

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar

Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék

**A szöveti hormontermelés vizsgálata egészséges és cryptorchid herékben kutya  
fajban.**

**Készítette:** Szegedi Gyöngyi

**Témavezető:** Dr. Kollár Eszter

SZIE-ÁOTK Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika, állatorvos

Budapest

2012

## Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	2
Irodalmi áttekintés.....	3
A here fejlődése és leszállása a herezacskóba.....	5
Kísérletek .....	8
Insulin-like factor 3 .....	8
Anti-Müllerian Hormon .....	9
Tesztoszteron (17 $\beta$ -hydroxiandrost-4-ene-3-one, C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> ) .....	10
Aromatáz .....	13
Ösztrogén .....	13
Progeszteron .....	15
Szállítófehérje .....	15
A hormonok vérbeli szintjének változásai .....	16
A hormon-termelésre irányuló vizsgálatok kutyákban .....	18
Anyag és módszer .....	21
1.Mintavétel .....	21
2. Hormon-mérések.....	22
Eredmények.....	25
Megbeszélés .....	27
Tesztoszteron.....	27
Ösztradiol .....	30
Progeszteron.....	32
Hormonok egymáshoz viszonyított aránya .....	33
Összefoglalás.....	40
Examination of the hormone production of the testicular tissue in cryptorchid dogs.....	41
Summary .....	41
Irodalomjegyzék.....	42
Köszönetnyilvánítás .....	47

## Bevezetés

A rejtett heréjűség az ember és az állatok egyik legfontosabb reprodukciós betegsége. Különböző vizsgálatok alapján elmondható, hogy kutyákban igen gyakran fordul elő. A vizsgált esetek 1-11 %-ában (Amann és Veeremachaneni, 2007). Yates és munkatársai 2003-as vizsgálatukban 3818 ivartalanított kan kutya közül azok 6,8%-át találták rejtett heréjűnek (Cassata és mtsai., 2007). A rendellenesség során egyik vagy mindkét here leszállása zavart szenved. Kutyakölykökben a herék a születés körül, vagy nem sokkal azután jutnak determinált helyzetükbe. A különböző vizsgálatok során a rendellenesség okának számos lehetőségét felderítették. Cassata és munkatársai 2007-ben íródott cikkükben a különböző véleményeket vetették össze. Marshall és munkatársai szerint fejlődési rendellenességről van szó, mely a MIF (Müllerian Inhibiting Factor) szekréciójának zavarából adódik, Cox és munkatársai szerint a nemi traktus rendellenességének eredménye. A kutatók ugyanakkor a genetikai háttérben sem értettek egyet. Cox és mtsai. 1978-ban úgy találták, hogy a rendellenesség háttérben autoszómális recesszív öröklésment van jelen, míg Czeizel és mtsai. szerint autoszómális domináns. 1999-ben Nef és Parada, valamint Zimmermann és mtsai. azt találták, hogy az Insulin-like factor 3 (Insl-3) génre nézve mutáns egerek életképesek voltak ugyan, de kétoldali rejtett heréjűséget mutattak. Emberekben is vizsgálták ezeket a genetikai defektusokat és azt találták, hogy a Relaxin/insulin-like Family Peptide Receptor 2 (RXFP2), más néven az LGR8 receptorra, vagy a receptor génjére, a GREAT génre nézve heterozigóta mutáns betegek rejtett heréjűek voltak (Cassata és mtsai., 2007). Truong és mtsai. 2003-ban izolálták és expresszálták a kutya INSL3 génjét (Cassata és mtsai., 2007).

Ma már valószínűsítik, hogy a rejtett heréjűség kialakulásáért nem önállóan genetikai faktorok játszanak szerepet, hanem genetikai, epigenetikai és környezeti faktorok együttesen (Amman és Veeremachaneni, 2007).

Vizsgálatunk során egészséges és rejtett heréjű kutyák véréből és hereszövetéből vett mintákban mértük meg a tesztoszteron- a progeszteron- és az ösztrogén koncentrációkat.

## Irodalmi áttekintés

A rejtett heréjűség (**1. ábra**) egyik vagy mindkét here leszállásának zavara, mely élettanilag a fajra jellemző időszakban történne meg. Ez az időszak kutyákban a születés ideje körül és azután néhány hétig tartó időintervallumot jelenti. Az elváltozást először humán tetemek boncolása során De Graaf írta le 1668-ban, amikor abdominálisan helyeződő heréket talált, főként a vesék mellett és az ágyéktájékon (Amann és Veeramachaneni, 2006).

Régebben úgy gondolták, hogy ez egy közepes örökölhetőségű, hímeiben megjelenő, a beltenyésztettséggel koncentrálttá váló betegség és megjelenése minimalizálható, ha a tenyésztésből eltávolítják az érintett hímeket és testvéreiket. Ez az elmélet azonban túlzottan leegyszerűsített. Valójában poligénes öröklésmenetről van szó. Ezt sertések esetében Sittmann és Woodhouse, valamint Rotschild és munkatársai; kutyában Cox és munkatársai, Nielen és munkatársai; emberekben pedig Czeizel és munkatársai vizsgálták (Amann és Veeramachaneni, 2007). A ma elfogadott elmélet alapján a betegséget multifaktoriálisnak tekintjük, melyben szerepet játszanak genetikai, epigenetikai (mely kifejezi, hogy hogyan kerül át a DNS egyik generációból a másikba a szekvenciaváltozás nélkül) és környezeti tényezők.

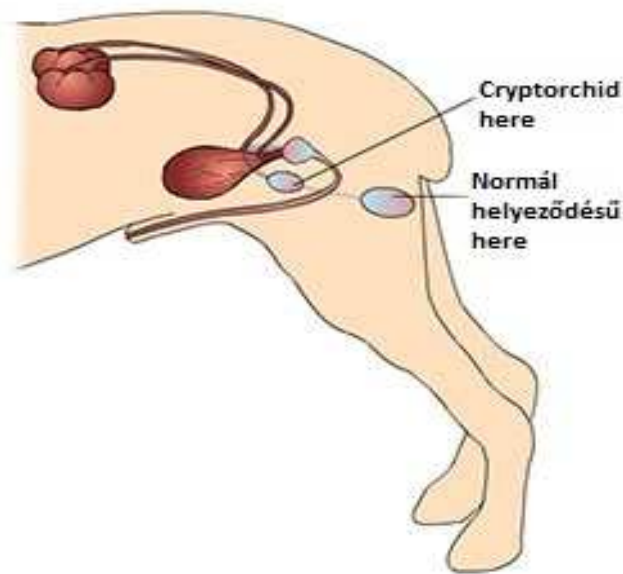
Ezek a tényezők nem csupán a here hibás leszállását okozzák, hanem egyéb rendellenességekkel is járhatnak. Az ilyen típusú rendellenességeket együttesen TDS-nek, vagyis Testicular Dysgenesis Syndrome-nak nevezzük. Ebbe a tünetegyüttesbe egyaránt beletartozik a rendellenesen helyeződő here, a rossz minőségű ondó- a spermiogenesis zavarai miatt-, a különböző típusú heredaganatok és a hypospadias (Amann és Veeramachaneni, 2007).

Hutson, Hasthorpe és Heyns 1997-es cikkében a következő lehetséges okokat adják meg a betegség kialakulására, humán esetek vizsgálata alapján:

- Androgén elégtelenség/blokk:
  - a hipofízis/ a placenta gonadotropin-elégtelensége
  - gonadális fejlődési rendellenesség
  - androgén-szintézis zavara, androgén receptorok zavara

- Mechanikai hibák
  - „szilva-has”, amikor a húgyhólyag elzárja a lágyékcsatornát
  - hátsó húgycsövi billentyű, amely esetben szintén a húgyhólyag zárja el a lágyékcsatorna nyílását
  - hasfali defektus
  - kromoszomális/malformációs szindróma, mely következtében a kötőszövet rendellenessége alakul ki és ez akadályozza a migrációt
- Neurológiai rendellenességek
  - myelomeningocele (nervus genitofemoralis dysplasia)
  - nervus genitofemoralis/CGRP (Calcitonin Gene-related Peptide) anomáliák
- Szerzett rendellenesség
  - agyi bénulás (cremaster izom spaszticitás)
  - felszálló/retraktilis here (valószínűleg a processus vaginalis fibrózus maradványa miatt)

Kutyákban Hayes és mtsai.-nak 1985-ben végzett vizsgálata alapján a leggyakrabban érintett fajták: boxer, cairn terrier, chihuahua, angol bulldog, máltai selyemkutya, törpetacskó, törpeuszkár, törpeschnauzer, pekingi palotakutya, sheltie, toy uszkár és yorkshire terrier (Romagnoli és Schlafer, 2005, Rijnberk, Kooistra, 2010).



**1. ábra:** Rejtett heréjű kutya sematikus ábrája

Forrás: <http://vcahospitals.com>

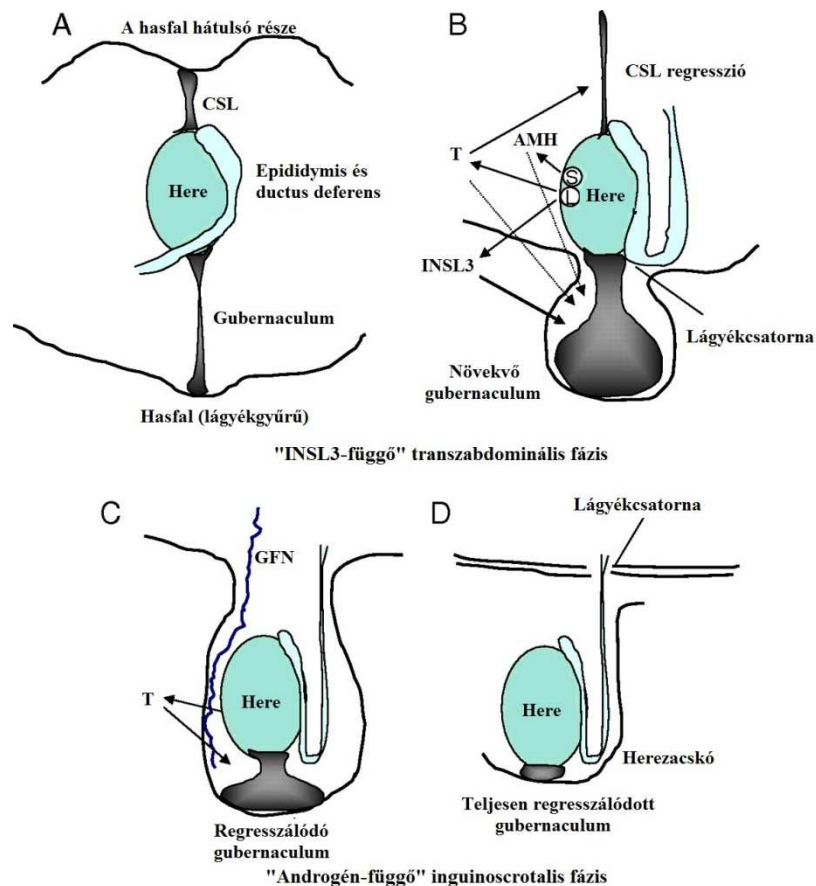
## A here fejlődése és leszállása a herezacskóba

A petesejt termékenyülésekor kialakul az embrió kromoszómális neme, ám szukákban és kanokban a gonádok fejlődése indifferens módon történik a vemhesség 36. napjáig (Meyers-Wallen és mtsai., 1991). Ezután aktiválódik az Y kromoszómán található Sex determining Y (SRY) gén (Meyers-Wallen és mtsai., 2001, Wilhelm és mtsai., 2006), valamint az ezt szabályozó autoszómális SOX9 gén, az X kromoszómán pedig a normális herefejlődésért felelős DAX-1 gén. Ezek nélkül a szignálok nélkül az embrió fejlődése a nőnem irányába folytatódna tovább (Wilhelm, Palmer, Koopman, 2006).

A gonádok fejlődésük korai szakaszában a hashártya által képzett ivarredőkben foglalnak helyet a mesonephros területén. Az ősvarsejtek az allantoison keresztül vándorolnak ide. Ezután mesenchymalis sejtek, valószínűleg a szomszédos coeloma epithel sejteit, a fejlődő gonádba jutnak és proliferálódnak, majd körülveszik a primordiális csírasejteket, differenciálódnak, majd kialakulnak belük a magzati Sertoli-sejtek, melyek megkezdik Anti-Müllerian Hormon (AMH) termelésüket. A Sertoli sejtek és a primordiális sejtek herecsatornácskákká alakulnak (Amann és Veeramachaneni, 2006). Szintén mesenchymalis eredetű (nem kizárható, hogy mesonephros-eredetű) sejtek jutnak a herecsatornácskák közti térbe és Leydig-sejtekké érnek. A magzati Leydig-sejtek 2-3 nap alatt elérik tesztoszteron-termelésük maximumát, valamint insulin-like factor 3-at (InsI3) szekretálnak. Ezen faktorok együttes hatására a ductus paramesonephricus, vagyis a Müller-cső elsovad, a ductus mesonephricus, a Wolff-cső pedig tovább fejlődik és létrehozza a mellékherét, az ondóvezetőt, a prosztatát és az ondóhólyagot. AMH és tesztoszteron hiányában a Müller-cső nem sovadna el, ez történik egészséges nőnemű embriókban, illetve a Perzisztens Müller-vezeték szindróma esetén is (PMDS). Az első vizsgálatokat az AMH és a Müller-cső regressziójának összefüggéséről Jost végezte 1947-ben. Meyers-Wallen és mtsai. 1991-ben vizsgálták kutya embriókban a Müller-cső regressziójának és az AMH szekréciójának pontos idejét a vemhesség alatt. A vemhesség 36. napjától tudtak AMH-szekréciót kimutatni és a Müller-cső sorvadásának kezdetét a 37-39. nap között figyelték meg (Meyers-Wallen és mtsai., 1991).

A gonádok a nemi differenciálódás előtt egy cranialis és egy caudalis szalag által vannak felfüggesztve a hasüregben. A cranialis szalag nőneműekben az androgének hiánya miatt tovább fejlődik, és a petefészkeket a vesékhez közeli pozícióban tartja, míg hím

neműekben androgén-hatásra sorvad a cranialis suspensory ligament (CSL) (Amann és Veeramachaneni, 2006), közben pedig kialakul a caudalis szalagból a gubernaculum, mely összeköti a herét a herezacskóval. A gubernaculum kifejezést reprodukciós szervekre elsőként Hunter alkalmazta 1762-ben (Tremblay, 2010), ez a név egy olyan struktúrát jelöl, mely kormányoz, irányít. Zselé-szerű anyag, mely főleg embrionális mesenchymából, kollagénrostokból valamint izomrostokból áll és sok hialuronsavat tartalmaz. A lágyéktájékon ered. Humán magzatok esetében a terhesség 15. hetében egy növekedési faktor, a descendin (vagyis az insulin-like factor 3) stimulálja a gubernaculum kinövését (Husmann és Levy, 1995). A gubernaculum egy dinamikus struktúra. A kinövés után a gubernaculum regressziója következik be (**2. ábra**). Ebben a folyamatban részt vesz még a csökkent sejtes proliferáció, a hialuronsav csökkenő mennyisége és a fokozott katabolikus enzimaktivitás. Ha a parakrin faktorok és a katabolikus enzimek nem aktiválódnának, nem következne be a gubernaculum regressziója, amely így anatómia útzárként funkcionálna a leszálló here számára (Husmann, 1991).



**2. ábra** A here leszállásának folyamata emberben

Forrás: Foresta és mtsai., 2008

A rejtett here 3 helyen fordulhat elő: a hasüregben, a lágyékcsatornában vagy a bőr alatt, a hasfalán kívül. Sok tudós a lágyéki és a bőr alatti helyeződést egy csoportba sorolja és az ő felosztásuk szerint a másik csoport a hasúri helyeződésű here. A lágyékcsatornában találtak rejtett herét emberekben, lovakban és nyulakban (Amann és Veeramachaneni, 2006).

A here leszállásában résztvevő struktúrák: a here, ductus epididymidis, ductus deferens, a degenerálódó mesonephros, a cranialis suspensory ligament, a gubernaculum, a processus vaginalis (mely a hashártya kitüremkedése), a cremaster izom, a genitofemoralis ideg a lumbális 1-es és 2-es ganglionokkal, valamint a herezacskó.

