

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Vojislav M. Al Daghistani

Upotreba implantata GnRH superagoniste za  
dugotrajnu reverzibilnu kontracepciju i njegov  
uticaj na pojavu estrusa i hormonalni status kod  
juvenilnih kuja

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Vojislav M. Al Daghistani

Use of GnRH superagonist implants for long-term reversible contraception and its effect on oestrus occurrence and hormonal status in prepuberal bitches

PhD thesis

Belgrade, 2024.

**Mentor:**

**Prof. dr Vladimir Magaš, vanredni profesor**  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Članovi Komisije:**

**Prof. dr Slobodanka Vakanjac, redovni profesor**  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Danijela Kirovski, redovni profesor**  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Saša Trailović, redovni profesor**  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Prof. dr Dragan Gvozdić, redovni profesor**  
Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

**Prof. dr Ivan Stančić, redovni profesor**  
Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za veterinarsku  
medicinu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica:

Zahvaljujem se svom mentoru, *prof. dr Vladimiru Magašu*, na nesebičnoj pomoći i trudu koji je uložio tokom istraživačkog rada i pisanja doktorske disertacije. Odlučnost, posvećenost, podrška i strpljenje mentora je zasluga za završetak ove disertacije. Zahvaljujem se profesorima, kolegama i prijateljima sa katedre porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje Veterinarskog fakulteta u Beogradu na podršci i pomoći tokom izrade ovog rada. *Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici, majci Jelici i ocu Mahmudu*. Vaše strpljenje i razumevanje su bili najveća snaga i podrška tokom izrade ovog rada.

**"Sve što jesam, ili se nadam da budem, dugujem svojoj majci i ocu."**

**(Abraham Lincoln)**



# UPOTREBA IMPLANTATA GnRH SUPERAGONISTE KOD JUVENILNIH KUJA ZA DUGOTRAJNU REVERZIBILNU KONTRACENCIJU I NJEGOV UTICAJ NA POJAVU ESTRUSA I HORMONALNI STATUS

## Sažetak

Ovariektomija, ovariohisterektomija i orhidektomija su najčešće hirurške intervencije koje se rutinski izvode u veterinarskoj praksi kod malih životinja. Incidencija komplikacija nakon ovariektomije ili ovariohisterektomije je relativno visoka i kreće se između 12% i 32%. Komplikacije neposredno nakon ovariektomije ili ovariohisterektomije uključuju krvarenje, vaginalno krvarenje, infekciju ili dehiscenciju rane, formiranje seroma, komplikacije usled anestezije, apsces grlića materice, reakciju tkiva na materijal za šivenje što može dovesti i do stvaranja granuloma ili fistula. Dugoročne komplikacije uključuju sindrom zaostalog jajnika, piometru, piometru zaostalog dela cerviksa "patrljka", fistule ili granulom patrljka, ozlede uretera, opstipaciju, uretro-, veziko-, enterovaginalne, kao i vaginoperitonealne fistule, opstrukcije kolona, pijelonefritis, urinarnu inkontinenciju, pararenalne pseudociste, hidronefrozu, a neretko i preteranu gojaznost. Poslednjih godina, na tržištu se pojavio veliki broj preparata, od kojih mnogi imaju više od jedne indikacije i mogućnosti primene. Kod potrebe za dugotrajnim ili permanentnim sprečavanjem polnog žara preporučuje se hirurška sterilizacija ženki i mužjaka, kao metod izbora, međutim sve više se govori o negativnim efektima rane (prepubertalne) sterilizacije i njihovim mogućim komplikacijama. Osnova za efikasnost u izazivanju infertiliteta kod određene vrste je razumevanje reproduktivnog ponašanja i fiziologije date vrste, i korišćenje tog znanja za odabir najpodesnije metode kontracepcije. Kontraceptivno sredstvo mora biti efikasno u izazivanju infertiliteta. Supresija estrusa kod kuja se postiže aplikacijom, uglavnom, progesteronskih preparata (gestagena), mada se mogu koristiti i sintetski anabolički steroidi (miboleron), međutim, sa navedenim sredstvima nisu postignuti zadovoljavajući rezultati.

Deslorelin preparati, GnRH agonisti imaju veliku perspektivu u menadžmentu i kontroli estrusa kuja. Implantati GnRH agonista su subkutane insercije sporo-otpuštajućeg GnRH, kao što su implantati sa 4,7 mg i 9,4 mg deslorelin acetata, i predstavljaju odličnu alternativu reverzibilne kontrole ovarijalne aktivnosti. Ubacivanjem implantata sporo-otpuštajućeg GnRH agoniste, prirodno pulsativno otpuštanje hormona hipotalamusa i hipofize je blokirano. Posledično dolazi do bazičnog otpuštanja gonadotropina, koje se reperkutuje na smanjenu sintezu i otpuštanje folikulostimulirajućeg i luteinizirajućeg hormona prevenirajući folikularno razviće, odnosno dovodi do privremenog dugotrajnog odlaganja polnog ciklusa i problema koji su vezani za polni ciklus. Vrlo malo studija je opisalo odlaganje puberteta korišćenjem deslorelin implantata kod kuja, ali postoje literaturni navodi koji su potvrdili efikasnost ove metode kontracepcije. Starost kuja igra važnu ulogu u odgovoru na implantat .

Cilj ovog istraživanja jeste određivanje dužine kontraceptivnog perioda nakon aplikacije agoniste GnRH kod juvenilnih kuja u prepubertetnom periodu i utvrđivanje efekata na hormonski status (estrogen, progesteron, melatonin), kao i na pojavu normalnog fiziološkog estrusa nakon perioda supresije.

Dvanaest vlasničkih kuja mešanaca starosti od 3 do 4 meseca podeljeno je u dve grupe, tretiranu grupu (DESLO) i kontrolnu (placebo) grupu (K). Kod DESLO grupe aplikacija implantata GnRH vršena je u regiji pupka (supkutano). Hormonski testovi, vaginalni mikrobiološki i citološki brisevi i merenje električnog otpora cervikalne sluzi vršeni su jednom svake 3 nedelje do pojave prvih znakova proestrusa, a tokom estrusa svaki dan. Aplikacija implantata GnRH nije izazvala neželjene efekte i nije primećen vidljiv odgovor na aplikaciju - efekat "razbuktavanja". GnRH implantat je značajno odložio vreme početka estrusa ( $633 \pm 30,38$  naspram  $143,80 \pm 52,30$  dana,  $P < 0,001$ ). U estrusu, DESLO grupa je pokazala statistički veće serumske koncentracije estrogena ( $34,58$  pg/mL naspram  $20,59$  pg/mL,  $P < 0,001$ ) i koncentracije melatonina ( $45,86$  pg/mL naspram  $18,85$  pg/mL,  $P < 0,001$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom. Prosečne koncentracije progesterona u serumu nisu pokazale statistički značajne razlike između ispitivanih grupa. U zaključku, deslorelin implantati ne izazivaju efekat „razbuktavanja“ kod prepubertalnih kuja mlađih od 4 meseca starosti, ali su primećene značajno veće koncentracije E2 i melatonina u serumu. Dobijeni rezultati pokazuju potrebu za budućim sveobuhvatnijim istraživanjima koji će ispitati uticaj aplikacije deslorelina na serumske koncentracije melatonina.

**Ključne reči:** deslorelin, estrus, hormonski status, melatonin, juvenilne kuje

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Ginekologija sa andrologijom

UDK broj:

# **USE OF GNRH SUPERAGONIST IMPLANTS IN PREPUBERAL BITCHES FOR LONG-TERM REVERSIBLE CONTRACEPTION AND ITS EFFECT ON OESTRUS OCCURRENCE AND HORMONAL STATUS**

## **Summary**

Ovariectomy, ovariohysterectomy and orchidectomy are the most common surgical interventions routinely performed in small animal practice. The incidence of complications after ovariectomy and ovariohysterectomy is relatively high and ranges between 12% and 32%. Complications immediately after ovariectomy or ovariohysterectomy include bleeding, vaginal bleeding, wound infection or dehiscence, seroma formation, complications from anesthesia, cervical abscess, tissue reaction to suture materials that can lead to granuloma or fistula formation. Long-term complications include residual ovary syndrome, pyometra, "stump" cervical residual pyometra, fistula or granuloma of the stump, ureteral injuries, constipation, urethro-, vesico-, enterovaginal, as well as vaginoperitoneal fistulas, colonic obstruction, urination, paralysis, hydronephrosis, and often excessive obesity. In recent years, a large number of contraceptive medications have appeared on the market, many of which have more than one indication and possibility of application. When there is a need for long-term or permanent prevention of sexual behavior in dogs, surgical castration is recommended as the method of choice, however, the negative effects of early (prepubertal) castration and their possible complications are being discussed. The basis of effectiveness in inducing infertility in certain species is understanding the reproductive behavior and physiology of a given species, and using that knowledge to select the most suitable method of contraception. The contraceptive must be effective in causing infertility. Suppression of estrus in bitches is achieved by the application, mainly, of progesterone preparations (gestagen), although synthetic anabolic steroids (mibolerone) can also be used, but satisfactory results have not been achieved.

Deslorelin, a GnRH agonist, have a great perspective in the management and control of estrus in bitches. GnRH agonist implants are subcutaneous insertions of slow-release GnRH, such as the 4,7 mg and 9,4 mg deslorelin acetate implants, and are an excellent alternative for reversible control of ovarian activity. By inserting a slow-release GnRH agonist implant, the natural pulsatile release of hormones from the hypothalamus and pituitary gland is blocked. This leads to a basal release of gonadotropins, after which there is a reduced synthesis and release of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone preventing follicular development, therefore, it leads to a temporary long-term delay of the sexual cycle and problems related to the sexual cycle. Very few studies have described the delay of puberty using the deslorelin implant in bitches, but there are literature reports that have confirmed the effectiveness of this method of contraception in adult bitches. Age plays an important role in implant response.

The aim of this study was to determine the length of the contraceptive period after the application of deslorelin implant (4,7 mg) in juvenile, prepubertal bitches and assess the effects on the hormonal status (estrogen, progesterone and melatonin), as well as on the occurrence of normal physiological estrus.



Twelve crossbred prepubertal female dogs (4 months of age) were divided into the two groups, the treated group (DESLO) and control (placebo) group (K). Hormone assays, vaginal microbiological and cytological smears and the measurements of electrical resistance of cervical mucus were performed once in 3 weeks until the first signs of proestrus, and every day during estrus. Application of the GnRH implant did not cause side effects and no visible response to the application of the implant - the "flare-up" effect - was observed. GnRH implant significantly postponed time of onset of estrus ( $633 \pm 30,38$  days vs.  $143,80 \pm 52,30$  days,  $P < 0,001$ ). In estrus, DESLO group showed statistically higher estrogen ( $34,58$  pg/mL vs.  $20,59$  pg/mL,  $P < 0,001$ ) and melatonin serum concentration ( $45,86$  pg/mL vs.  $18,85$  pg/mL,  $P < 0,001$ ) compared to the control group. The average progesterone serum concentration had no statistically significant differences between groups. In conclusion, deslorelin implants do not cause "flare up" effect in prepubertal bitches, however, increase of estrogen and especially melatonin serum concentrations show the need to explore the consequences and mutual influence of melatonin and deslorelin implants in the future.

**Keywords:** deslorelin, estrus, hormonal status, melatonin, prepubertal bitches

Major field of study: Veterinary Medicine

Special field of study: Gynecology and andrology

## SADRŽAJ:

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	3
2.1	Fiziologija reprodukcije psa	3
2.1.1	Endokrina regulacija polnog ciklusa psa	3
2.1.2	Pubertet i faze polnog ciklusa	5
2.1.3	Pseudograviditet	9
2.2	Kontracepcija	10
2.2.1	Istorijski kontekst kontracepcije i saznanja u oblasti kontrole plodnosti kod pasa	10
2.3	Hirurška gonadektomija kod pasa i posledični neželjeni efekti	11
2.4	Nehirurški pristup supresiji plodnosti kod pasa	15
2.4.1	Steroidni hormoni	15
2.4.1.1	Estrogeni	15
2.4.1.2	Gestageni	15
2.4.1.3	Androgeni	17
2.4.2	Genska terapija	18
2.4.3	Imunokontracepcija	19
2.4.4	GnRH agonisti	21
2.4.4.1	Odlaganje puberteta kod kuje	21
2.4.4.2	Vreme aplikacije implantata	22
2.4.4.3	Trajanje supresije puberteta	22
2.4.4.4	Uticaj na anatomski razvoj jedinke	23
2.4.4.5	Uticaj na matericu, jajnike i plodnost	24
2.4.4.6	Uticaj na ponašanje kuje	24
3.	CILJ I ZADACI	25
4.	MATERIJAL I METODE	26
4.1	Etička izjava	26
4.2	Mesto i vreme istraživanja	26
4.3	Materijal	26
4.3.1	Životinje koje su korišćene u istraživanju	26
4.4	Metode istraživanja	26
4.4.1	Zdravstveni status i isključivanje puberteta	26
4.4.2	Vaginalni mikrobiološki i citološki brisevi	27
4.4.3	Merenje otpora cervikalne sluzi (vaginalna impedometrija)	28
4.4.4	Ultrazvučni pregled genitalnog trakta	28
4.4.5	Određivanje hormonskog statusa	29
4.4.6	Alikacija GnRH	29

4.4.7	Statistička obrada podataka	30
5.	REZULTATI	31
5.1	Zdravstveno stanje kuja pre uvođenja u eksperiment	31
5.2	Aplikacija GnRH i vreme pojave estrusa	31
5.3	Mikrobiološke analize vaginalnih briseva	32
5.4	Ultrazvučni nalaz pregleda genitalnog trakta i merenje otpora vaginalne sluzi	32
5.5	Hormonske analize krvi	33
5.5.1	Koncentracija estrogena u krvnom serumu	33
5.5.2	Koncentracija progesterona u krvnom serumu	36
5.5.3	Koncentracija melatonina u krvnom serumu	38
5.6	Analiza kalcijuma, fosfora i magnezijuma u krvi	40
5.6.1	Analiza koncentracija kalcijuma, fosfora i magnezijuma u krvi ispitivanih kuja u proestrusu	40
5.6.2	Analiza koncentracija kalcijuma, fosfora i magnezijuma u krvi ispitivanih kuja tokom celog perioda ispitivanja	43
6.	DISKUSIJA	45
7.	ZAKLJUČCI	51
8.	LITERATURA	52



## 1. UVOD

U savremenoj veterinarskoj praksi, veterinari i vlasnici pasa se suočavaju sa mnogim problemima koji se odnose na reprodukciju i kontrolu reprodukcije. Dugi niz godina, hirurška kastracija je bila jedina pouzdana i trajna metoda kontracepcije kod pasa. Ovarijsktomija, ovariohisterektomija i orhidektomija su najčešće hirurške procedure koje se rutinski izvode kod malih životinja (Moxon i sar., 2022; 2023). Prepubertalna ovariektomija (ili OHC) se definiše kao hirurška kastracija nezrelih, juvenilnih ženki između 6 i 14 nedelje starosti i često je povezana dugoročnim efektima na ponašanje i zdravstveni status (Lukas, 2014; Romagnoli, 2017; Salvati i sar., 2018; Yates i Leedham, 2019). Zadnjih decenija, postavlja se pitanje o neželjenim efektima vezanim za hiruršku kastraciju, pri čemu se naglašavaju povezane koristi i rizici kod juvenilnih životinja kada polaze period fizičkih i fizioloških promena da bi postale reproduktivno aktivne.

Na tržištu postoje brojna kontraceptivna lekovita sredstva, sa više od jedne indikacije i primene, koja imaju direktan ili indirektan uticaj na polni ciklus životinja. Njihova upotreba zahteva iskustvo, ispravno i blagovremeno doziranje i poznavanje neželjenih efekata i kontraindikacija (Kutzler i Wood, 2006; Rhodes, 2017; Asa, 2018). Odabrano kontraceptivno sredstvo i metoda treba da bude prihvatljiva za vlasnika (jednokratna injekciona primena, jednostavna oralna primena i niska cena).

Primena kontraceptivnih preparata za supresiju estrusa kod kuja i libida kod mužjaka pasa su uobičajeni u praksi (Borges i sar., 2015). Mnoge studije su istraživale upotrebu GnRH agonista kao hormonske reverzibilne sterilizacije kod mužjaka pasa i njegova efikasnost je dobro ispitana i poznata (Romagnoli i sar., 2005; 2012; Fontaine i Fontbonne, 2011; Driancourt i Briggs, 2020) pa danas postoje komercijalno dostupni proizvodi registrovani za upotrebu samo kod mužjaka pasa (Asa, 2018). Poslednjih decenija, GnRH agonisti imaju veliku perspektivu u upravljanju i kontroli estrusa kod kuja (Borges i sar., 2015, Volkmann i sar., 2006; Kutzler i sar., 2009; Fontaine i sar., 2011). Potkožni implantati sa sporim oslobađanjem GnRH, kao što su 4,7 mg i 9,4 mg deslorelin acetat, predstavljaju odličnu alternativu za reverzibilnu kontrolu aktivnosti jajnika kod diestričnih kuja (Borges i sar., 2015). Prvi korak u mehanizmu delovanja GnRH agonista je efekat „razbuktavanja“, koji karakteriše povećanu sintezu gonadotropina. Ovaj stimulatívni efekat je izraženiji kod kuja nego kod mužjaka. Indukcija estrusa ovom metodom može se primetiti kod većine kuja u anestrusu, bez obzira na fazu anestrusa (Fontaine i sar., 2011; Fontaine i Fontbonne, 2010). Većina autora je potvrdila da sve odrasle kuje reaguju na isti način bez obzira na veličinu i starost, međutim, u zavisnosti od faze ciklusa, moguće je da odgovor na primenjeni implantat može izostati (Fontaine i Fontbonne, 2011). Nakon efekta „razbuktavanja“, prirodna pulsirajuća oslobađanja hormona hipotalamusa i hipofize su blokirana, što dovodi do bazalnog oslobađanja gonadotropina, i smanjene sinteze i oslobađanja folikulostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg (LH) hormona. Usled navedenih promena razvoj folikula je suprimiran, odnosno dolazi do privremene dugoročne supresije estrusa (Schafer-Somi i sar., 2022).

Melatonin je neurohormon koji luči epifiza i ima cirkadijalni ritam, sa niskim nivoom sekrecije tokom dana i visokim tokom noć. Kod životinjskih vrsta koje se pare u jesen (sezonski poliestrične, npr. ovce), melatonin kontroliše sezonski biološki i reproduktivni ritam, početak estrusa i poboljšava kvalitet sperme (Haldar, 2007; Salvati i sar., 2018). Sintaza i sekrecija melatonina igra jednu od glavnih uloga u složenom procesu sinteze GnRH, pa je od izuzetne važnosti utvrditi u kojoj meri deslorelin implantat utiče na endokrini status kod pasa.

Na osnovu dostupne literature, ne postoji dovoljno podataka o dužini delovanja primenjenih GnRH implantata kod juvenilnih kuja, i njihov uticaj na pojavu estrusa i hormonski status nakon prestanka delovanja, kao i mogućnost komplikacija. Imajući u vidu broj vlasničkih i nevlasničkih pasa u Republici Srbiji, rezultati ovog istraživanja daće detaljan uvid u sigurnost primene GnRH agonista i dužinu perioda kontracepcije kod juvenilnih kuja, što će pomoći nadležnim institucijama, klinikama ali i vlasnicima u sigurnoj, bezbolnijoj kontroli broja populacije pasa.

## 2. PREGLED LITERATURE

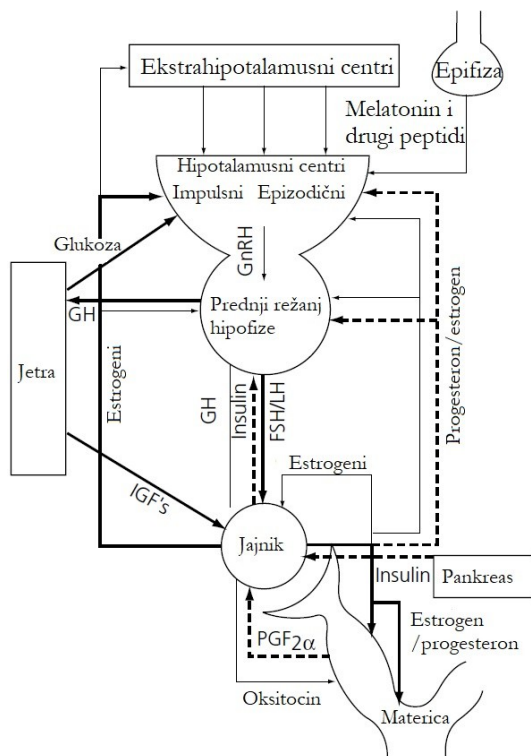
### 2.1 Fiziologija reprodukcije psa

#### 2.1.1 Endokrina regulacija polnog ciklusa psa

Regulacija polnog ciklusa kod ženki sisara je složen proces i uglavnom je pod kontrolom hipotalamo-hipofizno-gonadne osovine (Meethal i Atwood, 2005). Na jednom kraju ove ose nalazi se uticaj ekstrapitalamičkih područja – cerebralni korteks, talamus i srednji mozak – i uloga koju igraju stimulansi kao što su svetlost, miris i dodir, dok je na drugom kraju uticaj materice na jajnik (Noakes i sar., 2018). Epifiza (sinonim: pinealna žlezda) ima važnu ulogu u kontroli reprodukcije kod životinjskih vrsta koje su polno aktivne u sezoni parenja. Od nje takođe zavisi vreme početka puberteta jer utiče na oslobađanje folikulostimulirajućeg hormona (FSH), luteinizirajućeg hormona (LH) i prolaktina (Meethal i Atwood, 2005). Osim melatonina, koji se ubraja u indolamine po hemijskom sastavu, veoma su važni i drugi hormoni epifize, kao što su aminokiselina arginin, polipeptid vazotocin, gonadotropin i prolaktin-oslobađajući hormoni i inhibitorni hormoni. Smatra se da melatonin deluje direktno na hipotalamus/prednji režanj hipofize, ali i indirektno preko drugih peptida epifize (Noakes i sar., 2018).

Hipotalamus je odgovoran za kontrolu oslobađanja gonadotropina iz prednjeg režnja hipofize dejstvom specifičnih oslobađajućih i inhibirajućih faktora (Meethal i Atwood, 2005). Njih luče neuroni hipotalamusa, a prenose se iz srednje regije hipotalamusa preko hipotalamo-hipofizno-portalnog sistema. Gonadotropni oslobađajući hormon (eng. *gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) je jedan od specifičnih oslobađajućih hormona hipotalamusa odgovoran za razvoj polnih karakteristika jedinke, kao i za pravilno funkcionisanje reproduktivnog sistema (Squires, 2010). Dekapeptidna struktura svinjskog GnRH je utvrđena 1971. godine (Matsuo i sar., 1971), a iste godine je uspešno dobijen sintetski (Geiger i sar., 1971). GnRH je odgovoran za oslobađanje FSH i LH (Lamming i sar., 1979). Specifične neurotransmitterske supstance su uključene u regulaciju oslobađanja hormona hipofize, među kojima su tri monoamina: noradrenalin, dopamin i serotonin (Noakes i sar., 2018). Noradrenalin stimuliše oslobađanje FSH i LH, a inhibicija konverzije dopamina u noradrenalin blokira estradiolom indukovano oslobađanje LH, koji je odgovoran za ovulaciju. Serotonin inhibira bazalno lučenje LH i reguliše druge neurosekretorne sisteme. Dopamin takođe ima važnu ulogu u kontroli oslobađanja prolaktina (Squires, 2010).

Kod domaćih životinja sekreciju FSH i LH kontrolišu dva funkcionalno odvojena, ali preklapajuća sistema (Meethal i Atwood, 2005). Jedan je epizodni/tonični sistem, koji je odgovoran za kontinuiranu bazalnu sekreciju gonadotropina i stimuliše rast germinalnih i endokrinih komponenti jajnika. Drugi sistem je odgovoran za kratkotrajno intenzivno (impulsno) lučenje gonadotropina, posebno LH (tzv. LH pik ili eng. *LH surge*), tj. odgovoran je za ovulaciju (Slika 1). Postoje dva hipotalamusna centra koji su uključeni u kontrolu ova dva sistema (Squires, 2010; Noakes i sar., 2018).



Slika 1. Endokrina kontrola ciklične aktivnosti jajnika. \_\_\_\_\_, stimulacija; - - - - -, inhibicija;  $\text{PGF}_{2\alpha}$  – prostaglandini; IGF – insulinski faktori rasta; GH – hormon rasta; (Prilagođeno iz Lamming i sar., 1979).

Hipotalamus, hipofiza i jajnik se nalaze u međusobnoj sprezi. Prednji režanj hipofize ima direktan efekat na funkcije jajnika tako što stimulise folikulogenezu, sazrevanje folikula, ovulaciju i formiranje žutog tela. U toku razvoja folikula, u njemu se sintetiše estradiol, dok se progesteron luči iz žutog tela (lat. *corpus luteum* – CL). Epizodno/tonični hipotalamusni centar za oslobađanje nalazi se pod uticajem negativne povratne sprege pod dejstvom estradiola i progesterona (Squires, 2010; Noakes i sar., 2018).

Sekreciju FSH kontrolišu i brojni peptidni hormoni iz jajnika. Prvi koji je okarakterisan bio je inhibin. Proizvode ga granulosa ćelije velikih antralnih folikula i može se izolovati iz folikularne tečnosti. Inhibin i estradiol deluju zajedno u supresiji lučenja FSH. Inhibin, kojeg luče svi antralni folikuli, ima duže vreme delovanja i postavlja ukupan nivo negativne povratne sprege, dok estradiol, kojeg proizvode samo dominantni antralni folikuli, koji imaju potencijal za ovulaciju, odgovorna je za svakodnevne fluktuacije (Baird i sar., 1991). Dva druga peptidna hormona koja su izolovana iz folikularne tečnosti jesu aktivin, koji stimulise, i follistatin, koji potiskuje sekreciju FSH (Noakes i sar., 2018).

Funkcionalni CL, zbog toga što proizvodi progesteron, preko negativne povratne sprege deluje na prednji režanj hipofize i inhibira povratak u cikličnu aktivnost jajnika, što se dešava u toku graviditeta. Prostaglandini (PGF) imaju negativan, luteolitički efekat na CL, a predstavljaju tkivne hormone, koji se u ovom slučaju luče u materici. Kod kuja, mehanizmi za kontrolu životnog veka CL nisu u potpunosti objašnjeni, jer kod njih i u odsustvu graviditeta lutealna faza polnog ciklusa traje duže (Noakes i sar., 2018).



Melatonin (N-acetil-5-metoksi-triptofan), neurohormon koji se uglavnom proizvodi u epifizi svih kičmenjaka, ima cirkadijalni (dnevni) ritam. Cirkadijalni ritam lučenja melatonina vođen je suprahijazmatskim jezgrom hipotalamusa, i proizvodnja melatonina je najveća u toku noći (Salvati i sar., 2018). Nivo melatonina se smanjuje tokom dana, a povećava u mraku (Haldar, 2008). Kod ljudi je koncentracija melatonina u plazmi tokom ponoći sedam puta veća od njegove koncentracije u popodnevnom satima (Reece i sar., 2015). Melatonin kontroliše sezonske biološke i cirkadijalne ritmove kod sisara (Haldar, 2008). Sintetiše se iz serotonina, nakon N-acetilacije i O-metilacije. Proizvodnja melatonina nije ograničena samo na epifizu, već i druga tkiva poput mrežnjače. Koža i gastrointestinalni sistem mogu proizvoditi određene količine melatonina u određenim specifičnim situacijama (Vanecek, 1998; Ambriz-Tututi i sar., 2009). Različite studije su potvrdile pozitivne efekte melatonina na ublažavanje bola i razvoj imuniteta, kao i njegovo antioksidativno, antikancerogeno i citotoksično dejstvo (Lakin i sar., 1981; Sugden, 1983; Yu i sar., 1999). Melatonin je korišćen za lečenje alopecije X kod pasa zbog blokade estrogenskih receptora (Frank i sar., 2006; Frank, 2007). U složenom procesu sinteze GnRH, glavnu ulogu ima sinteza i lučenje melatonina, koje se odvija u epifizi. Kod životinjskih vrsta čija je reproduktivna aktivnost sezonska, kao što je ovca, u toku jeseni kada je noć duža, melatonin stimulatивно deluje na fertilitet ovaca ali i ovnova, čiji je kvalitet sperme bolji, a serumska koncentracija testosterona viša (English i sar., 1986; Kaia i sar., 2000). Kod sirijskih i džungarskih hrčaka, implantati melatonina izazivaju antigonadni efekat i smanjuju reproduktivnu funkciju (Tamarkin i sar., 1976; Carter i Goldman, 1983). Prema Stankovu i sar. (1994), postoji cirkadijalna signalizacija za melatonin, a takođe i melatoninski receptori u mozgu pasa.

#### 2.1.2 Pubertet i faze polnog ciklusa psa

Pubertet – proces fizičkih promena tokom kojih životinja sazreva u reproduktivno sposobnu jedinku – još uvek je nedovoljno rasvetljen period reproduktivne fiziologije sisara koji uključuje značajan broj međusobno povezanih faktora (Gobello, 2014). Pubertet je postepen, kvantitativni proces, a ne akutna i kvalitativna tranzicija (Pelletier i sar., 1981).

