundär antikropp i rumstemperatur
<ul style="list-style-type: none"> 60 min 100 mikroliter/snitt
TBS 1
5 min
TBS 2
5 min
TBS 3
5 min
ABC-lösning i TBS
<ul style="list-style-type: none"> 30 min 100 mikroliter/snitt
TBS 1
<ul style="list-style-type: none"> Skölj bort ABC-lösning försiktigt Låt stå i buffert i 2 min
DAB-lösning
<ul style="list-style-type: none"> 3 min 100 mikroliter/snitt
dH₂O
Skölj
Mayer's hematoxylin
1 min
Kran H₂O
1-2 min
Etanol 70%
5 min
Etanol 95%
5 min
Etanol 95%
5 min
Etanol 100%
5 min
Xylen 1
5 min
Xylen 2
5 min
Montering
Med Pertex

Bilaga 2: Kruskal-Wallis, AMH vs förvaringstemperatur

Descriptive Statistics

Temp	N	Median	Mean Rank	Z-Value
-80	7	6,4	6,3	-0,71
-20	6	8,1	7,8	0,71
Overall	13		7,0	

Test

Null hypothesis	H ₀ : All medians are equal
Alternative hypothesis	H ₁ : At least one median is different

DF	H-Value	P-Value
1	0,51	0,475

Bilaga 3: Kruskal-Wallis, IHC vs morfologi

Descriptive Statistics

Normal och

onormal	N	Median	Mean Rank	Z-Value
Normal	12	6,75	7,0	-3,41
Onormal	9	53,30	16,3	3,41
Overall	21		11,0	

Test

Null hypothesis	H ₀ : All medians are equal
Alternative hypothesis	H ₁ : At least one median is different

DF	H-Value	P-Value
1	11,64	0,001

Bilaga 4: Kruskal-Wallis, AMH (ng/ml) vs. IHC

Descriptive Statistics

IHC tot	N	Median	Mean Rank	Z-Value
2	2	8,40	9,5	-0,36
3	4	5,45	5,5	-1,97
4	7	7,10	7,3	-1,94
5	8	60,65	17,4	3,69
Overall	21		11,0	

Test

Null hypothesis H_0 : All medians are equal
Alternative hypothesis H_1 : At least one median is different

DF	H-Value	P-Value
3	14,21	0,003

The chi-square approximation may not be accurate when some sample sizes are less than 5.

Bilaga 6: Chi2-test IHC vs. morfologi

Rows: IHC genomsnitt Columns: Morfologi 1

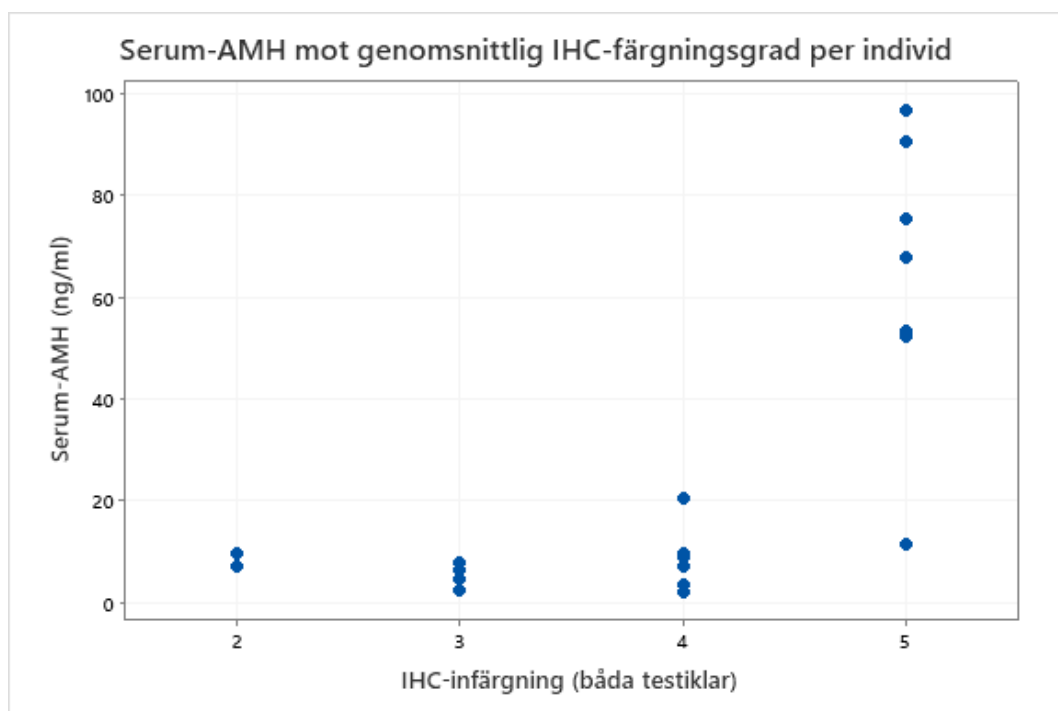
	N	O	All
1	14	2	16
	9,455	6,545	
10	12	16	28
	16,545	11,455	
All	26	18	44