A kutatások alapján a here leszállásakor a három fázis, melyek során megakadhat a folyamat:

- 1.fázis: Hasi áthelyeződés zajlik, mely során a here a fejlődő húgyhólyag nyakához migrál, miközben nő a hasüreg mérete, ezt pedig egy kisebb mértékű helyzetváltozás követi, a jövőbeni belső lágyékgyűrűhöz.

Szabályozásában fő szerepe az *Insl3*-nak van, mely stimulálja a gubernaculum növekedését. Ehhez a lépéshez nem szükséges tesztoszteron, bár a genitofemoralis ideg maszkulinizációjával elősegíti a processus vaginalis és a cremaster izom növekedését (Belman és mtsai., 2002).

- 2.fázis: A gubernaculum gumója megnő és kitágítja a lágyékcsatornát, így a nagy nyomás hatására a here és a mellékhere keresztülhalad a lágyékcsatornán, a majdani spermavezeték képező struktúrák meghosszabbodnak és a CLS csak vékony burokként marad fenn. A gubernaculum szerepe tehát passzív a lágyékcsatorna tágítása és a here, illetve mellékhere herezacskóhoz horgonyzása miatt és hormonok (*Insl3*, tesztoszteron) nincsenek hatással ezen szakaszra.

- 3.fázis: Az inguinoscrotalis fázis, mely során a here a bőr alatti, külső lágyékgyűrű-tájéki helyeződéséből a lágyékcsatornán kívülre, a herezacskó aljára jut. Ehhez a folyamathoz szükség van a gubernaculum bulbusának megnagyobbodására. Végül a gubernaculum sorvadni kezd, ezáltal összekötve a processus vaginalis külső felületét a herezacskó falával (scrotalis ligamentum), a belső falát pedig a mellékhere farkával. Rágcsálók és nyulak kivételével a lágyékcsatorna egy szűk járattá alakul, megakadályozva a hasúri szervek sérvét (Amann és Veeramachaneni, 2006).



Ebben a szakaszban fontos a folyamat megfelelő irányban való lezajlása, melyet a calcitonin-génhez kapcsolódó fehérje (CGRP, vagyis calcitonine gene-related peptid) biztosít. Ezt a fehérjét a genitofemorális ideg termeli tesztoszteron-stimulusra (Amann és Veeramachaneni, 2007).

## **Kísérletek**

A here leszállás zavarának oktana összetett, kiválthatja az Insl3 hiánya, az alacsony intraabdominális nyomás, a here kis mérete, az alacsony tesztoszteron-szint, magas ösztrogén-szint és egyéb tényezők. A következőkben a kiváltó okok vizsgálatára irányuló kísérletekről lesz szó.

### **Insulin-like factor 3**

1993-ban Adham és munkatársai fedezték fel a hím neműekben a magzati és az érett Leydig-sejtek, nőneműekben a theca sejtek által termelt Insl3 molekulát (Krausz és mtsai, 2000). Truong és munkatársai az Insl3-expressziót kutyák heréjében nagyobb mértékűnek találták, mint szukák petefészkében (Truong és mtsai., 2003). Azóta bebizonyosodott, hogy az összes vizsgált emlős fajban fontos szereppel bír a here leszállása során. Az Insl3 szerkezetileg nagyon hasonló a peptid-természetű inzulinhoz, illetve relaxinhoz (Ivell és Hartung, 2003).

Nef és mtsai. 2000-ben egér embriókon vizsgálták a gubernaculum fejlődését. Azt találták, hogy az Insl3 szintje a vemhesség 13,5. napjától a megszületés utáni 6. napig magas, és a gubernaculum bulbusában ekkor magas a receptorok száma. Az LGR8, vagy GREAT receptor G-proteinhez kötött. Egyéb, a here leszállásában szerepet játszó struktúrákban nem találtak Insl3-receptort (Nef és mtsai., 2000).

Ha az Insl3 nem volt jelen az állatok szervezetében, illetve ha a GREAT Insl3-receptorok génjére nézve knockout egeret vizsgáltak (Agoulnik, 2005), azt találták, hogy a here abdominális pozícióban maradt. A receptor-gén mutációja Overbeek és mtsai.-nak 2002-es vizsgálata alapján is rejtett heréjű utódokat eredményezett. Szintén ez volt az eredmény, ha az anyaállat szervezetébe a vemhesség alatt exogén ösztrogént juttattak. Ezáltal az ösztrogén az

$\alpha$ -ösztadiol receptorhoz kapcsolódik a Leydig-sejteken és elnyomja az Insl3 gén transzkripcióját (Nef, 2000). A vizsgált egyedekben a herék a hasüregben helyeződtek, jóval a belső lágycső felett, a gubernaculum ezen egyedekben ugyanakkor fejletlen volt.

Hypogonadalis (Hpg) állatban a magzati Leydig-sejtek populációja nagy mennyiségben expresszálja az Insl3 receptor mRNS-ét, illetve a receptorfehérjét, annak ellenére, hogy az állat rejtett herével születik. Ez azt sugallja, hogy a megfelelő androgén-mennyiségre is szükség van a here leszállásához (Ivell és Hartung, 2003). A hypothalamus-hypophysis-gonád tengely hibája esetén rendellenesség lép fel az androgén jelátadásban, illetve transzkripciós faktorokban, mint a HOXA 10, HOXA 11 és Desrt gének által kódolt fehérjék (Hutson és mtsai., 1997; Ivell és Hartung, 2003). A HOXA, vagyis homeobox gének DNS-kötő transzkripciós faktorokat kódolnak, melyek azután részt vesznek az embrionális fejlődés szabályozásában (Shen és mtsai., 1989). A HOXA 10 transzkripciós faktort knockout egereken vizsgálták Rijli és mtsai. 1995-ben, illetve Satokata és mtsai. 1995-ben. In situ hibridizációval igazolták, hogy a HOXA10 a gubernaculumban és a vesében is termelődik. A hím knockout egerek életképes, de termékenyítőképtelen utódok lettek (Ivell és Hartung, 2003).

Az Insl3 expresszióért felelős gén genetikai hibáját Adham és Angoulnik is vizsgálták 2004-ben. Az ilyen egerek magasan a hasüregben helyeződő herével születtek.

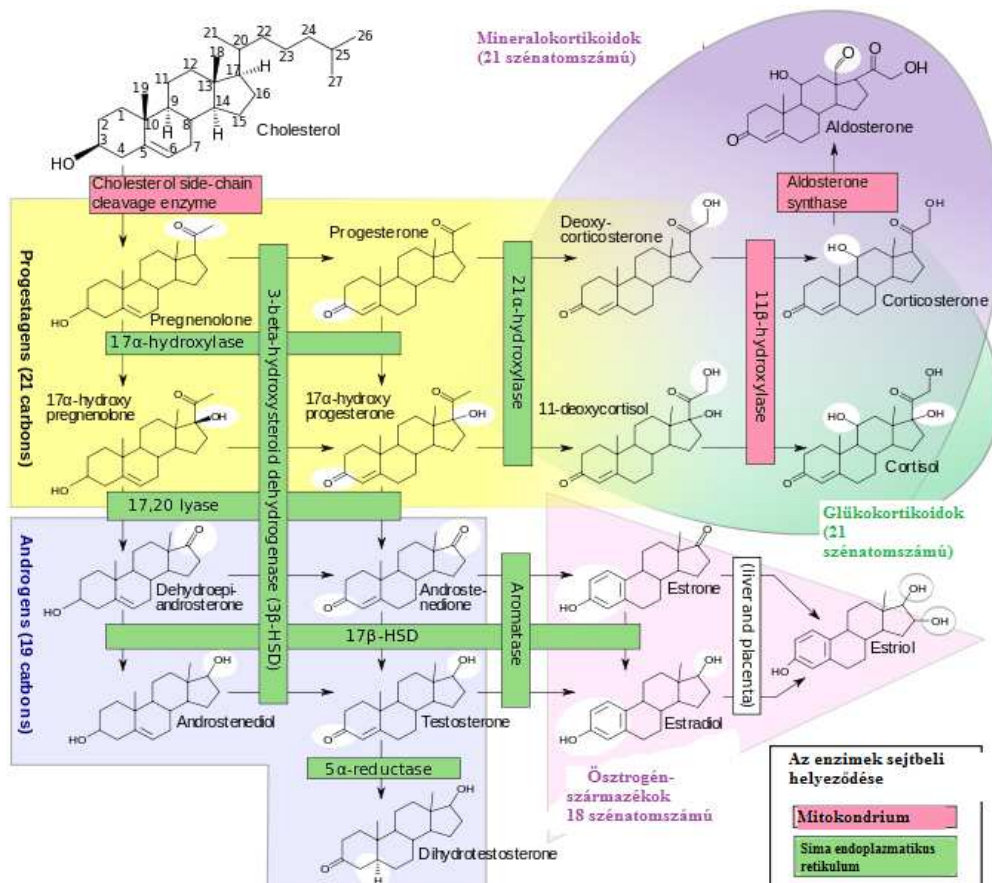
### **Anti-Müllerian Hormon**

A hormont a magzati Sertoli-sejtek termelik (Meyers-Wallen és mtsai., 1991). Egyes kutatók a MIS2 receptort vizsgálva azt találták, hogy a hormon a gubernaculum növekedésére serkentőleg hat (Kubota és mtsai., 2002). Más vizsgálatok szerint viszont knockout egerekben nem volt hatása a gubernaculumra (Ivell és Hartung, 2003).

A perzisztens Müller-vezeték szindróma esetén azonban gyakran alakul ki kétoldali rejtett heréjűség (Meyers-Wallen és mtsai., 1989), ugyanis a vezeték anatómiai barrierként szolgál a herék számára (Hutson és mtsai., 1997).

### Tesztoszteron (17 $\beta$ -hydroxiandrost-4-ene-3-one, C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>)

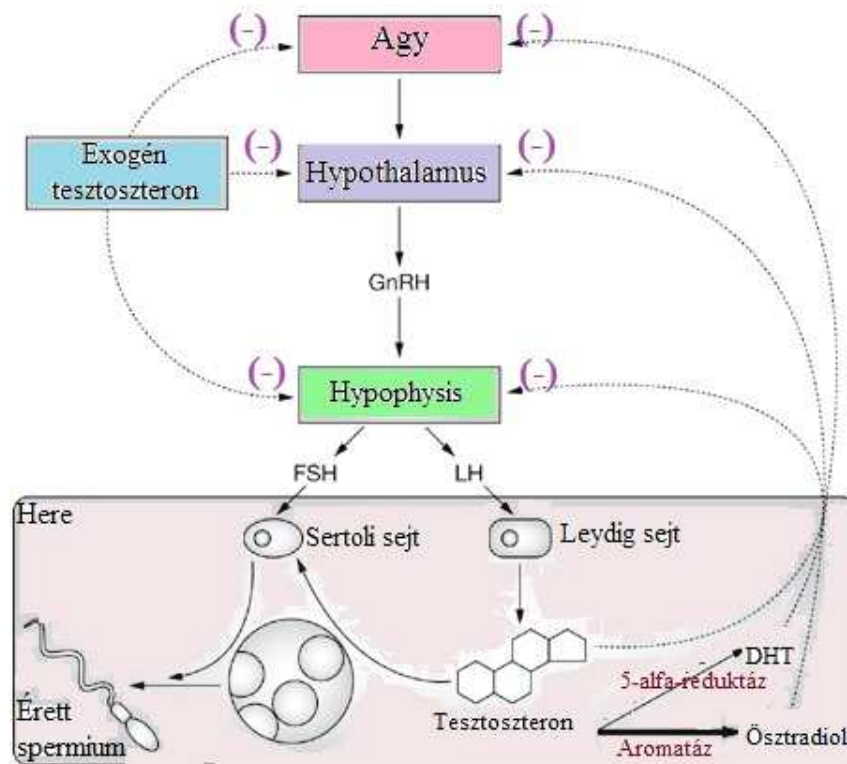
A nemi hormonok többsége, a tesztoszteronnal együtt, szteroid szerkezetű molekulák, melyek koleszterolból képződnek (3.ábra). A tesztoszteron egy 27 szénatomos molekula, melyből a 21 szénatomos pregnenolone keletkezik. Ezt a folyamatot a citokróm P450 side chain cleavage (scc), vagyis oldallánc-hasító enzim végzi. Ezután a pregnenolone-ból többféle vegyület képződhet: dehidroepiandroszteron (DHEA) a 17,20-liáz enzim által; progeszteron a 3 $\beta$ -hydroxiszteroid-dehidrogenáz enzim által; androsztendion hidroxilálás és a 17,20-liáz enzim által. Az androsztendionból a 17-ketoreduktáz enzim tesztoszteront, az aromatáz pedig öszttront képes előállítani. Tesztoszteronból szintén az aromatáz enzim képez ösztradiolt. DHEA-ból a 17-ketoreduktáz androsztendiolt készít, melyet a 3 $\beta$ -hydroxiszteroid-dehidrogenáz enzim alakít tesztoszteronná. A tesztoszteront pedig az 5 $\alpha$ -reduktáz alakítja dihidrotesztoszteronná, mely tízszer jobban képes kötődni (Wang és mtsai., 2008).



3. ábra: Szteroid hormonok szintézise, forrás: wikipédia

A tesztoszteron a Leydig-sejtekben termelődik LH-hatásra. A folyamat a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely szabályozása alatt áll, az **4. ábrán** látható módon.

A tesztoszteron három formában lehet jelen a perifériás keringésben: szabad tesztoszteronként, gyengén kötődve albuminhoz, illetve kotrizol-kötő globulinhoz és erős kötődéssel a Sex Hormon-Binding Globulinhoz (SHBG). A szabad tesztoszteron aktív formában található meg, az albuminhoz kötött tesztoszteron pedig gyenge kötődése miatt gyorsan leszakadhat a fehérjéről. Ezek a szervezet számára elérhető tesztoszteron-források, melyeket „nem SHBG-hez kötött” tesztoszteronnak is nevezünk (NSB-T). A SHBG érzékeny a keringő ösztrogén/androgén arányra, az albuminnal ellentétben (Vankrieken, 1997).



**4. ábra:** A hím nemi működés neuroendokrin szabályozása

Forrás: Mara Y Roth, John K Amory and Stephanie T Page, (2008)

A tesztoszteron szerepét a here leszállásában anti-androgénnel, flutamiddal vizsgálták, mely nagy affinitással bír az androgén-receptorhoz. Amman és Veeremachaneni 2007-ben patkányokon és sertéseken végeztek kísérleteket, hogy megtudják, a here leszállásának mely

szakaszaiért felelős a tesztoszteron. A hasi áthelyeződés 9 vizsgálat során 89%-ban végbement a prenatális vagy korai postnatalis flutamid-kezelés ellenére.

A transzinguinalis migráció 95%-ban végbement a flutamiddal kezelt állatokban. Amman és Veeremachaneni, Wensinghez (1988) és Hutson és munkatársaihoz (1997) hasonlóan azt tartják, hogy csupán a magas nyomásnak van szerepe a transzinguinális migrációban.

Az inguinoscrotalis fázis tesztoszteron-igényét először abban a szakaszban vizsgálták, amikor az valóban zajlik, és ekkor az összes here leszállt. Ám ha ez előtt az időablak előtt végezték a flutamid-kezelést, akkor 53 és 87% között volt a normálisan leszállt herék aránya.

A Gonadotrop Releasing Hormon- (GnRH), illetve Luteinizáló Hormon (LH)-receptor knockout egerekben, melyekben így nem volt megfelelő a tesztoszteron szint, nem jött létre az inguinoscrotalis migráció (Hutson és mtsai., 1997).

Patkányok esetében a prenatális Leydig-sejtek a vemhesség 15,5. napjától megnövekedett cAMP- és szteroid-termeléssel válaszolnak az LH stimulusra (Huhtaniemi és Pelliniemi, 1992). Tehát a hypophysis-gonadotrop tengely is hatással bír a rejtett heréjűség kialakulására, illetve bármely faktor, amely a Leydig-sejtek differenciálódását befolyásolni képes.