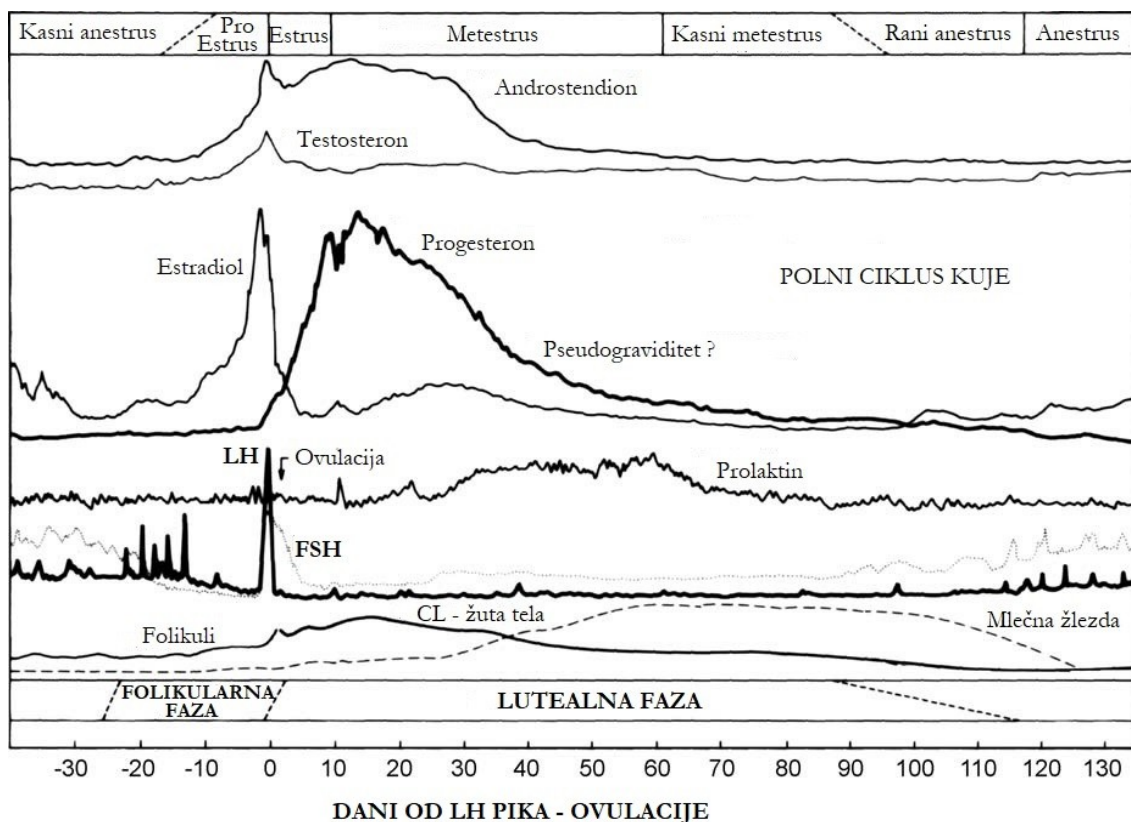
Kod kuja, zbog njihove fizičke manifestacije u fazi estrusa ili teranja (otok i crvenilo vulve, promena ponašanja, hemoragični iscedak), početak prvog proestrusa generalno se smatra pubertetom (Johnston i sar., 2001). Međutim, stvarna situacija nije tako jednostavna. Kuje u pubertetu često manifestuju podeljene (eng. *split*) ili tihe (eng. *silent*) estruse (Vildt i sar., 1981; Johnston i sar., 2001). U stručnoj i naučnoj literaturi kao početak puberteta navode se sledeći primeri: prva folikularna faza koja se manifestuje spoljnim simptomima estrusa i karakterističnom vaginalnom citologijom; prihvatanje mužjaka i naskok; ovulacija tj. ulazak u lutealnu fazu i skok serumske koncentracije progesterona u krvi; ili čak dijagnostikovan graviditet. Iz tog razloga pubertet mora biti jasno definisan prilikom istraživanja koja se odnose na reprodukciju psa (Gobello, 2014).

Kod ženki domaćih životinja pubertet prethodi nastanku fizičke zrelosti. Zato iako su sposobne za reprodukciju, efikasnost ženki, posebno u pogledu plodnosti, nije dostigla maksimum u pubertetu. Starost, telesna kondicija, okruženje i genetički potencijal za cikličnu aktivnost jajnika („biološki sat“) u velikoj meri utiču na početak puberteta (Noakes, 2009). Kada kuja dostigne pubertet, genitalni organi se povećavaju u veličini. Tokom prepubertetnog perioda rast i razviće genitalnih organa je slično razvoju drugih organskih sistema, ali se u pubertetu njihov rast ubrzava. Smatra se da kuje ulaze u pubertet u uzrastu od 6 do 20 meseci (Noakes i sar., 2018).

Promene koje se javljaju u pubertetu zavise direktno od aktivnosti jajnika, koji ima dvostruku osnovnu funkciju: proizvodnja ženskih gameta i sinteza hormona. Jajnik kuje se razvija tokom ranog fetalnog života. Oogeneza uključuje migraciju primordijalnih germinativnih ćelija i proliferaciju oogonija, ali se folikulogeneza, odnosno formiranje i rast folikula, odvija tek postnatalno. Pri rođenju, jajnik sadrži samo „gnězda“ oogonija i oogonijalnih mitoza (Reynaud i sar., 2012). Prvi primordijalni folikuli se mogu zapaziti približno 2–3 nedelje nakon rođenja (Andersen i sar., 1973). Tokom drugog meseca života dolazi do formiranja primordijalnih folikula, što je, kao i kod drugih sisara, praćeno masovnom degeneracijom germinativnih ćelija. Zaliha primordijalnih folikula se procenjuje na približno 100 000 po jajniku (Andersen i sar., 1973). U toj fazi, oocit je veličine 25-30  $\mu\text{m}$  u prećniku (Durrant i sar. 1998).

Na osnovu pojave estrusa, kuje su uglavnom nesezonski monoestrićne ili diestrićne životinje. U toku estrusa nastaje spontana ovulacija više jajnih ćelija (poliovulacija). Nakon ovulacije nastaje lutealna (progesteronska) faza koja je slična dućini ili malo duća ( $64 \pm 1$  dana) od lutealne faze tokom graviditeta (Concannon, 2011). Posle lutealne faze obavezno sledi period anestrusa, pre narednog polnog ciklusa. Interestrusni intervali variraju od 5 do 12 meseci, a obićno iznose 6-7 meseci. Mogu postojati individualne varijacije u trajanju, ili su intervali regularni, i u proseku se ne razlikuju znaćajno bilo da su kuje bili gravidne ili ne (Concannon, 2011; Noakes i sar., 2018).

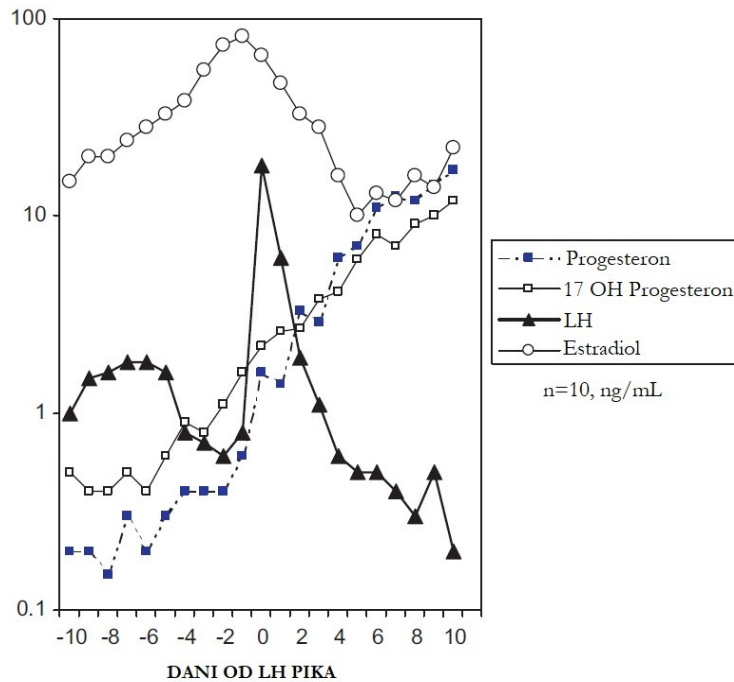
Prvi (pubertetni) estrus se javlja u uzrastu od 6 do 20 meseci kod kuja većine rasa, i smatra se da je u pozitivnoj korelaciji sa velićinom rase (Concannon, 2011). Polni ciklus (Slika 2) je klasićno podeljen u četiri faze: proestrus (5-20 dana), estrus (5-15 dana), metestrus (50-80 dana, lutealna faza) i anestrus (obićno traje 80–240 dana). Ove faze su odraz povećane serumske koncentracije estrogena u folikularnoj fazi (proestrus i estrus); povećane serumske koncentracije progesterona i pada koncentracije estrogena u lutealnoj fazi (kraj estrusa i metestrus) i intervala između gubitka lutealne funkcije i početka sledećeg ciklusa (anestrus). Preovulatorna maksimalna koncentracija LH ili LH pik se posmatra kao nulti dan polnog ciklusa (Concannon, 2011; Noakes i sar., 2018).



Slika 2. Shema tipičnih promena koncentracije reproduktivnih hormona u toku polnog ciklusa kuje, sa bazalnim i najvišim vrednostima (Prilagođeno iz Concannon, 2011). Estradiol, 5–10 pg/ml i 45–120 pg/ml ( $\sim 20\text{--}40$  pmol/l i  $\sim 150\text{--}450$  pmol/l). Progesteron, 0,2–0,5 ng/ml i 15–60 ng/ml ( $\sim 0,5\text{--}1,5$  nmol/l i  $\sim 50\text{--}200$  nmol/l). LH, 0,4–1,5 ng/ml i 5–40 ng/ml. FSH, 15–40 ng/ml i 200–400 ng/ml; prolaktin, 0,5–2 ng/ml i 5–30 ng/ml; testosteron,  $<0,5$  ng/ml i 2–5 ng/ml ( $<\sim 1$  nmol/l i  $\sim 6\text{--}16$  nmol/l). Androstendion, 0,5 ng/ml i 4–11 ng/ml ( $<\sim 1$  nmol/l i  $\sim 12\text{--}35$  nmol/l).

Proestrus nastaje kada se pojave spoljašnji znaci povećane estrogenizacije, odnosno otok i crvenilo vulve (edem), što je obično praćeno pojavom serohemoragičnog sekreta iz vagine. Proestrus u proseku traje 9 dana i karakteriše ga progresija nastalih znakova: veličina i turgor vulve; proliferacija, kornifikacija i edem epitela vagine; broj epitelnih ćelija u vaginalnom brisu; i vaginalni sekret bogat feromonima koji privlače mužjake. Na vaginalnom citološkom razmazu ćelijski profili se menjaju od dominacije parabazalnih ćelija (praćene različitim brojem neutrofila), do sukcesivnog smenjivanja skvamoznih ćelija srednje veličine, ka velikim intermedijarnim ćelijama, a zatim velikim rožnatim ćelijama dok se konačno ne sastoje od potpuno (98–100%) rožnatih (kornifikovanih) ćelija sa virtuelnim odsustvom neutrofila (Concannon, 2011). Najveći procenat kornifikovanih ćelija je 1-6 dana pre LH pika. Serohemoragičan iscedak se sastoji od serozne tečnosti koja sadrži intaktne i lizirane eritrocite i hemoglobin koji je procesom dijapedeze dospelo u matericu. Vaginoskopski pregledom sluzokoža izgleda edematozno, progresivno se menja od ružičaste do bele. Kuja sve više dopušta prilazak mužjaka. Analizom feromona u vaginalnom sekretu, identifikovan je metil-p-hidroksi-benzoat kao seksualni atraktant. Serumski estradiol povećava se od 5 do 15 pg/ml ( $\sim 20\text{--}55$  pmol/l) u početku (Slika 3), da

bi dostigao pik od 40–120 pg/ml (~150–450 pmol/l, prosečno 70 pg/ml ili 255 pmol/l). Na početku proestrusa, folikuli u razvoju su prečnika 0,5 cm, zatim progresivno rastu sve do ovulacije, kada njihova veličina varira od 0,6 cm do 1 cm. U ovo vreme jajnik je znatno uvećan, njegova veličina zavisi od broja prisutnih zrelih folikula, a oblik je nepravilan zbog projekcija folikula sa njegove površine (Noakes i sar., 2018). Proestrus se završava sa početkom receptivnog ponašanja, koje se obično javlja za 0,5-3 dana nakon pika koncentracije estradiola i u roku od jednog dana od preovulatornog LH skoka. Sa tačke gledišta endokrinologije, proestrus se završava preovulatornim porastom koncentracije LH (Concannon, 2011; Noakes i sar., 2018).



Slika 3. Prosečne serumske koncentracije LH, estradiola, progesterona i 17-hidroksi-progesterona u perioovulatornom periodu kuja kuja rase bigl. Istaknute karakteristike uključuju smanjenu stopu povećanja estradiola neposredno pre porasta LH, naglo povećanje progesterona i 17-OH-progesterona u toku ili pre početka porasta LH, i kao rezultat - nagli pad estrogena pre-LH pika. Srednji početak estrusa bio je 0,5, 1,3, i 1,8 dana nakon porasta LH u odvojenim ispitivanjima na rasi bigl, puta u rasponu uglavnom od -1 do +3 dana (Prilagođeno iz Concannon, 2011).

Ponašanje kuja u estrusu karakteriše pojačana međusobna zainteresovanost mužjaka i ženki (Okkens i Kooistra, 2006). Trajanje estrusa je različito, nestaje nakon 5-10 dana (u proseku posle 9 dana), ali može da traje u izvesnoj meri mnogo posle kraja 8. dana „fertilnog“ estrusa. Klinički definisan, estrus traje dok vaginalna anatomija i citologija više ne odražavaju punu ili maksimalnu kornifikaciju epitelnih ćelija vagine, pojava nekornifikovanih ćelija, i stanjivanje epitela sa migracijom neutrofila u lumen vagine, promene koji se obično javljaju 6–11 dana (u proseku 8 dana) nakon LH pika. Fiziološki početak estrusa ne prate jasno izražene citološke promene, ali se on anatomski prepoznaje po naboranom endometriju i mekom cerviksu koji je dilatiran, kao odgovor na nagli pad odnosa estrogena i progesterona. Maksimalna naboranost se javlja 4-5 dana posle LH pika.

Pad serumske koncentracije estradiola nastavlja se tokom kasnog proestrusa do prosečno 10–20 pg/ml (~40–90 pmol/l). Koncentracije progesterona u krvnom serumu naglo premašuju 1–3 ng/ml (3–6 nmol/l) tokom preovulatornog LH pika, dostižući 10–25 ng/ml (~30–80 nmol/l) do 10. dana nakon završetka estrusa (Concannon, 2011).

Period od povećanja koncentracije LH do ovulacije karakteriše brzo povećanje luteinizacije ćelija dominantnih folikula, rast teka ćelija i krvnih sudova, sa naglim povećanjem serumskih koncentracija progesterona i 17-hidroksi-progesterona, i daljim opadanjem serumskih koncentracija estradiola (Concannon i sar., 2009). Jedna od važnih karakteristika estrusa, koja se javlja samo kod kuja, jeste rast serumske koncentracije progesterona pre ovulacije. Ovo je odraz sporadičnih, histološki uočljivih mesta luteinizacije teka ćelija u folikulu, sa povećavanjem koncentracije progesterona tokom većeg dela proestrusa, od 0,2–0,4 ng/ml do 2 ng/ml 1–2 dana pre LH pika (Concannon, 2011; Noakes i sar., 2018).

Metestrus je bihevioralno definisan kao prestanak ispoljavanja znakova estrusa. Kraj metestrusa i početak anestrusa definišu završene histološke promene na endometriju, postepeno smanjivanje mlečne žlezde koja je bila uvećana kao odgovor na dejstvo visokih koncentracija progesterona. Sada koncentracija serumskog progesterona pada ispod 1 ng/ml ili 2 ng/ml (Okkens i Kooistra, 2006).

Kod kuja postoje značajne individualne varijacije u trajanju anestrusa. Razlike u trajanju anestrusa između rasa i sojeva unutar rase ukazuju na genetsku osnovu varijacije interestrusnih intervala. Kod rase koli, na primer, prosečni interestrusni interval je 36 nedelja, a kod alžaškog psa iznosi 20–22 nedelje (Okkens i Kooistra, 2006). Neke rase pasa, npr. basendži i tibetanski mastif, imaju estrus jednom godišnje, na koji se možda može uticati fotoperiodom. Faktori životne sredine takođe mogu uticati na interestrusni interval: anestrična kuja smeštena u neposrednoj blizini kuje u estrusu može pokazati znake početka proestrusa nekoliko nedelja ranije nego što bi do toga inače došlo. Kuje koje su smeštene zajedno često imaju sinhronizovane polne cikluse (Okkens i Kooistra, 2006).

### 2.1.3 Pseudogruditet

Tokom polnog ciklusa kuja koje nisu parene/osemenjavane, uzastopno delovanje estrogena i progesterona izaziva rast i aktivnost mamarnog kompleksa, što se obično klinički ne manifestuje. Razlog stimulacije mlečne žlezde je još jedna fiziološka karakteristika polnog ciklusa kuja, a naziva se pseudogruditet, i nastaje usled duge lutealne faze u metestrusu koja često traje i duže od graviditeta (može i do 75 dana, Noakes i sar., 2018). U većini slučajeva ne postoje klinički vidljive promene na mlečnoj žlezdi i naziva se prikriveni (eng. *covert*) pseudogruditet (Concannon, 2011; Noakes i sar., 2018). Klinički vidljivi pseudogruditet (eng. *overt pseudopregnancy*) predstavlja hipersenzitivni odgovor mlečne žlezde, koji uključuje laktogenezu, laktopoezu, a ponekad i laktaciju, usled hormonske stimulacije u metestrusu. U drugoj polovini lutealne faze nastaje povećanje prolaktinske stimulacije mlečne žlezde koja je uobičajena u graviditetu. Učestalost pseudogruditeta može dostići 10–20% ili više kod nekih rasa, ili je skoro zanemarljiva kod drugih (npr. rasa bigl) (Concannon, 2011). Kod kuja sa pseudogruditetom prosečne serumske koncentracije prolaktina su više, dok su prosečne serumske koncentracije progesterona niže kada se uporede sa ciklusima bez kliničkog pseudogruditeta (Tsutsui i sar., 2007). Ovarijektomija tokom lutealne faze često izaziva klinički pseudogruditet, ali i ovarijektomija, luteoliza izazvana prostaglandinima ili aplikacija antiprogestina može uzrokovati povećanu aktivnosti prolaktina (Concannon, 2009). Klinički izražen pseudogruditet je praćen promenama u

ponašanju kuje koja oponaša gravidne pse pred porođaj (npr. kruženje, kopanje, gnežđenje i odbrambeno ponašanje, Concannon, 2011; Noakes i sar., 2018).

## 2.2 Kontracepcija

Kontracepcija, kontrola rađanja, prevencija graviditeta ili kontrola plodnosti odnosi se na metode sprečavanje začeca kod seksualno aktivnih jedinki. Kontracepcija je korišćena u dalekoj prošlosti, ali su tek u XX veku postale dostupne efikasne i bezbedne metode kontracepcije. Kontrola rađanja uključuje proces planiranja, zatim stavljanja na raspolaganje i korišćenje kontraceptivnih sredstava. Ljudi nekih kultura zabranjuju ili ograničavaju upotrebu kontracepcije jer veruju da je to moralno, verski i/ili politički neprihvatljivo (Hanson i Burke, 2010). Kastracija vazektomijom kod muških životinja i ligiranje jajovoda kod ženki, intrauterini ulošci (eng. *intrauterine devices*, IUD) i implantirani kontraceptivi predstavljaju najefikasnije načine kontracepcije. Međutim, ređe se koriste kontraceptivna sredstva zasnovana na hormonima kao što su oblici lekova za oralnu primenu, flasteri, vaginalni prstenovi i injekcije. Fizičke barijere kao što su kondomi, dijafragme i sunđer i kontracepciju, kao i računanje plodnih dana manje su efikasni (Padodara i sar., 2022).

Spermicidi i povlačenje mužjaka pre ejakulacije su najmanje efikasne strategije. Iako je kastracija veoma efikasna, obično nije reverzibilna; sve druge metode kontracepcije su reverzibilne, a većina je neefikasna nakon prestanka delovanja. Fizičke barijere (kondomi) kod mužjaka i ženki takođe mogu pomoći u prevenciji polno prenosivih bolesti. Međutim, drugi oblici kontracepcije su neefikasni u tome. Ako se koriste u roku od 72 h do 120 h nakon nezaštićenog parenja, upotreba kontraceptiva može sprečiti graviditet (Gizzo i sar., 2012). Svaka tehnika kontracepcije koja ima mali uticaj na životnu sredinu naziva se zelena kontracepcija. Kompanije koje se pridržavaju zelenih propisa o proizvodnji, pakovanju, transportu i bezbednom odlaganju otpada i procedura koje ne koriste hormone i imaju mali uticaj na životnu sredinu mogu se smatrati zelenom kontracepcijom (Blithe, 2016).

Metode uvođenja barijere, hormonska kontracepcija, intrauterini ulošci, kastracija i bihevioralni tretmani su primeri humanih metoda kontrole rađanja. Sredstva za urgentnu kontracepciju su efikasna do 5 dana nakon koitusa i koriste se pre ili tokom polnog akta (Padodara i sar., 2022).

Kontracepcija je neophodna kod domaćih i divljih životinja iz tri osnovna razloga. Prvo i najvažnije jeste upravljanje populacijama životinja. Kao rezultat različitih okolnosti, populacije divljih životinja mogu nekontrolisano rasti. Jeleni npr. postaju sve urbaniji u Ujedinjenom Kraljevstvu, stvarajući značajne probleme u saobraćaju na putevima, oštećenjem useva, autohtone vegetacije, vrtova i ukrasa i sl. (Rutberg i Naugle, 2007). Drugi razlog je prenošenje zoonoza između životinja i ljudi. Lajmska bolest, tuberkuloza, bruceloza, pseudobesnilo, bolest Zapadnog Nila, ptičji grip i dr. samo su neki od primera bolesti koje se mogu preneti sa divljih životinja na ljude i stoku (Fagerstone i sar., 2006). Treći faktor je gubitak životne sredine jer pojedine populacije mogu dostići neprihvatljivo visoke nivoe, što dovodi do ekološke štete ili sukoba između ljudi, domaćih i divljih životinja (Fagerstone i sar., 2006).

### 2.2.1 Istorijski kontekst kontracepcije i saznanja u oblasti kontrole plodnosti kod pasa

Hirurška kastracija, uklanjanje testisa ili jajnika, milenijumima je bila jedina pouzdana i trajna metoda kontracepcije kod domaćih životinja. Najstariji dokaz o hirurškoj kastraciji domaćih muških životinja može se pratiti do kasnog neolita (7000-6000 p.n.e). Dokumentacija vezana za hiruršku kastraciju kod muških pasa seže do drevne Kine, Sibira,

i grčke i rimske antike (Purswell i Jöchle, 2010). Vekovima, mnogi autori u književnosti raspravljaju o uzgoju i zdravstvenoj zaštiti pasa. Od 15. do 19. veka postoje svedočanstva o evropskim profesionalcima sa posebnom licencom za kastraciju mužjaka i spiskovima naknada koje su odobravale lokalne vlasti ili vladajući knezovi (Purswell i Jöchle, 2010). Veterinarska medicina s kraja 18. i u 19. veku poznaje tehnike kastracije, barem kod kućnih ljubimaca i konja (ACC&D, 2013). Godine 1975. u publikaciji britanske asocijacije veterinara male prakse (eng. *British Small Animal Veterinary Society*) pomenuto je da je svako stariji od 18 godina imao zakonsko pravo da izvrši kastraciju mačke ili psa u bilo kom trenutku do uzrasta od šest meseci, pod uslovom da se primeni adekvatan anestetik. Godine 2007. zakon je promenjen i kastraciju pasa i mačaka mogu da izvode samo veterinari (ACC&D, 2013).

U 20. veku je došlo do promena zakona i propisa koji regulišu dobrobiti životinja u nekoliko skandinavskih zemalja, kojima je bilo kakva operacija kod zdravih kućnih ljubimaca bila zabranjena. Međutim, sagledavanjem medicinskih podataka o zdravstvenim prednostima gonadektomije, kao što je smanjenje učestalosti pojave i potrebe za terapijom tumora mlečne žlezde (ženke) i ređa pojava benigne hiperplazije prostate (BPH) kod muških pasa, gonadektomija kućnih ljubimaca ponovo je postala legalna (ACC&D, 2013).

Kontraceptivni lekovi kod pasa i mačaka postaju aktuelni u drugoj polovini 20 veka. Oko 1960. progestini koji se primenjuju peroralno sve su popularniji kod žena. Istovremeno, počinje primena preparata sa istim ili sličnim aktivnim supstancama u kontroli reprodukcije pasa i mačaka. Tome je doprinelo unapređenje statusa pasa i mačaka, koji postaju pratioci, članovi porodice, pa čak i neka vrsta zamene za decu (ACC&D, 2013). Zagovornici dobrobiti životinja su u to vreme bili zabrinuti za sudbinu neželjenog i neplaniranog potomstva zbog sve većeg broja eutanaziranih pasa i mačaka iz godine u godinu, pa se pokreću edukativne kampanje za informisanje javnosti o prevenciji neželjenih legala. „Pilule za kućne ljubimce“ na bazi progestina su razvijene u Evropi i pojavile se na tržištu 1963. godine. Masovna kontrola populacije pasa i mačaka u SAD počela je početkom 1970-ih godina (ACC&D, 2013).

Progestini (jedinjenja slična progesteronu) su najčešće supstance koje su se koristile u cilju supresije estrusa kod kuja. Primenjivali su se oralno ili injekcijom, sa različitim rezultatima, i naišli na različit prijem kod veterinara i vlasnika kućnih ljubimaca. Medroksi-progesteron-acetat (MPA) u obliku tableta je bila prvi put na tržištu u Evropi 1963. U SAD je MPA bio prodavan u obliku injekcija i korišćen kod pasa sa katastrofalnim rezultatima. Uveden 1964. MPA je bio proizveden kao kristalna suspenzija dugog dejstva (4-5 meseci trajanja, Promone-E<sup>®</sup> ili Depo-Provera<sup>®</sup>). Bio je veoma efikasan u supresiji estrusa, ali je izazvao izraženu cističnu hiperplaziju endometrijuma i posledično piometru kod velikog broja pasa. Ovaj problem je rezultirao povlačenjem proizvoda sa tržišta dve godine kasnije. Pojava neželjenih dejstava MPA dovela je do toga da veterinari u SAD izgube poverenje u bilo koji vid hormonske kontracepcije i veterinarska profesija u Severnoj Americi se odlučila za strogo hiruršku kontrolu estrusa kod pasa i mačaka u to vreme (ACC&D, 2013).

### **2.3 Hirurška gonadektomija kod pasa i posledični neželjeni efekti**

Dugi niz godina hirurško uklanjanje polnih žlezda predstavljalo je jedini pouzdan i trajan metod kontracepcije kod pasa. Međutim, u mnogim zemljama rasprave o hirurškoj kastraciji i kontroverze vezane za ovu intervenciju i dalje traju i preispituju se i analiziraju povezane koristi i rizici (Reichler, 2009). Ovarijektomija, ovariohisterektomija i orhidektomija su najčešće hirurške intervencije koje se rutinski izvode u maloj praksi, a kao

zajednički termin koristi se gonadektomija (Kutzler, 2020). U SAD 64% pasa je podvrgnuto hirurškim tehnikama gonadektomije, a i izvodi se najčešće između uzrastu od 6 nedelja i 12 meseci (Travejo i sar., 2011). Činjenice koje govore u prilog gonadektomije su kontrola rasta populacije pasa, kontracepcija, modulacija nekih agresivnih i neželjenih efekata vezanih za dejstvo polnih hormona, kao i smanjenje mogućnosti izbijanja nekih zaraznih bolesti (Salvati i sar., 2018).

Kod zdravih odraslih sisara, hipotalamus luči GnRH koji stimuliše prednji režanj hipofize da oslobađa LH (Meethal i Atwood, 2005). LH stimuliše lučenje gonadnih steroidnih hormona (testosteron kod mužjaka, estrogen i progesteron kod ženki). Ovi gonadni steroidni hormoni tada negativno utiču na hipotalamus i prednji režanj hipofize da bi se smanjila sekrecija GnRH, odnosno LH. Međutim, kod gonadektomisanih sisara nema negativne povratne informacije (sprege), što rezultira cirkulišućim koncentracijama LH znatno višim od fizioloških (Kutzler, 2020). Kod gonadektomisanih pasa, serumske koncentracije LH su više od trideset puta veće od koncentracija kod intaktnih pasa (Beijerink i sar., 2007). Glavne uloga LH odnosi se na funkcionalnost reproduktivnog sistema (npr. Ovulacija i formiranje žutog tela), ali receptori za LH postoje i van reproduktivnog trakta. Njihova svrha u nereproduktivnim tkivima nije poznata, ali mogu indukovati deobu ćelija i stimulisati oslobađanje azotnog oksida (Greene i Ginther, 2015).