Cell Contents
Count
Expected count

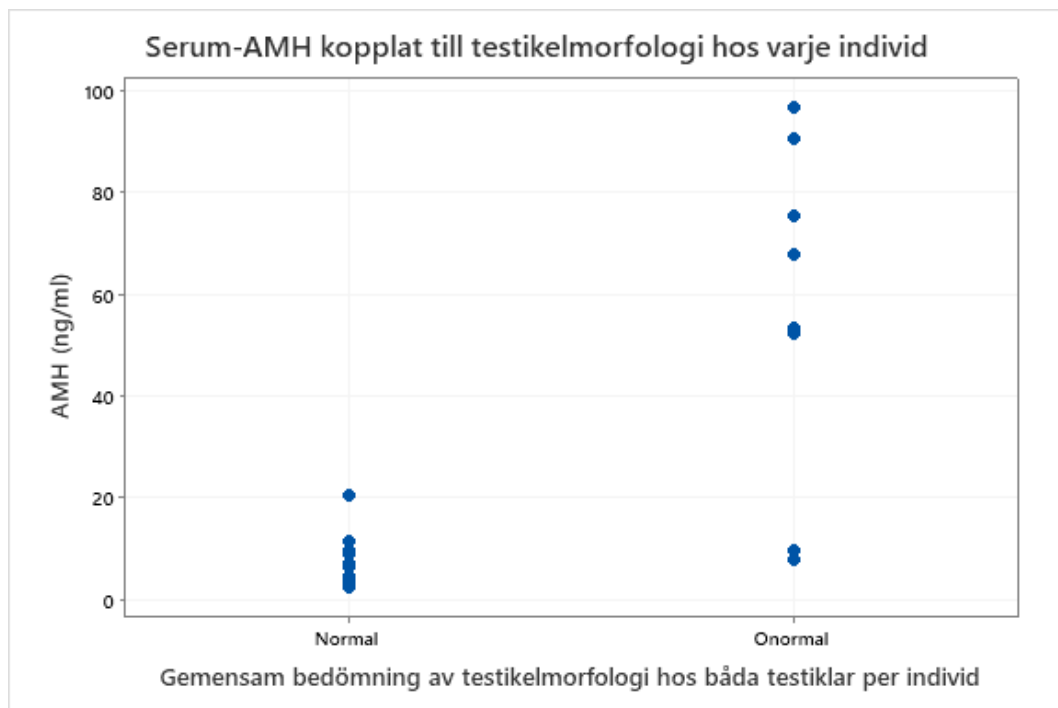
Chi-Square Test

	Chi-Square	DF	P-Value
Pearson	8,394	1	0,004
Likelihood	9,235	1	0,002
Ratio			

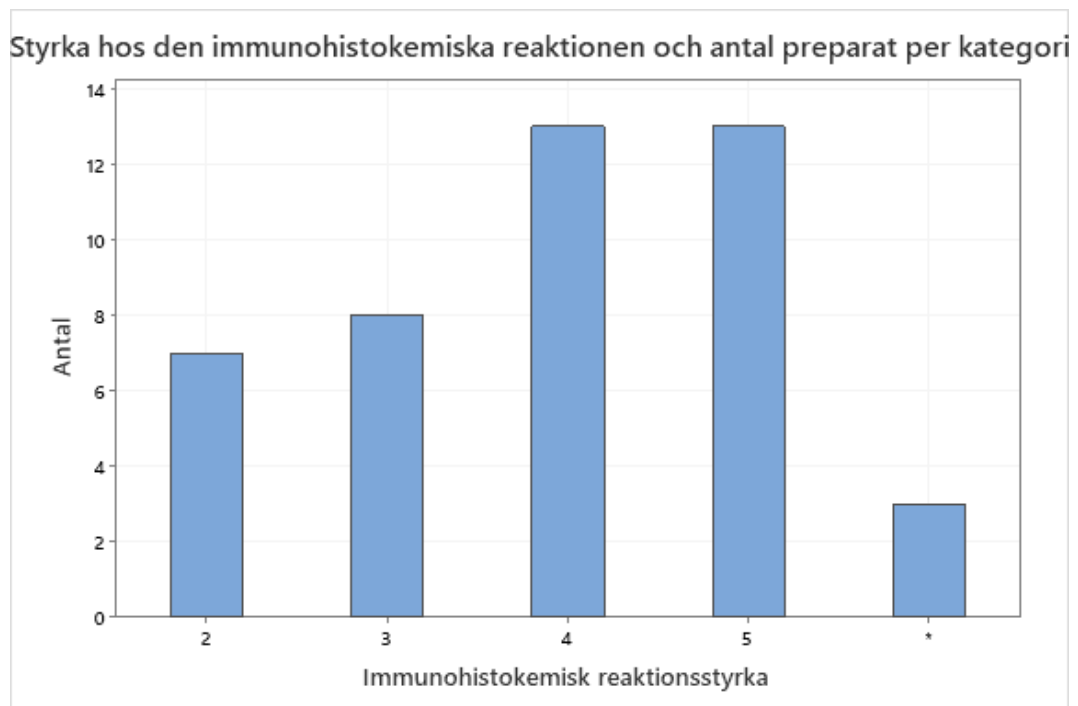
Bilaga 7: Individual Value Plot, serum-AMH vs. genomsnittlig IHC-infärgning per individ



Bilaga 8: Individual Value plot, serum-AMH vs. testikelmorfologi



Bilaga 9: Tabell över IHC-styrka och antal preparat inom respektive kategori



Bilaga 10: Deskriptiv statistik

Statistics

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
AMH (ng/ml) samtliga prov	21	0	28,30	6,99	32,02	2,20	5,45	9,60	53,00	96,70

Statistics

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
AMH (ng/ml) onormal morfologi	9	0	56,3	10,5	31,4	8,0	31,0	53,3	83,1	96,7

Statistics

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
AMH (ng/ml) normal morfologi	9	9	8,22	1,87	5,61	2,20	3,45	7,20	10,50	20,60

Statistics

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
AMH för SCO-tubuli (ng/ml)	4	0	69,5	10,5	21,0	52,7	52,9	64,4	91,4	96,7

Statistics

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
AMH (ng/ml) för avstannad spermatogenes	8	0	56,8	11,8	33,5	8,0	20,3	60,6	86,9	96,7

Statistics

Variable	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
AMH (ng/ml) för enstaka avvikande tubuli	4	0	5,38	1,10	2,21	3,40	3,47	5,05	7,60	8,00

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. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

- <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

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

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