A tesztoszteronnak viszont fontos szerepe van a genitofemoralis ideg maszkulinizációjában.

Baumans és munkatársai 1985-ben kutyákon vizsgálták a tesztoszteron szekrécióját a here leszállás időszakában. Kutyákban a here a születés utáni 3-4. napon jut át a lágyékcsatornán (Baumans és mtsai., 1985). Mivel a perifériás vérből mért tesztoszteron nem mutatja pontosan a tesztoszteron szint változását (Baumans és mtsai., 1985), a hormon szintjét a herékből is megmérték. Az állatokat humán choriongonadotropinnal (hCG) kezelték, mely nagyrészt LH-hatású, és így a Leydig-sejtek tesztoszteron szekrécióját fokozza. A kutatók azt találták, hogy a szérum- és herebeli tesztoszteron szint nem mutatott emelkedést a here leszállásának második szakaszában, míg ezt korábban Rajfer és Walsh 1977-ben, valamint Colenbrander, de Jong és Wensing 1978-ban kimutatták sertés és patkány modelleken (Colenbrander és mtsai., 1978; Baumans és mtsai., 1985). A magzati, illetve újszülött kutyakölykökben a fő androgénnek a tesztoszteron bizonyult, ellentétben Rajfer és Walsh 1977-es, patkányokon végzett vizsgálatával, melyben az  $5\alpha$ -dihidrotesztoszteron volt a nagyobb mennyiségben jelenlevő androgén hormon. A kutyák herebeli tesztoszteron szintje 5000-szer nagyobbak bizonyult a szérum-beli értékhez viszonyítva (Baumans és mtsai., 1985).

1993-ban Kawakami és munkatársai szintén kutyák androgén-szintjét vizsgálták a vemhességi, illetve korai újszülött időszakban. Ők azt találták, hogy a plazma dihidrotesztoszteron-szint a vemhesség 54 és 58. napja között megemelkedett a magzatokban. A 60. nap után a DHT szintje csökkent, a tesztoszteron szintje pedig emelkedett és a születéstől számított 30. napon magas értéket ért el.

### **Aromatáz**

Az aromatáz enzim tesztoszteronból ösztradiolt képez (Carreau, 2003), valamint androsztendionból ösztront állít elő. Génjének túlexpressziója rejtettheréjűséghez vezethet, valószínűleg mert növeli az ösztradiol szintet a herén belül (Klonisch és mtsai., 2004).

Li és mtsai. 2001-ben végzett vizsgálatukkal ugyanezt találták. A felesleges ösztrogén az Insl3 expresszió szuppressziójához vezet, és feltehetően negatív feedback révén hat a hypothalamus-hypophysis-gonád tengelyre, csökkentve az androgének vérbeli szintjét (Ivell és Hartung, 2003).

### **Ösztrogén**

Mindkét nemben termelődik ösztrogén. Roselli és munkatársai 1997-ben kimutatták, hogy hím nemű állatokban a here Leydig-, Sertoli- és csírasejtjei mellett az agyban is termelődik és magas koncentrációban megtalálható egyes fajok ondójában is (Hess és mtsai., 2001). Az ösztrogén koncentrációja jellemzően magasabb a here vénájában, mint a perifériás keringésben (Hess és mtsai., 2001).

Az ösztrogén úgy fejt ki hatását, hogy egy intracelluláris receptorhoz kötődik és aktiválja azt (Lubahn és mtsai., 1993). Az első ösztrogén-receptort (ER) 1986-ban klónozták először Green és munkatársai (Delbes és mtsai., 2006) és  $\alpha$ -receptornak nevezték. 10 évvel később fedezték fel a  $\beta$ -receptort Kulper és munkatársai (Delbes és mtsai., 2006). Az ösztradiol metabolitjai, az ösztron és az ösztriol, gyengébb agonisták az ösztrogén-receptorokon, mint az ösztradiol molekula (Heldring és mtsai., 2007).

Az 1950-es években sok terhes anyát kezeltek dietil-stilbösztrollal, hogy hormonálisan támogassák a terhességet. Ám ezt megszüntették, miután a megszületett gyerekek nagy

hányada lett rejtett heréjű, illetve egyéb defektustól szenvedtek (Ivell és Hartung, 2003). Ezt kísérleti körülmények között is vizsgálták. Vemhes patkányoknak adtak ösztrogént, és bebizonyosodott, hogy a hím utódok heréje nem szállt le a megfelelő módon (Ivell és Hartung, 2003, Saunders és mtsai., 2001). Toppari és Skakkebaek 1998-ban a megnövekedett humán cryptorchid eseteket összefüggésbe hozták a xenoösztrogének jelenlétével a környezetben. Thonneau és munkatársai is hasonló eredményekről számolnak be cikkükben (Thonneau és mtsai., 2003).

Emmen és mtsai. 2000-ben, illetve Nef és mtsai. 2000-ben dietil-stilbösztrollal kezeltek vemhes egereket, kiváltva az újszülöttek rejtett heréjűségét. A magzati *Insl3* mRNS-szintézist alacsonyabb szintűnek találták a kontroll állatokéhoz viszonyítva.

Lague és Tremblay 2009-ben vizsgálták, hogy az ösztradiol direkt módon elnyomja-e az *Insl3* expresszióját. MA-10 sejteket, melyek Leydig-sejtek, ösztrogénnel, illetve dimetilszulfoxiddal (DMSO) kezeltek és azt találták, hogy a DMSO-val kezelt sejtek a behatás után is nagymértékben expresszáltak *Insl3*-t, míg ösztrogén-kezelés után csökkent a fehérjeszintézis mértéke.

Cederroth és mtsai. 2007-ben, Delbes és mtsai. 2005-ben kimutatták, hogy az ösztradiol csökkenti a tesztoszteron bioszintéziséhez szükséges egyes enzimek génjének expresszióját, mely által csökken a tesztoszteron szintje (Delbes, 2006, Cederroth, 2007). Mivel az *Insl3* expressziót növeli a tesztoszteron (Lague és Tremblay, 2008), lehetséges, hogy az ösztradiol represszív hatása az *Insl3*-ra csak másodlagos a tesztoszteron-szintézis csökkenéséhez viszonyítva.

Raynaud és Raynaud 1958-ban, illetve Jean 1973-ban szintén egereken vizsgálták az exogén ösztrogén hatását. A vemhesség 14. napján adott ösztrogén-injekcióval az összes hím utód rejtett heréjű volt. Vizsgálták a hipofízis LH-tartalmát, a herék méretét és struktúráját és a reproduktív traktus egyéb részeit a születés napján, majd 2, 4, 8 és 14 hetesen. Az LH-szint alacsony volt, nem rendelkeztek kifejlett gubernaculummal, és a herék szabadon mozogtak a hasüregben. Hypogonadalis hím egerek, melyeknek alacsony a GnRH-szintje, cryptorchidok lettek, de a gubernaculum normális fejlettségű volt és ha gonadotrop hormonokkal kezelték az állatokat, a herék leszálltak determinált pozíciójukba. Ha a hypogonadotrop anyát ösztradiollal kezelték, a fiú utódokban nem fejlődött ki megfelelően a gubernaculum. Ez azt jelenti, hogy a hypothalamus-hypophysis tengely nem játszik fontos szerepet az ösztrogén-indukált rejtett heréjűség esetében (Grocock és mtsai., 1988).

Tudósok beszámoltak arról, hogy a környezeti endokrin diszruptornak (EED) nevezett anyagok szintén ártalmas hatással bírnak a méhen belül fejlődő hím magzatok nemi szerveire (Agoulnik, 2005; Scott és mtsai., 2009). Ezek az anyagok úgy hatnak, hogy beavatkoznak az élettani hormon háztartásba, ezáltal a reprodukciós szervek fejlődését gátolják. Ezek közé az anyagok közé tartoznak a xenoösztrogének (pl. gyári kemikáliák), perzisztáló organohalogén szennyezők, melyek felhalmozódnak a táplálékláncban, ftalátok, melyeket gyári termékek előállításakor használnak, szintetikus és természetes hormonok, fito- és mikoösztrogének, valamint egyéb, az endokrin jelátadást befolyásoló anyagok (Agoulnik, 2005).

Mivel a zsírszövet is fontos forrása az ösztrogénnek, az anyai elhízás is okozhat ösztrogén-túlsúly miatti rejtett heréjűséget (Delbes, 2006).

## **Progeszteron**

Bár a progeszteron -az ösztrogén mellett- főként női nemi hormon, mégis fontos szerepet játszik a hím nemi működésben is (Han és mtsai., 2009), például a spermatogenezisben, a Sertoli-sejtek funkciójában, a kapacitációs reakció létrejöttében és a tesztoszteron bioszintézisében (Schwarzenbach és mtsai., 2003). A progeszteron, a többi szteroid hormonhoz hasonlóan koleszterolból képződik, melyből a citokróm P450<sub>sc</sub> mitokondriális enzim képez pregnenolone-t. Ezután az endoplazmatikus retikulumban a 3 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz létrehozza a progeszteron molekulát (Hanukoglu, 2002)..

2 progeszteron receptort találtak a spermacytákon, melyekben a petesejt cumulus sejteiben termelődő progeszteron hatására megnő az intracelluláris kalcium-ion szint és klorid-kiáramlás következik be (Thérien és Manjunath, 2003). A spermacyták felületén levő progeszteron-receptorok és általuk a progeszteron szerepet játszik az akroszóma-reakció létrejöttében is (Gadkar és mtsai., 2002).

## **Szállítófehérje**

A nemi hormonokat a Sex Hormone-binding Globulin (SHBG) szállítja a vérben és ezáltal befolyásolja a szövetek hozzáférését a hormonokhoz (Porto és mtsai, 1995). A fehérje májbeli szintézise változik az életciklus során. Elsősorban hormonális és metabolikus faktorok



befolyásolják. Amellett, hogy szabályozza a plazmabeli eloszlást, a metabolikus clearance-t és a szexuál-szteroidok biológiai hasznosulását, az SHBG az extravascularis térben egyes szövetekben akkumulálódik és kifejti hatását az androgénekre és ösztrogénekre. A főemlősöknel fejletlenebb fajokban az SHBG-expresszió a Sertoli-sejtekben FSH-kontroll alatt történik. Mint a klasszikus hormonok, a szexuáliszteroidok vagy prekursoraik a gonádok szteroid-szintetizáló sejtjeiben, a mellékvesében és a placentában termelődnek, majd a vérbe ürülve és szállítódva jutnak el célszerveikhez (Hammond, 2011).

Baker 2002-es vizsgálatai alapján a szállítófehérjék közül a vérben legnagyobb mennyiségben jelenlevő az albumin, mely minden típusú szteroidot képes kötni, nem specifikus módon, alacsony affinitással és rezervoárként funkcionál, ami növeli a lipofil molekulák oldékonyságát és meghosszabbítja azok felezési idejét. Ezzel szemben a SHBG egy plazmabeli glükoprotein, mely a biológiailag aktív ösztrogéneket és androgéneket specifikusan képes kötni, 4-5x erősebben, mint az albumin. Madarak kivételével minden gerinces állat vérében megtalálható. Az erős ligand-kötődés miatt a plazma SHBG a fő transzportfehérje a biológiailag aktív szexuáliszteroidok számára. A tesztoszteron szállításának mintegy 1 %-ában a kortizol-binding-protein is részt vesz (Hammond, 2011).

### **A hormonok vérbeli szintjének változásai**

Szteroid hormonokat a gonádokon kívül a mellékvesekéreg, valamint a vemhesség alatt a placenta termel (Hanukoglu, 1992). Ezen hormonok vérplazmabeli szintje napszaki ingadozást mutat, melyre a hypothalamus és a hypophysis trop-hormonjai vannak hatással. Hypophysectomián átesett állatokon végzett kísérletek bizonyították, hogy a szteroid-szintézis enzimeihez szükség van a gonadotrop-hormonok szintjének ingadozására (Hanukoglu, 1992). Hypogonadalis egereket vizsgálva azt találták, hogy a gonadotrop releasing hormon génjének hibája miatt a hormon nem termelődött, ezáltal pedig a folliculus-stimuláló- és a luteinizáló hormon se és így a legtöbb szteroid-szintézisben szereplő enzim aktivitása csökkent, kivéve a  $3\beta$ -HSD enzimét, mely a pregnenolone-t progeszteronná alakítja. Külső luteinizáló hormon adása esetén 10 napon belül újra megnőtt a szteroid-szintetizáló enzimek szintje a vérben, ami bizonyítja, hogy a felsőbb szabályozás és annak cirkadián ritmusa hatással van az enzimek működésére (Hanukoglu, 1992).

A stresszhatás képes a hypothalamus- hypophysis- here tengely működésének megzavarására, azáltal, hogy negatívan hat a luteinizáló hormon termelésére (Hanukoglu, 1992).

Hales és munkatársainak 1992-ben végzett kísérlete alapján a Leydig-sejtek szomszédságában lévő makrofágok aktivitása is képes csökkenteni a P450c17 szteroid-szintetizáló enzim aktivitását. Ezen kívül azt találták, hogy az interleukin-1 szintén ilyen hatással volt az enzimre (Hanukoglu, 1992). Orava és munkatársai 1989- ben az interferon- $\gamma$  hatását vizsgálva azt találták, hogy ez szintén gátló hatással bírt a Leydig-sejtek szteroid-szintetizáló képességére (Hanukoglu, 1992).

Az emlős fajokban fontos szerepe van a tesztoszteronnak a spermatogenezisben (Jarow és mtsai., 2001). Zirkin és munkatársai 1989-ben azt találták, hogy patkányok esetében a tesztoszteron koncentrációja a hereszövetben 30-40-szer több, mint a szérumbeli tesztoszteron-koncentráció. Awoniyi és munkatársainak 1992-es kutatása alapján ennek az értéknek legalább 10-szeresnek kell lenni ahhoz, hogy fennmaradjon a spermatogenezis (Jarow és mtsai., 2001).

Setchell vizsgálta a vér-here barrier működését azáltal, hogy a tubuli seminiferiben és a rete testisben található folyadék összetételét hasonlította össze a nyirok- és a vérkeringéssel. Kezdeti kísérleteiben csak a rete testis folyadékát vizsgálta, mely káliumban és kloridban gazdagabb, nátriumban, foszfátban, bikarbonátban, magnéziumban szegényebb volt. Később a tubuli seminiferiből származó folyadékot is képes volt mikropunkció által vizsgálni. A here tubulusaiból származó folyadék még több káliumot, ám kevesebb kloridot és nátriumot tartalmazott, mint a rete testisből származó minta. Ezután mérték a tesztoszteron, az inozitol, a totál protein értékét és a spermatocták számát is. A tesztoszteron és az összfehérje koncentrációja alacsonyabb volt a rete testisből származó mintában, mint a here kanyarult csatornácskáiban, de a spermatocták számában nem volt jelentős eltérés a két folyadék között (Setchell, 1979).

A tesztoszteron facilitált diffúzióval, egy karrier molekula segítségével jut a Sertoli-sejteken keresztül a tubulusokba, de arra vonatkozóan is vannak irodalmi adatok, hogy egyszerű diffúzióval mozognak a szteroidok a sejtek között (Setchell, 1979).

## A hormon-termelésre irányuló vizsgálatok kutyákban

Kawakami, Hori és Tsutsui 1999-ben vizsgálták, hogy miként hat a mesterségesen rejtett helyeződésűvé tett here az ellenoldali párjára és a spermatogenezisre. 8 beagle kutyán végezték el a műtétet, mely során a bal herét meghagyták scrotalis helyeződésben, a jobb oldalt ellenben a lágyékcsatorna kitérítése után a hasüregbe helyezték. Feljegyezték a műtét során mindkét here méretét, biopszia által mintát vettek belőlük szövettani vizsgálatra, valamint a transferrin szint mérése miatt. A transferrin szint mérését azért végezték el, mert Skinner és Griswold 1980-ban végzett tanulmánya alapján ezt a glükoproteint a Sertoli-sejtek termelik, és általa mérhető a Sertoli-sejtek aktivitása (Kawakami és mtsai., 1999). Ezen kívül vért vettek a vena spermaticából, illetve perifériás vénából is és ebből hormon szinteket határozta meg. Mérték a tesztoszteron-, a  $17\beta$ -ösztadiol- és a luteinizáló hormon szintjét. A műtét után 52 héttel elvégezték ugyanezeket a teszteket mind a 8 állaton.