Komplikacije neposredno nakon gonadektomije uključuju krvarenje na mestu hirurškog reza ili iz vagine, infekciju ili dehiscenciju rane, formiranje seroma, komplikacije usled anestezije, apsces grlića materice i reakciju tkiva na materijal za šivenje, koja može dovesti i do stvaranja granuloma ili fistula (Kutzler, 2020). U dugoročne komplikacije (Tabela 1 i 2) ubrajaju se sindrom zaostalog jajnika, piometra, piometra zaostalog dela cerviksa (patrljka), fistule ili granulom patrljka, ozlede uretera, opstipacija, uretro-, veziko-, enterovaginalne i vaginoperitonealne fistule, opstrukcije kolona, pijelonefritis, urinarna inkontinencija, pararenalne pseudociste, hidronefroza i preterana gojaznost (Root Kustritz, 2012).

Tabela 1. Neželjena stanja kao posledica gonadektomije i njihova učestalost pojave kod kuja (Burrow i sar., 2005)

Neželjena stanja	Učestalost
Hirurški (operacioni) rizik	7-27%
Gojaznost	25-50%
Urinarna inkontinencija	5-12%
Osteoporoza	Eksperimentalno izazvana
Promene ponašanja	Postoje prijavljeni slučajevi

Gojaznost je ozbiljan medicinski problem koji se definiše kao prekomerno nakupljanje masti izvan fizičke i skeletne granice (German, 2006). Kod pasa sterilizacija predstavlja najveći pojedinačni faktor rizika za razvoj gojaznosti (Martin i sar., 2006). Smatra se da nastaje kod oko 68% pasa nakon gonadektomije (Lefebvre i sar., 2013). Gonadektomija uzrokuje gojaznost kroz dva glavna mehanizma: povećan apetit i usporavanje metabolizma; tj. dolazi do stimulacije unosa hrane (Haupt, 1991) i povećanja neselektivnog apetita (O'Farrell i Peachey, 1990). Kod pasa sa gonadama, unos hrane potiskuje lučenje gastrointestinalnih hormona (holecistokinina i glukagona), što rezultira ublažavanjem gladi i osećajem sitosti (Levin i sar., 1984). Međutim, u roku od nedelju dana nakon uklanjanja gonada, unos hrane se povećava za oko 20% (Haupt i sar., 1979, Jeusette i sar., 2004). Kao



razlog navodi se stimulacija LH receptora (prisutna u gastrointestinalnom sistemu nakon gonadektomije) i povećanje oslobađanja holecistokinina i/ili glukagona (Kutzler, 2020). Takođe, navodi se da su LH receptori u hipotalamusu uključeni u povećanje apetita (Daniel i sar., 2013), pošto lezije unutar ventromedijalnog hipotalamusa dovode do hiperfagije (Rozkowska i Fonberg, 1973).

Urinarna inkontinencija je nevoljno isticanje urina usled oslabljenog sfinktera uretre. Nastaje kao česta komplikacija gonadektomije kuja. Javlja se u 5% do 30% sterilisanih ženki (Angioletti i sar. 2004; Spain i sar., 2004). Sterilizacija u ranom uzrastu (pre navršenih pet meseci) može dodatno povećati rizik od pojave inkontinencije kod kuja (Spain i sar., 2004). LH receptori su eksprimirani u telu i vratu beške, kao i celom dužinom uretre (Welle i sar., 2006; Ponglowhapan i sar., 2007). Zapaženo je da kuje sa urinarnom inkontinencijom imaju značajno veći broj LH receptora u kaudalnom delu urinarnog sistema u odnosu na intaktne kuje (Coit i sar., 2009). Kontrola uriniranja se može popraviti aplikacijom estrogena (Hill i sar., 2012), agonista GnRH (Reichler i sar., 2006) ili GnRH imunizacijom (Donovan i sar., 2014), čime se smanjuje serumska koncentracija LH.

Dijabetes melitus nastaje usled poremećene sekrecije insulina sa promenljivim stepenom periferne insulinske rezistencije koja dovodi do hiperglikemije (Kutzler, 2020). Kod pasa, incidencija dijabetesa kreće se oko 0,4-1,2% (Bosch i sar., 2014), ali je primećena tendencija porasta (Guptill i sar., 2003). Kod pasa uklanjanje gonada udvostručuje rizik od razvoja dijabetesa (Marmor i sar., 1982). Iako gonadektomija povećava rizik od gojaznosti, povećana učestalost dijabetesa kod pasa nakon gonadektomije nije povezana sa gojaznošću (Rand i sar. 2004), već to može biti direktan efekat LH na pankreas (npr. hronični pankreatitis).

Hipotireoidizam je endokrini poremećaj koji nastaje kada štitna žlezda ne proizvodi dovoljne količine tiroidnog hormona (Scott-Moncrieff, 2007). Uklanjanje gonada značajno utiče na funkciju štitne žlezde i najvažniji je uzrok hipotireoze kod pasa (Pancieri, 1994). Kod 30% sterilisanih pasa razvija se hipotireoza (Milne i Hayes, 1981). LH receptori su prisutni u štitnoj žlezdi pasa u neposrednoj „blizini“ TSH (tireostimulirajući hormon) receptora (Zwida i Kutzler, 2019). Postoji mogućnost da kontinuirana aktivacija LH receptora ometa mehanizam delovanja TSH u štitnoj žlezdi, što dovodi do hipotireoze (Kutzler, 2020).

Tabela 2. Incidencija kratkoročnih i dugotrajnih komplikacija koje se mogu pripisati ovarijektomiji ili ovariohisterektomiji kod pasa (Prilagođeno iz Romagnoli i Sontas, 2010).

<sup>a</sup>Rizik od komplikacija je veći nakon ovariohisterektomije nego ovarijektomije. <sup>b</sup>ORS - sindrom zaostalog jajnika (eng. *ovarian remnant syndrome*)

	Tehnika	Incidenca	Referenca
<b>Kratkoročne komplikacije</b>			
Komplikacije zbog anestezije	OHC	3–41%	Dorn i Swist, 1977; Berzon, 1979.
Hemoragije (nekompletna ligatura/pucanje krvnih sudova)	OHC <sup>a</sup> OVE	2–79%	Berzon, 1979.
Vaginalna krvarenja	OHC <sup>a</sup> OVE	2–15%	Pearson, 1973; Berzon, 1979.
Pseudograviditet	OHC OVE	13%	Okkens i sar., 1981b
Dehiscencija šava/infekcija/apsces/edem	OHC OVE	2.7–25%	Dorn i Swist, 1977; Berzon, 1979; Janssens i

			Janssens, 1991.
Peritonitis	OHC OVE	0.3–2%	Berzon, 1979.
Dugoročne komplikacije			
<sup>b</sup> Sindrom zaostalog jajnika (ORS)	OHC OVE	17–43%	Pearson, 1973; Okkens i sar., 1981b
Ligiranje uretera/uretrovaginalna fistula	OHC	2–3%	Okkens i sar., 1981b
Granulom uterusnog/ovarijalnog tkiva	OHC OVE	6–28%	Pearson, 1973; Okkens i sar. 1981a
Granulom patrljka (eng. <i>stump</i> )	OHC	15–51%	Pearson, 1973; Okkens i sar. 1981b
Fistula usled neresorptivnog materijala	OHC	38%	Pearson, 1973
Zaostajanje gaze u abdomenu	OHC	Prijavljeno	Mai i sar., 2001
Infekcija materičnog patrljka	OHC	35%	Okkens i sar., 1981b
Gojaznost	OHC	0–50%	Dorn i Swist, 1977; Edney i Smith, 1986; Howe i sar., 2000
Defekt sfinktera uretre	OHC	3–20%	Okkens i sar., 1997
	OVE	9–21%	Arnold i sar., 1989; Okkens i sar., 1997.
Intestinalne i peritonealne adhezije	OHC	5,5%	Pearson, 1973.
ORS i tumor granulosa ćelija	OHC	Prijavljeno	Pluhar i sar., 1995.
ORS i lejomiom	OHC	Prijavljeno	Sontas i sar., 2010.
ORS i vaginalni neurofibrom	OHC	Prijavljeno	Sontas i sar., 2009.

Displazija kukova kod pasa je povezana sa abnormalnom strukturom zglobova i labavošću mišića, vezivnog tkiva i ligamenata koji normalno podržavaju zglob kuka (Dassler, 2003). Većina pasa sa displazijom kukova rađa se sa kukovima fiziološke građe, ali se kod njih usled unutrašnjih i/ili spoljašnjih faktora sekundarno razvija displazija. Incidenca displazije kuka može biti visoka, 40–83%, kod džinovskih i velikih rasa pasa (Van Hagen i sar., 2005). Nezavisno od pojave gojaznosti, gonadektomija značajno povećava incidencu displazije kuka kod pasa (Witsberger i sar., 2008). U poređenju sa polno aktivnim psima, gonadektomija povećava verovatnoću pojave displazije kuka za oko 1,5 (Van Hagen i sar., 2005) do dva puta (De La Riva i sar., 2013). Pozitivna korelacija između gonadektomije i incidencije displazije kuka je izraženija kod mužjaka (Kutzler, 2020). Mehanizam povezanosti gonadektomije sa displazijom kuka nije poznata, ali su pojedina ispitivanja pokazala ekspresiju LH receptora unutar ligamenta glave butne kosti, hijalinske hrskavice, i u subhondralnom regionu glave butne kosti (Kiefel i Kutzler, 2016).

Pored displazije kukova, uklanjanje gonada značajno povećava prevalenciju rupturu kranijalnog ukrštenog ligamenta (Duval i Budsberg, 1999), udvostručavajući pojavu u odnosu na polno aktivne pse, sa incidencom od 5,1% kod mužjaka i 7,7% kod ženki (De La Riva i sar., 2013). Zapaženo je da gonadektomija urađena pre puberteta odlaže zatvaranje ploče rasta tibije, što povećava dužinu tibije i strminu tibijalnog platoa (Osmond i sar., 2006). Povećana strmina tibijalnog platoa može povećati kranijalni tibijalni potisak, što predstavlja rizik za rupturu kranijalnog ukrštenog ligamenta (Morris i Lipowitz, 2001).

Uprkos deformacijama skeleta koje se javljaju usled prepubertetne gonadektomije (pre uzrasta od 6 meseci), čak i psi kojima je izvršena gonadektomija između 6 i 12 meseci starosti imaju povećan rizik od pucanja kranijalnog krucijalnog ligamenta (De La Riva i sar., 2013).

Uticao gonadektomije na ponašanje pasa je složen. (Neželjeni) oblici ponašanja vezani za reprodukciju (obeležavanje teritorije uriniranjem u kući, režanje i sl.) smanjuju se ili eliminišu nakon gonadektomije (Neilson i sar., 1997). Međutim, ispoljavanje straha i agresije ima tendenciju porasta (Zink i sar., 2014). Strah od oluje, pucnja i buke, ujedanje, plašljivost, separaciona anksioznost i pokorno uriniranje značajno se pojačavaju nakon gonadektomije. Iako neki psi mogu postati manje agresivni nakon uklanjanja polnih žlezda (Neilson i sar., 1997), dominantna agresija (Borchelt, 1983) i agresija usmerena na vlasnika (Reisner i sar., 2005) značajno su učestalije. Hipokampus i hipotalamus igraju važnu ulogu u kontroli ponašanja, posebno onih koji su u vezi sa strahom i agresijom. Receptori LH su u mnogobrojni u hipokampusu i hipotalamusu (Lei i sar., 1993). Takođe, aplikacija LH psima nakon gonadektomije u dozama kojima se postižu koncentracije više od fizioloških može izazivati agresiju i druge promene ponašanja (Kutzler, 2020).

Sindrom kognitivne disfunkcije je neurodegenerativni poremećaj starijih pasa, tj. karakterišu ga i kognitivne promene i neurofiziološka patologija (Oates, 2014). Kako stanje napreduje, može se javiti slabija memorija, slabije veštine rešavanja problema, društvena nepovezanost i konfuzija. Uklanjanje gonada značajno povećava razvoj i progresiju sindroma kognitivne disfunkcije kod pasa (Casadesus i sar., 2007). Povećanje koncentracije LH je povezana sa padom kognitivnih performansi. Pored toga, povećane koncentracije LH povećavaju formiranje beta-amiloidnog plaka i umešani su u razvoj Alchajmerove bolesti kod ljudi (Casadesus i sar., 2007). Moguće je da su LH i njegov receptor važni u razvoju sindroma kognitivne disfunkcije kod pasa nakon gonadektomije (Kutzler, 2020).

## **2.4 Nehirurški pristup supresiji plodnosti kod pasa**

### **2.4.1 Steroidni hormoni**

#### **2.4.1.1. Estrogeni**

Sintetički estrogeni su efikasni u supresiji LH pika, odnosno ovulacije, što ih čini dobrim kandidatima za kontracepciju. Estrogeni koji se koriste uključuju estradiol-cipionat (ECP), estradiol-benzoat (E2B), dietil-stilbestrol i mestranol (Tsusui i sar., 2006). Osim što nedostaju podaci o minimalnoj efikasnoj dozi, učestalosti i vremenu aplikacije sintetičkih estrogena, oni su povezani sa ozbiljnim neželjenim efektima. Mogu izazvati potencijalno fatalnu supresiju koštane srži i aplastičnu anemiju kod pasa, endometritis, piometru, pseudograviditet i stvaranje folikularnih cista na jajnicima (Kennelly, 1969; Bowen i sar., 1985; Sutton i sar., 1997; Weiss i Klausner, 1990). Tsusui i sar. (2006) su pokazali da jedan tretman estradiol-benzoatom može biti efikasan i siguran za rani prekid graviditeta kod pasa.

#### **2.4.1.2 Gestageni**

Sintetički analozi progesterona, koji se nazivaju progestini ili gestageni (PG), su hemijska jedinjenja koja se obično koriste za kontrolu reproduktivnog ciklusa domaćih životinja. Kod

pasa se koriste sledeći PG (Tabela 3) za privremeno (aplikacija neposredno pre početka proestrusa) ili produženo (aplikacija u anestrusu) odlaganje estrusa, ili za supresiju estrusa (aplikacija nakon početka proestrusa): medroksi-progesteron-acetat (MPA), meggestrol-acetat (MA), proligeston (PR ili PGS), hlormadinon-acetat (CMA), delmadinon-acetat (DMA), noretisteron-acetat (NTA) i melengestrol-acetat (MGA) (Romagnoli, 2006; Romagnoli i Sontas, 2010). Svi navedeni proizvodi deluju na sličan način, blokiranjem sinteze i/ili otpuštanja GnRH iz hipotalamusa (Romagnoli i Sontas, 2010).

Tabela 3. Preporučene doze najčešće korišćenih gestagenskih jedinjenja kod kuja za kontrolu estrusa (Prilagođeno iz Romagnoli i Sontas, 2010)

Gestagen	Doze
MPA	Parenteralno: 2,5–3,0 mg/kg i.m. svakih 6 meseci Oralno: 1–2 mg/kg/dan prva 4 dana, nakon toga 0,5–1 mg/kg/dan sledećih 12 dana
MA	Proestrus: $\leq 2$ mg/kg/dan oralno u periodu $\leq 2$ nedelje Anestrus: 0,5 mg/kg/dan oralno maksimalno 40 dana
DMA	0,25–5,0 mg/kg oralno svakih 24 h <10 kg TM: 1–2 mg/kg i.m, s.c. svakih 6 meseci 10–20 kg TM: 1–1,5 mg/kg i.m, s.c. svakih 6 meseci >20 kg TM: 1 mg/kg i.m, s.c. svakih 6 meseci
PR/PGS	10–33 mg/kg s.c. pa ponoviti u 3. i 4. mesecu nakon prve aplikacije, a zatim posle 5 meseci

Medroksiprogesteron acetat (MPA) je široko primenjivan progestagen dugog dejstva. Daje se na različite načine: peroralno (za supresiju estrusa kod pasa i mačaka) i kao depo preparat (uglavnom za dugoročnu supresiju estrusa kod pasa). S obzirom da se MPA sporo metabolize u jetri, efektivne koncentracije u cirkulaciji mogu se održavati 3–6 meseci nakon jedne intramuskularne injekcije (Romagnoli, 2006; Romagnoli i Sontas, 2010). Međutim, kod tretiranih životinja česte su patološke promene (Tabela 4) na materici (Kutzler, 2006). Histopatološkim nalazom nakon ovariohisterektomije ustanovljena je prevalencija lezija na materici od 45% kod kuja tretiranih u cilju supresije estrusa, u poređenju sa prevalencijom od 5% kod netretiranih životinja (Von Berky i Townsend, 1993). Takođe, supkutana primena MPA kod kuja je dovela do kliničkih znakova adrenokortikalne supresije (npr. alopecija, promena boje dlake, stanjivanje kože i mobilizacija potkožne masti) (Nelson, 1977). DMA i CMA su sintetički gestageni čije je delovanje na reproduktivni i endokrini sistem slično kao MPA (Romagnoli i Sontas, 2010).

Meggestrol-acetat (MA) je progestagen kratkog dejstva koji se pokazao korisnijim od MPA za privremeno odlaganje i supresiju estrusa (Romagnoli i Sontas, 2010). Uglavnom se aplikuje oralno (postoje i oblici za parenteralnu primenu) u dozama koje variraju u zavisnosti od faze polnog ciklusa kuja: od 0,55 mg/kg/dan tokom 32 dana u anestrusu, do maksimalne doze od 2,2 mg/kg/dan tokom 8 dana u ranom proestrusu. Međutim, osim piometre, koja nastaje kod 0,8% tretiranih kuja (Burke i Reynolds, 1975), zabeleženi su neželjeni efekti produženog MA tretmana (Tabela 4): povećan apetit koji dovodi do povećanja telesne mase, letargija ili nemir (Plumb, 2002); izražena stimulacija mamarnog kompleksa sa hiperplastičnim i/ili neoplastičnim promenama; kliničke i patološke promene tipične za dijabetes melitus (Weikel i Nelson, 1977; Beck, 1977).

Proligeston (PR ili PGS) je „najnovija“ dostupna vrsta gestagena za upotrebu kod pasa i mačaka. Deluje selektivno na hipotalamus-hipofizno-gonadnu osovinu i ima manju progestacijsku aktivnost nego drugi sintetički gestageni. Međutim, niz neželjenih efekata PR opisan je u studijama sprovedenim u Holandiji (Romagnoli i Sontas, 2010). Preporučeni režim doziranja je 10-33 mg/kg s.c. ponavlja se nakon 3 i 4 meseca, a zatim svakih 5 meseci. Međutim, može doći do pojave estrusa tokom tretmana. Kod kuja interval od poslednje aplikacije do prvog spontanog estrusa kreće se od 3 do 9 meseci (Romagnoli, 2006).

#### 2.4.1.3 Androgeni

Na sličan način kao i gestageni, primena androgena kod kuja inhibira oslobađanje GnRH zbog negativne povratne sprege na osovinu hipotalamus-hipofiza-gonade. Kao najčešće primenjeni androgeni navode se testosteron (i njegovi estri) i miboleron. Androgeni receptori su identifikovani u ciljnim tkivima estrogena, pa primena androgena može izazvati smanjenje funkcionalnog odgovora tkiva na estrogen (Romagnoli i Sontas, 2010). Aplikaciju androgena treba započeti kada je životinja u prvoj polovini anestrusa, jer kasnija primena može biti neefikasna (Kutzler i Wood, 2006). Kada se primenjuju u visokim dozama (Tabela 4), ili predugo, kod pogrešne indikacije (pacijentu), ali i nakon hroničnog tretmana u normalnim dozama, androgeni mogu izazvati neželjene efekte. To mogu biti hipertrofija klitorisa i vaginitis (najčešći), virilizacija, maskulinizacija ženskih fetusa (nenamerna primena tokom graviditeta), mošusni miris tela, urinarna inkontinencija, prskanje urina, zadebljanje grlića materice i epifora (Kutzler i Wood, 2006; Romagnoli i Sontas, 2010).

Predoziranje androgenima može dovesti do pojave zadebljanja paraanalnih žlezda i posledičan nastanak neprijatnog mirisa. Neželjeni efekti nakon hronične upotrebe miboleronu u efikasnim dozama uključuju fibrom jajnika, atrofiju endometrijuma i vaginalne sluzokože. Upotreba androgena se ne preporučuje u sledećim slučajevima (Kutzler i Wood, 2006; Romagnoli i Sontas, 2010):

- kuje namenjene za kasniji priplod;
- kuje starije od 7 meseci zbog ranog zatvaranja epifize;
- kuje rase bedlington terijer, zbog genetske predispozicije za hronični progresivni hepatitis;
- gravidne životinje;
- kuje sa androgen-zavisnim neoplazmama;
- životinje sa bolestima jetre ili bubrega

Tabela 4. Najvažniji neželjeni efekti gestagena, androgena i agonista GnRH na reproduktivni sistem, mlečnu žlezdu, telesna masu (TM) i ponašanje kuja (Prilagođeno iz Romagnoli i Sontas, 2010)

Neželjeno dejstvo	Gestageni	Androgeni	GnRH agonisti
Povećana frekvenca GnRH pulsa			√ <sup>a</sup>
Smanjena frekvenca GnRH pulsa	√	√	√ <sup>b</sup>
Supresija ovarijalne aktivnosti	√	√	√ <sup>b</sup>
Supresija motiliteta uterusu	√	√	√ <sup>b</sup>

Supresija adrenokortikalne osovine	√		
Povećana sekrecija Prol i STH	√		
Insulinska rezistencija	√		
Endometrijalna proliferacija i sekrecija	√		√ <sup>c</sup>
Atrofija endometrijuma		√	
Zatvaranje cerviksa	√	√	√ <sup>d</sup>
Proliferacija mlečne žlezde	√		√ <sup>c</sup>
Atrofija mlečne žlezde		√	√
Prekid laktacije	√	√	√
Nastanak fetalnih defekata	√	√	
Odlaganje porođaja	√		√ <sup>e</sup>
Povećan apetiti i TM	√	√	
Vaginitis		√	
Povećan libido/agresivnost		√	
Anabolički efekat		√	
Smanjen libido/agresivnost	√		
Hipertrofija klitorisa		√	
Urinarna inkontinencija		√	
Promena boje kože	√	√	
Rast analnih žlezda		√	
Zadebljanje cervikalnog epitela		√	
Epifora		√	
Zatvaranje epifiza kod prepubertalnih pasa	√	√	

<sup>a</sup>Prisutan samo tokom 2–4 nedelje nakon tretmana, nakon čega nestaje. <sup>b</sup>Pojavljuje se kad protekne 2-4 nedelje od tretmana. <sup>c</sup>Prisutan samo tokom 2-4 nedelje nakon tretmana kod kuja kojima je implantiran deslorelin tokom diestrusa. <sup>d</sup>Održava se kod kuja kojima je implantiran u anestrusu. <sup>e</sup>Prisutan ako je implantiran tokom poslednjeg trimestra graviditeta.

#### 2.4.2 Genska terapija (eng. „gene silencing“)

Otkriće male interferirajuće RNK (siRNA) ili mikro-RNK molekula i njihova sposobnost da vezuju specifične gene i inhibiraju njihovu ekspresiju postavili su nove ciljeve u razvoju terapeutika (Soutschek i sar., 2004). Da bi siRNA dospela do njihove mete, i da bi se osigurala ekspresija RNK određeno vreme u cilju produžavanja efekta, koriste se virusni vektori. Dugi niz godina se koriste genetski modifikovani virusi kao vektori za unošenje gena u ćelije (Rhodes, 2017). Posle deset godina usavršavanja, još uvek postoje velike prepreke za proizvodnju RNK molekula i njihov transport do odgovarajućih ćelija (Rhodes, 2017). Određene kompanije (npr. Alnylam Pharmaceuticals) razvijaju siRNK formulacije za lečenje amiloidoze i porfirije primenom ovog mehanizma delovanja. U veterinarskoj medicini, genska terapija hemofilije kod pasa rezultirala je obnavljanjem normalne funkcije koagulacije tokom života lečenih pasa (Herzog i sar., 2001; Niemeyer i sar., 2009).

Za supresiju reproduktivnih ili bilo kog drugog gena, neophodne su tri stvari: definisati specifični gen za „isključivanje“, odabrati virusni vektor koji treba da isporuči siRNA potrebnu za supresiju tog gena i osigurati da siRNA dođe do ćelija koje eksprimiraju gen (Rhodes, 2017).

Jedan od pristupa koji se istražuje je konstrukcija virusnog vektora koji cilja na kispeptin, peptid koji je neophodan za inicijaciju GnRH sekrecije (Albers-Wolthers i sar., 2014; Dissen i sar., 2012). Virusni vektor mora isporučiti siRNA do neurona hipotalamusa koji luče kispeptin, što je otežano zbog prisustva krvno-moždane barijere. Međutim, ako bi se pravi hipotalamusni neuroni koji luče GnRH mogli locirati, taj virusni vektor bi mogao uzrokovati kontinuiranu proizvodnju siRNA čime bi se zaustavila reproduktivna aktivnost. U tom slučaju, jedan proizvod bi teoretski mogao da funkcioniše i kod muških i kod ženskih pasa tokom celog životnog veka (Rhodes, 2017).

Dissen i sar. (2014; 2016) su razvili metod za isporuku siRNA u hipotalamus mačaka koristeći adeno-povezani virus (AAV) u cilju isključivanja centralnih reproduktivnih gena, kao što su Kiss1 i Tac2. Ovi regioni kodiranja su zajednički za psi i mačke. Roesl i sar. (2016) su opisali mikro-RNK koji će potisnuti ekspresiju gena odgovornih za receptore za androgen u Sertolijevim ćelijama. Oni su pokazali da su muški miševi kojima je dat ovaj preparat neplodni do 5 meseci (kada je eksperiment prekinut).

Proučava se izvodljivost ubacivanja gena koji izazivaju prekomernu ekspresiju gonadotropin-inhibirajućeg hormona (GnIH) ili Mullerova inhibiciona supstanca (MIS). GnIH bi potencijalno mogao smanjiti sintezu i oslobađanje GnRH (Tsutsui i sar., 2010). MIS reguliše regrutaciju primordijalnih folikula kod odraslih ženki i proizvodnju testosterona kod odraslih muških mačaka i pasa (Pepin i sar., 2016). Pretpostavlja se da se isporukom gena koji bi mogao da izrazi dovoljno visoke nivoe MIS tokom životnog veka pasa i mačaka može potisnuti regrutovanje folikula kod ženki i smanjiti sinteza testosterona kod mužjaka što rezultira neplodnošću (Rhodes, 2017).

Genska terapija se takođe može koristiti za isporuku gena koji bi postigao kontinuirano lučenje anti-GnRH monoklonskih antitela. Pasivni imuni odgovor bi trebalo da omogući proizvodnju dovoljno visokog titra antitela koji bi mogao da inaktivira GnRH, što bi dovelo do neplodnosti. Rezultati pionirskog rada pokazali su se dobrim: geni su isporučeni mužjacima i ženkama miševa pomoću AAV vektora koji izazivaju prekomernu ekspresiju monoklonskih antitela protiv GnRH i proteina zone pelucide koji izazivaju supresiju plodnosti u trajanju preko 6 meseci (Li i sar., 2015).

Još jedan od pristupa jeste korišćenje mikro-RNA tehnologije za inhibiciju ekspresije receptora za androgen u testisima, s obzirom da je stimulacija androgena neophodna za normalnu funkciju testisa i proizvodnju spermatozoida. Roesl i sar. (2016) opisuju isporuku mikro-RNK koji će potisnuti ekspresiju gena odgovornih za receptore androgena u Sertolijevim ćelijama.

Gameti se takođe mogu ciljati korišćenjem genske terapije; postoje mali molekuli RNK za koje se zna da su od vitalnog značaja za sazrevanje jajnih ćelija i spermatozoida. Ometanje ovih RNK molekula, koji su jedinstveni za gamete, još jedna je zanimljiva meta za siRNA (Fu i Wang, 2014; He i sar., 2009).

#### 2.4.3 Imunokontracepcija

Imunokontracepcija je aktivna imunizacija protiv antigena važnog za reproduktivnu funkciju, čiji će imuni odgovor suprimirati reproduktivnu aktivnost. GnRH, LH, FSH ili proteini zone pelucide su mogući antigeni poreklom od domaćina, za razliku od stranih proteina poreklom od bakterija ili virusa. Za snažan, odgovarajući imuni odgovor protiv sopstvenog antigena, potrebni su različiti adjuvansi i konjugati (Rhodes, 2017).

Istovremeno, istražuju se biomaterijali koji sporo oslobađaju antigen tokom dužeg vremenskog perioda ili obezbeđuju „samopojačavanje“ imunog odgovora nakon jedne injekcije. Pulsirajuće oslobađanje antigena je poželjnije od sporog oslobađanja, jer izlaganje antigenu sa sporim oslobađanjem može izazvati imunu anergiju. Drugi pristup za dugoročnu isporuku antigena je upotreba virusnih vektora koji eksprimiraju GnRH, proteinske zone pelucide ili druge reproduktivne antigene i mogu ostati aktivni unutar domaćina tokom života, čime se obezbeđuju kontinuirana imunizacija (Munks, 2012).

Stvaranje imunološkog odgovora koji indukuje antitela na GnRH je obećavajuća meta jer je GnRH dekaeptid koji kada je efikasno imunološki suprimiran, rezultira supresijom svih hormona važnih za reprodukciju, uključujući LH, FSH, estradiol i testosteron kod oba pola. Postoje GnRH vakcine za bezbedno suprimiranje reproduktivne aktivnosti kod mačaka (Enright i Swift, 1995) i pasa (Jung i sar., 2005), ali su neophodne ponovne vakcinacije u određenim intervalima da bi se održao dovoljno visok titar anti-GnRH antitela. Za dalji razvoj ovog pristupa potrebno je usavršavanje metoda kako bi se produžilo trajanje imunološkog odgovora na GnRH, ponovna vakcinacija učinila nepotrebnom i omogućilo održavanje anti-GnRH antitela duži vremenski period. Kada je reč o imunokontracepciji, istražuju se tri nove oblasti: upotreba novih antigena, novi načini ekspresije antigena i novi načini povećanja imunog odgovora (Rhodes, 2017).

Imunizacija protiv antigena jajnika je među prvim predloženim pre više od 30 godina kada je otkriveno da su zečevi izloženi tkivu jajnika hrčka proizvodili antitela koja blokiraju oplodnju. Zona pelucida (ZP) je zaštitni sloj proteinske, acelularne, želatinozne građe koji pokriva spoljašnju površinu jajnih ćelija sisara. Sastoji se od tri glikoproteina: ZP1, ZP2 i ZP3. Spermatozoidi se vezuju za ZP da bi oplodjenje bilo moguće (Cathey i Memon, 2010). Primenom transmisione elektronske mikroskopije i imuno-gold bojenja ustanovljeno je da kod pasa i mačaka oocit produkuje ZP (Barber i sar., 2001). Spermatozoidi se specifično vezuju za ZP3 receptor i prolaze kroz akrozomsku reakciju, koja rezultira oslobađanjem enzima koji razlažu ZP, dozvoljavajući spermatozoidima da uđu i spoje se sa oocitom (Aitken i sar., 1996). Antitela protiv ZP blokiraju receptorska mesta spermatozoida. Receptor ZP3 ima jedinstvene epitope, koji ga čine idealnim ciljnim mestom za imunokontracepciju. Međutim, imunizacija ZP proteinima iste vrste životinja ima slab efekat (Dunbar, 1983). U razvoju vakcina korišćen je ZP3 (pZP3) poreklom od svinja jer je lako dostupan i ima antigensku sličnost sa ZP3 pasa i mačaka (Aitken i sar., 1996).

Iako je vakcinacija protiv pZP3 dovela do neplodnosti kod 75% kuja (Mahi-Brown i sar., 1985; Srivastava i sar., 2002), vakcinacija protiv proteina rekombinantne zona pelucide dva pasa (rec-dZP2) nije uspela da spreči graviditet kod kuja (Srivastava i sar., 2002). Posle imunizacije sa pZP3, serumske koncentracije progesterona nisu rasle tokom estrusa, što ukazuje na neuspešne ovulacije kao uzrok neplodnosti, a ne blokadu mesta vezivanja spermatozoida (Mahi-Brown i sar., 1982). Imunokontracepcija pasa inhibicijom pZP3 je praćena nepravilnim razvojem folikula usled atretičnih promena u ZP (Srivastava i sar., 2002). Kod 64% kuja imunizovanih svinjskim ZP3, kao najčešća patologija navode se ciste na jajnicima (Mahi-Brown i sar., 1988). Kuje imunizovane sirovim PZP proteinima imale su folikularne ciste obložene tankim slojem granuloza ćelija (Mahi-Brown i sar., 1988). Kuje imunizovane delimično prečišćenim PZP proteinima imale su ciste jajnika koje su bile obložene bazalnom membranom sa grupom luteinizovanih ćelija (Mahi-Brown i sar., 1988). Ove histološke promene su objasnile nepravilnosti polnog ciklusa (produženo proestrualno krvarenje i estrusno ponašanje) koje su primećene kod kuja nakon imunizacije sa pZP3. Smatra se da je patofiziologija ovih promena jajnika imunološki posredovana (Mahi-Brown i sar., 1988). Kod nekih kuja sa visokim titrom anti-ZP3 antitela nakon vakcinacije javljao se



ooforitis kao posledica autoimunog odgovora na ZP T-ćelijske epitope, što je rezultiralo trajnom sterilizacijom (Mahi-Brown i sar., 1985).

#### 2.4.4 GnRH agonisti

GnRH stimuliše proizvodnju i lučenje FSH i LH, utičući na gonade koje dalje regulišu proizvodnju steroida, spermatogenezu, razvoj folikula i ovulaciju (Hull i Kenigsberg, 1987; Fontaine i Fontbonne, 2011). Agonisti GnRH se proizvode sa izmenjenim aminokiselinskim rasporedom u odnosu na prirodni GnRH molekul, sa ciljem da duže deluju i imaju duže poluvreme eliminacije (Schäfer-Somi i sar., 2022). Produžena aplikacija GnRH i njegovih agonista dovodi do desenzibilizacije i negativne povratne sprege za GnRH-receptore u hipofizi, koji potiskuju sekreciju gonadotropina i inhibiraju osovину hipofiza–gonade, što je i dokazano kod pasa (Vickery i sar., 1989; Trigg, 2001). Razvoj agonista GnRH sporog oslobađanja ima dugu istoriju, a u međuvremenu su potkožni implantati postali dostupni. Od njih se očekuje da imaju dugoročni efekat, da tokom nekoliko meseci utiču na plodnost kod mužjaka i ženki pasa (Schäfer-Somi i sar., 2022). Dva GnRH agonista su najčešće korišćena kod pasa za supresiju funkcije testisa: deslorelin i azagli-nafarelin (Driancourt i Briggs, 2020). Agonisti GnRH se mogu koristiti za indukciju i supresiju estrusa kod kuja (Fontaine i Fontbonne, 2011; Trigg, 2001; Rubion i sar., 2006; Fontaine i sar., 2011; Walter i sar., 2011). Deslorelin je agonista GnRH sa sporim oslobađanjem: implantat sa 4,7 mg dejstvene supstance u početku je bio licenciran za kontracepciju kod mužjaka pasa, i implantat od 9,4 mg za istu svrhu kod mužjaka pasa i feretki. U međuvremenu, deslorelin je uspešno korišćen van indikacija za koje je registrovan, za odlaganje puberteta, bez uticaja na funkciju jajnika i razvoj tela kod mužjaka i ženki pasa (Lacoste i sar., 1989; Trigg i sar., 2006; Sirivaidyapong i sar., 2012; Kaya i sar., 2015; Kaya i sar., 2017; Schäfer-Somi i sar., 2018).

Kod kuja srednje veličine tela, aplikacija deslorelina od 4,7 mg i 9,4 mg suprimira pojavu puberteta do >2 godine života (Kaya i sar., 2015). Aplikacija deslorelina nakon puberteta izaziva supresiju aktivnosti jajnika, a posle prestanka delovanja nema negativnog uticaja na funkcionalnost jajnika i cikličnost (Kaya i sar., 2017). Tokom supresije i nakon prvog estrusa patološke pojave u materici nisu bile češće nego kod netretiranih kuja (Schäfer-Somi i sar., 2018). Iako se dugoročni efekti odlaganja puberteta korišćenjem deslorelina (uticaj na zglobove, razvoj tumora, imuni sistem i ponašanje) još ispituju, dosadašnji rezultati pružaju nadu da će primena biti uspešna (Schäfer-Somi i sar., 2022). Nakon gonadektomije uočeno je povećanje koncentracija LH i FSH koje se može sprečiti korišćenjem supkutanog implantata agonista GnRH, jer postoje dokazi negativnog efekta povećane koncentracije LH na zdravlje gonadektomisanih pasa (Ettinger i sar., 2019).

##### 2.4.4.1 Odlaganje puberteta kod kuja

Rezultate ispitivanja suprimiranja puberteta kod kuja je teško uporediti zbog velikih razlika u dizajnu eksperimenata (Schäfer-Somi i sar., 2022). Jedna od nedoumica u literaturi je korišćenje termina „vreme do puberteta“ (nakon ugradnje implantata) ili „starost u pubertetu“, pošto se koriste oba termina u istu svrhu. Definicija estrusa je nedosledna: u nekim izučavanjima on se definiše kao povećanje broja kornifikovanih ćelija na vaginalnom citološkom brisu i povećanje koncentracije estradiola (E2) u serumu (Kaya i sar., 2013, 2015; Marino i sar., 2014), dok kod drugih autora to je pojava otoka vulve i/ili vaginalnog iscetka, ponekad u kombinaciji sa povećanjem indeksa superficijalnih ćelija (SCI) i/ili povećanjem koncentracije progesterona u serumu (Trigg i sar., 2006; Kaya i sar., 2013, 2015). Takođe, u studijama su korišćeni različiti agonisti GnRH koji su primenjivani

različito vreme. Concannon i sar. (1988) je opisao efekat supkutane osmotske pumpe koje konstantno isporučuju agonist GnRH sličan nafarelinu tokom jedne godine; drugi su primenjivali 100 g injekcionog agonista GnRH SID tokom 23 meseca. Što se tiče implantata, upotrebljavani su oni sa 18,5 mg azagli-nafarelina (Rubion i sar., 2006), kao i 4,7 mg (Fontaine i sar., 2012; Kaya i sar., 2013; Marino i sar., 2014), 9,4 mg [Trigg i sar., 2006; Fontaine i sar., 2012; Kaya i sar., 2015) i 18,8 mg deslorelina (Faya i sar., 2018). Neka ispitivanja su rađena bez kontrolne grupe pasa (Lacoste i sar., 1989; Fontaine i sar., 2012).

#### 2.4.4.2 Vreme aplikacije implantata

Starost životinje na početku istraživanja je varijabilna, gde su najmlađe jedinke kojima je aplikovan implantat bile stare jedan dan (Faya i sar., 2018), a druge 5,3 meseca (Fontaine i sar., 2012). Međutim, starost na početku puberteta je važan faktor, jer kod pasa rase bigl, povećanje FSH i LH, kao i DHEA (dehidro-epi-androsteron) se javlja već u uzrastu od četiri meseca (Concannon i sar., 1997). Ugradnja implantata deslorelina kod kuja starijih od četiri meseca, kao što je rađeno u nekim ogleđima (Trigg i sar., 2006; Fontaine i sar., 2012), može biti prekasno, a tako dobiveni rezultati diskutabilni (Schäfer-Somi i sar., 2022). Sa druge strane, pojedini autori su se odlučili za detaljniji i objektivniji pristup, pa su kuje klinički pregledane što je, između ostalog, uključivalo određivanje vaginalne citologije i merenje hormona (P4, E2, DHEA i drugi steroidni hormoni, Lacoste i sar., 1989; Kaya i sar., 2013, 2015; Marino i sar., 2014), čak su rađeni i radiografski pregledi na mesečnom nivou da bi se odredio momenat zatvaranja epifiza (Kaya i sar., 2015).

#### 2.4.4.3 Trajanje supresije puberteta

Jedan od prvih pokušaja supresije polnog ciklusa svakodnevnom injekcijom agonista GnRH (100 µg) kod 9 juvenilnih kuja tokom 23 meseca, odložio je pubertet u trajanju od 4 do 12 meseci od zadnje aplikacije (Lacoste i sar., 1989). Ovaj ogleđ istakao je efikasnost agonista GnRH. Kasnije su uvedeni dugodelujući potkožni implantati agonista GnRH, koji su pokazali visoku efikasnost u mnogim ispitivanjima (Schäfer-Somi i sar., 2022).

Rubion i sar. (2006) su nasumično raspoređivali kuje u tretiranu ili kontrolnu grupu u dobi od  $4,88 \pm 0,32$  meseca. Ogleđne kuje su primale 18,5 mg azaglinafarelina u vidu potkožnih implantata. Kuje nisu pokazivale znake estrusa (oticanje vulve i vaginalno krvarenje), a cikličnost je potisnuta tokom 24 meseca. Ovo su rezultati jedinog ispitivanja gde je implantat uklonjen nakon godinu dana. Međutim, redovna vaginalna citologija i merenja serumske koncentracije estrogena nisu rađena da bi se sa sigurnošću potvrdilo da je estrus izostao. Navedena metodologija je obavezna za procenu dugoročnog efekta agonista GnRH u cilju upoređivanja sa rezultatima drugih studija (Schäfer-Somi i sar., 2022).

U drugom ogleđu (Trigg i sar., 2006), štenci su detaljno pregledani pre aplikacije implantata (9,4 mg deslorelina) i raspoređeni u tri grupe (I grupa - implantat u 4 meseca; II grupa – implantat sa 7 meseci; i III kontrolna grupa gde je aplikovan placebo sa 4 meseca). Otok vulve, vaginalni iscedak i citologija, kao i povećanje serumske koncentracije progesterona  $>2$  ng/mL bili su parametri koji su praćeni u cilju otkrivanja prvog estrusa. Trigg i sar. (2006) su jasno pokazali da aplikacijom implantata kod kuja uzrasta 4 meseca i kod kuja u prepubertetskom periodu (7. mesec), nijedan od znakova estrusa nije primećen u periodu trajanja eksperimenta, gde je u drugoj grupi kuja (aplikacija u 7. mesecu starosti) anestrija trajala 9 meseci. Kao nedostatak dizajna eksperimenta navodi se potreba dužeg perioda praćenja kuja, koji bi omogućio procenu srednjoročnih i dugoročnih efekata odlaganja puberteta.

Fontaine i sar. (2012) koristili su implantat deslorelina od 9,4 mg za odlaganje puberteta kod kuja starih prosečno 4,2 meseca. Implantat od 9,4 mg je aplikovan kod 11 kuja, a od 4,7 mg je primenjen kod 16 kuja. Raspon telesne mase bio je između 3 i 40 kg, ali se ne navodi prosečna telesna masa, kao ni koje od kuja su primile koji implantat. Ujednačenije grupe životinja bi poboljšale prilično subjektivno vrednovanje efekata deslorelina u datom ispitivanju. Efekat kod veoma krupnih rasa može biti doveden u pitanje zbog kasnog nastanka puberteta, što se često dešava kod kuja sa velikom telesnom masom. Takođe, detekciju estrusa su radili vlasnici pasa, koji su pozivali kliniku kada bi primetili znake estrusa, što je vrlo diskutabilno. Pregled kuja u estrusu je obavljen na kraju estrusa, zabeleženi su neželjeni efekti i izmeren progesteron. U grupi kuja koje su dobile implantate od 9,4 mg nije detektovan estrus u periodu posmatranja od 8 do 15 meseci. Međutim, zbog metodologije tj. činjenice da su estrus detektovali vlasnici pasa, postoji mogućnost da nije svaki estrus zabeležen.

Korišćenjem implantata od 4,7 mg kod četiri kuje starosti 4,3 meseca i 9,4 mg implantata kod pet kuja starih 4,2 meseca, Kaya i sar. (2015) su uočili pojavu puberteta u uzrastu od 18 do 25 meseci. Koncentracija deslorelina nije uticala na trajanje supresije estrusa. Međutim, relativno mali broj kuja je učestvovao u ovim ispitivanjima. Kod četiri kuje koje su primale 0,9% NaCl (kontrolna grupa), pubertet je nastupio u proseku nakon 15 meseci.

U ispitivanjima koja su uradili Faya i sar. (2018), upareni su mešanci prosečne telesne mase 13 kg, a novorođeni muški i ženski štenci su nasumično raspoređeni u eksperimentalnu i kontrolnu grupu prvog dana života. Eksperimentalna grupa je dobila dva 9,4 mg implantata deslorelina supkutano u predelu leve i desne lopatice. Štenci su jednom nedeljno pregledani radi praćenja anatomskog razvoja (visina u grebenu, telesna masa, obim skrotuma) i znakova estrusa, a u krvi je određivan estradiol (E2) i testosteron (T). Kontrolama je aplikovan supkutani placebo implantat. Starost u pubertetu bila je skoro udvostručena u eksperimentalnoj grupi (72 nedelje) u poređenju sa kontrolom (39,3 nedelje) i rezultati su uporedivi sa efektom tretmana kod štenaca starih 4–5 meseci iz drugih ispitivanja (Fontaine i sar., 2012; Marino i sar., 2014; Kaya i sar., 2015). Jedna od prednosti dizajna studije je da su štenci očigledno bili u prepubertetnom dobu od aplikacije implantata, ali se neophodnost ovakvog ranog tretmana dovodi u pitanje (Schäfer-Somi i sar., 2022). S obzirom da su neželjeni efekti kao što je perivulvarni dermatitis i uzlazne infekcije urogenitalnog trakta česte nakon prepubertetne kastracije (Joshua, 1965; Jagoe i Serpell, 1988; Salmeri i sar., 1991), opservacije tokom prvih godina života razjasniće da li se neželjeni efekti mogu sprečiti upotrebom dugotrajnog agonista GnRH.

Trajanje supresije estrusa je teško predvideti jer može zavisiti od drugih faktora kao što su mesto aplikacije, mehanizam resorpcije i individualni metabolizam. Još uvek nije razjašnjeno da li kod kuja trajanje supresije puberteta zavisi od doze, pošto je ono bilo slično sa implantatima deslorelina od 4,7 mg i 9,4 mg (Trigg i sar., 2006; Fontaine i sar., 2012; Marino i sar., 2014; Kaya i sar., 2015).

#### 2.4.4.4 Uticaj na anatomske razvoj jedinke

U većini ispitivanja vezanih za prepubertetnu aplikaciju GnRH agonista, eksperimentalne životinje i kontrole su imale jednaku visinu grebena i telesnu masu u pubertetu (Lacoste i sar., 1989; Rubion i sar., 2006; Fontaine i sar., 2012; Kaya i sar., 2013, 2015; Faya i sar., 2018). Dobijeni rezultati se razlikuju od ranijih rezultata posle prepubertetne gonadektomije, kada je zabeleženo odloženo zatvaranje zona rasta dugih kostiju kod mačaka i pasa (Salmeri i sar., 1991; von Pfeil i sar., 2009).

U studiji koju su uradili Kaya i sar. (2015), radiografska snimanja su rađena jednom mesečno sve do zatvaranja epifize. Zabeleženo je da razvoj konstitucije i spoljašnjih genitalnih organa nije bio izmenjen, ali je zatvaranje epifize bilo odloženo pa se lokalni efekat polnih steroida na vulvu ne može isključiti. Osetljivost estrogenskih receptora se povećava tokom puberteta, a gustina receptora i individualna osetljivost takođe mogu igrati ulogu.

#### 2.4.4.5 Uticaj na matericu, jajnike i plodnost

Odlaganje puberteta primenom implantata od 4,7 mg i 9,4 mg deslorelina nije izmenilo funkcije jajnika, materice i plodnost jedinke (Lacoste i sar., 1989; Fontaine i sar., 2012; Kaya i sar., 2013, 2015; Faya i sar., 2018). Lokalni uticaj deslorelina na supresiju jajnika i nastavak ciklične aktivnosti jajnika nakon prestanka delovanja agonista GnRH istražili su Kaya i sar. (2017). Autori nisu primetili dugoročni efekat na lutealnu funkciju nakon prvog estrusa. Nisu postojale makroskopske ni mikroskopske promene u tkivu materice, niti je uočena razlika između kuja tretiranih deslorelinom, kojima je izvršena OHC nakon njihovog prvog estrusa, i kontrola (Kaya i sar., 2017). Odlaganje puberteta nije uticalo na plodnost jedinki posle nastavka cikličnosti jajnika (Lacoste i sar., 1989; Faya i sar., 2018). Dva šteneta kojima je aplikovan deslorelin u dozi od 18,8 mg tokom prva 24 h života, nakon parenja tokom prvog estrusa posle supresije estrusa dijagnostikovao je graviditet (Faya i sar., 2018). Deslorelin nije uticao na plodnost ni kod odraslih kuja nakon nastavka cikličnosti, pod uslovom da je ispoljen fiziološki estrus (Borges i sar., 2015).

#### 2.4.4.6 Uticaj na ponašanje kuje

Promene ponašanja kod odraslih pasa oba pola nakon hemijske reverzibilne supresije estrusa korišćenjem agonista GnRH uglavnom se javljaju kao rezultat prolazne seksualne stimulacije neposredno nakon primene analoga GnRH (Strom i sar., 2010; De Gier i sar., 2013; Goericke-Pesch, 2017). Iako ovaj period varira individualno, uglavnom se ispoljava tokom prve dve nedelje, a zatim nestaje sa potisnutim oslobađanjem gonadotropina. U cilju sprečavanja indukcije estrusa, korišćeni su različiti tretmani, kao što je promena vremena ugradnje implantata, korišćenje egzogenih progestina, acilina, anastrozola, klomifen-acetata ili osateron-acetata. Dobijeni su kontroverzni, nezadovoljavajući rezultati (Anjolras, 2011; Maenhoudt i sar., 2014; Masson i sar., 2021).

### 3. CILJ I ZADACI

Osnovni cilj doktorske disertacije jeste određivanje dužine kontraceptivnog perioda nakon aplikacije agoniste GnRH kod juvenilnih kuja u prepubertetnom periodu i utvrđivanje efekata na hormonski status (estrogen, progesteron, melatonin), kao i na pojavu normalnog fiziološkog estrusa nakon perioda supresije.

Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije utvrdili bi dužinu delovanja GnRH superagoniste prilikom njegovog aplikovanja prepuberalnim kujama, kao i njegov uticaj na pojavu estrusa i hormonalni status nakon prestanka delovanja. Sagledala bi se mogućnost primene GnRH superagoniste u svakodnevnoj kliničkoj praksi kod juvenilnih kuja, posebno onih visokovrednih, čiji vlasnici žele bezbednu reverzibilnu kontracepciju bez narušavanja hormonskog i zdravstvenog statusa, a što se drugim kontraceptivnim tehnikama često ne može postići.

U skladu sa postavljenim ciljem, definisani su sledeći zadaci rada:

- Odabir 12 zdravih juvenilnih (uzrast do 4 meseca) kuja mešanaca, slične konstitucije i telesne mase; nasumično raspoređivanje jedinki u eksperimentalnu i kontrolnu grupu (po 6 kuja).
- Procena zdravstvenog stanja reproduktivnog trakta juvenilnih kuja ultrazvučnim pregledom i uzimanjem vaginalnih citoloških i mikrobioloških briseva.
- Procena hormonskog statusa odabranih kuja određivanjem serumskih koncentracija progesterona i estrogena, merenjem otpora vaginalne sluzi i uzimanjem citoloških vaginalnih briseva.
- Aplikacija implantata GnRH (Suprelorin 4,7 mg, Virbac, France) u regiji pupka (supkutano) eksperimentalnoj grupi kuja.
- Aplikacija placebo injekcija, 2 ml 0,9% NaCl, u regiji pupka (supkutano) kod 6 kuja u kontrolnoj grupi.
- Prikupljanje uzoraka jednom mesečno i to: citološki i mikrobiološki vaginalni brisevi, vađenje krvi za hormonske analize (estrogen, progesteron i melatonin) i merenje otpora vaginalne sluzi do pojave prvog estrusa.
- Statistička obrada dobijenih podataka vezanih za hormonski status, vreme do pojave prvog estrusa. Poređenje podataka dobijenih u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi kuja. Kritička komparacija sa vrednostima opisanim u stručnoj i naučnoj literaturi.

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1 Etička izjava**

Istraživanja u okviru ove disertacije usklađena su sa međunarodnim i nacionalnim propisima koji se tiču nege i upotrebe životinja u eksperimentalne svrhe. Dobijeno je odobrenje nadležnih institucija (Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, Rešenje br. 323-07-07459/2020-05) i pismena saglasnost vlasnika svih životinja.

### **4.2 Mesto i vreme istraživanja**

Klinički pregled i odabir životinja za ogled, aplikacija deslorelina, uzorkovanje materijala kao i deo analiza uzoraka urađeni su na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Određivanje koncentracija progesterona, estrogena i melatonina u krvnom serumu urađeno je u veterinarskoj laboratoriji za kliničku dijagnostiku VetLab (Beograd, Srbija). Sva istraživanja i statistička obrada podataka obavljena su u periodu od 2019. do 2023. godine.

### **4.3 Materijal**

#### **4.3.1 Životinje koje su korišćene u istraživanju**

Za potrebe istraživanja odabrano je 12 vlasničkih kuja mešanaca. Kriterijumi za uvođenje jedinki u ogled su sledeći:

- 1) Uzrast kuja 3-4 meseca (pre nastanka puberteta);
- 2) Slična konstitucija i telesna masa, od 10 do 15 kg;
- 3) Sve kuje su držane u istim kućnim uslovima, sa sličnim vremenom boravka u kući i van nje;
- 4) Hranjene su istom komercijalnom granuliranom hranom u skladu sa starosnom kategorijom.

Materijal koji je korišćen u istraživanju jeste vaginalni citološki i mikrobiološki brisevi, vaginalni iscedak, krvni serum, ultrazvučni nalaz.

Nakon odabira životinja, nasumično su podeljene u dve grupe od po 6 jedinki. Prvu grupu su činile kuje kojima je aplikovan implantat deslorelina (tretirana, DESLO grupa), a druga grupa je bila kontrolna grupa (C grupa) i kujama u ovoj grupi aplikovan je placebo.

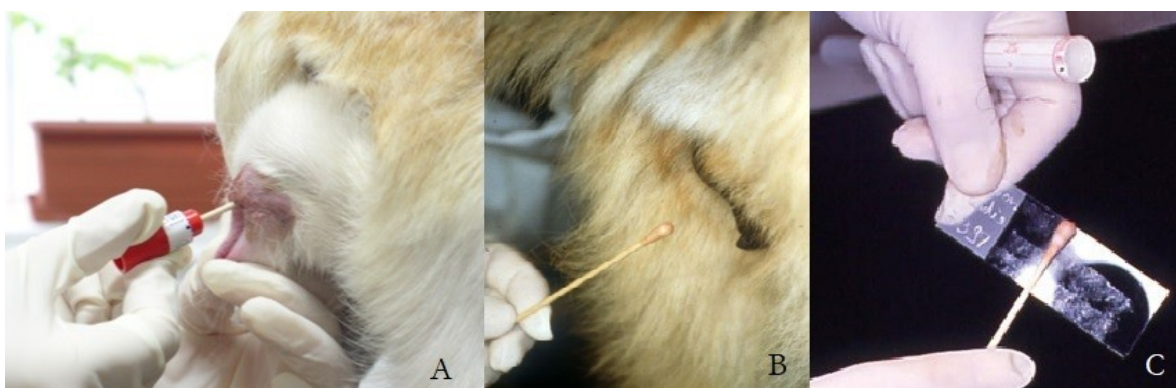
### **4.4 Metode istraživanja**

#### **4.4.1 Zdravstveni status i isključivanje puberteta**

Pre uvođenja u ogled, svaka životinja je klinički pregledana u cilju ocene zdravstvenog statusa. Klinički pregled se sastojao od uzimanja anamneze, merenja trijasa, pregleda zdravstvenog kartona (redovna dehelmintizacija i vakcinacija) i otvaranje internog zdravstvenog kartona za potrebe istraživanja ako su svi uslovi ispunjeni. Pored navedenog, urađen je pregled genitalnog trakta i analiza hormonskog statusa – određivanje koncentracija progesterona, estrogena i melatonina u krvnom serumu. Pregled genitalnog trakta uključivao je uzimanje vaginalnih mikrobioloških i citoloških briseva, ultrazvučni pregled genitalnog trakta i merenje otpora vaginalne sluzi.

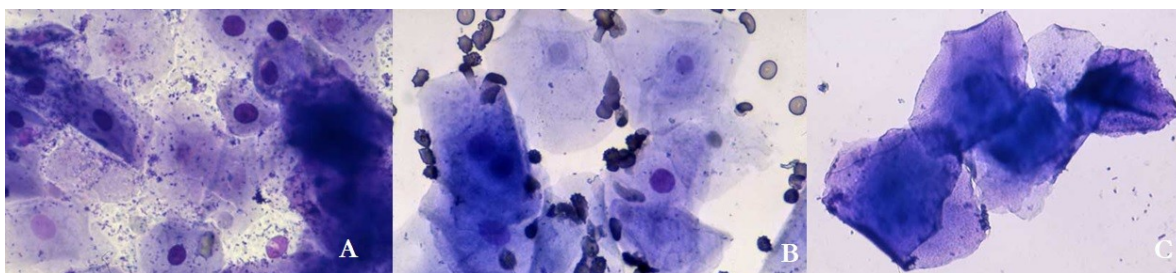
#### 4.4.2 Vaginalni mikrobiološki i citološki brisevi

Pre svakog uzorkovanja vaginalnih mikrobioloških i citoloških briseva, kuje su bile fiksirane na stolu za pregled, sa repom pomerenim u stranu. Nakon čišćenja tečnim sapunom sa dezinficijensom (0,5% hlor-heksidin-diglukonat) i 70% rastvorom etanola, sušenja, uziman je prvo mikrobiološki, a zatim citološki bris. U oba slučaja korišćeni su sterilni štapići sa vatom, bez medijuma, koji su plasirani uz dorzalni zid vagine (Slika 4). Vaginalni mikrobiološki brisevi slati su u laboratoriju VetLab. Citološki vaginalni brisevi obrađivani su u laboratoriji Katedre za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje. Vaginalna citologija je rutinska metoda kojom se pouzdano određuje u kojoj se fazi polnog ciklusa nalazi kuja. Kada je štapić za bris u vagini, 2-3 puta je rotiran da bi se uzeo uzorak sa zida vagine. Vaginalni razmaz je pravljen odmah nakon uzorkovanja, tako što se štapić sa uzorkom rotirao na mikroskopskoj pločici u vidu dve tanke paralelne linije. Preparati su sušeni na vazduhu i obojeni Diff-Quick tehnikom bojenja.