Bizonyított, hogy a rejtettheréjű állatokban az abdominális helyeződés, ezáltal a magasabb hőmérséklet miatt nincs spermatogenezis (Kawakami és mtsai., 1999). Arra is irányultak vizsgálatok, hogy a cryptorchid herével contralateralisan helyeződő herében alacsonyabb volt a spermatogenezis kutyákban (Kawakami és mtsai., 1999). Mengel és Moritz 1976-os kísérletükben ennek háttérében azt feltételezték, hogy a mesterségesen rejtett helyeződésűvé tett here autoantitesteket termel a contralateralis, egészséges here ellen, gátolva annak működését, így a spermatogenezist. Ez a teória nem bizonyított, ám Kawakami, Tsutsui, Yamada, Ogasa és Yamauchi 1988-as vizsgálatai alapján, ha a rejtett herét eltávolították, az egészséges here funkciója helyreállt.

Kawakami, Horu és Tsutsui a műtét előtti és az 52 héttel későbbi eredmények alapján azt találták, hogy a mesterségesen cryptorchiddá tett herék tömege átlagosan a kiindulási méret 34%-ára csökkent, míg a bal oldali, scrotalis helyeződésükben megtartott herék tömege nem csökkent szignifikánsan. A szövettani vizsgálat során azt találták, hogy a cryptorchid herékben a Sertoli-sejtek és a spermatogoniumok száma nem különbözött a műtét előtt és 52 héttel utána, ám a primer spermatocyták és a spermatidák száma alacsony volt. A transferrin szint csökkent a műtét után mind a scrotalis, mind az abdominalis helyeződésű herék esetén. A tesztoszteron szint a vena spermaticából származó mintában alacsonyabb volt a rejtett here esetében a műtét után 52 héttel. Az ösztadiol szint ugyanitt mérve ellenben jelentősen

megemelkedett. Az ellenoldali, scrotalis here vena spermaticájában a tesztoszteron és az ösztradiol szintje egyaránt csökkent. A perifériás vérben csökkent az LH szintje.

Valószínűleg a cryptorchid here által nagy mennyiségben termelt ösztradiol indukálta az agyalapi mirigyet az alacsonyabb mértékű LH-elválasztásra és ennek következményeként alakult ki az alacsony tesztoszteron-szint is (Kawakami, Horu, Tsutsui, 1999).

A kísérlet során kapott eredményeiket az **1. táblázat**ban mutatom be:

- 1. táblázat:** Tesztoszteron (T) és ösztradiol (E<sub>2</sub>) szintje a vena spermaticában a scrotalis- és az abdominalis helyeződésű here esetében a műtét idején, illetve 52 héttel később vizsgálva. Valamint a perifériás vérből ugyanebben a két időpontban az előbbi két hormon és a luteinizáló hormon (LH) szintje. Kawakami, Horu és Tsutsui 1999-es kísérlete 8 beagle kan vizsgálata alapján.

			0.hét (műtét)	52. hét
Vena spermaticából származó vér	Normál helyeződésű here	T (ng/ml)	95.2 +/- 10.4	80.6 +/- 6.8
		E <sub>2</sub> (pg/ml)	50.8 +/- 11.3	44.8 +/- 7.1
	Cryptorchid here	T (ng/ml)	91.4 +/- 6.3	51.0 +/- 8.1
		E <sub>2</sub> (pg/ml)	51.4 +/- 10.2	79.8 +/- 9.3
Perifériás vér		T (ng/ml)	2.5 +/- 0.3	1.2 +/- 0.1
		E <sub>2</sub> (pg/ml)	14.2 +/- 1.1	22.4 +/- 0.8
		LH (ng/ml)	5.5 +/- 1.0	3.8 +/- 1.2

Egy másik kísérlet során Mischke, Meurer, Hoppen, Ueberschär, Hewicker-Trautwein német tudósok 2002-ben vizsgálták kutyák vérplazmájának ösztradiol- és tesztoszteron szintjét, valamint ezek egymáshoz viszonyított arányát.

Céljuk az volt, hogy összehasonlítsák az egészséges kutyák hormonszintjét a különféle degeneratív- és daganatos hereelváltozással rendelkező állatok hormonszintjével. A kísérlet

során vizsgáltak 20 egészséges, bilateralis scrotalis helyeződésű herékkel bíró kutyát, 20 állatot Leydig-sejtes daganattal, 6 darabot Sertoli-sejtes daganattal, 9-et seminomával, 7-et egyoldali, inguinalis rejtettheréjűséggel, 9-et abdominalis rejtettheréjűséggel (közülük 1 egyed esetében bilateralis volt az elváltozás, a többi 8 esetében unilateralis), 6-ot degeneratív elváltozást mutató, de scrotalis helyeződésű herével (2 bilateralis volt közülük). Mindegyik herét megvizsgálták szövettanilag, hematoxin-eozinnal festve. Az állatokból EDTA-s csövekbe vért vettek a vena cephalicából, vagy a vena saphenából. Az eredmények a **2. táblázatban** láthatóak.

**2. táblázat:** Mischke és munkatársainak 2002-ben végzett kísérletének eredménye.

	Ösztrogén (pg/ml)	Tesztoszteron (ng/ml)	Tesztoszteron/Ösztrogén
Normál here	18 (min.:8.6, max.:31.5)	1.95 (min.:0.05, max.: 3.7)	9.6 (min.:0.58, max.: 35.8)
Sertoli-sejtes daganat	29 (min.:14.4, max.:48.3)	0.08 (min.:0.03,max.: 0.77)	0.32 (min.:0.06, max.:2.80)
Seminoma	12	1.15	9.9
Leydig-sejtes daganat	16.8	1.70	8.2
Rejtett here	≈normál	2.3 (bilateralis cryptorchid egyed)	inguinalis≈kontroll abdominalis≈Leydig-sejtes daganat

A táblázatban foglaltak alapján látható, hogy a rejtettheréjű kutyáknál ebben a kísérletben nem találtak az egészségeshez viszonyítva magasabb ösztradiol szintet, ami ellentmond az előző kísérletben tapasztaltaknak.

A bilateralis rejtettheréjű egyed esetében a tesztoszteron értéke a felső határhoz állt közel, 2.3 ng/ml volt.

A rejtettheréjű kutyák esetén a tesztoszteron és az ösztradiol aránya az inguinalisan helyeződő herék esetében alig tér el a kontrollhoz viszonyítva, az abdominalis rejtett heréjű állatok esetében pedig az átlagérték a Leydig-sejtes daganat átlagértékével esik egy értéktartományba.

Mattheeuws és Comhaire 1999-ben, valamint Feldman és Nelson 1996-ban szintén azt találták, hogy az unilateralis cryptorchid kutyák ösztradiol - és tesztoszteron szintje az egészséges kutyák hormon szintjéhez közeli értéket mutat (Mischke és mtsai., 2002).

# Anyag és módszer

## 1. Mintavétel

Vizsgálatainkban rutin ivartalanítás során gyűjtött heremintákat dolgoztunk fel. A beteganyagot a Szent István Egyetem Kisállat Klinikája szolgáltatta. A vizsgálatban  $n=25$  egészséges és  $n=10$  rejtett heréjű egyed vett részt. Az állatok 8 és 120 hónapos kor közöttiek voltak, átlagosan 33 hónaposak.

Az  $n=10$  cryptorchid kutya közül  $n=3$  állatnak volt inguinalis helyeződésű az egyik heréje, az ellenoldali pedig a herezacskóban volt megtalálható.

Hasúri helyeződésű heréket  $n=7$  állat esetében találtunk, közülük  $n=2$  egyednek mind a két heréje a hasüregben volt, a többi eb contralateralis heréje a herezacskóban volt megtalálható.

Első lépésként alvadásban nem gátolt vért vettünk az állatoktól. Ezután az ivartalanítás során eltávolított herékből, a herék tokjának eltávolítása után, borsószemnyi nagyságú parenchyma-részletet metszettünk ki, melyet analitikai mérlegen megmértünk. A mintát  $-86$  °C-on tároltuk feldolgozásig, melynek során a mintákat PBS-oldattal felhígítottuk úgy, hogy a homogenizátum ml-enként 1 g hereszövetet tartalmazzon. Ezután szobahőmérsékleten, Janke & Kummel Ika-Werk UltraA-Turrax szövet homogenizátorral végeztük a homogenizálást. 20 percig 4000/perc fordulatszámon centrifugáltuk a mintákat, a vizsgálatig pedig a felülúszót Eppendorf-csövekben tároltuk  $-20$  °C-on. A hereszövetből származó mintákból 1:40 arányú hígítási sort készítettünk és ezután mértük meg a hormon koncentrációkat.

## 2. Hormon-mérések

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) módszerrel mértük meg a tesztoszteron, a progeszteron és az ösztradiol koncentrációját a szérumban, illetve a herehomogenizátumban.

A teszteket, melyek az **5. ábrán** láthatóak, a **DRG Instruments GmbH**-től rendeltük (Frauenbergstrasse 18., D-35039, Marburg). (A tesztoszteron-szinteket az EIA-1559 jelű ELISA kit-tel, az ösztradiolt az EIA-2693 jelű kit-tel, a progeszteront pedig Quantichcek-kel mértük.)



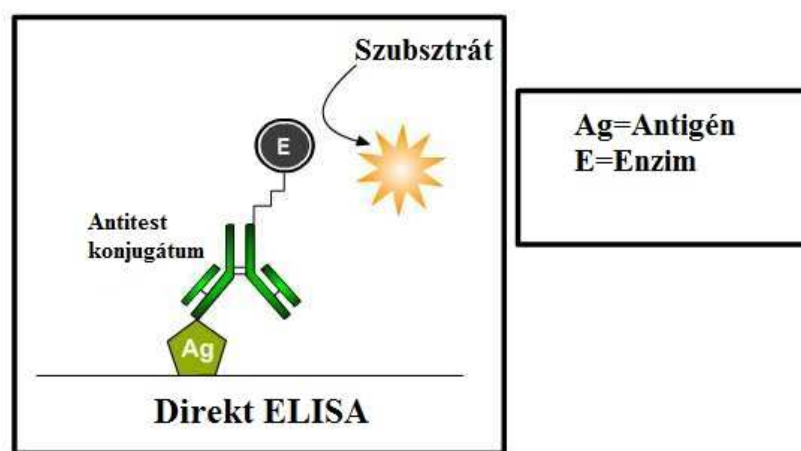
**5. ábra:** DRG Instruments GmbH ELISA-tesztjei

Forrás: <http://www.drgmedtek.pl/cms/node/11>

Direkt ELISA kit-ekkel dolgoztunk, mely egy kvantitatív in vitro diagnosztikai módszer. A tesztek kompetitív kötésen alapulnak. Direkt ELISA esetén a kit felülete antitestekkel van fedve. Ez a tesztoszteron kit esetében egérből származó monoklonális tesztoszteron ellenanyag, az ösztradiol kit esetében nyúlból származó, poliklonális ösztradiol antitest, a Quantichcek esetében pedig szintén monoklonális progeszteron ellenanyag.

Első lépésként a mintát tesszük a kit mélyedéseibe. A mintában található hormon kötődik az antitesthez. A felesleget ezután mosófolyadékkal eltávolítjuk, majd enzimmel jelölt antitestet adunk az elegyhez, mely színreakciót okoz pozitív esetben. Ezután újabb mosás következik, hogy eltávolítsuk a nem kötődött antitesteket. Így pozitív esetben a kit felületén lévő

ellenanyaghoz a vizsgált hormon antigénje, ahhoz pedig az enzimmel jelölt antitest kötődik. A következő lépés az, hogy hozzáadjuk az enzim szubsztrátját és az így létrejövő reakció színváltozást okoz a pozitív mintában (**6. ábra**). Végül stop oldatot adunk az elegyhez és mikrotiter olvasó segítségével meghatározzuk az abszorbanciát, amit a spektrofotometriában használnak annak mérésére, hogy az adott anyagra vetülő sugárzás milyen arányban áll az anyagon keresztül jutó sugárzással (<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html>, Perry és munkatársai, 2002).



**6. ábra: direkt ELISA**

Forrás: <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=69&sim=696&cnt=1>

A tesztoszteron kitéhez tartozó standardek a következők: 0; 0,2; 0,5; 1, 2; 6; 16 ng/ml. 1 ng/ml tesztoszteron 3,467 nmol/l-nek felel meg. Az ösztradiol kit esetében pedig: 0,25; 100; 250; 500, 1000; 2000 pg/ml, ahol 1 pg/ml ösztradiol 3,67 pmol/l-nek felel meg.

A progeszteron szinteket a Veterinorg Ltd. (Budapest, Itsván utca 2) Quantichack-tesztjével mértük. Monoklonális anti-progeszteron antitestet tartalmaz a kit, Szintén alkalmaznak enzimmel jelölt progeszteront, szubsztrátot, inkubációt és a reakció lezajlása végén a színváltozás alapján értékelik a tesztet, a szín intenzitása ebben az esetben is fordítottan arányos a hormon-koncentrációval. Pontos értéket 450 nm-es hullámhosszon fotométerrel tudunk mérni.



A Quanticheck, mely a **7. ábrán** látható, 1 és 10 ng/ml progeszteron szint között képes mérni, amely 3,17 és 31,79 közötti nmol/l értéknek felel meg. A teszt érzékenysége 0,5 ng/ml.



**7. ábra:** Quanticheck ELISA-kit, Forrás: [http://www.univet.hu/units/Szuleszet/regi\\_web/diagnosztikai\\_labor.htm](http://www.univet.hu/units/Szuleszet/regi_web/diagnosztikai_labor.htm)

Kvalitatívan értékelni az eredményt a kialakult kék szín intenzitása alapján lehet, kvantitatívan pedig úgy, hogy minden mélyedésbe 2 csepp kénsavat, stop reagenst adunk, ami után a kialakult sárga szín intenzitását fotométerrel 450 nm hullámhosszon tudjuk mérni. A kialakult szín erőssége a progeszteron koncentrációval fordítottan arányos.

## Eredmények

Vizsgálataink alapján a **3. táblázatban** látható eredményeket találtuk. A herehomogenizátumból mért tesztoszteron szintek átlaga egészséges állatok esetében mintegy 281-szerese a vérszérumbeli értékek átlagának. A hereszövetből mért tesztoszteron koncentráció értéke az inguinalis rejtett herék esetében volt a legkiugróbb, a maximális értéke 20000 ng/g, az átlag érték 10223,33 ng/g. A contralateralis herék esetében az átlagérték a normál helyeződésű herék átlagértékétől nem tér el jelentős mértékben.

A szérumbeli tesztoszteron szint átlagértéke normál helyeződésű herék esetében 5,81 ng/g volt, míg cryptorchid heréknél ez az érték 3,12 ng/g.

Az ösztradiol szint szérumbeli átlaga egészséges állatok esetében bizonyult magasabbnak, a rejtett heréjű csoport értékének 2,3-szorosa volt. A herehomogenizátumból mérve viszont a normál, az abdominalis és a contralateralis helyeződésű herék átlagos ösztradiol koncentrációja hasonló egymáshoz, míg az inguinalis herék esetében ez az érték magasabb, 480,83 pg/g.

Az intratesticularis progeszteron szint átlaga esetében ugyanaz a tendencia figyelhető meg, mint az ösztradiol esetében. Az inguinalis heréknél az átlagérték 33,12 ng/g, míg a normál helyeződésű heréknél 11,09 ng/g, az abdominalis rejtett heréknél 9,11 ng/g, a contralateralis heréknél pedig 13,95 ng/g volt az átlagérték.

A szérumbeli progeszteron értékek nem tértek el jelentősen egészséges és cryptorchid állatokban. A herehomogenizátumban mért progeszteron szintek átlaga körülbelül 15-szöröse a szérumbeli átlagnak normál helyeződésű herék esetén. Az inguinalis helyeződésű rejtett heréjű állatokban ez az arány 51-szeres.

3. táblázat: Méréseink eredményei (Minimum, maximum, szórás, átlag és medián értékek).

		Normál helyeződésű here	Inguinalis rejtett here	Abdominalis rejtett here	Contralateralis here
Intratesticularis tesztoszteron (ng/g)	Minimum	163,3	5070	72,5	62,8
	Maximum	6400	20000	13200	5000
	<b>Átlag</b>	<b>1632,46</b>	<b>10223,33</b>	<b>2719,19</b>	<b>1537,68</b>
	Szórás	1437,66	8470,99	4149,43	1928,79
	Medián	1647	5600	1600	712,95
Szérum- tesztoszteron (ng/ml)	Minimum	0,17	0,41		
	Maximum	17	5,69		
	<b>Átlag</b>	<b>5,81</b>	<b>3,12</b>		
	Szórás	5,33	1,77		
	Medián	5,47	3,08		
Intratesticularis ösztadiol (pg/g)	Minimum	97	357,79	122,39	0,78
	Maximum	535,8	503,9	433,4	604,6
	<b>Átlag</b>	<b>253,84</b>	<b>430,83</b>	<b>241,52</b>	<b>241,99</b>
	Szórás	144,63	103,34	94,18	250,99
	Medián	175,9	430,83	228,27	264,7
Szérum- ösztadiol (pg/ml)	Minimum	0	0		
	Maximum	141,32	42,51		
	<b>Átlag</b>	<b>36,36</b>	<b>15,98</b>		
	Szórás	48,27	16,31		
	Medián	8,22	5,26		
Intratesticularis progeszteron (ng/g)	Minimum	0,32	1,93	0,46	0,72
	Maximum	48,2	64,3	33,6	36
	<b>Átlag</b>	<b>11,09</b>	<b>33,12</b>	<b>9,11</b>	<b>13,95</b>
	Szórás	15,01	44,1	12,98	14,77
	Medián	1,16	33,12	2,39	11,1
Szérum- progeszteron (ng/ml)	Minimum	0,29	0,56		
	Maximum	1,86	1,58		
	<b>Átlag</b>	<b>0,74</b>	<b>0,96</b>		
	Szórás	0,44	0,37		
	Medián	0,56	0,78		

## Megbeszélés

Az irodalmi adatok és saját kísérletünk is megerősíti azt a tényt, hogy a hereszövetben sokkal magasabb koncentrációban vannak jelen a szteroid hormonok, mint a vérszérumban. Annak oka, hogy miért jóval alacsonyabb a hereszövetben termelődő hormonok szintje a vérplazmába jutva, még kérdéses.

Setchell 1979-es vizsgálatainak alapján a here csatornácskáinak különböző szakaszain eltérő a folyadék összetétele. Ez azért lehet így, mert a spermatocták érése és tárolása során a különböző fázisokban más környezeti körülmények az optimálisak számukra. A Sertoli-sejteken, melyek a különféle molekulák tubulusokba történő transzportjában fontos szerepet játszanak, androgén receptorok találhatóak meg, így valószínűleg a tesztoszteron is szerepet játszik a tubulusok mikrokörnyezetének kialakításában, a transzportfolyamatok szabályozása által (Meng és mtsai., 2005).

A tesztoszteronnak, melyet a here interstitiumában található Leydig-sejtek termelnek, sokrétű a funkciója. Egyrészt képes más hormonokká átalakulni, például az aromatáz enzim által, mely ösztadiollá alakítja. Ez a folyamat kifejlett állatokban a Leydig-sejteken, a még fejlődő szervezetekben a Sertoli-sejteken zajlik. Másrészt az interstitiumból a here csatornácskáiba jutva tovább szállítódik és részt vesz a spermatoctáknak megfelelő környezet kialakításában.

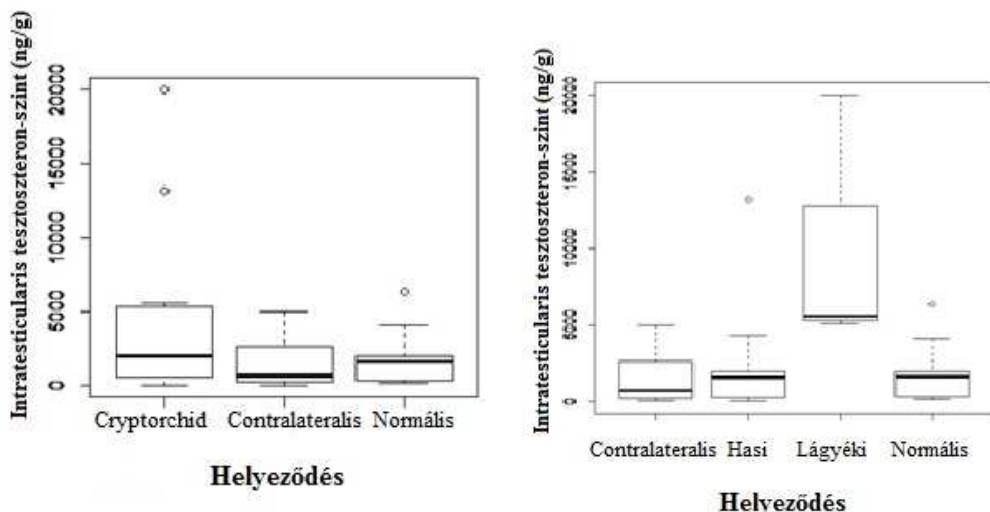
Az ösztadiol és a progeszteron vizsgálataink alapján sokkal kisebb mennyiségben van jelen a hereszövetben, mint a tesztoszteron, ám mindkét hormon és azok receptorai (Lubahn és mtsai., 1993, Thérien és Manjunath, 2003) is fontos szerepet játszanak a hím nemi működésben, illetve a fertilizáció bekövetkeztében (Schwarzenbach és mtsai., 2003).

## Tesztoszteron

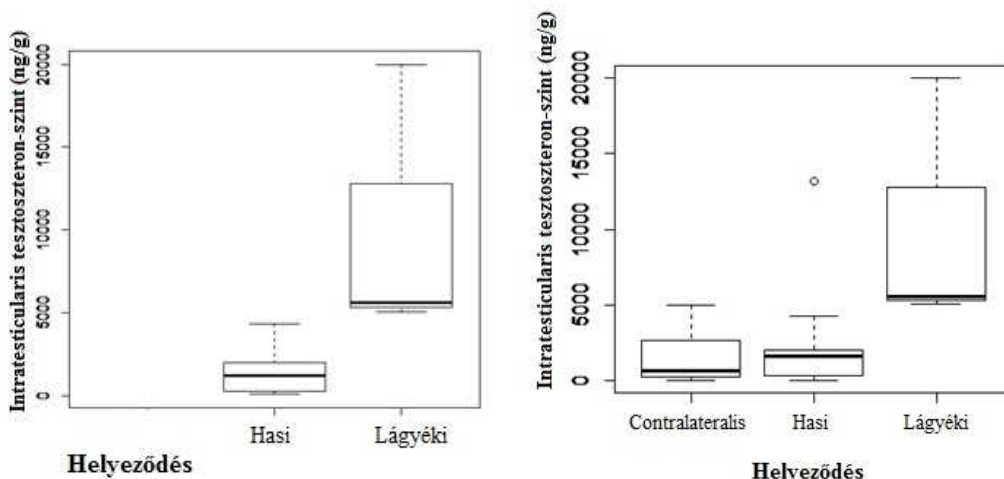
Vizsgálatunk alapján elmondható, hogy a kísérletben részt vevő  $n=25$  egészséges és  $n=10$  rejtett heréjű állat esetében is az intratesticularis tesztoszteron koncentráció volt a legmagasabb. Ugyan az inguinalis helyeződésű cryptorchid állatokból csak  $n=3$  mintánk volt, az látható, hogy kiugróan magas intratesticularis tesztoszteron értékeket mutattak: 1.:5070 ng/g, 2.:5600 ng/g és 3.:20000 ng/g. Mindhárom állat esetében csak az egyik here volt

rendellenes pozícióban. A contralateralis herékből származó intratesticularis tesztoszteron szinteket összevettem az inguinalis here-mintákkal: 1.:1110 ng/g, 2.:603,9 ng/g, 3.:5000 ng/g. A 3. alany kivételével a contralateralis herékből származó tesztoszteron szint közelít az n=25 egészséges állatból származó minta átlagához, mely 1632,46 ng/g.

A hereszövetből mért tesztoszteron koncentrációk eredményeit a **8-9. ábrákon** látható box plotokon tüntettem fel.



**8. ábra:** Hereszövetbeli tesztoszteron szint (ng/g). Bal oldalon az összes cryptorchid here egy boxban ábrázolva, jobb oldalon pedig külön a hasi és külön a lágyéki helyeződésű rejtett herék (Forrás:Kollár Eszter, 2012).



**9. ábra:** Hereszövetbeli tesztoszteron szint (ng/g). Bal oldalon a hasi és a lágyéki helyeződésű rejtett here esetében, jobb oldalon a contralateralis, a hasi és a lágyéki helyeződésű herék esetében (Forrás:Kollár Eszter, 2012).

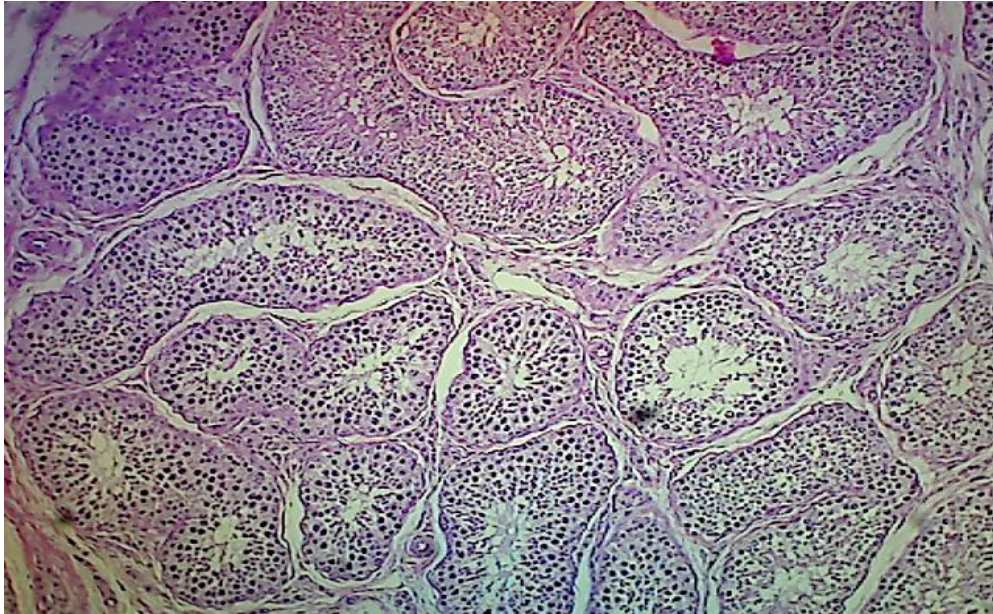
2 olyan egyed volt, melynek mindkét heréje a hasüregben volt fellelhető. Esetükben a bal és a jobb oldali heréből származó minták tesztoszteron koncentrációja eltért, az egyik állatnál 133,5 ng/g és 324,1 ng/g volt, mely az átlagérték alatti tartományba esik, a másik állat esetében viszont 819,6 ng/g és 2000 ng/g lett az eredmény, mely az egészséges állatok átlagértékéhez viszonyítva magasabb, ám az abdominális helyeződésű hereminták átlagánál, 2719,19 ng/g-nál alacsonyabb.

Az összes cryptorchid heréből származó minta átlagos szöveti tesztoszteron koncentrációja 4595,23 ng/g, mely 2,8-szorosa az egészséges állatok átlagos tesztoszteron koncentrációjának.

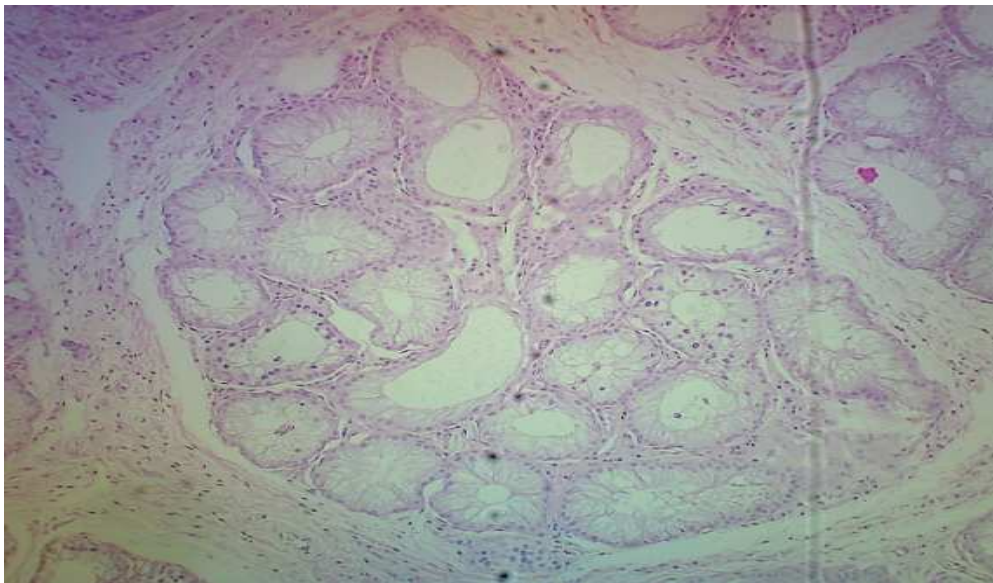
A szérumból mért tesztoszteron koncentráció átlaga egészséges állatokban 5,81 ng/ml, mely majdnem kétszerese a rejtett heréjű állatok szérumából mért tesztoszteron szintnek, ami 3,12 ng/ml. Olvasmányaim alapján Kawakami és munkatársainak 1999-es kísérletében kutyák perifériás véréből vizsgálva is hasonló értékeket kaptak. 2,5 ng/ml volt a szérumbeli tesztoszteron szint a kísérlet 0.napján és 1,2 ng/ml 52 héttel azután, hogy mesterségesen rejtett heréjűvé tették az állatokat.

Tehát bár a cryptorchid herékből származó szöveti mintákban átlagosan magasabb volt a tesztoszteron koncentráció, a véráramba jutva kevesebb hormon van jelen, mint egészséges állatokban.

Jarow és munkatársai (2001) szerint a spermiogenezis működéséhez arra van szükség, hogy a hereszövetben a tesztoszteron koncentrációja legalább 10-szerese legyen a vérbeli koncentrációnak. Az általunk vizsgált rejtett heréjű állatok esetében ez az érték sokszor többszázszoros volt. Az inguinalis helyeződésű herék szövettani vizsgálata alapján (Kollár és mtsai., 2012), a magas intratesticularis hormon koncentrációk ellenére a spermiogenezisre utaló jelek hiányoznak (**11. ábra**).