Slika 4. Pravilno uzimanje vaginalnog citološkog brisa kod kuje (A i B) i pravljenje citološkog preparata (C)

Mikroskopskim pregledom (objektiv sa uvećanjem 40x) brisa sluznice vagine određuje se dominacija površnih ćelija sluznice vagine i zapažaju se promene u građi i izgledu ćelija vaginalnog brisa, na osnovu čega se određuje faza polnog ciklusa. Ukoliko se kuja nalazi u anestrusu na mikroskopskom preparatu se zapažaju epitelne ćelije i ponekad leukociti. Na početku proestrusa u vaginalnom brisu se zapaža prisustvo kornifikovanih epitelnih ćelija i eritrocita, a pri kraju proestrusa nalaze se velike kornifikovane epitelne ćelije (Slika 5). Za vreme estrusa bris sadrži samo potpuno keratinirane velike epitelne ćelije sa ili bez nukleusa. Pre i tokom ovulacije kornifikacija, orožavanje epitelnih ćelija je najizrazitije. Pri kraju estrusa u brisu se zapaža poneki leukocit.



Slika 5. Izgled obojenih vaginalnih citoloških preparata kod kuje u toku proestrusa (A i B) i estrusa (C)

#### 4.4.3 Merenje otpora vaginalne sluzi (Vaginalna impedometrija)

Vaginalna impedometrija je izvedena sa 2-elektrodnim, krutim impedometrom na baterije (Draminski DOD2, Dog Ovulation Detector, Szabruk, Poljska). Impedanca vaginalne sluzi je merena i beležena svakodnevno (Slika 6 i 7). Vaginalni impedometar je potpuno umetnut u vaginu i okretan u jednom pravcu kako bi se osiguralo da elektrode dođu u potpuni kontakt sa svežom sluzi. Impedometar prikazuje vrednost koja predstavlja srednju vrednost određenu na osnovu nekoliko očitavanja. Kod kuja u anestrusu ove vrednosti se obično kreću između 90-110, dok kod kuja u proestrusu rastu i dostižu pik vrednosti u estrusu, a ta vrednost je individualna za svaku jedinku, i kreće se od 600 do 1100. Ovaj proces je ponovljen, tako što je impedometar najpre okrenut da bi se elektrode izložile novoj sluzi. Posle svake svakodnevne upotrebe, kao i između pregleda pojedinačne kuje istog dana, impedometar je dezinfikovao 70% izopropil-alkoholom, zatim koncentrovanim algicidom, i ispran destilovanom vodom.

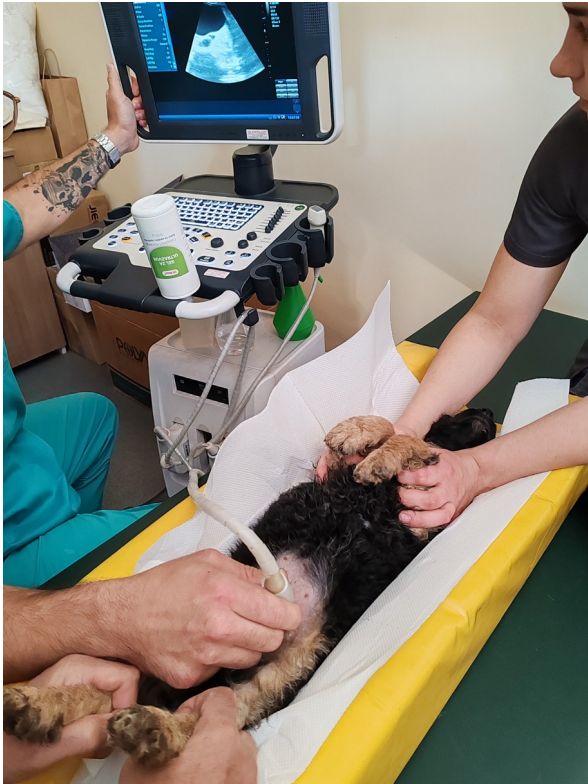


Slike 6 i 7. Prikaz uređaja za merenje otpora cervikalne sluzi (impedometrija) i postupak merenja

#### 4.4.4 Ultrazvučni pregled genitalnog trakta

Priprema kuja za ultrazvučni pregled jajnika i materice sastojala se u brijanju abdomena, obuhvatajući poprečne nastavke 3. i 4. lumbalnog pršljena, jer su životinje bile pozicionirane u bočnoj ili dorzo-lateralnoj poziciji, levo ili desno, u zavisnosti od toga koji je jajnik pregledan. U slučajevima kada je zbog prisustva određenih delova creva u blizini jajnika pregled bio otežan, kuje su se pregledale u uspravnom položaju. Nakon nanošenja gela na sveže obrijano područje, vršena je vizualizacija bubrežne karlice kao orijentacione tačke. Jajnik je pozicioniran kaudo-lateralno prema distalnom delu bubrega. Anatomski osobenost genitalnog trakta kuje predstavlja poziciju desnog jajnika kranijalniju u odnosu na bubreg, za razliku od levog jajnika, koji se nalazi kaudalnije. Ultrasonografski pregled vršen je prvo sa leve strane vizuelizacijom levog jajnika (Slika 8), pošto ga je lakše locirati, nakon čega pregledana i druga strana. Ultrazvučni pregled je urađen korišćenjem ultrazvučnog aparata Mindray DC30 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, Kina), mikrokonveksne sonde u modu B, frekvence od 3-10MHz.





Slika 8. Ultrasonografski pregled kuja

#### 4.4.5 Određivanje hormonskog statusa

Za hormonske analize uzeti su uzorci krvi iz *v. cephalica antebrachii* i sakupljeni u epruvete bez antikoagulansa. Krvni serum je odvojen nakon centrifugiranja na 3000 rpm tokom 15 minuta i čuvan na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Koncentracije 17-beta-estradiola (E2), progesterona (P4) i melatonina određivane su hemoluminiscentnom metodom, korišćenjem automatskog analizatora hormona (Access 2 Beckman Coulter, SAD) i komercijalnih kompleta, prema uputstvima proizvođača, u laboratoriji VetLab.

#### 4.4.6 Aplikacija GnRH

Životinje u DESLO grupi ( $n=6$ ) tretirane su supkutanim implantatima deslorelin-acetata od 4,7 mg (Suprelorin®, Virbac, Francuska) u regiji pupka, a zabeleženi podaci su uneti u zdravstvene kartone životinja. Kontrolna grupa ( $n=6$ ) primila je placebo supkutanu injekciju (2 ml 0,9% vodenog rastvora natrijum-hlorida). Nakon aplikacije, životinje su svakodnevno praćene na prisustvo alergijske reakcije i estrusa fizičkim pregledom vulve, vaginalnim citološkim preparatima (Diff-Quick bojenje) i promena u seksualnom ponašanju prvih pet nedelja (Tabela 5). Nakon toga, hormonske analize, vaginalni citološki bris i merenja električne otpornosti cervikalne sluzi rađeni su jednom u 3 nedelje do prvih znakova proestrusa, a svaki dan tokom perioda estrusa. Praćene su promene u ćelijskim profilima dobijenim vaginalnim citološkim brisom u cilju otkrivanja proestrusa: od preovladavanja parabazalnih ćelija u anestrusu (praćene različitim brojem neutrofila), do sukcesivnog smenjivanja skvamoznih ćelija srednje veličine do velikih intermedijarnih ćelija, a zatim do velikih keratinocita dok se konačno ne sastoje u potpunosti (98–100%) od keratinocitnih (orožalih) ćelija sa odsustvom neutrofila (Concannon, 2011). Postepeno povećanje električnog otpora cervikalne sluzi sa 120 oma na 220 oma smatra se početkom

proestrusa (Concannon, 2011). Povećanje serumskih koncentracija E2 (tokom proestrusa) i P4 (na kraju proestrusa i estrusa) ukazuje na rast folikula i ovulaciju.

Tabela 5. Prikaz eksperimentalnog dizajna

Starost/dani	Odabir jedinki/kriterijumi:	
3-4 meseca	Klinički pregled i analize krvi Mikrobiološki i citološki vaginalni bris Merenje otpora vaginalne sluzi Ultrazvučni pregled Hormonske analize	
	Raspoređivanje kuja u dve grupe	
4. mesec	DESLO grupa (n=6)	C grupa (n=6)
	Aplikacija implantata deslorelina	Aplikacija placebo injekcije
Svaki dan u trajanju od 5 nedelja	Mikrobiološki i citološki vaginalni bris Merenje otpora vaginalne sluzi Hormonske analize (P4, E2 i melatonin)	
Svake 3. nedelje do pojave prvih promena u proestrusu	Mikrobiološki i citološki vaginalni bris Merenje otpora vaginalne sluzi Hormonske analize (P4, E2 i melatonin)	
Svaki dan ciklusa	Citološki vaginalni bris Merenje otpora vaginalne sluzi Hormonske analize (P4, E2 i melatonin)	

#### 4.4.7 Statistička obrada podataka

Podaci su testirani na normalnost distribucije Shapiro-Wilk testom. Ako su podaci imali normalnu distribuciju (Shapiro-Wilk test,  $P > 0,05$ ), za poređenje dve grupe korišćen je neupareni t-test. Ukoliko podaci nisu bili normalno raspoređeni (Shapiro-Wilk test,  $P < 0,05$ ), za poređenje dve grupe korišćen je Mann-Whitney test. Značajnost razlika je procenjena na nivou  $P < 0,05$ . Vrednosti za medijanu prilazane su kao vrednost medijane i razlike kvartalnih vrednosti ( $Q_3-Q_1$ ). Statistička analiza rezultata dobijenih u eksperimentu izvršena je korišćenjem statističkog softvera GraphPad Prism verzija 7 (GraphPad, San Dijego, Kalifornija, SAD).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Zdravstveno stanje kuja pre uvođenja u eksperiment

Na osnovu kliničkog pregleda (anamneza, trijasa, zdravstveni karton), pregleda genitalnog trakta (uzimanje vaginalnih mikrobioloških i citoloških briseva, ultrazvučni pregled genitalnog trakta i merenje otpora vaginalne sluzi) i analiza hormonskog statusa (određivanje koncentracija progesterona, estrogena i melatonina u krvnom serumu), utvrđeno je da su sve životinje bile zdrave, bez vidljivih znakova estrusa, normalnog izgleda spoljašnjih i unutrašnjih genitalnih organa za ispitivanu starosnu kategoriju.

### 5.2. Aplikacija GnRH i vreme pojave estrusa

U ovom istraživanju ispitano je trajanje perioda anestrusa, odnosno kontracepcije kod šest juvenilnih kuja nakon aplikacije supkutanog implantata deslorelina, agoniste GnRH. Istovremeno, praćen je i efekat ovog tretmana na koncentraciju estrogena, progesterona i melatonina u krvnom serumu kuja, kao i poređenje sa vrednostima u kontrolnoj grupi.

Procedura aplikacije implantata obavljena je rutinski, po preporuci proizvođača i protekla je bez klinički ispoljenih lokalnih i sistemskih neželjenih efekata.

Aplikacija placebo injekcija (fiziološki rastvor NaCl) nije dovela do sistemske reakcije, kao ni reakcije okolnog tkiva.

Kod dve kuje u tretiranoj, DESLO grupi, uočena je hiperplazija dorzalnog zida vagine (tip 1), i to nakon prvih znakova estrusa koji su spontano regresirali i više se nije javljala u sledećem estrusu.

Tabela 6. Broj dana protekao od tretmana kuja deslorelinom (DESLO), odnosno od placebo tretmana (kontrola) do pojave prvih znakova estrusa

Grupa	N	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrola (K)	6	143,80	52,30	91,00	244,00	36,36
DESLO	6	633,00	30,38	587,00	673,00	4,80

Vrednosti broja dana do prvih primetnih znakova estrusa bile su homogene ( $CV < 30\%$ ) u DESLO grupi ( $CV = 4,8\%$ ), dok su u kontrolnoj grupi vrednosti bile heterogene ( $CV = 36,36\%$ ). Primećena je statistički značajna razlika ( $P < 0,001$ ) u broju dana do početka estrusa između ispitivanih grupa (Grafikon 1): kod kuja DESLO grupe proteklo je 4,4 puta više dana do pojave estrusa nego kod kontrolnih (Tabela 6).



Grafikon 1. Poređenje broja dana proteklih od tretmana (DESLO) do pojave prvih znakova estrusa u tretiranoj i kontrolnoj grupi kuja ( $P < 0.001$ )

### 5.3. Mikrobiološke analize vaginalnih briseva

Tokom trajanja oglada, na osnovu kliničkog pregleda genitalnog trakta i kolekcijom vaginalnih mikrobioloških briseva, kod većine kuja ali i većine uzoraka, nisu primećeni znakovi patoloških procesa infektivne etiologije. Kod dve kuje u DESLO grupi i jedne u kontrolnoj grupi nastupio je blagi juvenilni vaginitis, između 20. i 30. nedelje od ubrizgavanja implantata, odnosno 14. nedelje posle placebo tretmana. Na osnovu mikrobiološke analize poslatih uzoraka izolovane su bakterije *Echerichia coli* kod prve kuje iz DESLO grupe, *Staphylococcus pseudintermedius* kod druge kuje iz DESLO grupe i mešana infekcija sa *Streptococcus canis* i *Enterococcus spp.* kod kuje iz kontrolne grupe. Ova stanja nisu zahtevala nikakav poseban tretman jer su se životinje spontano oporavile.

### 5.4 Ultrazvučni pregled genitalnog trakta kuja i merenje otpora vaginalne sluzi

Na osnovu dobijenih ehosonograma kuja pre i posle ulaska u eksperiment nisu primećene patološke strukture na genitalnom traktu. U zavisnosti od faze ciklusa kuje prilikom pregleda, ultrazvučni nalaz se shodno tome i razlikovao.

Transverzalno postavljenom sondom uterus se zapaža kao uska, hipoehogena, cevasta struktura, koja ima pravougaoni izgled pri skeniranju u longitudinalnoj ravni. Kod većine jedinki primećivala su se dva različita sloja: centralna homogena hipoehogena zona, okružena perifernom hiperehogenom zonom. Centralna hipoehogena zona predstavlja endometrijum i miometrijum, a hiperehogena - serozu uterusa. U nekim slučajevima uočen je i lumen materice u podužnom preseku, kao jedna centralna linija koja je manje ehogena od tkiva endometrijuma, a njegova uočljivost i dimenzije zavise od količine prisutne tečnosti.

Za vreme proestrusa i estrusa, uterus je pokazivao više hipoehogenosti, ali i centralne zrakaste hiperehogene linije koje su karakteristične za edem uterusa ili tanke koncentrične slojeve koji bi mogli da označavaju hipertrofiju. U longitudinalnoj projekciji, oblik uterusa se ponekada menja od pravouglog u zavojit ili zmijolik oblik. Za vreme ultrazvučnog pregleda kuja u prvom estrusu, kod pojedinih kuja je postojala i jedna ehogena linija koja se uočavala centralno unutar lumena uterusa. Ovo ukazuje na aspirirani vazduh. Prečnik uterusa se povećavao nekoliko milimetara u toku rane lutealne faze, pa ga je bilo lakše

identifikovati za vreme estrusa i ranog metestrusa. Sa opadanjem nivoa estrogena edematozni izgled se progresivno smanjivao.

Vrednosti merenja vaginalne impedometrije su bile karakteristične za fazu polnog ciklusa, i pratile su rast serumskih koncentracija progesterona, sa vrednostima u proestrusu od 200-500 u proseku, a u samom piku estrogenizacije, vrednosti su iznosile od 900 do 1200. U toku eksperimenta urađeno je preko 600 merenja otpora vaginalne sluzi i analize preparata vaginalne eksfolijativne citologije (citološki bris vagine). Nalazi citoloških preparata pojedinih faza polnog ciklusa su odgovarali vrednostima merenja vaginalne impedometrije, odnosno otpora vaginalne sluzi.

## 5.5 Analiza hormona u krvi

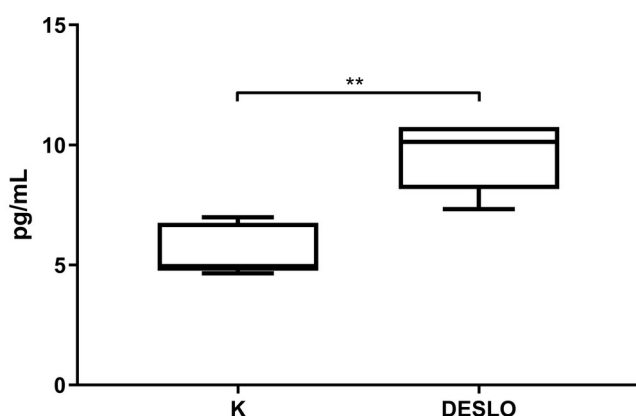
### 5.5.1 Koncentracije estrogena u krvnom serumu

U tabelama 7, 8 i grafikonima 2, 3, 4 i 5 prikazana je koncentracija estrogena u krvnom serumu kuja.

Tabela 7. Koncentracija estrogena u krvnom serumu kuja (pg/mL) do pojave prvih znakova estrusa

Grupa	N	Medijana	Q1	Q3	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrola (K)	6	4,95	4,76	6,76	4,66	6,99	18,95
DESLO	6	10,13	8,16	10,74	7,32	10,75	14,90

Vrednosti serumskih koncentracija estrogena pre pojave prvih znakova estrusa bile su homogene ( $CV < 30\%$ ) u obe ispitivane grupe (Tabela 7). Aplikacija implantata deslorelinea dovela je do većih prosečnih vrednosti serumskih koncentracija estrogena ( $P < 0,01$ ) u DESLO grupi (10,13 pg/mL), u odnosu na kontrolnu grupu (4,95 pg/mL) merenih do jedne nedelje pre primećenih prvih znakova estrusa (Grafikon 2). Važno je napomenuti da je deslorelin doveo do neznatno većih koncentracija estrogena u krvi u DESLO grupi u trajanju od 6 do 12 dana nakon aplikacije, dok u kontrolnoj grupi nije bilo promena.



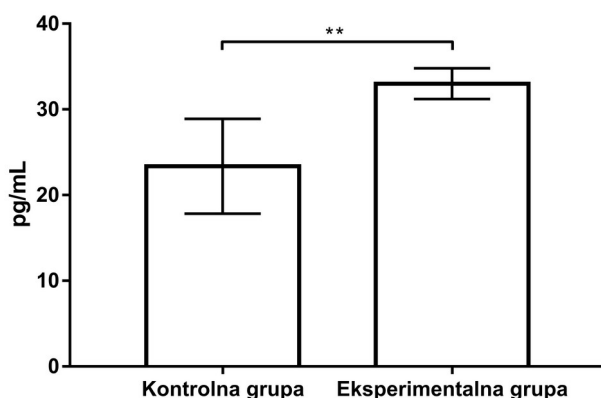
Grafikon 2. Poređenje koncentracija estrogena u krvnom serumu tretiranih i kontrolnih kuja u periodu do pojave prvih znakova estrusa ( $P < 0,01$ ).

U toku proestrusa kuje iz DESLO grupe su imale signifikantno ( $P < 0.001$ ) veće serumske koncentracije estrogena ( $33.00 \pm 1.79$  pg/mL), u odnosu na kontrolnu grupu ( $23.37 \pm 5.53$  pg/mL, Tabela 8 i Grafikon 3). Vrednosti serumskih koncentracija estrogena tokom estrusa bile su homogene ( $CV < 30\%$ ) u obe ispitivane grupe.

Tabela 8. Koncentracija estrogena (pg/mL) u krvnom serumu tokom proestrusa u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja ( $P < 0,01$ ).

Grupa	N	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	6	23,37	5,53	16,80	33,00	23,66
Eksperimentalna grupa	6	33,00	1,79	30,90	35,00	5,42

U DESLO grupi, maksimalna izmerena koncentracija estrogena u serumu tokom proestrusa bila je 36 pg/mL i 40 pg/mL kod dve jedinice, dok je u kontrolnoj grupi maksimalna vrednost estrogena iznosila 23 pg/mL.

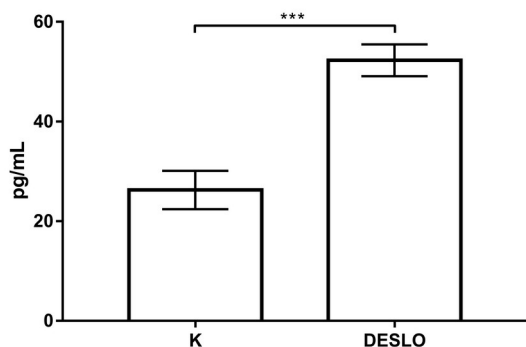


Grafikon 3. Poređenje koncentracija estrogena u krvnom serumu tretiranih i kontrolnih kuja u proestrusa ( $P < 0,01$ ).

Tabela 9. Koncentracija estrogena (pg/mL) u krvnom serumu tokom estrusa u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja ( $P < 0,001$ ).

Grupa	N	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	6	26,26	3,84	19,00	30,53	14,62
Eksperimentalna grupa	6	52,28	3,19	48,38	55,73	6,10

U toku estrusa kuja iz DESLO grupe su imale signifikantno ( $P < 0.001$ ) veće serumske koncentracije estrogena ( $52,28 \pm 3,19$  pg/mL), u odnosu na kontrolnu grupu ( $26,26 \pm 3,84$  pg/mL, Tabela 9 i Grafikon 4). Vrednosti serumskih koncentracija estrogena tokom estrusa bile su homogene ( $CV < 30\%$ ) u obe ispitivane grupe.

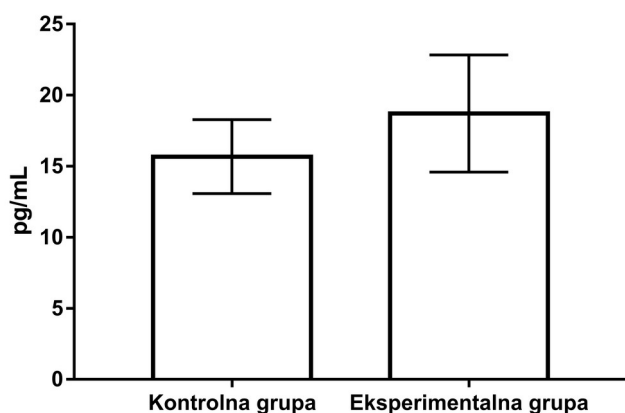


Grafikon 4. Poređenje koncentracija estrogena u krvnom serumu tokom estrusa u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja ( $P < 0,001$ ).

Tabela 10. Koncentracija estrogena u krvnom serumu kuja (pg/mL) u metestrusu

Grupa	N	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	6	15,67	2,60	12,40	18,50	16,60
Eksperimentalna grupa	6	18,70	4,13	14,20	26,00	22,05

Vrednosti serumskih koncentracija estrogena u metestrusu estrusa bile su homogene ( $CV < 30\%$ ) u obe ispitivane grupe (Tabela 10). Prosečne koncentracije progesterona u serumu kuja tokom metestrusa bile su veće u DESLO grupi ( $18,70 \pm 4,13$  pg/mL) u poređenju sa kontrolnom grupom ( $15,67 \pm 2,60$  pg/mL), ali razlika između grupa nije bila značajna (Grafikon 5).

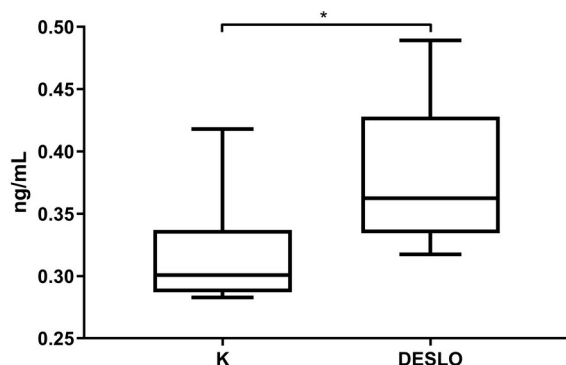


Grafikon 5. Poređenje koncentracija estrogena u krvnom serumu tokom metestrusa u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja

### 5.5.2 Koncentracije progesterona u krvnom serumu

U tabelama 11, 12, 13 i grafikonima 6, 7, 8, i 9 prikazana je koncentracija progesterona u krvnom serumu kuja.

Tokom perioda posmatranja, odnosno anestrusa, u tretiranoj, DESLO i kontrolnoj grupi, koncentracija progesterona u serumu je bila ispod 0,6 ng/mL (Grafikon 6).

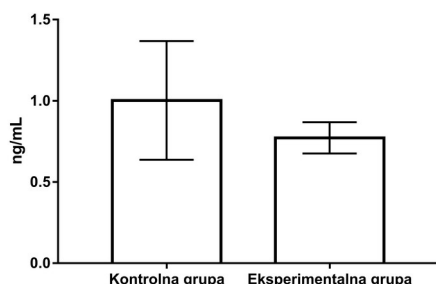


Grafikon 6. Poređenje koncentracija progesterona u serumu kuja u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi pre prvog estrusa ( $P < 0,05$ ).

U DESLO grupi, srednja izmerena koncentracija progesterona u serumu tokom proestrusa bila je  $1,00 \pm 0,37$  pg/mL dok je u kontrolnoj grupi srednja vrednost progesterona iznosila  $0,77 \pm 0,10$  pg/mL i nisu bile statistički značajane. Vrednosti serumskih koncentracija progesterona tokom proestrusa bile su heterogene ( $CV > 30\%$ ) u kontrolnoj grupi (Tabela 11 i Grafikon 7)

Tabela 11. Koncentracija progesterona u krvnom serumu kuja (ng/mL) u proestrusu

Grupa	N	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	6	1,00	0,37	0,50	1,46	36,51
Eksperimentalna grupa	6	0,77	0,10	0,63	0,89	12,47



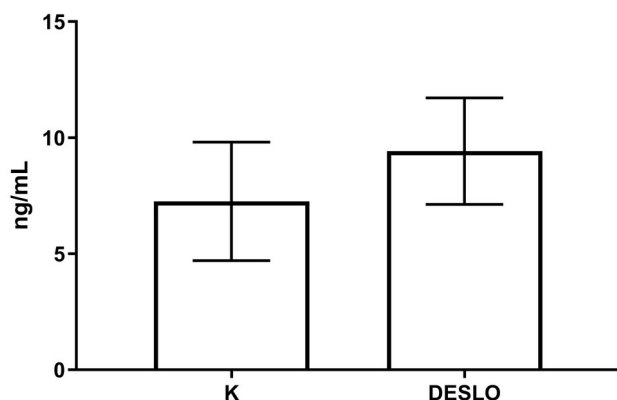
Grafikon 7. Poređenje koncentracija progesterona u serumu kuja u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj u proestrus



Tabela 12. Koncentracija progesterona u krvnom serumu kuja (ng/mL) u estrusu

Grupa	N	Medijana	Q1	Q3	Minimum	Maksimum	Cv (%)
<b>Kontrolna grupa</b>	6	10,07	8,98	13,77	7,58	21,26	41,99
<b>Eksperimentalna grupa</b>	6	13,69	12,63	16,43	12,47	17,46	13,92

Prosečne koncentracije progesterona u serumu kuja tokom estrusa bile su veće u DESLO grupi (13,69 ng/mL) u poređenju sa kontrolnom grupom (10,07 ng/mL), ali razlika između grupa nije bila značajna (Tabela 12 i Grafikon 8). Vrednosti serumske koncentracije progesterona u kontrolnoj grupi (Tabela 12) su bile heterogene (CV = 41,99%).

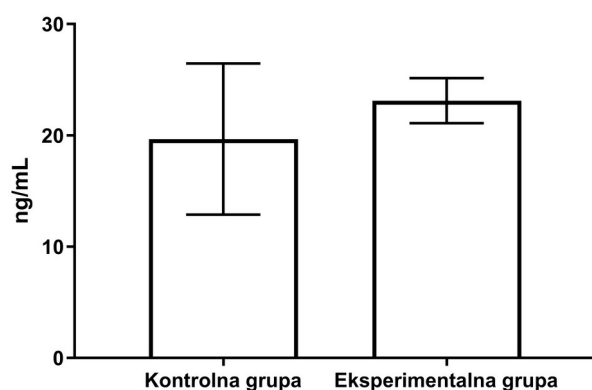


Grafikon 8. Poređenje koncentracija progesterona u krvnom serumu kuja u DESLO i kontrolnoj grupi tokom estrusa.