**10. ábra:** Egészséges, többsoros csírahámot tartalmazó hereszövet  
(Forrás: Kollár Eszter, 2012)



**11. ábra:** Inguinalis helyeződésű rejtett here, melyben nem zajlik spermatogenesis.

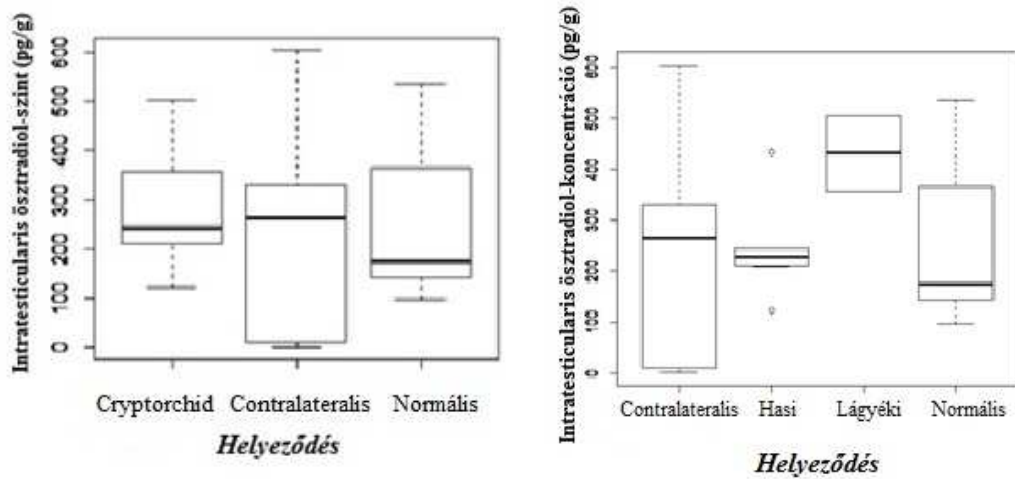
( Forrás: Kollár Eszter,2012)

## Ösztradiol

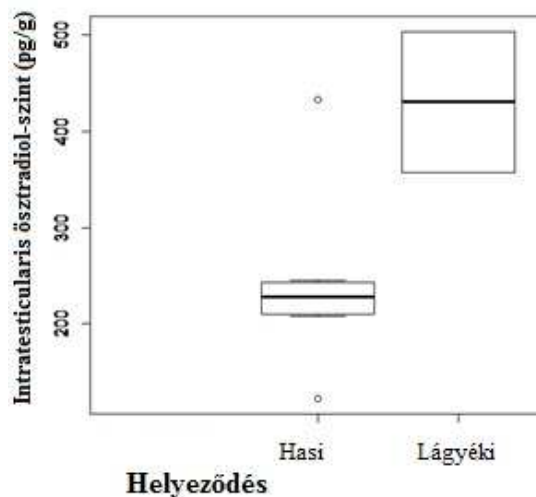
Az intratesticularis ösztradiol szinteket vizsgálva (**12-13.ábra**) látható az eredmények alapján, hogy a contralateralis herékből származó mérési eredmények mutatják a legnagyobb szórást, ebben a csoportban van a legkisebb intratesticularis ösztradiol érték, mely 0,78 pg/g és a legnagyobb is, 604,6 pg/g. Ha a normális, a contralateralis és a cryptorchid egyedek



adatait vizsgáljuk, az átlagértékek közel esnek egymáshoz: 253,84 pg/g, 283,6 pg/g, 241,99 pg/g. Ám ha a cryptorchid állatokon belül két csoportra bontjuk az eredményeket, akkor látható, hogy az abdominalis herék átlagos ösztadiol koncentrációja, melynek értéke 241,52 pg/g, jóval kisebb, mint az inguinalisan helyeződő heréké, melynek koncentrációja 430,83 pg/g.



**12. ábra:** Hereszövetbeli ösztadiol szintek (pg/g). Bal oldalon az összes cryptorchid here egy boxban ábrázolva, jobb oldalon pedig külön a hasi és külön a lágyéki helyeződésű rejtett herék (Forrás:Kollár Eszter, 2012).



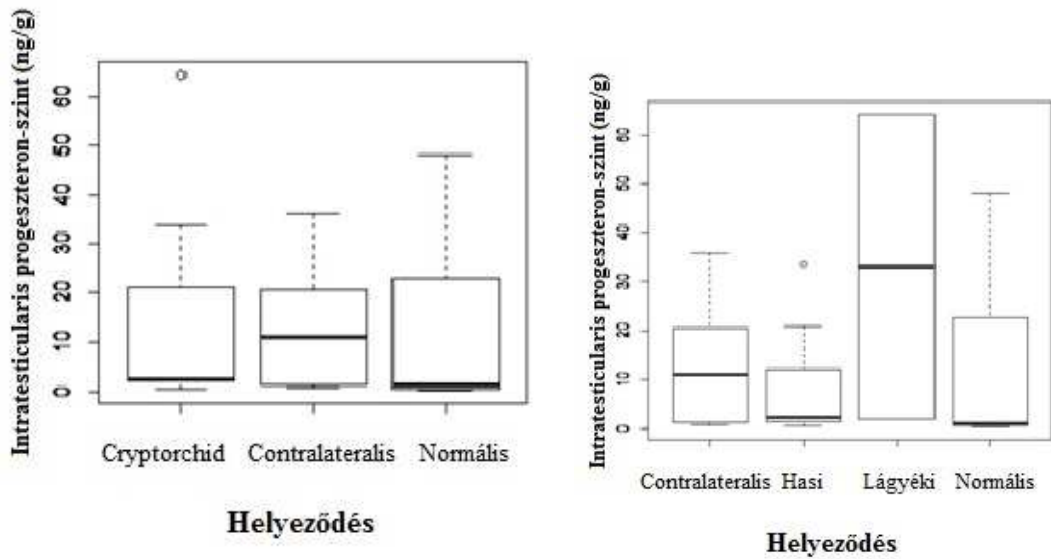
**13. ábra:** Hereszövetbeli ösztadiol szintek (pg/g) a kétféle helyeződésű cryptorchid herék esetében (Forrás:Kollár Eszter, 2012).



A szérumból mért ösztradiol szint szintén jóval alacsonyabb a hereszövetből mért koncentrációknál. Egészséges állatok esetén az intratesticularis koncentráció átlagosan 7-szerese a szérumbelinek. Ez az érték az inguinalisan helyeződő rejtett herék esetében 36-szoros. A szérumbeli ösztradiol koncentrációknál is megfigyelhető, hogy az egészséges herék esetében talált átlagos koncentráció, 36,36 pg/ml, magasabb mint a rejtett heréjű mintákban, mely 15,98 pg/ml. Erre vonatkozóan nem találtam adatokat az irodalomban, de megfigyeléseink alapján az lehet az oka ennek a jelenségnek, hogy a rendellenes pozícióban lévő here számára nem optimálisak a környezeti körülmények. Emiatt megváltozhat egyes enzimek, például az aromatáz enzim működése, de okozhatja a Sertoli-sejtekben bekövetkező funkcióváltozás is, illetve egyéb, még nem vizsgált tényezők.

## **Progeszteron**

A progeszteron koncentrációkat vizsgálva (**14.ábra**) az figyelhető meg, hogy az intratesticularis átlagértékek tekintetében csak az inguinalis helyeződésű herék átlagos koncentrációja, mely 33,12 ng/g, tér el a többi átlagtól, melyek 9,11 ng/g és 13,95 ng/g közötti értéket mutatnak. Ám ha a medián értékeket is figyelembe vesszük, a normális helyeződésű és a cryptorchid csoportok mediánja (1,16 ng/g és 2,39 ng/g) jóval a contralateralis herék medián értéke (11,1 ng/g) alatt van. Inguinalis mintából csak két eredményt kaptunk, így a medián megegyezik az átlaggal (33,12 ng/g), mely szintén magasabb érték. A kis elemszám miatt megfigyeléseinkből messzemenő következtetést nem tudunk levonni, mindenesetre érdekes, hogy úgy tűnik, az inguinalis mintákban a hormon szintek minden esetben eltérnek az abdominális mintákban mérhetőektől.



**14. ábra:** Hereszövetbeli progoszteron szint (ng/g). Bal oldalon az összes cryptorchid here egy boxban ábrázolva, jobb oldalon pedig külön a hasi és külön a lágyéki helyeződésű rejtett herék (Forrás:Kollár Eszter, 2012).

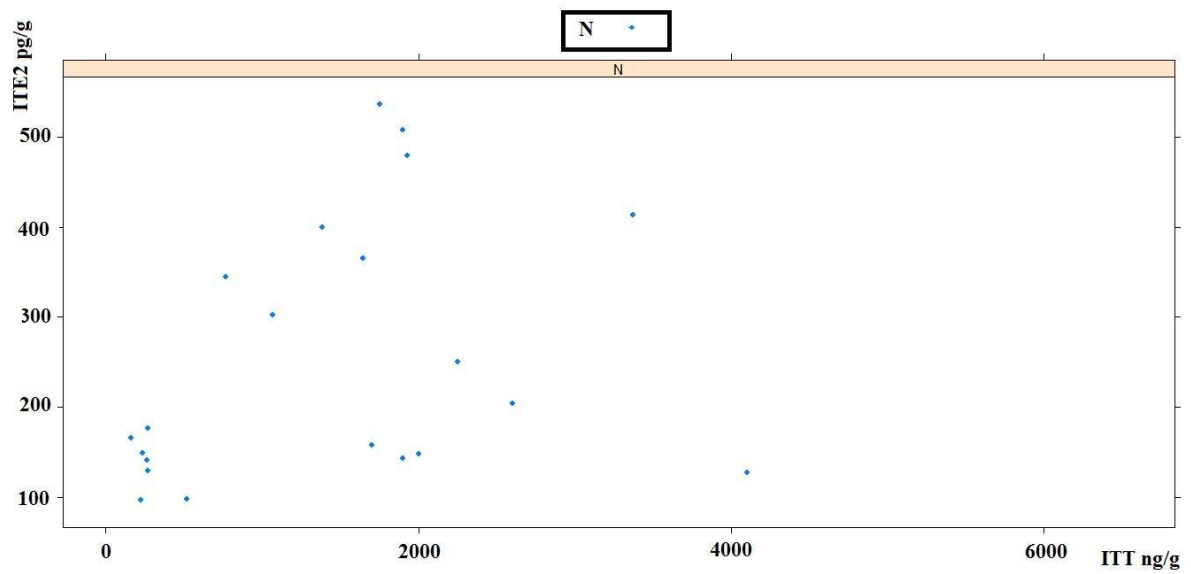
A szérumból mért progoszteron koncentrációk esetén úgy tűnik, hogy nincs jelentős különbség egészséges egyedek átlagértéke, mely 0,74 ng/ml, és cryptorchid egyedek átlagértéke között, ami pedig 0,96 ng/ml. A szérumbeli progoszteron szint referenciaértékére vonatkozóan egy irodalmi adatot találtam kutyákban, eszerint egészséges, intakt hímek progoszteron-szintje kevesebb, mint 0,2 ng/ml (Herndon, 2012). Ha figyelembe vesszük, hogy az egyes laboratóriumokban mért referenciaértékek különbözhetnek egymástól, feltételezhetjük, hogy az általunk, az egészséges állatokban mért progoszteron koncentrációk az egészséges, elvárható tartományban vannak.

## Hormonok egymáshoz viszonyított aránya

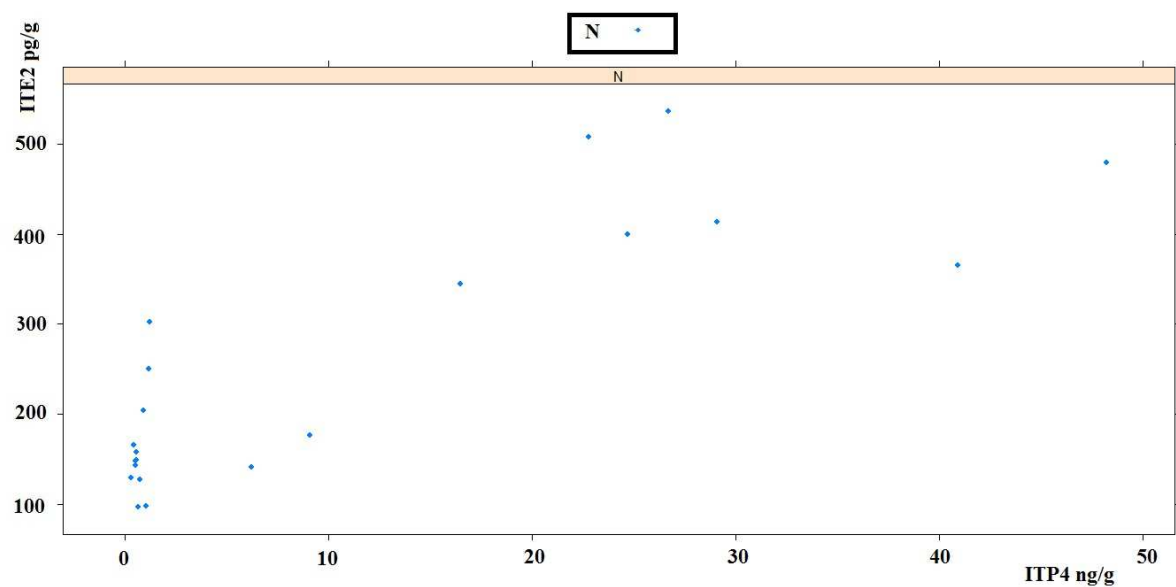
A **15-20. ábrákon** pontdiagrammon tüntettük fel a vizsgált egyedek hereszövetből mért hormonjainak egymáshoz viszonyított arányát.

Az egészséges állatok adataiból készült ábrán, mely a hereszövetből mért progoszteron- és ösztradiol szintek összefüggését mutatja (**16.ábra**), látható, hogy az alacsony progoszteron értékekhez alacsony ösztradiol koncentráció tartozik, a magasakhoz pedig magas. A tesztoszteron és az ösztradiol -, illetve a tesztoszteron és a progoszteron közötti összefüggést mutató ábrákon (**15. és 17. ábra**) egészséges állatok esetében nem figyelhető meg ilyen

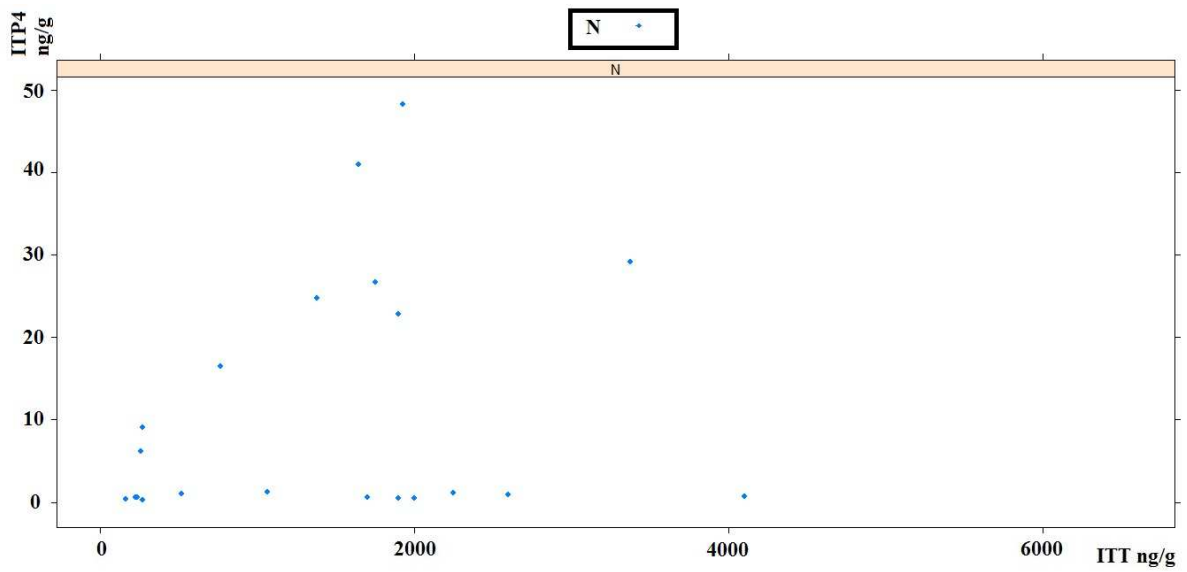
összefüggés. A **18-20. ábrákon** a contralateralis herék esetében láthatunk pozitív kapcsolatot, a cryptorchid herék esetében nem.



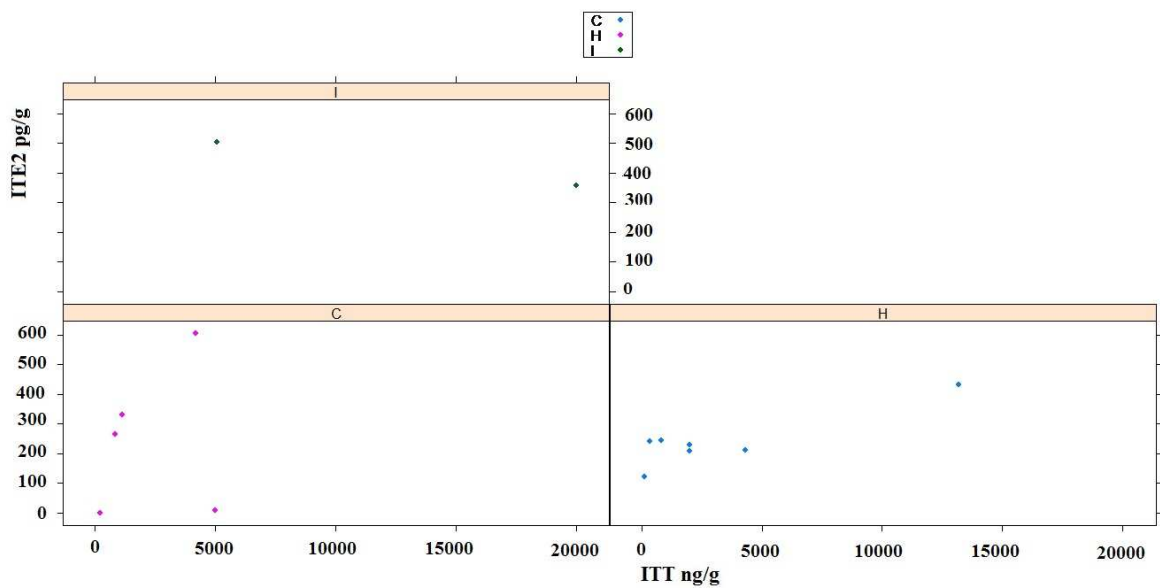
**15.ábra:** A vizsgált egészséges egyedekből mért intratesticularis tesztoszteron- (ng/g) és ösztradiol szint (pg/g) összefüggése.



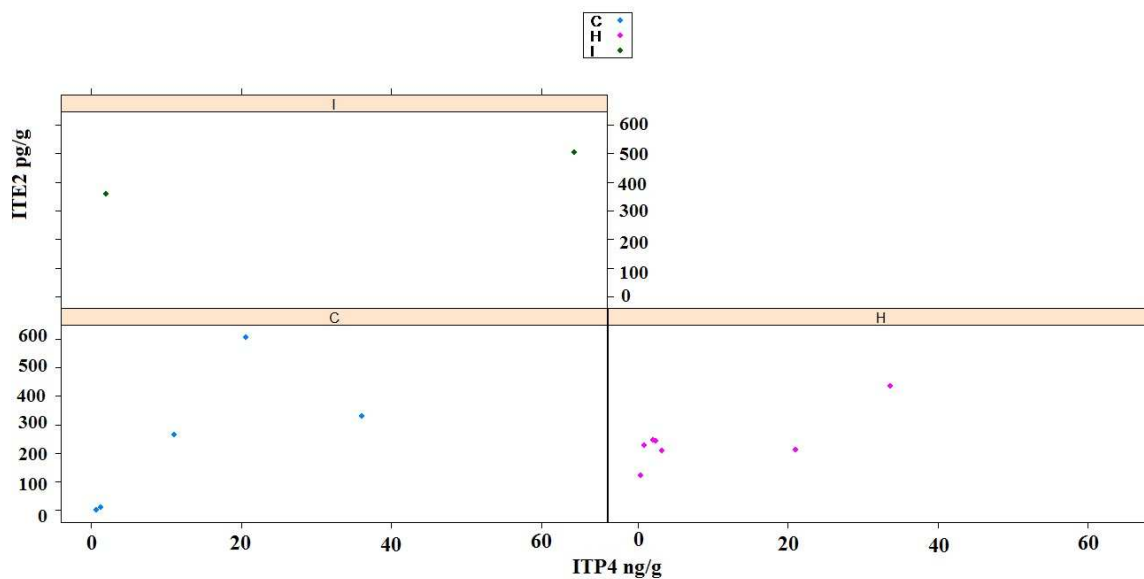
**16. ábra:** A vizsgált egészséges egyedekből mért intratesticularis progeszteron- (ng/g) és ösztradiol szint (pg/g) összefüggése.



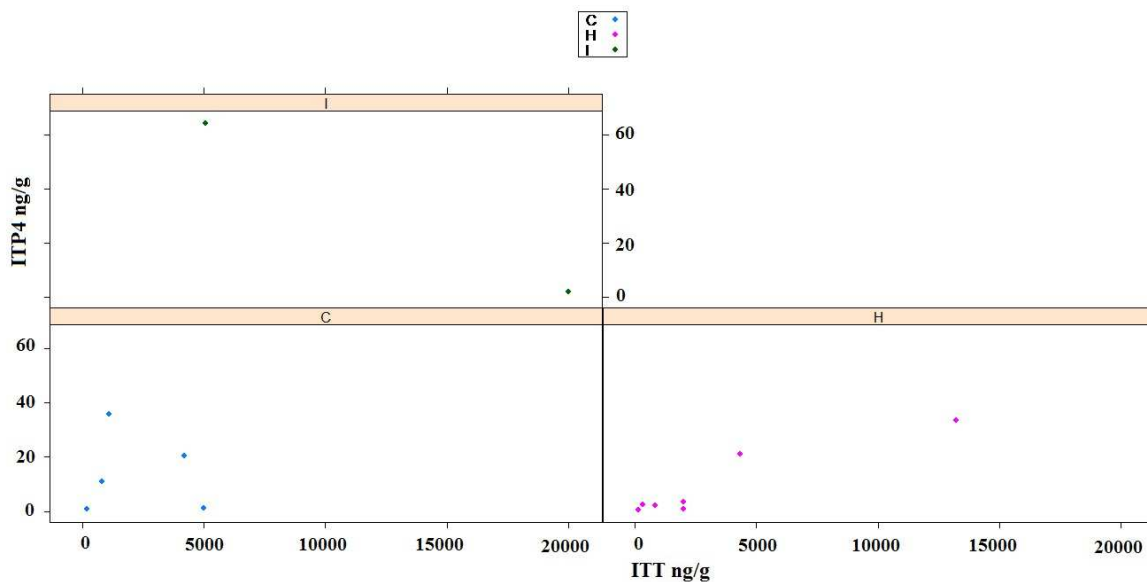
**17. ábra:** A vizsgált egészséges állatokból mért intratesticularis tesztoszteron- (ng/g) és progeszteron szint (ng/g) összefüggése.



**18. ábra:** A vizsgált rejtett heréjű állatokból mért intratesticularis tesztoszteron- (ng/g) és ösztadiol szint (pg/g) összefüggése. Bal oldalon felül I-vel és zöld pontokkal jelölve az inguinalisan helyeződő rejtett herékből-, bal oldalon alul H-val és rózsaszín pontokkal jelölve a hasüregben helyeződő rejtett herékből, jobb oldalon pedig C-vel és kék pontokkal jelölve a contralateralis herékből származó értékek láthatóak



**19.ábra:** A vizsgált rejtett heréjű állatokból mért intratesticularis progeszteron- (ng/g) és ösztradiol szint (pg/g) összefüggése. Bal oldalon felül I-vel és zöld pontokkal jelölve az inguinalisan helyeződő rejtett herékből-, bal oldalon alul H-val és rózsaszín pontokkal jelölve a hasüregben helyeződő rejtett herékből, jobb oldalon pedig C-vel és kék pontokkal jelölve a contralateralis herékből származó értékek láthatóak.



**20.ábra:** A vizsgált rejtett heréjű állatokból mért intratesticularis tesztoszteron- (ng/g) és progeszteron szint (ng/g) összefüggése. Bal oldalon felül I-vel és zöld pontokkal jelölve az inguinalisan helyeződő rejtett herékből-, bal oldalon alul H-val és rózsaszín pontokkal jelölve a hasüregben helyeződő rejtett herékből, jobb oldalon pedig C-vel és kék pontokkal jelölve a contralateralis herékből származó értékek láthatóak.

A herehomogenizátumból mért tesztoszteron koncentrációk átlaga egészséges állatok esetében mintegy 281-szerese a vérszérumbeli értékek átlagának. Ez az arány a contralateralis herek esetén a legalacsonyabb: 55,25-szörös. Az inguinalis rejtett herekben mért tesztoszteron koncentrációk átlaga a vérszérumban mért koncentráció 854,08-szorosa, mely az abdominalis rejtett herek esetén 865,98-szoros értéket jelent. Ez az egészséges állatokéhoz képest jóval magasabb érték (**4. táblázat**).

**4. táblázat:** Az általunk mért hormonok átlagkoncentrációinak aránya a hereszövetben a szérumbeli értékekhez képest, a vizsgált mintákban.

Intratesticularis tesztoszteron (ng/g) /Szérumbeli tesztoszteron (ng/ml) arány, Intratesticularis ösztadiol (pg/g) / Szérumbeli ösztadiol (pg/ml) arány, Intratesticularis progeszteron (ng/g) / Szérumbeli progeszteron (ng/ml) arány.

	<b>Normál helyeződésű here</b>	<b>Inguinalis rejtett here</b>	<b>Abdominalis rejtett here</b>	<b>Contralateralis here</b>
<b>Intratesticularis/szérumbeli tesztoszteron arány</b>	280,97	854,08	865,98	55,25
<b>Intratesticularis/szérumbeli ösztadiol arány</b>	6,98	35,99	12,95	12,66
<b>Intratesticularis/szérumbeli progeszteron arány</b>	14,99	50,95	8,21	16,03

A hormonok átlagkoncentrációjának egymáshoz viszonyított arányát (**5. táblázat**) vizsgálva az látható, hogy a hereszövetből mért tesztoszteron/ösztadiol hányados a normális helyeződésű és a contralateralis herek esetében hasonló, körülbelül 6500, míg az inguinalis rejtett herek esetében az arányszám 23729,38; az abdominalis rejtett hereknél pedig 11258,65.

**5. táblázat:** A tesztoszteron és az ösztadiol átlagkoncentrációinak egymáshoz viszonyított aránya a hereszövetben, valamint a szérumban, az általunk vizsgált mintákban. A tesztoszteron és az ösztadiol koncentrációjának mértékegysége egyaránt ng/g, illetve ng/ml.

	<b>Normál helyeződésű here</b>	<b>Inguinalis rejtett here</b>	<b>Abdominalis rejtett here</b>	<b>Contralateralis here</b>
<b>Intratesticularis tesztoszteron/ösztadiol arány</b>	6431,06	23729,38	11258,65	6534,31
<b>Szérumbeli tesztoszteron/ösztadiol arány</b>	159,79	195,24		

Az intratesticularis tesztoszteron/progeszteron hányados alapján is hasonló arányok láthatóak, mint a tesztoszteron/ösztadiol esetén (**6. ábra**), vagyis hogy a normál helyeződésű és a contralateralis csoportban az arány hasonló (147,20, illetve 110,23), a rejtett herék esetében pedig magasabb (inguinalis: 308,98; abdominalis: 298,48).

A szérumbeli tesztoszteron/progeszteron arány az egészséges állatok esetében magasabb (7,85), mint a cryptorchid egyedeknél (3,25).

**6. ábra:** A tesztoszteron és a progeszteron átlagkoncentrációinak egymáshoz viszonyított aránya a hereszövetben, valamint a szérumban, az általunk vizsgált mintákban. A tesztoszteron és a progeszteron koncentrációjának mértékegysége egyaránt ng/g, illetve ng/ml.

	<b>Normál helyeződésű here</b>	<b>Inguinalis rejtett here</b>	<b>Abdominalis rejtett here</b>	<b>Contralateralis here</b>
<b>Intratesticularis tesztoszteron/progeszteron arány</b>	147,20	308,98	298,48	110,23
<b>Szérumbeli tesztoszteron/progeszteron arány</b>	7,85	3,25		

A kísérletünk célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy cryptorchid kutyák esetében a szöveti hormontermelés mennyiben tér el az egészséges állatokétól. Az eredmények alapján elmondható, hogy a tesztoszteron, az ösztadiol és a progeszteron is ezeknek a heréknek az esetében volt átlagosan a legmagasabb.

Jelen vizsgálat elemszáma, elsősorban a rejtett heréjű egyedek tekintetében alacsony, így a vizsgálat eredményeinek statisztikai értékelése egyelőre nem lehetséges. Limitáló tényező ugyanakkor a rendkívül magas szórás értékek ténye. Az eredmények alapján megfontolandó a jövőben extrakció beiktatása a minták feldolgozása során, a szteroidok kinyerése a szövet homogenizátumokból. Az eredmények alapján elmondható ugyanakkor, hogy a szöveti hormontermelés vizsgálata ígéretes lehet a cryptorchidismus (vagy más, intratesticularis rendellenesség) kilikumának megítélésében, esetleg a kasztrációt követő terápia meghatározásában, a hormonális diszfunkciók regenerálódásának nyomonkövetésében, melyhez elsősorban szérum markerek meghatározására van szükség.

Meggondolandó ugyanakkor, hogy a rejtett herék helyeződése és az intratesticularis hormonkoncentrációk alapján következtethetünk-e a rendellenességek kialakulásának okára. Ha meggondoljuk- ahogy az irodalmi összefoglalóban is részleteiben szerepel- hogy a

fejlődés során létrejött rendellenességek sokszor hormonális hatásra vagy rendellenes hormonális hatást kifejtve jönnek létre, elméletileg elképzelhető lehet. Természetesen mindehhez nagy esetszámra, modell kísérletekre és egyéb, immunhisztokémiai, esetleg genetikai vizsgálatokra lenne szükség.

A cryptorchidismus kialakulásának lehetséges okai sokfélék, ám a végeredmény szempontjából mindegy, hogy a rejtett heréjűség hormonális defektus, mechanikai hiba, neurológiai-, kromoszómális, vagy egyéb rendellenesség miatt alakult ki (Hutson és mtsai., 1997), az abnormális pozícióban visszamaradt here szöveti hormontermelése és a spermatogenezis végeredményben megváltozik

Az a tény ugyanakkor szintén további vizsgálatra szorul, hogy vajon miért magasabbak a szöveti hormonkoncentrációk az inguinalisan helyeződő rejtett herék esetében, mint az abdominalis herékben.



## Összefoglalás

A rejtett heréjűség az élővilágban széles körben elterjedt rendellenesség, melynek oka összetett, genetikai, epigenetikai és környezeti tényezők együttesen alakítják ki. Szerepet játszhat benne az anti-Müllerian hormonnak, az Insulin-like factor 3-nak, vagy a tesztoszteronnak a hiánya, az ösztrogén-túlsúly, a szállítófehérje defektusa, mechanikai okok, neurológiai rendellenességek, enzimhibák, stb.

Kísérletünkben  $n=35$ , 8 - 120 hónap közötti kutyát vizsgáltunk meg. Közülük  $n=25$  állat volt egészséges,  $n=10$  pedig rejtett heréjű. Az  $n=10$  rejtett heréjű állat közül  $n=3$  kutyának inguinalis helyeződött az egyik heréje, a további  $n=7$  eb pedig abdominalis rejtett herével bírt.

Első lépésként alvadásban nem gátolt vért vettünk az állatoktól. Ezután rutin ivartalanítás során eltávolítottuk a heréket a Szent István Egyetem Szülészeti Klinikáján és szövet homogenizátumot készítettünk belőlük. A mintákat direkt ELISA módszerrel vizsgáltuk. Tesztoszteron-, ösztradiol- és progeszteron-szinteket mértünk a herehomogenizátumból és a szérumból egyaránt.

Kísérletünk eredményei alapján kijelenthetjük, hogy a szöveti hormon-szintek többszöröse a szérumban mért értékeknek.

A tesztoszteron, az ösztradiol és a progeszteron szöveti koncentrációja is a rejtett heréjű állatokban volt magasabb az egészséges állatokhoz képest. Kiemelkedő értékeket az inguinalis helyeződésű herék esetén tapasztaltunk.

A tesztoszteron és az ösztradiol esetében a szérumban az egészséges állatoknál találtunk magasabb hormon koncentrációt, annak ellenére, hogy a szövetbeli koncentráció a cryptorchid egyedekben volt magasabb.

A progeszteron szöveti koncentrációja az inguinalis rejtett herékből és a contralateralis herékből mérve mutatott magas koncentrációt, míg a szérumbeli értékek nem tértek el jelentősen az egészséges és a cryptorchid állatok esetében.

A szöveti- és a szérumbeli hormonkoncentrációk ezen különbségének oka ma még nem tisztázott.