Tabela 13. Koncentracija progesterona u krvnom serumu kuja (ng/mL) u metestrusu

Grupa	N	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maksimum	Cv (%)
<b>Kontrolna grupa</b>	6	19,66	6,79	12,93	32,40	34,53
<b>Eksperimentalna grupa</b>	6	23,12	2,02	19,98	26,05	8,73

Vrednosti serumskih koncentracija progesterona u metestrusu nisu bile homogene (CV > 30%) u kontrolnoj grupi (Tabela 13). Prosečne koncentracije progesterona u serumu kuja tokom metestrusa bile su veće u DESLO grupi (23,12 ng/mL) u poređenju sa kontrolnom grupom (19,66 ng/mL), ali razlika između grupa nije bila značajna (Grafikon 9).



Grafikon 9. Poređenje koncentracija progesterona u krvnom serumu kuja u DESLO i kontrolnoj grupi metesrusa

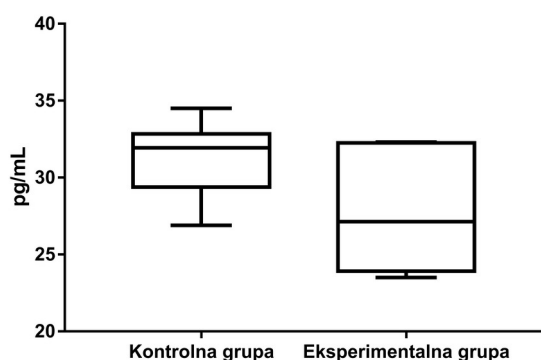
### 5.5.3 Koncentracije melatonina u krvnom serumu

U tabelama 14, 15, 16 i grafikonima 10, 11 i 12 prikazana je koncentracija melatonina u krvnom serumu kuja.

Vrednosti serumskih koncentracija melatonina kod kuja pre pojave prvih znakova estrusa bile su homogene ( $CV < 30\%$ ) u obe ispitivane grupe, sa prosečnim vrednostima od 27,13 pg/mL u DESLO grupi i 31,93 pg/mL u kontrolnoj grupi bez statističke značajnosti (Tabela 14 i Gafikon 10).

Tabela 14. Koncentracija melatoninu krvnom serumu kuja (pg/mL) u do pojave prvih znakova estrusa

Grupa	N	Medijana	Q1	Q3	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	6	31,93	29,39	32,84	26,90	34,50	8,16
Eksperimentalna grupa	6	27,13	23,91	32,26	23,50	32,31	15,50

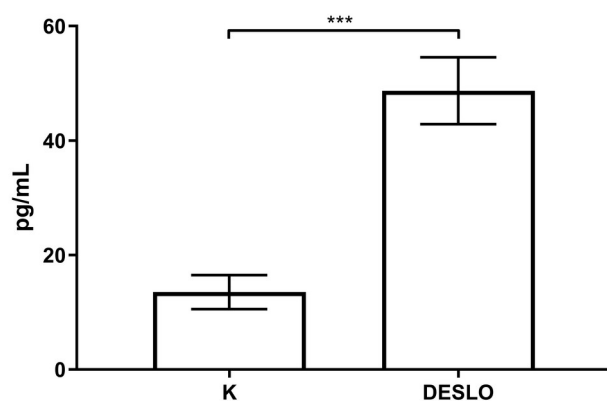


Grafikon 10. Poređenje koncentracija melatonina u krvnom serumu kuja u DESLO i kontrolnoj grupi do pojave prvih znakova estrusa

Serumske koncentracije melatonina tokom estrusa (Tabela 15 i Grafikon 11) u DESLO grupi bile su značajno veće ( $P < 0,001$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom, sa prosečnim koncentracijama od  $48,70 \pm 5,84$  pg/mL, odnosno  $13,56 \pm 2,98$  pg/mL. U obe eksperimentalne grupe vrednosti koncentracije melatonina bile su homogene ( $CV < 30\%$ , Tabela 9). Najveće vrednosti zabeležene su u DESLO grupi 3 nedelje nakon prvih znakova estrusa ( $52,16$  pg/mL).

Tabela 15. Koncentracije melatonina (pg/mL) u krvnom serumu kuja u toku estrusa

Grupa	N	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrola (K)	6	13,53	2,98	9,50	17,33	22,00
DESLO	6	48,70	5,84	43,33	57,83	11,99

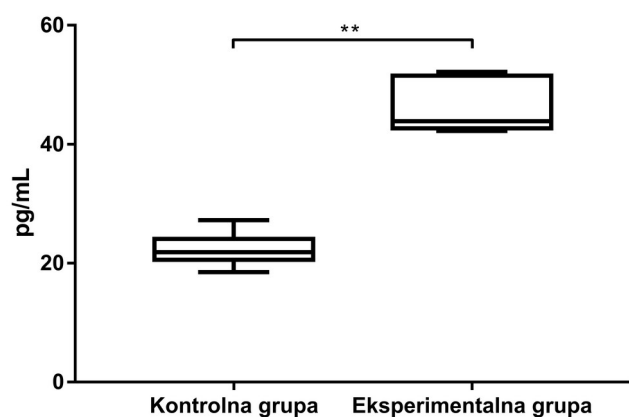


Grafikon 11. Poređenje koncentracija melatonina u krvnom serumu u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja tokom estrusa ( $P < 0,001$ ).

Tabela 10. Koncentracije melatonina (pg/mL) u krvnom serumu kuja u toku metestrusa

Grupa	N	Medijana	Q1	Q3	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	6	21,83	20,56	24,06	18,50	27,24	12,91
Eksperimentalna grupa	6	43,85	42,66	51,54	42,23	52,17	9,79

Serumske koncentracije melatonina tokom metestrusa (Grafikon 12) u DESLO grupi bile su značajno veće ( $P < 0,01$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom, sa prosečnim koncentracijama od  $43,85$  pg/mL, odnosno  $21,83$  pg/mL. U obe eksperimentalne grupe vrednosti koncentracije melatonina bile su homogene ( $CV < 30\%$ , Tabela 10).



Grafikon 12. Poređenje koncentracija melatonina u krvnom serumu u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja tokom metestrusa ( $P < 0,01$ ).

## 5.6 Analiza koncentracija kalcijuma, fosfora i magnezijuma u krvi

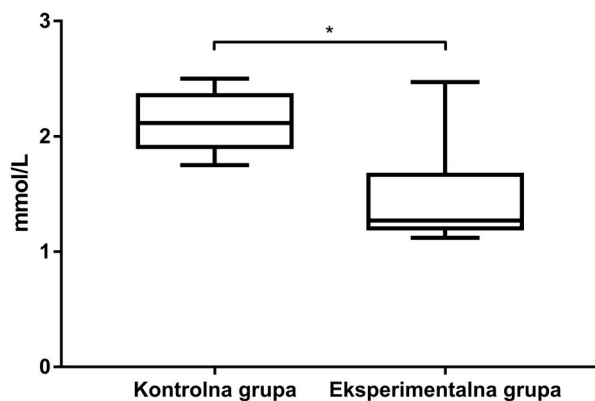
### 5.6.1 Analiza koncentracija kalcijuma, fosfora i magnezijuma u krvi ispitivanih kuja u proestrusu

U tabelama 17, 18, 19 i grafikonima 13, 14 i 15 prikazana je koncentracija kalcijuma, fosfora i magnezijuma u krvnom serumu kuja tokom proestrusa.

Tabela 17. Koncentracije kalcijuma (mmol/L) u krvnom serumu kuja u toku proestrusa

Grupa	N	Medijana	Q1	Q3	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	6	2,12	1,91	2,36	1,75	2,50	12,71
Eksperimentalna grupa	6	1,27	1,20	1,67	1,12	2,47	34,45

Serumske koncentracije kalcijuma tokom proestrusa (Grafikon 13) u kontrolnoj grupi bile su značajno veće ( $P < 0,05$ ) u poređenju sa DESLO grupom, sa prosečnim koncentracijama od 2,12 mmol/L, odnosno 1,27 mmol/L. U eksperimentalnoj grupi vrednosti koncentracije kalcijumanisu nisu bile homogene ( $CV > 30\%$ , Tabela 17).

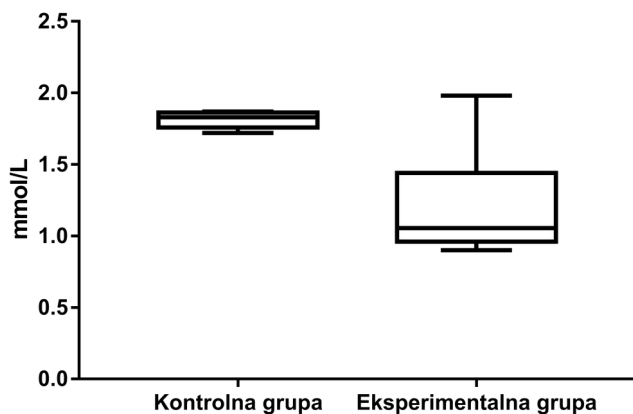


Grafikon 13. Poređenje koncentracija kalcijuma u krvnom serumu u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja tokom proestrusa ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 18** Koncentracije fosfora (mmol/L) u krvnom serumu kuja u toku proestrusa

Grupa	N	Medijana	Q1	Q3	Minimum	Maksimum	Cv (%)
<b>Kontrolna grupa</b>	6	1,83	1,76	1,86	1,72	1,87	3,34
<b>Eksperimentalna grupa</b>	6	1,06	0,96	1,44	0,90	1,98	33,12

Nije bilo statističke značajnosti u ispitivanim grupama serumskih koncentracija fosfora tokom proestrusa (Grafikon 14), mada su u kontrolnoj grupi bile veće koncentracije fosfora (1,83 mmol/L) u odnosu na DESLO grupu, sa prosečnim koncentracijama od 1,06 mmol/L. U eksperimentalnoj grupi vrednosti koncentracije kalcijuma nisu bile homogene ( $CV > 30\%$ , Tabela 18).



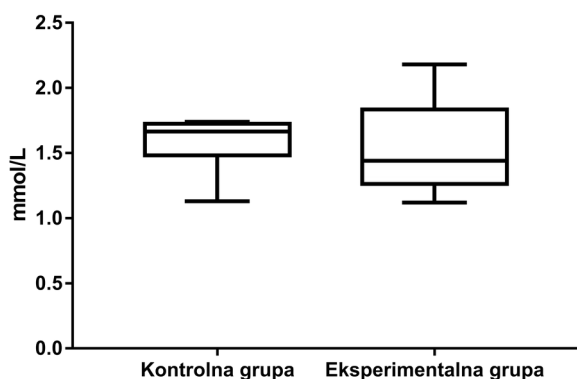
Grafikon 14 Poređenje koncentracija fosfora u krvnom serumu u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja tokom proestrusa

**Tabela 19.** Koncentracije magnezijuma (mmol/L) u krvnom serumu kuja u toku proestrusa

Grupa	N	Medijana	Q1	Q3	Minimum	Maksimum	Cv (%)
<b>Kontrolna grupa</b>	6	1,67	1,48	1,73	1,13	1,74	14,47
<b>Eksperimentalna grupa</b>	6	1,44	1,26	1,84	1,12	2,18	24,57

Nije bilo statističke značajnosti u ispitivanim grupama serumskih koncentracija magnezijuma tokom proestrusa (Grafikon 15), mada su u kontrolnoj grupi bile veće

koncentracije fosfora (1,67 mmol/L) u odnosu na DESLO grupu, sa prosečnim koncentracijama od 1,44 mmol/L, U ispitivanim grupama vrednosti koncentracije kalcijuma nisu bile su homogene (CV<30%, Tabela 19).



Grafikon 15. Poređenje koncentracija magnezijuma u krvnom serumu u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja tokom proestrusa

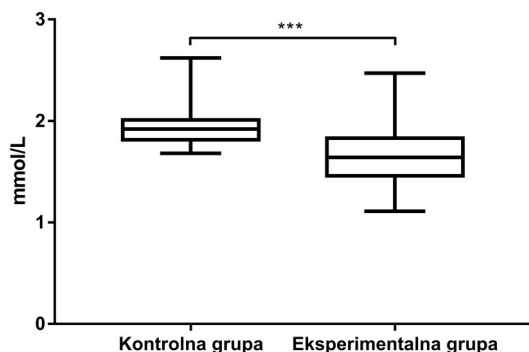
### 5.6.2 Analiza koncentracija kalcijuma, fosfora i magnezijuma u krvi ispitvanih kuja tokom cerlog perioda ispitivanja

U tabelama 20, 21, 22 i grafikonima 16, 17 i 18 prikazana je koncentracija kalcijuma, fosfora i magnezijuma u krvnom serumu kuja tokom celog perioda ispitivanja.

Tabela 20. Koncentracije kalcijuma (mmol/L) u krvnom serumu kuja u toku ispitivanog perioda

Grupa	N	Medijana	Q1	Q3	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	21	1,92	1,82	2,01	1,68	2,62	10,48
Eksperimentalna grupa	23	1,64	1,46	1,83	1,11	2,47	18,16

Serumske koncentracije kalcijuma tokom ispitivanog perioda (Grafikon 16) u kontrolnoj grupi bile su značajno veće ( $P < 0,001$ ) u poređenju sa DESLO grupom, sa prosečnim koncentracijama od 1,92 mmol/L, odnosno 1,64 mmol/L. U obe eksperimentalne grupe vrednosti koncentracije kalcijuma bile su homogene ( $CV < 30\%$ , Tabela 20).

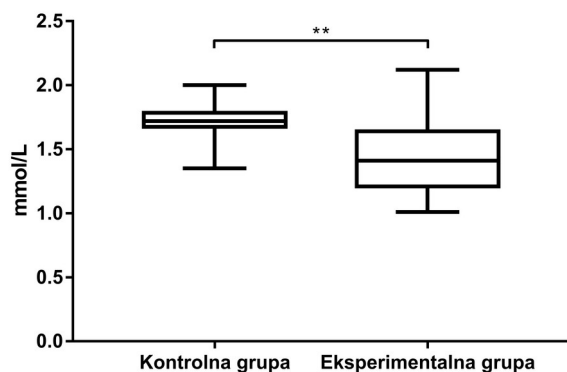


Grafikon 16. Poređenje koncentracija kalcijuma u krvnom serumu u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja tokom ispitivanog ogleada ( $P < 0,001$ )

Tabela 21. Koncentracije fosfora (mmol/L) u krvnom serumu kuja u toku ispitivanog perioda

Grupa	N	Medijana	Q1	Q3	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	21	1,72	1,68	1,79	1,35	2,00	8,09
Eksperimentalna grupa	23	1,41	1,21	1,64	1,01	2,12	20,80

Serumske koncentracije fosfora tokom ispitivanog perioda (Grafikon 17) u kontrolnoj grupi bile su značajno veće ( $P < 0,01$ ) u poređenju sa DESLO grupom, sa prosečnim koncentracijama od 1,72 mmol/L, odnosno 1,41 mmol/L. U obe eksperimentalne grupe vrednosti koncentracije kalcijuma bile su homogene ( $CV < 30\%$ , Tabela 21).

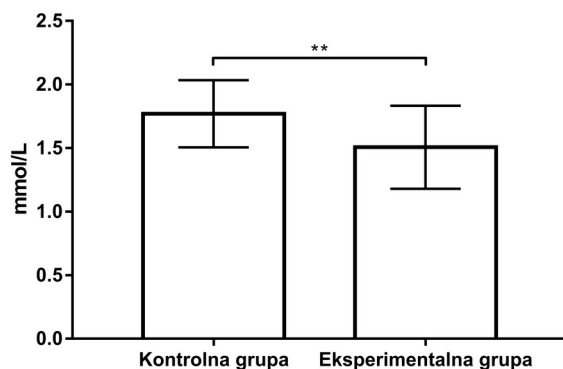


Grafikon 17. Poređenje koncentracija fosfora u krvnom serumu u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja tokom ispitivanog ogleada ( $P < 0,01$ )

**Tabela 22. Koncentracije magnezijuma (mmol/L) u krvnom serumu kuja u toku ispitivanog perioda**

Grupa	N	$\bar{x}$	SD	Minimum	Maksimum	Cv (%)
Kontrolna grupa	21	1,77	0,26	1,41	2,23	14,93
Eksperimentalna grupa	23	1,51	0,33	0,88	2,12	21,70

Serumske koncentracije magnezijuma tokom ispitivanog perioda (Grafikon 13) u kontrolnoj grupi bile su značajno veće ( $P < 0,01$ ) u poređenju sa DESLO grupom, sa prosečnim koncentracijama od  $1,77 \pm 0,26$  mmol/L, odnosno  $1,51 \pm 0,33$  mmol/L. U obe eksperimentalne grupe vrednosti koncentracije kalcijuma bile su homogene ( $CV < 30\%$ , Tabela 15).



**Grafikon 18. Poređenje koncentracija magnezijuma u krvnom serumu u tretiranoj (DESLO) i kontrolnoj grupi kuja tokom ispitivanog ogleada ( $P < 0,01$ )**



## 6. DISKUSIJA

Veterinari, vlasnici kućnih ljubimaca i stručnjaci za dobrobit životinja nastoje da suprimiraju polni nagon, tj. spermatogenezu i libido kod mužjaka pasa iz različitih razloga. Kao najbitniji navode se izbegavanje neželjenog parenja, unapređenje zdravstvenog statusa životinja i smanjeno ispoljavanje seksualnog ponašanja indukovano testosteronom (Driancourt i Briggs, 2020). Značaj činilaca kao što su trajanje i troškovi tretmana, pristupačnost procedure i proces aplikacije razlikuju se u zavisnosti od ciljane populacije, u zavisnosti od toga da li se radi o kućnim ljubimcima, psima u uzgojnim programima, psima lualicama koji su smešteni u azilima ili pak slobodno lutaju. Postoji obilje radova u kojima su korišćeni agonisti GnRH kod mužjaka pasa, koji potvrđuju sa su to bezbedna, efikasna sredstva za privremeno hemijsko suzbijanje testosterona i fertiliteta bez hirurške intervencije (Junaidi i sar., 2007, 2009a, 2009b). Trajanje supresije se može produžiti sukcesivnom ugradnjom nekoliko implantata (Driancourt i Briggs, 2020).

Za razliku od pasa muškog pola, kod kojih postoje sada već registrovani lekovi, efikasnost i bezbednost tretmana supkutanog implantata GnRH agonista kod kuja nije dovoljno ispitana zbog kompleksnosti anatomske građe reproduktivnog trakta ženki i specifičnosti njihovog endokrinog statusa. Potraga za alternativnim pristupom kontrole estrusa (indukcija ili supresija) kod kuja je važno pitanje, a kao i kod mužjaka, poseban značaj poslednjih godina ima upotreba implantata koji sporo oslobađaju agoniste GnRH (Schafer-Somi i sar., 2022). Dosadašnje studije pokazuju da su kratkoročni i dugoročni efekti implantata deslorelina koji se primenjuju u prepubertetskom periodu slični onima kod odraslih pasa; međutim, postoje važne razlike. Starost kuje, metabolički status jedinke i doziranje glavne su determinante odgovora na deslorelin (Schafer-Somi i sar., 2022). Generalno, definicija puberteta kod pasa je veoma varijabilna jer postoji mnogo rasa i nezavisna je od telesne mase (Johnston i sar., 2001; Schafer-Somi i sar., 2022). Definicija početka puberteta između mužjaka i ženki pasa je različita. Pubertet kod pasa različitog pola nastaje u različito vreme: kod ženki verovatno počinje ranije, praćen je promenom rasta folikula, vaginalne citologije i steroidnih hormona, dok je kod mužjaka obeležen skokom kao jednim od polnih refleksa i pojavom prvih spermatozoida u urinu (Gobello, 2014).

Uzimajući u obzir činjenicu da u našoj zemlji jedan od najvećih zootehničkih, sanitarnih i epizootioloških problema predstavlja veliki broj pasa bez vlasnika, od izuzetnog značaja je ustanoviti bezbednost i delotvornost aplikacije supkutanog implantata deslorelina kod kuja u periodu pre nastanka puberteta i njegov uticaj na pojavu estrusa i hormonski status nakon prestanka delovanja, kao i moguće komplikacije.

U cilju adekvatne komparacije dobijenih rezultata, metode koje su korišćene u eksperimentu sprovedenom u okviru ove disertacije bile su sveobuhvatne kako bi se sa sigurnošću utvrdile kuje koje nisu u pubertetu i kuje bez zapaljenskog procesa u genitalnom traktu, od kojih je juvenilni vaginitis jedan od najčešćih. Ovo inflamatorno stanje se obično spontano povlači nakon prvog estrusa, međutim, kod kuja kojima je izvršena gonadektomija perzistira duže vreme (Johnston i sar., 2001). U ispitivanjima koje su obavili Marino i sar. (2014), šest prepuberalnih kuja sa juvenilnim vaginitisom koje su primile implantat deslorelina u dobi od 3 meseca starosti, imale su spontanu remisiju nakon prvog tretmana, što je najverovatnije uzrokovano početnim povećanjem estrogena (E2). Kuje sa juvenilnim vaginitisom bi trebalo isključiti iz ispitivanja, jer u navedenoj studiji, druge uključene kuje kojima je aplikovan GnRH agonist pre puberteta nisu pokazale povećanje E2 (Marino i sar., 2014).

Autori koji su istraživali delovanje kontraceptivnih lekova na odlaganje puberteta dobijali su veoma varijabilne rezultate u različitim postavkama eksperimenata, pa je upoređivanje rezultata i donošenje zaključaka veoma zahtevno, ili gotovo nemoguće (Schafer-Somi i sar., 2022). Kod ispitivanih kuja u DESLO i kontrolnoj grupi postavljeni su jasni parametri na osnovu kojih je isključena pojava puberteta, a koji su nakon toga korišćeni za detekciju estrusa. Obuhvatali su mikrobiološki i citološki pregled vaginalnog brisa, vaginalnu impedometriju i hormonske analize krvnog seruma (E2, P4). Definisanje materijala i metoda za detekciju estrusa je nedosledna u nekim studijama; navodi se praćenje povećanje broja kornifikovanih ćelija u citološkom nalazu vaginalnog brisa i povećanje serumskih koncentracija estradiola E2 (Marino i sar., 2014; Kaya i sar., 2013; 2015), dok je kod drugih autora to otok vulve i/ili vaginalni iscedak, ponekad u kombinaciji sa povećanjem indeksa površinskih ćelija i/ili povećanjem koncentracije progesterona u serumu (Trigg i sar., 2006).

Ograničen broj prethodnih studija otkrio je da se adspekcijom vidljiv odgovor na aplikaciju implantata deslorelina - efekat „razbuktavanja“ (eng. „flare up“) - dešava u prepubertetskom periodu kuja starijih od sedam meseci, dok prepubertalne kuje sa četiri meseca starosti nisu pokazivale znake estrusa nakon primene leka (Rubion i sar., 2006; Trigg i sar., 2006; Kaya i sar., 2013; 2015).

Nakon ugradnje implantata u DESLO grupi, sve kuje su praćene zbog moguće pojave efekta „razbuktavanja“ i to: kliničkim pregledom, uzimanjem vaginalnog brisa za citološki pregled, određivanjem vaginalne impedetrije i hormonskim analizama krvnog seruma (E2, P4). U DESLO grupi, kao i u prethodnim istraživanjima sa kujama uzrasta od četiri meseca, nije bilo efekta „razbuktavanja“, a prosečno vreme do početka estrusa bilo je 633 dana (oko 90 nedelja).

Jedan od prvih pokušaja supresije polnog ciklusa upotrebom svakodnevnih injekcionih GnRH agonista (100 µg) kod 9 prepuberalnih kuja tokom 23 meseca odložio je pubertet u trajanju od 4 do 12 meseci od zadnje aplikacije (Lacoste i sar., 1989). Rubion i sar. (2006) su nasumično raspoređivali kuje u tretiranu ili kontrolnu grupu u dobi od  $4,88 \pm 0,32$  meseca. Ogleđne kuje su primale 18,5 mg azaglinafarelina u vidu potkožnih implantata. Kuje nisu pokazivale znake estrusa (praćeno je oticanje vulve i vaginalno krvarenje), a cikličnost je potisnuta tokom 24 meseca. Ovo je jedina dostupna studija gde je implantat uklonjen nakon godinu dana. Međutim, redovna vaginalna citologija i merenja serumske koncentracije estrogena nisu rađena da bi bilo sasvim sigurno da nije došlo do pojave estrusa.

U drugoj studiji (Trigg i sar., 2006), štenci su detaljno pregledani pre aplikacije implantata (9,4 mg deslorelina) i raspoređeni u tri grupe (I grupa - implantat ugrađen u uzrastu od četiri meseca; II grupa – implantat sa sedam meseci; i treća kontrolna grupa gde je aplikovan placebo sa četiri meseca). Otok vulve, vaginalni iscedak i citologija, kao i povećanje serumske koncentracije progesterona  $>2$  ng/mL bili su parametri koji su praćeni u cilju detektovanja prvog estrusa. Trigg i sar. (2006) su jasno pokazali da aplikacijom implantata kod kuja od četiri meseca starosti i kod kuja u prepubertetskom periodu (7. mesec), nijedan od znakova estrusa nije primećen u periodu trajanja eksperimenta, gde je u drugoj grupi kuja (aplikacija u 7. mesecu starosti) anestrija trajala devet meseci. Kao nedostatak studijskog dizajna navodi se potreba dužeg period praćenja kuja koji bi omogućio procenu srednjoročnih i dugoročnih efekata odlaganja puberteta.

Fontaine i sar. (2012) su koristili implantat deslorelina od 9,4 mg za odlaganje puberteta kod kuja čija je prosečna starost bila 4,2 meseca. Implantat od 9,4 mg je aplikovan kod 11, a

implantat od 4,7 mg je aplikovan kod 16 kuja. Raspon telesne mase kretao se između 3 i 40 kg, ali se ne navodi i prosečna telesna masa kao i koje od kuja su primile implantat sa više, odnosno manje deslorelina. Homogenija grupa životinja bi pojednostavila prilično subjektivno vrednovanje efekata deslorelina. Efekat kod veoma velikih rasa može biti doveden u pitanje zbog kasnog nastanka puberteta, što je česta pojava kod kuja sa velikom telesnom masom. Takođe, detekciju estrusa u navedenom istraživanju su radili vlasnici koji su pozivali kliniku kada bi primetili znake estrusa, što je vrlo diskutabilno. Pregled kuja u estrusu je obavljen na kraju estrusa, zabeleženi su neželjeni efekti, i izmerena koncentracija progesterona. U grupi kuja koje su dobile implantate od 9,4 mg, nije detektovan estrus u periodu posmatranja od 8-15 meseci; međutim, zbog manjkavosti metodologije, odnosno činjenice da su eventualnu pojavu estrusa detektovali vlasnici životinja, postoji mogućnost da nije svaki estrus zabeležen.

Korišćenjem implantata od 4,7 mg kod četiri kuje starosti 4,3 meseca, kao i 9,4 mg implantata kod pet kuja starih 4,2 meseca, Kaya i sar. (2015) su uočili pojavu puberteta u dobi od 18 do 25 meseci. Koncentracija deslorelina nije imala uticaja na trajanje supresije estrusa, međutim, relativno mali broj kuja je učestvovao u studiji. Kod četiri kuje (kontrolna grupa) koje su primale 0,9% vodeni rastvor natrijum-hlorida, pubertet je nastupio u proseku nakon 15 meseci.

U ispitivanju Faya i sar. (2018) pareni su mešanci prosečne telesne mase od 13 kg, a njihovi novorođeni muški i ženski štenci su nasumično raspoređeni u eksperimentalnu i kontrolnu grupu u uzrastu od jednog dana. Eksperimentalna grupa je dobila dva 9,4 mg implantata supkutano u predelu leve, odnosno desne lopatice. Štenci su jednom nedeljno pregledani radi praćenja anatomskog razvoja (visina u grebenu, telesna težina i obim skrotuma) i znakova estrusa, a u krvnom serumu je određivan estradiol (E2) i testosteron (T). Kontrolama je aplikovan supkutani placebo implantat. Starost u pubertetu bila je skoro udvostručena u eksperimentalnoj grupi (72 nedelje) u poređenju sa kontrolom (39,3 nedelje) i rezultati su uporedivi sa efektom tretmana kod štenaca starih 4–5 meseci iz drugih studija (Fontaine i sar., 2012; Marino i sar., 2014; Kaya i sar., 2015). Jedna od prednosti dizajna studije je da su štenci očigledno bili u prepubertalnom dobu od aplikacije implantata, ali se neophodnost ranog tretmana dovedu u pitanje (Schäfer-Somi i sar., 2022). Budući da su neželjeni efekti kao što je perivulvarni dermatitis i uzlazne infekcije urogenitalnog trakta česte nakon kastracija obavljenih pre puberteta (Joshua, 1965; Jagoe i Serpell, 1988; Salmeri i sar., 1991), zapažanja tokom prvih godina života razjasniće da li se neželjeni efekti mogu sprečiti upotrebom dugotrajnog agonista GnRH.

Trajanje supresije estrusa je teško predvideti i može zavisiti od drugih faktora, kao što su mesto aplikacije, mehanizam resorpcije i metabolizam jedinki. Još uvek je nejasno da li je kod kuja trajanje supresije dozno zavisno, pošto se trajanje supresije nije bitno razlikovalo, bilo da su primenjeni implantati deslorelina od 4,7 ili od 9,4 mg aktivne supstance (Trigg i sar., 2006; Fontaine i sar., 2012; Marino i sar., 2014; Kaya i sar., 2015).

Kod kuja iz tretirane grupe u našem ispitivanju primećene su male varijacije vrednosti serumskih koncentracija E2 i P4 tokom perioda bez pojave estrusa izazvanog aplikacijom implantata deslorelina. Kaya i sar. (2015) su u svom istraživanju primetili varijabilne vrednosti serumskih koncentracija E2 i P4 kod kuja u periodu pre puberteta, a nakon aplikacije implantata GnRH tokom perioda bez pojave estrusa, koji je trajao od 8 do 19,5 meseci. Kod novorođenih kuja, aplikacija deslorelina prvog dana života nije izazvala oscilacije E2 i P4 tokom celog perioda bez pojave estrusa (Faya i sar., 2018). Razlog za ova mala odstupanja u rezultatima mogu biti posledica velike varijabilnosti faktora u svakoj

pojedinačnoj studiji sa sličnim ili različitim dizajnom i verovatnije, individualnim razlikama u apsorpciji leka ili metabolizmu između kuja, jer su navedena odstupanja primećena samo kod jedne do dve kuje (Kaya i sar., 2013; 2015; Schafer-Somi i sar., 2022).

U našem ispitivanju koncentracije P4 u serumu se nisu razlikovale između tretirane i kontrolne grupe, što je u saglasnosti sa rezultatima ranije obavljenih ispitivanja (Kaya i sar., 2015). Kaya i sar. (2015) su odabrali 13 kuja mešanki srednjeg rasta starosti od 4–5,1 mesec u cilju ispitivanja delovanje agoniste GnRH na hormonski status i rast kostiju. Kao razlog se navodi već pomenuta individualna razlika u metabolizmu kuja, ali i činjenica da su neke od kuja bile starije od četiri meseca. Za razliku od većine autora, Faya i sar. (2018) su aplikovali agonistu GnRH postnatalno, tj. prvog dana života, i nisu primetili značajne razlike u serumskim koncentracijama P4 između ispitivanih grupa. Uprkos napretku u razumevanju lutealne fiziologije kod gravidnih i negravidnih kuja (Kowalewski, 2012, 2014; Kowalewski i sar., 2015), mehanizmi supresije i obnavljanja aktivnosti jajnika i lutealne funkcije nakon kratkotrajne ili dugotrajne inhibicije aktivnosti gonada ostaju nedovoljno razjašnjeni. Međutim, značajno je istaći da sa kliničkog aspekta status koncentracije P4 govori da deslorelin nema negativnih efekata na funkcionalnost jajnika posle dugotrajnog odlaganja estrusa kod kuja (Kaya i sar., 2017).

Melatonin, regulatorni neuropeptid, izaziva mnoge reakcije na promene u telu, kao i odgovor organizma na promene u životnoj sredini. U ovom istraživanju, po prvi put je doveden u vezu supresivni efekat deslorelina na osu hipotalamus – hipofiza - gonade i status koncentracije melatonina u serumu, jer melatonin ima jednu od najvažnijih uloga u sintezi GnRH. Pored toga, dobijeni rezultati u vidu značajno veće koncentracije E2 ( $P < 0,001$ ) u tretiranoj grupi kuja, razlikuju se u poređenju sa onima iz prethodnih studija (Rubion i sar., 2006; Trigg i sar., 2006; Kaya i sar., 2013; 2015; 2017). Takođe, vrednosti serumskih koncentracija melatonina su bile značajno veće u DESLO grupi nakon pojave estrusa. Ranija istraživanja vezana za uticaj melatonina na endokrini status kod kastriranih i intaktnih muških pasa (Lakin i sar., 1981; Salvati i sar., 2018) pokazala su da povećanje melatonina smanjuje serumske koncentracije progesterona i estrogena. Pošto su istraživanja rađena na mužjacima, ostaje pitanje kolika je razlika u mehanizmima delovanja i regulacije određenih hormona među polovima, ili tačnije, kako estrus utiče na status melatonina nakon supresije deslorelinom. Pretpostavlja se da efekat deslorelina – supresija estrusa kod kuja u prepubertetskom periodu – izaziva regrutaciju većeg pula folikula čiji je ovulatorni kapacitet sporan, ali koji su sposobni za sintezu veće koncentracije estrogena. Tokom anestrusa, implantat deslorelina predstavlja izvor GnRH, a osovina hipotalamus - hipofiza je potisnuta. Posle efekta deslorelina tj. dugotrajne reverzibilne kontracepcije, aktivnost melatonina prati sinteza i oslobađanje GnRH, koji je u DESLO grupi pokazao visoku serumsku koncentraciju.

Melatonin luči pinealna žlezda i reguliše se količinom svetlosti. Kod životinje kratkog dana, kao što su ovce, visoka koncentracija melatonina u serumu stimuliše aktivnost estrusa, dok visoka koncentracija u serumu inhibira estrus kod životinja dugog dana kao što su mačke (Gimenez i sar. 2009; Faya i sar. 2011). Melatonin može da ometa estrogenske receptore i takođe može da promeni lučenje FSH i LH. Za razliku od vuka, domaći pas se smatra nesezonskom životinjom sa prosečno dva ciklusa godišnje (1–4), bez jasnih dokaza o sezonskom obrascu (Sokolowski i sar. 1977). U našem radu kuje pokazuju ponašanje kao ovace, gde su visoke koncentracije melatonina prisutne u periodu estrusa i to u značajno većoj koncentraciji u DESLO grupi nego kod kontrolne grupe.

Zapaljenje vagine se naziva kao vaginitis i veoma je česta pojava kod odraslih kuja, međutim, može se desiti da se pojavi i kod štenadi prepuberteta. Vaginitis kod štenadi naziva se juvenilni vaginitis. Uobičajeni klinički znak kod štenaca uključuje vaginalni iscjedak i zapaljenje vulve (Učar i sar., 2011). Juvenilni vaginitis je retko stanje koje se javlja u periodu od 8 do 12 meseci stari štenci (Bouchaute, 2015). Tretman juvenilnog vaginitis se zasniva na težini kliničkih simptoma koje štenci pokazuju a najčešće se stanje se povlači nakon početka puberteta. Juvenilni vaginitis čini 40-52% prijavljenih slučajevi vaginitisa i obolele životinje obično ne pokazuju težu kliničku sliku (Johnston; Kustritz; Olson, 2001). Nezrelost reproduktivnog trakta kod mladih kuja dovodi do zapaljenja odnosno do vaginalnih infekcija (Pursvell, 2004). Juvenilni vaginitis se javlja kod kuja pre puberteta a karakteriše se mukoznim ili mukopurulentnim sekretom iz vulve (Pursvell, 2004) i u većini slučajeva dolazi do samoizlečenja (Pursvell, 2004). Kako vaginalni sekret ne pokazuje značajnu bakterijsku kontaminaciju, upotreba antibiotika je kontraindikovana (Johnston; Kustritz; Olson, 2001). Primarni vaginitis se javlja kod štenaca ili kuje u prepubertetskom periodu i predstavlja samoograničavajuću bolest koja nestaje sa početkom estrusa. Iako nije posebno dokazano, izgleda da postoji kolonizacija vagine bakterijama koje izazivaju prolaznu inflamatornu reakciju dok se nerazviju nespecifični zaštitni faktori (Barton 1977). U vagini kuja postoji normalna mikroflora, a najčešće izolovane bakterije su *Escherichia coli*, beta-hemolitičke streptokoke i *Staphylococcus aureus* i *intermedius* i drugih. Iako se oni mogu smatrati potencijalno patogenima, njihova uključenost u bolest je diskutabilna. Hirsh i Viger (1977) u svom radu su naveli da ovi mikroorganizmi obično se nalaze i kod klinički zdravih kuja, više različitih vrsta bakterija i njihov veći broj obično se nalazi kada postoje jači vaginalni eksudati. U vaginalnim brisevima (n = 12) uvek su izolovani mikroorganizmi i to uglavnom pokazujući srednji do visok stepen rasta. Izolovani su u tri uzorka mikroorganizmi iz roda streptokoka i to *Streptococcus canis*, *S. pseudointermedius*; *S. saprophiticus*. Među gram negativnim bakterijama, *E. coli* je najčešće izolovani mikroorganizam (sedam uzoraka), a zatim *Klebsiella spp.* (*K. pneumoniae*) i *Enterobacter spp.* (*E. cloacae*) (dva uzorka); *Proteus spp.* (*P. mirabilis*) i *Leclercia spp.* (*L. adekarboksilata*), po jedan uzorak. (Carro A i sar. 2022). U našem radu kod dve kuje iz DESLO grupe izolovana je *E. Coli* i *Staphylococcus pseudointermedius* i mešana kultura kod jedne kuje iz kontrolne grupe, ali ova stanja nisu zahtevala tretman i kuje su se spontano oporavile.

Tokom estrusnog ciklusa ispitivan je odnos između električnog otpora vaginalne sluzokože i koncentracija estradiola i progesterona u serumu. Utvrđeno je da su impedometrijske karakteristike vaginalne sluzi pokazatelj serumskih koncentracija progesterona i njegove korelacije sa estrogenom u terminalnoj fazi estrusnog ciklusa kod cikličnih ženki (Bartlevski et al., 1999). Ovulaciju karakteriše povećanje nivoa progesterona u serumu iznad 5 ng / ml, i javlja se tokom perioda povećane otpornosti vaginalne sluzi u poslednja 3 dana (Gunzel et al., 1986). Dokazana je korelacija između električnog otpora vaginalne membrane i preovulatorne koncentracije luteinizirajućeg hormona. Kako folikuli sazrevaju, električni otpor (450-600 oma) naglo opada. Tokom estrusa, kada je otpor vaginalne sluzokože 200-300 oma, grlić materice je uvek otvoren, a kada je otpor veći od 350 oma, može biti zatvoren ili blago otvoren. Optimalno vreme za osemenjavanje je na 250-400 oma (Bordjugov et al., 2013). Gurler i dr. (2018) smatraju da je metoda vaginalne električne impedanse bila brža i jeftinija metoda od procene progesterona i pouzdanija od vaginalne citologije i kliničke procene. U zaključku, autori navode da je kombinacija vaginalnog merenja električne impedance i procene progesterona bila korisna metoda za određivanje optimalnog vremena osemenjavanja kod kuja (Gurler et al., 2018). Draminski detektor

ovulacije pokazao je da je 87,5% kuja bilo blizu ovulacije (Gurler et al., 2018). Prirodna naizmenična struja vaginalne sluzokože se pojačava na početku estrusa, i čini se da biološki aktivne tačke imaju uslovnu neravnotežu, čime se povećava bioelektrična aktivnost, što smanjuje provodljivost. Električna provodljivost se naglo povećava na relevantnim biološki aktivnim tačkama, koje su odgovorne za funkciju jajnika i materice povezane sa ovulacijom. Oni zaključuju da pomoću ovog testa možete odrediti optimalno vreme za prirodnu ili veštačku oplodnju, izbegavajući nepotrebne troškove za odgajivače (Rocha Fonseca, 2016). Ljubeckij i sar. (2010) proučavali su korelaciju između promena električne provodljivosti biološki aktivnih tačaka materice i jajnika tokom ciklusa sa optimalnim vremenom osemenjavanja kuje. Utvrđeno je da je dinamika električne provodljivosti u biološki aktivnim tačkama kože, koje su odgovorne za funkciju materice i jajnika, povezana sa morfo-funkcionalnim promenama u genitalijama kuja tokom estrusa i odražava njihovu bioelektričnu aktivnost. Oni zaključuju da je upotreba ove metode za dijagnozu optimalnog vremena osemenjavanja kuja prilično korisna, ali je zbog složenosti primene, a posebno interpretacije rezultata, njena široka primena u praksi često ograničena (England, Concannon, 2002; Tomas, 2013).

Kalcijum je vitalni mineral i njegova uloga je u izgradnji kostiju i zuba, igra aktivnu ulogu u zgrušavanju krvi, prenosu nervnih impulsa i sekretornim i membranskim aktivnostima. Fosfor je, s druge strane, uključen u više metaboličkih funkcija nego bilo koji drugi mineral, uključen je u formiranje kostiju, energetski metabolizam, integritet membrane, metabolizam nukleinske kiseline, pufersko delovanje, itd. Organizam pokušava da održi nivo jonizovanog kalcijuma u krvi i to preko dva načina: podsticanjem apsorpcije kalcijuma iz creva i stimulisanjem reapsorpcije kalcijuma iz kostima (Barrette 1988). Referentne vrednosti koncentracije fosfora u serumu mladih pasa iznose od 1,29 do 3,1 mmol/L a kalcijuma od 2,35-2.98 mmol/L (Czerwik i sar. 2019). Jonizovani kalcijum kod pasa najčešće se nalazi u intervalu 1,25 do 1,45 mmol/ L (Sakals i sar. 2006). Rezultati naših istraživanja ukazuju da je koncentracija kalcijuma i fosfora bila u referentnim vrednostima, i menjala se tokom trajanja oglada kako su kuje rasle i razvijale se, a koncentracija kalcijuma ( $P < 0,001$ ) i fosfora ( $P < 0,01$ ) bila je značajno veća u kontrolnoj grupi tokom celog ispitivanog perioda. Magnezijum je neophodan za sintezu proteina, energetski metabolizam (He i sar. 2006), kontrakciju mišića, regulaciju krvnog pritiska (He i sar. 2005), i moduliranje nivoa glukoze u krvi kao i značajan broj enzimskih reakcija u telu (Covan, 2002). Prosečan nivo magnezijuma u serumu zdravih odraslih pasa je između 17 i 27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Plumb, 1999) odnosno 0.7–1.0 mmol/L (Latimer i sar. 2011). Koncentracija magnezijuma u našem radu bila je značajno veća u kontrolnoj grupi ( $P < 0,01$ ) tokom celog ispitivanog perioda ali u obe grupe vrednosti ovih mikroelemenata bile su referentnim intervalima. Osifikacija kostiju je proverena magnetnom rezonancom kod svih ispitivanih kuja. U literaturi nema dovoljno podataka za koncentracije ovih mikroelemenata u toku faza ciklusa tokom primene metoda hormonske supresije estrusa kod juvenilnih kuja.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata u okviru sprovedenog istraživanja došli smo do sledećih zaključaka:

1. Aplikacija implantata GnRH u regiji pupka (supkutano) nije izazvala neželjene efekte kod juvenilnih kuja mlađih od 4 meseca starosti i nije izazvala vidljiv odgovor na aplikaciju implantata deslorelina - efekat „razbuktavanja“.
2. Kod kuja iz DESLO grupe primećen je 4,4 puta duži vremenski period ( $P < 0.001$ ) mirovanja bez znakova estrusa, u poređenju sa kontrolnom grupom.
3. Poređenjem koncentracija estrogena u serumu pre pojave prvih znakova estrusa, i u toku proestrusa i estrusa, u DESLO grupi su dobijene značajno veće prosečne vrednosti koncentracija estrogena u odnosu na kontrolnu grupu ( $P < 0,01$ ;  $P < 0,01$  i  $P < 0,001$ , pojedinačno).
4. Poređenjem koncentracija progesterona u serumu pre pojave prvih znakova estrusa, u DESLO grupi su dobijene značajno veće prosečne vrednosti koncentracija progesterona ( $P < 0,05$ ).
5. Serumske koncentracije melatonina tokom estrusa i metestrusa u DESLO grupi bile su 3,5 odnosno dva puta veće u poređenju sa kontrolnom grupom, sa utvrđenom statističkom značajnošću od  $P < 0,001$  i  $P < 0,01$  pojedinačno.
6. Citološki pregled vaginalnog brisa, vaginalna impedometrija i hormonske analize krvnog seruma (E2, P4) predstavljaju pouzdanu metode na osnovu kojih se može i isključiti i detektovati pojava estrusa kod kuja.
7. Supresija osovine hipotalamus – hipofiza – gonade aplikacijom implantata GnRH kod juvenilnih kuja utiče na serumske koncentracije estrogena i melatonina u krvi.
8. Nakon prestanka delovanja implantata GnRH, kuje iz DESLO grupe su pokazale jasne znakove estrusa, kao i fiziološke vrednosti koncentracije E2, P4 i melatonina.
9. U proestrusu su samo koncentracije kalcijuma bile veće u kontrolnoj u odnosu na DESLO grupu, dok su u toku celog perioda ispitivanja koncentracije kalcijuma, fosfora i magnezijuma bile statistički značajno veće u kontrolnoj grupi u odnosu na DESLO grupu. U obe ispitivane grupe koncentracija ovih makroelemenata bile su u referentnim intervalima tokom celog perioda ispitivanja.

## 8. LITERATURA

1. Aitken, R.J., Paterson, M. and Duin, M.V., 1996. The potential of the zona pellucida as a target for immunocontraception. *American Journal of Reproductive Immunology*, 35(3), pp.175-180.
2. Albers-Wolthers, K.H., De Gier, J., Kooistra, H.S., Rutten, V.P., Van Kooten, P.J., De Graaf, J.J., Leegwater, P.A., Millar, R.P. and Schaefer-Okkens, A.C., 2014. Identification of a novel kisspeptin with high gonadotrophin stimulatory activity in the dog. *Neuroendocrinology*, 99(3-4), pp.178-189.
3. Alliance for Contraception in Cats and Dogs (ACC&D). *Contraception and fertility control in dogs and cats*. E-book: 2013.
4. Ambriz-Tututi, M., Rocha-González, H.I., Cruz, S.L. and Granados-Soto, V., 2009. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life sciences*, 84(15-16), pp.489-498.
5. Andersen, A.C., Simpson, M.E. and Geron-X Inc, 1973. Ovarian development, from birth to puberty. *The Ovary and the Reproductive Cycle of the Dog (Beagle)*. Los Altos, California, pp.48-102.
6. Angioletti, A., De Francesco, I., Vergottini, M. and Battocchio, M.L., 2004. Urinary incontinence after spaying in the bitch: incidence and oestrogen-therapy. *Veterinary Research Communications*, 28, pp.153-155.
7. Anjorlas, E. *Prevention de L'oestrus Induit par la Pose d'un Implant de Desloreline Chez la Chienne: Utilisation de l'ac Etate d'osaterone*. Doctoral Dissertation, Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France, 2011; pp. 1–142.
8. Arnold, S., Hubler, M. and Reichler, I.M., 2009. Urinary incontinence in spayed bitches: new insights into the pathophysiology and options for medical treatment. *Reproduction in domestic animals*, 44(Suppl), pp.190-192.
9. Barber, M.R., Lee, S.M., Steffens, W.L., Ard, M. and Fayrer-Hosken, R.A., 2001. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology*, 55(8), pp.1705-1717.
10. Barrette DC., *Calcium and Phosphorus for Cats and Dogs*, *Can Vet J*, 29, 1988, 751-752.
11. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. 1999. The relationship between vaginal mucous impedance and serum concentrations of estradiol and progesterone throughout the sheep estrous cycle. *Theriogenology* 51: 813-827.
12. Beck, P., 1977. Effect of progestins on glucose and lipid metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 286, pp.434-445.
13. Beijerink, N.J., Buijtel, J.J.C.W.M., Okkens, A.C., Kooistra, H.S. and Dieleman, S.J., 2007. Basal and GnRH-induced secretion of FSH and LH in anestrus versus ovariectomized bitches. *Theriogenology*, 67(5), pp.1039-1045.
14. Berzon, J.L., 1979. Complications of elective ovariohysterectomies in the dog and cat at a teaching institution: clinical review of 853 cases. *Veterinary Surgery*, 8(3), pp.89-91.
15. Blithe, D.L., 2016. Pipeline for contraceptive development. *Fertility and Sterility*, 106 pp.1295–1302.



16. Borchelt, P.L., 1983. Aggressive behavior of dogs kept as companion animals: classification and influence of sex, reproductive status and breed. *Applied Animal Ethology*, 10(1-2), pp.45-61.
17. Bordjugov KS, Bordjugova SS, Kot VS. 2013. Rizni metody vyznachennja ovuljacji' u sobak [Different methods for determining ovulation in dogs]. *Visnyk Poltavs'koi' Derzhavnoi' Agrarnoi' Akademii' 1*: 116-119 (in Ukrainian).
18. Bouchaute, J.V. (2015) Puppy Vaginitis. Thesis submitted to the University of Ghent Faculty of Veterinary Medicine. Belgium. pp 09-11, 16.
19. Bowen, R.A., Olson, P.N., Behrendt, M.D., Wheeler, S.L., Husted, P.W. and Nett, T.M., 1985. Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186(8), pp.783-788.
20. Burke, T.J. and Reynolds Jr, H.A., 1975. Megestrol acetate for estrus postponement in the bitch. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 167(4), pp.285-287.
21. Carro A D, Corrà, M, Bertero A, Colitti B, Banchi P, Bertolotti L, Rota A, The evolution of dam-litter microbial flora from birth to 60 days of age, *BMC Veterinary Research* volume 18, Article number: 95 (2022)
22. Carter, D.S. and Goldman, B.D., 1983. Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology*, 113(4), pp.1261-1267.
23. Casadesus, G., Milliken, E.L., Webber, K.M., Bowen, R.L., Lei, Z., Rao, C.V., Perry, G., Keri, R.A. and Smith, M.A., 2007. Increases in luteinizing hormone are associated with declines in cognitive performance. *Molecular and cellular endocrinology*, 269(1-2), pp.107-111.
24. Cathey, M. and Memon, M.A., 2010. Nonsurgical methods of contraception in dogs and cats: Where are we now. *Vet. Med*, 105, pp.12-17.
25. Coit, V.A., Dowell, F.J. and Evans, N.P., 2009. Neutering affects mRNA expression levels for the LH-and GnRH-receptors in the canine urinary bladder. *Theriogenology*, 71(2), pp.239-247.
26. Concannon, P., Lasley, B. and Vanderlip, S., 1997. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement*, 51, pp.41-54.
27. Concannon, P., Montanez, A. and Frank, D., 1988. Suppression of LH secretion by constant infusion of GnRH agonist in ovx dogs and prolonged contraception of prepubertal bitches by constant subcutaneous administration of GnRH-agonist. 3pp.
28. Concannon, P.W., 1993. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, pp.3-27.
29. Concannon, P.W., 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal reproduction science*, 124(3-4), pp.200-210.
30. Corrada, Y., Hermo, G. and Gobello, C., 2006. Theriogenology Question of the Month. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(6), pp.855-856.

31. Cowan JA. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals*. 2002;15(3):225–235.
32. Czerwik A, Olszewska A, Starzomska B, Korta R, Henrich M, Wrzosek M, Schmidt J, Multiple cartilaginous exostoses in a Swiss Mountain dog causing thoracolumbar compressive myelopathy, *Acta Vet Scand* (2019) 61:32, 2-6.
33. Daniel, J.A., Foradori, C.D., Whitlock, B.K. and Sartin, J.L., 2013. Hypothalamic integration of nutrient status and reproduction in the sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 48, pp.44-52.
34. Dassler, C.L., 2003. Canine hip dysplasia: diagnosis and nonsurgical treatment. *Textbook of small animal surgery*, 3, pp.2019-2028.
35. De Gier, J., Kooistra, H.S. and Vinke, C.M., 2013, July. The effects of orchietomy and chemical castration using deslorelin on male dog behavior. In *Proceedings of the 16th EVSSAR Congress*, Toulouse, France (pp. 5-6).
36. de la Riva, G.T., Hart, B.L., Farver, T.B., Oberbauer, A.M., Messam, L.L.M., Willits, N. and Hart, L.A., 2013. Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers. *PloS one*, 8(2), p.e55937.
37. Dissen, G. A., Lomnixai, A., & Chen, Y. H., 2014. Suppressing GnRH activators using gene silencing. Oral presentation. 11th International Symposium on GnRH, Salzburg, Austria.
38. Dissen, G.A., Adachi, K., Lomniczi, A., Chatkupt, T., Davidson, B.L., Nakai, H. and Ojeda, S.R., 2017. Engineering a gene silencing viral construct that targets the cat hypothalamus to induce permanent sterility: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, pp.354-358.
39. Dissen, G.A., Lomniczi, A., Boudreau, R.L., Chen, Y.H., Davidson, B.L. and Ojeda, S.R., 2012. Targeted gene silencing to induce permanent sterility. *Reproduction in domestic animals*, 47, pp.228-232.
40. Donovan, C.E., Gordon, J.M. and Kutzler, M.A., 2014. Gonadotropin-releasing hormone immunization for the treatment of urethral sphincter mechanism incompetence in ovariectomized bitches. *Theriogenology*, 81(2), pp.196-202.
41. Dorn, A.S., Swist, R.A., 1977, Complications of canine ovariohysterectomy. *Journal of the American Animal Hospital Association* 13, pp.167–171.
42. Driancourt, M.A. and Briggs, J.R., 2020. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist implants for male dog fertility suppression: A review of mode of action, efficacy, safety, and uses. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p.483.
43. Dunbar, B.S., 1983, Antibodies to zona pellucida antigens and their role in fertility. In: Wegmann TG, Gill TJ, editors. *Immunology of reproduction*. pp.505–34.
44. Durrant, B.S., Pratt, N.C., Russ, K.D. and Bolamba, D., 1998. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*, 49(5), pp.917-932.
45. Duval, J.M., Budberg, S.C., Flo, G.L. and Sammarco, J.L., 1999. Breed, sex, and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 215(6), pp.811-814.

46. Edney, A.T. and Smith, P.M., 1986. Study of obesity in dogs visiting veterinary practices in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 118(14), pp.391-396.
47. England G, Concannon DW. 2002. Determination of the optimal breeding time in the bitch-basics considerations. In: PW Concannon, G England, J Verstegen and C LindeForsberg (Eds.). *Recent advances in Small Animal Reproduction*. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA.
48. English, J., Poulton, A.L., Arendt, J. and Symons, A.M., 1986. A comparison of the efficiency of melatonin treatments in advancing oestrus in ewes. *Reproduction*, 77(2), pp.321-327.
49. Enright, W.J. and Swift, P.J., 1995. GnRH immunization of peripubertal male cats: dose titration of a GnRH-gly-cys-ovalbumin (GnRHOVAL) conjugate on immune and testicular responses. *Journal of Reproduction and Fertility*. 15, p. 15.
50. Ettinger, A.M., Gust, S.K. and Kutzler, M.A., 2019. Luteinizing hormone receptor expression by nonneoplastic and neoplastic canine lymphocytes. *American Journal of Veterinary Research*, 80(6), pp.572-577.
51. Fagerstone, K.A., Miller, L.A., Bynum, K.S., Eisemann, J.D. and Yoder, C.A., 2006. When, where and for what wildlife species will contraception be a useful management approach?. In *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference* (Vol. 22, No. 22).
52. Faya, M., Carranza, A., Priotto, M., Graiff, D., Zurbriggen, G., Diaz, J.D., Gobello, C. Long-term melatonin treatment prolongs interestrus, but does not delay puberty, in domestic cats. *Theriogenology* 2011, 75, 1750–1754.
53. Faya, M., Marchetti, C., Priotto, M., Grisolia, M., D'Francisco, F. and Gobello, C., 2018. Postponement of canine puberty by neonatal administration of a long-term release GnRH superagonist. *Theriogenology*, 118, pp.190-195.
54. Fontaine, E. and Fontbonne, A., 2011. Clinical use of GnRH agonists in canine and feline species. *Reproduction in domestic animals*, 46(2), pp.344-353.
55. Fontaine, E. Maenhoudt, C. Mir, F. Navarro, C. Fontbonne, A., 2012. Postponement of puberty using GnRH agonist implants in bitches of different breeds. In *Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, Whistler, BC, Canada, 26–29 July.
56. Fontaine, E., Mir, F., Vannier, F., Gérardin, A., Albouy, M., Navarro, C. and Fontbonne, A., 2011. Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. *Theriogenology*, 76(8), pp.1561-1566.
57. Frank, L.A., 2007. Oestrogen receptor antagonist and hair regrowth in dogs with hair cycle arrest (alopecia X). *Veterinary dermatology*, 18(1), pp.63-66.
58. Frank, L.A., Donnell, R.L. and Kania, S.A., 2006. Oestrogen receptor evaluation in Pomeranian dogs with hair cycle arrest (alopecia X) on melatonin supplementation. *Veterinary Dermatology*, 17(4), pp.252-258.
59. Fu, Q. and Wang, P.J., 2014. Mammalian piRNAs: Biogenesis, function, and mysteries. *Spermatogenesis*, 4(1), p.e27889.
60. German, A.J., 2006. The growing problem of obesity in dogs and cats. *The Journal of nutrition*, 136(7), pp.1940S-1946S.