# **Examination of the hormone production of the testicular tissue in cryptorchid dogs**

## **Summary**

Cryptorchidism is a common failure, which can occur both in animals and in humans. It is caused by complex reasons, including genetical, epigenetical and environmental factors. The absence of anti-Müllerian hormone, insulin-like factor 3 or testosterone, excess of oestradiol, failure of carrier proteins, mechanical reasons, neurological disorders and enzyme defects can play a role in development of cryptorchidism.

In our research n=35 dogs, aged between 8 and 120 months were examined. Among them were n=25 healthy and n=10 cryptorchid animals. N=3 of the n=10 cryptorchid dogs had one testis in an inguinal position, other n=7 dogs have suffered from abdominal cryptorchidism. Our first step in the experiment was to take clotted blood from the animals. After that, we castrated the dogs at the Obstetrics Clinic of the Szent István University and we made a homogenate from the testicles. We examined the samples with direct ELISA method. We measured the concentrations of testosterone, oestradiol and progesterone out of the homogenate and the serum samples.

According to our research it can be said that the hormone concentrations measured from the testicular homogenates are multiple fold higher than samples measured from the serum. The concentrations of all three hormones from the homogenates of cryptorchid animals showed values that were multiple times higher, than the values of the healthy dogs. We found outstanding values in case of the testicles with inguinal position. In case of testosterone and oestradiol we found higher concentration levels in the serum of healthy animals, despite the fact that the concentrations of these hormones from the homogenates were higher in the cryptorchid animals. Progesterone concentrations from homogenates showed high levels in case of the inguinal cryptorchid testicles and the contralateral testicles, while the values from the serum of healthy and cryptorchid animals didn't show any significant differences.

The causes of the difference between hormone concentrations measured from the serum and the testicle homogenate samples is still unclear.

## Irodalomjegyzék

1. Amann, R. P. and Veeramachaneni, D. N. R. (2006): Cryptorchidism in common eutherian mammals *Reproduction* (2007) **133** 541-561 DOI: 10.1530/REP-06-0272, URL: <http://www.reproduction-online.org/content/133/3/541.full.pdf+html>
2. Cassata, R., Iannuzzi, A., Parma, P., De Lorenzi, L., Peretti, V., Perucatti, A., Iannuzzi, L., Di Meo, G.P. (2007): Clinical, cytogenetic and molecular evaluation in a dog with bilateral cryptorchidism and hypospadias *Cytogenetic and Genome Research* **120**:140-143(2008) DOI:10.1159/000118753
3. Hutson, J. M., Hasthorpe, S., Heyns, C. F. (1997) : Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism *Endocrine Reviews* (1997) **18(2)** 259-280 DOI: 10.1210/er.18.2.259  
<http://edrv.endojournals.org/content/18/2/259.full.pdf+html>
4. Meyers-Wallen, V.N. (2001): Inherited abnormalities of sexual development in dogs and cats *Recent Advances in Small Animal Reproduction* 2001.09.13.  
<http://www.ivis.org/advances/Concannon/meyers/ivis.pdf>
5. Meyers- Wallen, V. N., Manganaro, T. F., Kuroda, T., Concannon, W., MacLaughlin, D. T., Donahoe, P. K. (1991) The critical period for Mullerian duct regression in the dog embryo *Biology of Reproduction* **45** 626-633 (1991)
6. Belman, A. B., King, L. R., Kramer, S. A.(2002): Clinical Pediatric urology 4th ed., 1125-1131  
<http://books.google.hu/books?hl=hu&id=IKexq6xCRmIC&q=genitofemoral#v=snippet&q=genitofemoral&f=false>
7. AgoulNIK, A. (2005): Cryptorchidism: An Estrogen Spoil? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90** (8) 4957-4977 (2005) doi: 10.1210/jc.2005-1290
8. Ivell, R., Hartung, S. (2003): The molecular basis of cryptorchidism *Molecular Human Reproduction* Vol. **9** No.4 175-181 (2003) doi:10.1093/molehr/gag025  
<http://molehr.oxfordjournals.org>
9. Meyers-Wallen, V.N., Donahoe, P.K., Ueno, S., Manganaro, T.F., Patterson, D.F. (1989) Mullerian Inhibiting Substance is present in testes of dogs with Persistent Mullerian Duct Synrome. *Biology of Reproduction* **41** 881-889 (1989)
10. <http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.php>
11. Vankrieken, L. (1997) Testosterone and the Free Androgen Index  
<http://www.dpcweb.com>
12. Hess, R.A., Bunick, D., Bahr, J. (2001) Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract- a review. *Molecular and Cellular Endocrinology* **178** (1-2) 29-38 (2001) URL: <http://vetmed.illinois.edu/~rexhess/manuscp/z1HessMCellEndo.pdf>
13. Porto, C.S., Lazari, M.F.M., Abreu, L.C., Bardin, C.W., Gunsalus, G.L. (1995) Receptors for androgen-binding proteins: internalization and intracellular signalling. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **53** (1-6) 561-565 (1995)

14. Scott, H.M., Mason, J.I., Sharpe, R.M. (2009) Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. *Endocrine Reviews* **30** (7) 883-925 (2009) doi: 10.1210/er.2009-0016
15. Foresta, C., Zuccarello, D., Garolla, D., Ferlin, A. (2007) Role of Hormones, Genes and Environment in Human Cryptorchidism. *Endocrin Reviews* **29** (5) 560-580 (2008) doi: 10.1210/er.2007-0042
16. Delbés, G., Levacher, C., Habert, R. (2006) Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction* **132** 527-538 (2006) doi: 10.1530/rep.1.01231
17. Hammond, G.L. (2011) Diverse Roles for Sex Hormone-Binding Globulin in Reproduction. *Biology of reproduction* **85** 431-441 (2011) doi: 10.1095/biolreprod.111.092593
18. Baumans, V., Dieleman, S.J., Wouterse, H.S., van Tol, L., Dijkstra, G., Wensing, C.J.G. (1985) Testosterone secretion during gubernacular development and testicular descent in dog. *Journals of Reproduction & Fertility* **73** 21-25 (1985)
19. Kawakami, E., Yamada, Y., Tsutsui, T., Ogasa, A., Yamauchi, M. (1993) Changes in Plasma Androgen Levels and testicular Histology with Descent of the Testes in the Dog. *The Journal of Veterinary Medical Science* **55** (6) 931-935 (1993)
20. Lague, E., Tremblay, J.J. (2009) Estradiol represses Insulin-like 3 expression and promoter activity in MA-10 Leydig cells. *Toxicology* **258** 101-105 (2009) doi: 10.1016/j.tox.2009.01.013
21. Truong, A., Bogatcheva, N.V., Schelling, C., Dolf, G., Agoulnik, A.I. (2003) Isolation and expression Analysis of the Canine Insulin-like Factor 3 Gene *Biology of reproduction* **69** 1658-1664 (2003) doi: 10.1095/biolreprod.103.019166
22. Wilhelm, D., Palmer, S., Koopman, P. (2006) Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiological Reviews* **87** 1-28 (2007) doi: 10.1152/physrev.00009.2006  
URL: [physrev.physiology.org](http://physrev.physiology.org)
23. Wang, R-S., Yeh, S., Tzeng, C-R., Chang, C. (2008) Androgen Receptor Roles in Spermatogenesis and Fertility: Lessons from Testicular Cell-Specific Androgen Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews* **30** (2) 119-132 (2009) doi: 10.1210/er.2008-0025
24. Thonneau, P.F., Candia, P., Mieusset, R.(2003) Cryptorchidism: Incidence, Risk Factors, and Potential Role of Environment; An Update. *Journal of Andrology* **24** (2) Március/Aprilis 155-162 (2003)
25. Grocock, C.A., Charlton, H.M., Pike, M.C. (1998) Role of the fetal pituitary in cryptorchidism induced by exogenous maternal oestrogen during pregnancy in mice. *Journal of Reproduction and Fertility* **83** 295-300 (1988)
26. Krausz, Cs., Quintana-Murci, L., Fellous, M., Siffroi, J-P., McElreavey, K. (2000) Absence of mutations involving the *INSL3* gene in human idiopathic cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction* **6** (4) 298-302 (2000)
27. Nef, S., Parada, L.F. (2000) Hormones in male sexual development. *Genes & Development* **14** 3075-3086 (2000) doi: 10.1101/gad.843800 URL: [genesdev.cshlp.org](http://genesdev.cshlp.org)

28. Colenbrabder, B., de Jong, F.H., Wensing, C.J.G. (1978) Changes in serum testosterone concentrations in the male pig during development. *Journal of Reproduction and Fertility* **53** 377-380
29. Cederroth, C.R., Schaad, O., Descombes, P., Chambon, P., Vassali, J-D., Nef, S. (2007) Estrogen Receptor  $\alpha$  Is a Major Contributor to Estrogen-Mediated Fetal Dysgenesis and Cryptorchidism. *Endocrinology* **148** (11) 5507-5519
30. Tremblay, J.J. (2010) What Signals Testis Descent? *Biology of Reproduction* **83** 687-689 (2010) doi: 10.1095/biolreprod.110.087197
31. Kubota, Y., Temelcos, C., Bathgate, R.A.D., Smith, K.J., Scott, D., Zhao, D., Hutson, J.M. (2002) The role of insulin 3, testosterone, Müllerian inhibiting substance and relaxin in rat gubernacular growth. *Molecular Human Reproduction* **8** (10) 900-905 (2002) URL: <http://molehr.oxfordjournals.org>
32. Heldring, N., Pike, A., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J. (2006) Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews* **87** 905-931 (2007) doi: 10.1152/physrev.00026.2006
33. Romagnoli, S., Schlafer, D.H. (2005) Disorders of sexual differentiation in puppies and kittens: a diagnostic and clinical approach. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **36** (3) 573-606 (2006) doi: 10.1016/j.cvsm.2005.12.007
34. Kawakami E, Hori T, Tsutsui T (1999) Function of Contralateral Testis after Artificial Unilateral Cryptorchidism in Dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science* **61** (10) 1107-11 (1999) doi: 10.1292/jvms.61.1107 <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/10563287>
35. Mischke, R., Meurer, D., Hoppen H.-O., Ueberschär, S., Hewicker-Trautwein, M. (2002) Blood plasma concentrations of oestradiol-17 $\beta$ , testosterone and testosterone/oestradiol ratio in dogs with neoplastic and degenerative testicular diseases. *Research in Veterinary Science* **73** 267-272 (2002) doi: 10.1016/S0034-5288(02)00100-5 URL: <http://www.idealibrary.com>
36. Husmann, D.A., Levy, J.B. (1995) Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology* **46** (2) 267-76 (1995)
37. Shen, W.-F., Largman, C., Lowney, P., Corral, J.C., Detmer, K., Hauser, C.A., Simonitch, T.A., Hack, F.M., Lawrence, H.J. (1989) Lineage-restricted expression of homeobox-containing genes in human hematopoietic cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **86** (21) 8536-8540 (1989) URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC298317/?page=1>
38. Hanukoglu, I. (1991) Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **43** (8) 779-804 (1992) URL: <http://www.science.co.il/hi/pub/Steroid-Hormone-Biosynthesis.pdf>

39. Klonisch, T., Fowler, P.A., Hombach-Klonisch, S. (2004) Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Developmental Biology* **270** 1-18 (2004) doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.018  
URL:[http://ac.els-cdn.com/S001216060400137X/1-s2.0-S001216060400137X-main.pdf?\\_tid=bf16c2e8-2921-11e2-82f0-0000aacb361&acdnat=1352323749\\_f71205d529e3f41adb879b6d345a080f](http://ac.els-cdn.com/S001216060400137X/1-s2.0-S001216060400137X-main.pdf?_tid=bf16c2e8-2921-11e2-82f0-0000aacb361&acdnat=1352323749_f71205d529e3f41adb879b6d345a080f)
40. Saunders, P., Sharpe, R. M., Williams, K., Macpherson, S., Urquart, H., Irwine, D. S., Millar, M. R. (2001) Differential expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular Human Reproduction* **7** (3) 227-236 (2001) doi: 10.1093/molehr/7.3.227  
URL: <http://molehr.oxfordjournals.org/content/7/3/227.full.pdf+html?sid=ec7c156e-5d84-4555-8d72-b135a87f8548>
41. Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., Smithies, O. (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90** 11162-11166 (1993)  
URL:<http://www.pnas.org/content/90/23/11162.long>
42. Rijnberk, A., Kooistra, H. Clinical Endocrinology of Dogs and Cats. Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft, 2010, 2nd edition, p. 338
43. Schwarzenbach, H., Manna, P.R., Stocco, D.M., Chakrabarti, G., Mukhopadhyay, A.K. (2002) Stimulatory Effect of Progesterone on the Expression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein in MA-10 Leydig Cells. *Biology of Reproduction* **68** 1054-1063 (2003) DOI 10.1095/biolreprod.102.009266  
URL:<http://www.biolreprod.org/content/68/3/1054.full.pdf+html?sid=31b8c7ec-f217-4d03-8301-91644fbe639b>
44. Han, Y., Feng, H.L., Sandlow, J.I., Haines, C.J. (2009) Comparing Expression of Progesterone and Estrogen Receptors in Testicular Tissue From Men With Obstructive and Nonobstructive Azoospermia. *Journal of Andrology* **30** (2) 127-33 (2009) DOI: 10.2164/jandrol.108.005157  
URL: <http://www.andrologyjournal.org/cgi/content/full/30/2/127>
45. Gadkar, S., Shah, C.A., Sachdeva, G., Samant, U., Puri, C.P. (2002) Progesterone Receptor as an Indicator of Sperm Function. *Biology of Reproduction* **67** 1327-1336 (2007) DOI 10.1095/biolreprod.102.003830  
URL: <http://www.biolreprod.org/content/67/4/1327.full.pdf+html?sid=9dfc0245-aefb-497f-aa10-9c46bc5216ed>
46. Thérien, I., Manjunath, P. (2003) Effect of Progesterone on Bovine Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction* **69** 1408-1415 (2003) doi:10.1095/biolreprod.103.017855  
URL: <http://www.biolreprod.org/content/69/4/1408.full.pdf+html?sid=9dfc0245-aefb-497f-aa10-9c46bc5216ed>
47. <http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html> , Perry és munkatársai, 2002

48. <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=69&sim=696&cnt=1>
49. Jarow, J.P., Chen, H., Rosner, W., Trentacoste, S., Zirkin, B. (2000) Assessment of the Androgen Environment Within the Human Testis: Minimally Invasive Method to Obtain Intratesticular Fluid. *Journal of Andrology* **22** (4) 640-645 (2001) URL: <http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/22/4/640>
50. Kollár, E., Lanszki, R., Müller, L., Thuróczy, J. (2012) Akadémiai beszámoló
51. Setchell, B.P. (1979) The Functional Significance of the Blood-testis Barrier. *Journal of Andrology* **1** (1) 3-10 (1980)  
URL: <http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/1/1/3.pdf>
52. Meng, J., Holdcraft, R.W., Shima, J.E., Griswold, M.D., Braun, R.E. (2005) Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102** (46) 16696-16700 doi: 10.1073/pnas.0506084102  
URL: <http://www.pnas.org/content/102/46/16696.full.pdf+html>
53. Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., Bourguiba, S. (2003) Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1** 35 (2003) doi: 10.1186/1477-7827-1-35  
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC155680/pdf/1477-7827-1-35.pdf>
54. Huhtaniemi, I., Pelliniemi, L.J. (1992) Fetal Leydig Cells: Cellular Origin, Morphology, Life Span, and Special Functional Features. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and medicine* **201** (2) 125-140 (1992) doi: 10.3181/00379727-201-43493  
URL: <http://ebm.rsmjournals.com/content/201/2/125.full.pdf+html>
55. Herndon, A.M., Casal, M.L., Jaques, J.T.S. (2012) Testicular Neoplasia in the Retained Testicles of an Intersex Male Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* **48** (2) 118-124 (2012) doi: 10.5326/JAAHA-MS-5696  
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3329716/>

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Kollár Eszternek a kitartó munkáját és a sok segítséget, amit kaptam tőle, hogy létrejöhessen ez a dolgozat.

Valamint szeretnék köszönetet mondani Szegedi Nándornak és Bocskai Zoltánnak a türelmükért és segítségükért, mellyel hozzájárultak, hogy megérthessem az Excel-táblázatokat és a diagramm-készítés rejtelseit.