61. Gimenez, F., Stornelli, MC., Tittarelli, CM., Savignone, CA., Dorna, IV., de la Sota, RL., Stornelli, M.A. Suppression of estrus incats with melatonin implants. *Theriogenology* 2009, 72, 493–499.
62. Gizzo, S., Fanelli, T., Di Gangi, S., Saccardi, C., Patrelli, T.S., Zambon, A., Omar, A., D'Antona, D. and Nardelli, G.B., 2012. Nowadays which emergency contraception? Comparison between past and present: latest news in terms of clinical efficacy, side effects and contraindications. *Gynecological Endocrinology*, 28(10), pp.758-763.
63. Gobello, C., 2014. Prepubertal and pubertal canine reproductive studies: conflicting aspects. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(6), pp.e70-e73.
64. Goericke-Pesch, S., 2017. Long-term effects of GnRH agonists on fertility and behaviour. *Reproduction in domestic animals*, 52, pp.336-347.
65. Greene, J.M. and Ginther, O.J., 2015. Circulating nitric oxide metabolites during luteolysis and the effect of luteinizing hormone on circulating nitric oxide metabolites in heifers. *Theriogenology*, 83(2), pp.213-221.
66. Günzel A-R, Koivisto P, Fougner J. 1986. Electrical resistance of vaginal secretion in the bitch. *Theriogenology* 25: 559-570.
67. Guptill, L., Glickman, L. and Glickman, N., 2003. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records (1970–1999). *The Veterinary Journal*, 165(3), pp.240-247.
68. Gúrler H, Koldas E, Binli F, Akçay A. (2018). Efficiency of vaginal electrical impedance to determine the stage of the reproductive cycle in bitches. *Medycyna Weterynaryjna* 74: 179-181.
69. Haldar, C., 2008. *Experimental endocrinology and reproductive biology*. Science Publishers
70. He K, Liu K, Daviglius ML, Morris SJ, Loria CM, Van Horn L, Jacobs DR, Savage PJ. Magnesium intake and incidence of metabolic syndrome among young adults. *Circulation*. 2006;113(13):1675–1682.
71. He Y, Yao G, Savoia C, Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: Role of angiotensin II. *Circ. Res*. 2005;96(2):207–215.
72. He, Z., Kokkinaki, M., Pant, D., Gallicano, G.I. and Dym, M., 2009. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*, 137(6), pp.901-911.
73. Hill, K., Jordan, D., Ray, J., Mays, A.A. and Griffin, K., 2012. Medical therapy for acquired urinary incontinence in dogs. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 16(5), pp.369-375.
74. Hirsh DC, Wiger N. (1977) The bacterial flora of the normal canine vagina compared with that of vaginal exudates. *J Small Anim Pract* 18(1): 25-30.
75. Historical Approaches to Nonsurgical Contraception in Dogs and Cats by Beverly J. Purswell and Wolfgang Jöchle, the Proceedings of the 4th International Symposium on Non- Surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control, 2010.
76. Houpt, K.A., 1991. Feeding and drinking behavior problems. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21(2), pp.281-298.
77. Houpt, K.A., Coren, B., Hintz, H.F. and Hilderbrant, J.E., 1979. Effect of sex and reproductive status on sucrose preference, food intake, and body weight of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 174(10), pp.1083-1085.

78. Hull, M.E. and Kenigsberg, D.J., 1987. Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use. *Laboratory Management*, 25, pp.51-58.
79. Jagoe, J.A., Serpell, J.A., 1988. Optimum time for neutering. *Veterinary Records*, 122(18), pp.447.
80. Janssens, L.A.A. and Janssens, G.H.R.R., 1991. Bilateral flank ovariectomy in the dog-surgical technique and sequelae in 72 animals. *Journal of Small Animal Practice*, 32(5), pp.249-252.
81. Jeusette, I., Detilleux, J., Cuvelier, C., Istasse, L. and Diez, M., 2004. Ad libitum feeding following ovariectomy in female Beagle dogs: effect on maintenance energy requirement and on blood metabolites. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88(3-4), pp.117-121.
82. Johnston, S. D.; Kustritz, M. V. R.; Olson, P. N. S. Disorders of the canine vagina, vestibule and vulva. *Canine and feline therioegenology*. Philadelphia: WB Saunders, 2001. cap. 12, p. 235-237.
83. Johnston, S.D., Root, Kustritz, M.V., Olson, P.N. 2001. *Canine and Feline Theriogenology*, Saunders: Philadelphia, PA, USA, ISBN 0721656072.
84. Johnston, S.D., Root, Kustritz, M.V., Olson, P.N. 2001. The canine estrous cycle. *Canine and Feline Theriogenology*. Saunders WB, Philadelphia, pp. 16–31.
85. Joshua, J.O., 1965. The spaying of bitches. *Veterinary Records*, 77, 642–646.
86. Jung, M.J., Moon, Y.C., Cho, I.H., Yeh, J.Y., Kim, S.E., Chang, W.S., Park, S.Y., Song, C.S., Kim, H.Y., Park, K.K. and McOrist, S., 2005. Induction of castration by immunization of male dogs with recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-canine distemper virus (CDV) T helper cell epitope p35. *Journal of veterinary science*, 6(1), pp.21-24.
87. Kaya, A., Baspinar, N., Yildiz, C., Kurtoglu, F., Ataman, M.B. and Haliloglu, S., 2000. Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151(12), pp.1143-1146.
88. Kaya, D., Aslan, S., Kaya, S., Kuru, M., Kacar, C. and Schäfer-Somi, S., 2013. Clinical and endocrine short-term effects of GnRH analogue deslorelin in prepubertal bitches: does a "flare-up" occur?. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 19(2) pp.299-304.
89. Kaya, D., Gram, A., Kowalewski, M.P., Schäfer-Somi, S., Kuru, M., Boos, A. and Aslan, S., 2017. Expression of GnRH receptor in the canine corpus luteum, and luteal function following deslorelin acetate-induced puberty delay. *Reproduction in domestic animals*, 52(6), pp.1104-1112.
90. Kaya, D., Schäfer-Somi, S., Kurt, B., Kuru, M., Kaya, S., Kaçar, C., Aksoy, Ö. and Aslan, S., 2015. Clinical use of deslorelin implants for the long-term contraception in prepubertal bitches: Effects on epiphyseal closure, body development, and time to puberty. *Theriogenology*, 83(7), pp.1147-1153.
91. Kennelly, J.J., 1969. The effect of mestranol on canine reproduction. *Biology of Reproduction*, 1(3), pp.282-288.
92. Kiefel, C. and Kutzler, M.A., 2016, June. Luteinizing hormone receptor expression in canine anterior cruciate and femoral head ligaments. In *Proceedings of the International Symposium on Canine and Feline Reproduction* (pp. 22-25).

93. Kowalewski, M., 2012. Endocrine and molecular control of luteal and placental function in dogs: a review. *Reproduction in domestic animals*, 47, pp.19-24.
94. Kowalewski, M.P., 2014. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reproductive Biology*, 14(2), pp.89-102.
95. Kowalewski, M.P., Ihle, S., Siemieniuch, M.J., Gram, A., Boos, A., Zduńczyk, S., Fingerhut, J., Hoffmann, B., Schuler, G., Jurczak, A. and Domosławska, A., 2015. Formation of the early canine CL and the role of prostaglandin E2 (PGE2) in regulation of its function: an in vivo approach. *Theriogenology*, 83(6), pp.1038-1047.
96. Lacoste, D., Dubé, D., Trudel, C., Bélanger, A. And Labrie, F., 1989. Normal Gonadal Functions and Fertility After 23 Months of Treatment of Prepubertal Male and Female Dogs with the GnRh Agonist [D-Trp6, des-Gly-NH210] GnRH Ethylamide. *Journal of andrology*, 10(6), pp.456-465.
97. Lakin, M.L., Miller, C.H., Stott, M.L. and Winters, W.D., 1981. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life sciences*, 29(24), pp.2543-2551.
98. Latimer KS, Duncan Prasse's *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*, 5th ed., Wiley-Blackwell, 2011;
99. Lefebvre, S.L., Yang, M., Wang, M., Elliott, D.A., Buff, P.R. and Lund, E.M., 2013. Effect of age at gonadectomy on the probability of dogs becoming overweight. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(2), pp.236-243.
100. Lei, Z., Rao, C.V., Kornyei, J.L., Licht, P. and Hiatt, E.S., 1993. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology*, 132(5), pp.2262-2270.
101. Levine, A.S., Sievert, C.E., Morley, J.E., Gosnell, B.A. and Silvis, S.E., 1984. Peptidergic regulation of feeding in the dog (*Canis familiaris*). *Peptides*, 5(4), pp.675-679.
102. Li, J., Olvera, A.I., Akbari, O.S., Moradian, A., Sweredoski, M.J., Hess, S. and Hay, B.A., 2015. Vectored antibody gene delivery mediates long-term contraception. *Current Biology*, 25(19), pp.R820-R822.
103. Ljubec'kyj VJ, Derkach SS, Myhajljuk MM, Val'chuk OA. 2010. Dynamika elektroprovodnosti u biologichno aktyvnyh tochkah shkiry pid chas tichky u suk [Dynamics of electrical conductivity in biologically active points of the skin during heat in bitches]. *Naukovi dopovidi NUBiP Ukraïny 3* [Electronic resource].
104. Mahi-Brown, C.A., Huang Jr, T.T. and Yanagimachi, R., 1982. Infertility in bitches induced by active immunization with porcine zona pellucida. *Journal of Experimental Zoology*, 222(1), pp.89-95.
105. Mahi-Brown, C.A., Yanagimachi, R., Nelson, M.L., Yanagimachi, H. and Palumbo, N., 1988. Ovarian histopathology of bitches immunized with porcine zona pellucida. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, 18(3), pp.94-103.
106. Mahi-Brown, C.A., Yanagimachi, R.Y.U.Z.O., Hoffman, J.C. and Huang Jr, T.T., 1985. Fertility control in the bitch by active immunization with porcine zona pellucida: use of different adjuvants and patterns of

- estradiol and progesterone levels in estrous cycles. *Biology of Reproduction*, 32(4), pp.761-772.
107. Mai, W., Ledieu, D., Venturini, L., Fournel, C., Fau, D., Palazzi, X. and Magnol, J.P., 2001. Ultrasonographic appearance of intra-abdominal granuloma secondary to retained surgical sponge. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 42(2), pp.157-160.
  108. Marino, G., Rizzo, S., Quartuccio, M., Macri, F., Pagano, G., Taormina, A., Cristarella, S. and Zanghi, A., 2014. Deslorelin Implants in Pre-pubertal Female Dogs: Short-and Long-Term Effects on the Genital Tract. *Reproduction in domestic animals*, 49(2), pp.297-301.
  109. Marmor, M., Willeberg, P., Glickman, L.T., Priester, W.A., Cypess, R.H. and Hurvitz, A.I., 1982. Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in dogs. *Am J Vet Res*, 43(3), pp.465-470.
  110. Martin, L.J.M., Siliart, B., Dumon, H.J.W. and Nguyen, P.G., 2006. Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 90(9-10), pp.355-360.
  111. Masson, S., Medam, T., Raibon, E., Fontaine, C. and Levy, X., 2021. Double-blind, placebo-controlled trial of cyproterone acetate to prevent flare-up effect on dogs implanted with deslorelin. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, p.714154.
  112. Meethal, S.V. and Atwood, C.S., 2005. The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cell Mol Life Sci*, 62(3), pp.257-270.
  113. Milne, K.L. and Hayes Jr, H.M., 1981. Epidemiologic features of canine hypothyroidism. *The Cornell Veterinarian*, 71(1), pp.3-14.
  114. Morris, E. and Lipowitz, A.J., 2001. Comparison of tibial plateau angles in dogs with and without cranial cruciate ligament injuries. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(3), pp.363-366.
  115. Munks, M.W., 2012. Progress in development of immunocontraceptive vaccines for permanent non-surgical sterilization of cats and dogs. *Reproduction in domestic animals*, 47, pp.223-227.
  116. Neilson, J.C., Eckstein, R.A. and Hart, B.L., 1997. Effects of castration on problem behaviors in male dogs with reference to age and duration of behavior. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 211(2), pp.180-182.
  117. Nelson, M., 1977. After-effect of injection. *The Veterinary record*, 100(4), p.78.
  118. Neus Bosch, M., Pugliese, M., Andrade, C., Gimeno-Bayón, J., Mahy, N. and Rodriguez, M.J., 2015. Amyloid- $\beta$  immunotherapy reduces amyloid plaques and astroglial reaction in aged domestic dogs. *Neurodegenerative Diseases*, 15(1), pp.24-37.
  119. Noakes, D.E., 2009. Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. *Veterinary reproduction and obstetrics*, 9, pp.3-58.
  120. Noakes, D.E., Parkinson, T.J. and England, G.C. eds., 2018. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
  121. Oates, S.M., 2014. Uncloaking cognitive decline: the emergence of canine cognitive dysfunction in veterinary medicine and its implications for understanding Alzheimer's disease. *Veterinary Heritage: Bulletin of the American Veterinary History Society*, 37(2), pp.47-51.

122. O'farrell, V. and Peachey, E., 1990. Behavioural effects of ovariectomy on bitches. *Journal of Small Animal Practice*, 31(12), pp.595-598.
123. Okkens, A.C. and Kooistra, H.S., 2006. Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reproduction in domestic animals*, 41(4), pp.291-296.
124. Okkens, A.C., Biewenga, W.J., Rothuizen, J. and Voorhout, G., 1981. Urological complications following ovariectomy in dogs (author's transl). *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 106(23), pp.1189-1198.
125. Okkens, A.C., Dieleman, S.J. and van de Gaag, I., 1981b. Gynaecological complications following ovariectomy in dogs, due to partial removal of the ovaries or inflammation of the uterocervical stump. *Tijdschr Diergeneeskd*, 106(22), pp.1142-1158.
126. Okkens, A.C., Kooistra, H.S. and Nickel, R.F., 1997. Comparison of long-term effects of ovariectomy versus ovariectomy in bitches. *Journal of Reproduction and Fertility-Supplements only*, (51), pp.227-232.
127. Osmond, C.S., Marcellin-Little, D.J., Harrysson, O.L. and Kidd, L.B., 2006. Morphometric assessment of the proximal portion of the tibia in dogs with and without cranial cruciate ligament rupture. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 47(2), pp.136-141.
128. Padodara, R., Singh, V., Odedara, A., Vasava, A., Sharma, A. and Mehta, V., 2022. Modern approaches to contraception in domestic and wild animals: A review. *J. Glob. Ecol. Environ*, 16, pp.14-25.
129. Panciera, D.L., 1994. Hypothyroidism in dogs: 66 cases (1987-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(5), pp.761-767.
130. Pavone, M.E. and Burke, A., 2007. Fertility control: contraception, sterilization, and abortion. *The Johns Hopkins Review of Gynecology & Obstetrics*, p.114.
131. Pearson, H., 1973. The complications of ovariectomy in the bitch. *Journal of small animal practice*, 14(5), pp.257-266.
132. Pelletier, J., Carrez-Camous, S. and Thiery, J.C., 1981. Basic neuroendocrine events before puberty in cattle, sheep and pigs. *J Reprod Fertil*, 30(9), pp.1-102.
133. Pepin, D., Kano, M., Sosulski, A., Zhang, L., Nicolaou, F., Nagykerly, N., Wang, D., Gao, G. and Donahoe, P., 2016. Gene therapy with Mullerian inhibiting substance as a female dog and cats contraceptive with lifetime suppression of fertility. In Abstract presented at the ISCFR-EVSSAR Congress, Paris, France.
134. Pluhar GE, MA Memon and LG Wheaton (1995) Granulosa cell tumor in an ovariectomized dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207, 1063–1065
135. Plumb DC. *Veterinary drug handbook*. Third Edition. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press; 1999. p. 812.
136. Plumb, D.C., 2002. *Veterinary drug handbook*. Ames. IA Iowa State University Press.
137. Ponglowhapan, S., Church, D.B., Scaramuzzi, R.J. and Khalid, M., 2007. Luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors and



their transcribed genes (mRNA) are present in the lower urinary tract of intact male and female dogs. *Theriogenology*, 67(2), pp.353-366.

138. Purswell, B. J.; Vaginal Disorders. In: Ettinger, S. J.; Feldman, E. C. *Textbook of veterinary internal medicine*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004. v. 2, chap. 253, p. 1686-1690.

Barton CL. 1977 Canine vaginitis. *Vet Clin North Am* 7(4): 711-714.

139. Rand, J.S., Fleeman, L.M., Farrow, H.A., Appleton, D.J. and Lederer, R., 2004. Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture?. *The Journal of nutrition*, 134(8), pp.2072S-2080S.
140. Reece, W.O., Erickson, H.H., Goff, J.P. and Uemura, E.E. eds., 2015. *Dukes' physiology of domestic animals*. John Wiley & Sons.
141. Reichler, I.M., Barth, A., Piché, C.A., Jöchle, W., Roos, M., Hubler, M. and Arnold, S., 2006. Urodynamic parameters and plasma LH/FSH in spayed Beagle bitches before and 8 weeks after GnRH depot analogue treatment. *Theriogenology*, 66(9), pp.2127-2136.
142. Reisner, I.R., Houpt, K.A. and Shofer, F.S., 2005. National survey of owner-directed aggression in English Springer Spaniels. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(10), pp.1594-1603.
143. Reynaud, K., Fontbonne, A., Saint-Dizier, M., Thoumire, S., Marnier, C., Tahir, M.Z., Meylheuc, T. and Chastant-Maillard, S., 2012. Folliculogenesis, ovulation and endocrine control of oocytes and embryos in the dog. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, pp.66-69.
144. Rhodes, L., 2017. New approaches to non-surgical sterilization for dogs and cats: Opportunities and challenges. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, pp.327-331.
145. Rocha Fonseca BDC. 2016. Estudio comparativo para detección de ovulación en hembras canina por citología vaginal, progesterona sérica y detector draminski. Julio-Diciembre 2015 (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria).
146. Roesl, C., Jeffery, N. and Smith, S.E., 2016, June. Single injection sterility via lentiviral-mediated suppression of androgen receptors in Sertoli cells. In Abstract presented at the ISCFR-EVSSAR Congress, Paris, France.
147. Romagnoli, S. and Sontas, H., 2010. *BSAVA manual of canine and feline reproduction and neonatology*. Gloucester (United Kingdom): British Small Animal Veterinary Association, pp.23-33.
148. Romagnoli, S., 2006. Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones. *Reproduction*, pp.701-706.
149. Rozkowska, E. and Fonberg, E., 1973. Salivary reactions after ventromedial hypothalamic lesions in dogs. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 33(3), pp.553-562.
150. Rubion, S., Desmoulins, P.O., Rivière-Godet, E., Kinziger, M., Salavert, F., Rutten, F., Flochlay-Sigognault, A. and Driancourt, M.A., 2006. Treatment with a subcutaneous GnRH agonist containing controlled release device reversibly prevents puberty in bitches. *Theriogenology*, 66(6-7), pp.1651-1654.

151. Rutberg, A.T. and Naugle, R.E., 2007. Population effects of immunocontraception in White-tailed deer. In Proc 6th int. symp on fertility control in wildlife. Wildlife Society, York.
152. Sakals S, Peta HGR,, Fernandez NJ, Allen A L.. Determining the cause of hypercalcemia in a dog Can Vet J. 2006, 47(8): 819–821.
153. Salavati, S., Mogheiseh, A., Nazifi, S., Tabrizi, A.S., Taheri, P. and Koohi, F., 2018. Changes in sexual hormones, serotonin, and cortisol concentrations following oral administration of melatonin in castrated and intact dogs. *Journal of veterinary behavior*, 27, pp.27-34.
154. Salmeri, K.R., Olson, P.N. and Bloomberg, M.S., 1991. Elective gonadectomy in dogs: a review. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(7), 1183–1192.
155. Schäfer-Somi, S., Kaya, D. and Aslan, S., 2022. Prepubertal use of long-term GnRH agonists in dogs: Current knowledge and recommendations. *Animals*, 12(17), pp.2267.
156. Schäfer-Somi, S., Kaya, D., Sözmen, M., Kaya, S. and Aslan, S., 2018. Pre-pubertal treatment with a Gn RH agonist in bitches—Effect on the uterus and hormone receptor expression. *Reproduction in domestic animals*, 53, pp.103-109.
157. Scott-Moncrieff, J.C., 2007. Clinical signs and concurrent diseases of hypothyroidism in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(4), pp.709-722.
158. Sirivaidyapong, S., Mehl, N.S. and Trigg, T.E., 2012. Delay of Puberty and Reproductive Performance in Male Dogs Following the Implantation of 4.7 and 9.4 mg GnRH-Agonist Deslorelin at an Early Pre-pubertal Age. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, pp.400-402.
159. Sokolowski J.H., Stover D.G., VanRavenswaay F. Seasonal incidence of estrus and interestrous interval for bitches of seven breeds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1977;171:271–273.
160. Sontas, B.H., Altun, E.D., Güvenc, K., Arun, S.S. and Ekici, H., 2010. Vaginal neurofibroma in a hysterectomized poodle dog. *Reproduction in domestic animals*, 45(6), pp.1130-1133.
161. Sontas, B.H., Özyogurtcu, H., Turna, Ö., Arun, S. and Ekici, H., 2010. Uterine leiomyoma in a spayed poodle bitch: a case report. *Reproduction in domestic animals*, 45(3), pp.550-554.
162. Spain, C.V., Scarlett, J.M. and Houpt, K.A., 2004. Long-term risks and benefits of early-age gonadectomy in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(3), pp.372-379.
163. Squires, E. J., 2010. *Applied animal endocrinology*. Cabi.
164. Srivastava, N., Santhanam, R., Sheela, P., Mukund, S., Thakral, S.S., Malik, B.S. and Gupta, S.K., 2002. Evaluation of the immunocontraceptive potential of Escherichia coli-expressed recombinant dog ZP2 and ZP3 in a homologous animal model. *Reproduction-Cambridge*, 123(6), pp.847-857.
165. Stankov, B., Möller, M., Lucini, V., Capsoni, S. and Fraschini, F., 1994. A carnivore species (*Canis familiaris*) expresses circadian melatonin rhythm in the peripheral blood and melatonin receptors in the brain. *European journal of endocrinology*, 131(2), pp.191-200.

166. Sugden, D., 1983. Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 227(3), pp.587-591.
167. Sutton, D.J., Geary, M.R. and Bergman, J.G., 1997. Prevention of pregnancy in bitches following unwanted mating: a clinical trial using low dose oestradiol benzoate. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement*, 51, pp.239-243.
168. Sutton, D.J., Geary, M.R. and Bergman, J.G., 1997. Prevention of pregnancy in bitches following unwanted mating: a clinical trial using low dose oestradiol benzoate. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement*, 51, pp.239-243.
169. Thomas P. 2013. Breeding management and ovulation timing in the bitch. In: *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings* (March 6-9, 2013).
170. Trevejo, R., Yang, M. and Lund, E.M., 2011. Epidemiology of surgical castration of dogs and cats in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(7), pp.898-904.
171. Trigg, T.E., Doyle, A.G., Walsh, J.D. and Swangchan-Uthai, T., 2006. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, 66(6-7), pp.1507-1512.
172. Trigg, T.E., Wright, P.J., Armour, A.F., Williamson, P.E., Junaidi, A., Martin, G.B., Doyle, A.G. and Walsh, J., 2001. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 57, pp.255-261.
173. Tsutsui, K., Bentley, G.E., Bedecarrats, G., Osugi, T., Ubuka, T. and Kriegsfeld, L.J., 2010. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(3), pp.284-295.
174. Tsutsui, T., Kirihara, N., Hori, T. and Concannon, P.W., 2007. Plasma progesterone and prolactin concentrations in overtly pseudopregnant bitches: a clinical study. *Theriogenology*, 67(5), pp.1032-1038.
175. Tsutsui, T., Mizutani, W., Hori, T., Oishi, K., Sugi, Y. and Kawakami, E., 2006. Estradiol benzoate for preventing pregnancy in mismated dogs. *Theriogenology*, 66(6-7), pp.1568-1572.
176. Ucar, M., Cargi, C. and Civelek, T. (2011) A new curative approach to puppy vaginitis. *YYU Vet., Fac. Rev.*, 22 (1): 65.
177. van Hagen, M.A., Ducro, B.J., van den Broek, J. and Knol, B.W., 2005. Incidence, risk factors, and heritability estimates of hind limb lameness caused by hip dysplasia in a birth cohort of boxers. *American journal of veterinary research*, 66(2), pp.307-312.
178. Vanecek, J., 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological reviews*, 78(3), pp.687-721.
179. Vickery, B.H., McRae, G.I., Goodpasture, J.C. and Sanders, L.M., 1989. Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 39, pp.175-187.

180. Von Berky, A.G. and Townsend, W.L., 1993. The relationship between the prevalence of uterine lesions and the use of medroxyprogesterone acetate for canine population control. *Australian veterinary journal*, 70(7), pp.249-250.
181. Von Pfeil, D., DeCamp, C. and Abood, S.K., 2009. The epiphyseal plate: nutritional and hormonal influences; hereditary and other disorders.
182. Walter, B., Otzdorff, C., Brugger, N. and Braun, J., 2011. Estrus induction in Beagle bitches with the GnRH-agonist implant containing 4.7 mg Deslorelin. *Theriogenology*, 75(6), pp.1125-1129.
183. Weikel Jr, J.H. and Nelson, L.W., 1977. Problems in evaluating chronic toxicity of contraceptive steroids in dogs. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 3(1-2), pp.167-177.
184. Weiss, D.J. and Klausner, J.S., 1990. Drug-associated aplastic anemia in dogs: eight cases (1984-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196(3), pp.472-475.
185. Welle, M.M., Reichler, I.M., Barth, A., Forster, U., Sattler, U. and Arnold, S., 2006. Immunohistochemical localization and quantitative assessment of GnRH-, FSH-, and LH-receptor mRNA Expression in canine skin: a powerful tool to study the pathogenesis of side effects after spaying. *Histochemistry and cell biology*, 126, pp.527-535.
186. Witsberger, T.H., Villamil, J.A., Schultz, L.G., Hahn, A.W. and Cook, J.L., 2008. Prevalence of and risk factors for hip dysplasia and cranial cruciate ligament deficiency in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(12), pp.1818-1824.
187. Yu, C.X., Weng, S.M. and Chen, C.H., 1999. Studies on the analgesic effect and physical dependence of melatonin in mice. *Chinese Journal of Drug Dependence*, 38(8), pp.58-60.
188. Zink, M.C., Farhoo, P., Elser, S.E., Ruffini, L.D., Gibbons, T.A. and Rieger, R.H., 2014. Evaluation of the risk and age of onset of cancer and behavioral disorders in gonadectomized Vizslas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(3), pp.309-319.
189. Zwida, K.H. and Kutzler, M.A., 2019. Luteinizing hormone receptor is immunoexpressed within the canine thyroid. *Clinical Theriogenology*, 11(1), pp.23-29.

## Biografija kandidata

### Kratka biografija

Vojislav M. Al Daghistani rođen 08.01.1987 godine u Beogradu. Osnovnu školu „Stefan Nemanja“ završio 2002 godine u Beogradu. „Četvrtu beogradsku gimnaziju“ završio 2006 godine. Fakultet veterinarske medicine upisao 2006 godine i završio 2014 godine. Specijalističke studije upisao 2015 godine na fakultetu veterinarske medicine u Beogradu. Specijalistički rad pod nazivom „Rendgenska dijagnostika i hiruška sanacija nekih naslednih i razvojnih anomalija lakatnog zgloba i podlaktatnih kostiju pasa“ završio i odbranio 2016 godine na fakultetu veterinarske medicine u Beogradu. Uže specijalističke studije upisao 2016 na fakultetu veterinarske medicine u Beogradu. Specijalistički rad – uža specijalizacija pod nazivom „ Povrede i oboljenja koksofemoralne regije kod pasa“ obranio 2018 godine. Master studije finansije bankarstvo i osiguranje na Visokoj školi za poslovnu ekonomiju i preduzetništvo u Beogradu upisao 2021 i završio 2022. Od 2002 godine akitvan član beogradskog kinološkog društva, od 2007 godine nacionalni kinološki sudija, 2009 postaje međunarodni kinološki sudija. Kao aktivni član i sudija kinološkog saveza Srbije do sada sudio u preko 60 zemalja širom sveta. Osniva firmu 2020 godine pod nazivom „Linkapet“ čiji je vlasnik i direktor.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Војислав Ал Дагхистани

број уписа 14/17

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Употреба имплантата GnRH суперагонисте код јувенилних куја за дуготрајну  
реверзibilну контрацепцију и његов утицај на појаву еструса и хормонални  
статус

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 30.08.2024.

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Војислав Ал Дагхистани

Број уписа: 14/17

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: Употреба имплантата GnRH суперагонисте код јувенилних куја за дуготрајну реверзибилну контрацепцију и његов утицај на појаву еструса и хормонални статус

Ментор: Владимир Магаш

Потписани: Војислав Ал Дагхистани

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 30.08.2024.

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Употреба имплантата GnRH суперагонисте код јувенилних куја за дуготрајну реверзибилну контрацепцију и његов утицај на појаву еструса и хормонални статус**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 30.08.2024. године

---

Војислав Ал Дагхистани



