



Kedi ve Köpeklerde GnRH'nın Reprodüktif Endikasyonları

Mürşide Ayşe DEMİREL¹✉

1. Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Deneysel Hayvanları Bakım ve Deneysel Araştırmalar Ünitesi, Ankara, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
15.04.2015	28.10.2015	24.04.2016

Öz: Gonadotropin salıcı hormon (GnRH), ön hipofizden folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH) salınımını uyarak, ovaryum fonksiyonlarını kontrol eder. Doğal GnRH molekülünde bulunan aminoasit yapılarının değiştirilmesi sonucu geliştirilen GnRH analogları, endojen GnRH'ya göre daha güçlü ve etkilidir. Genellikle östrüsün uyarılması veya baskılanması amacıyla güvenle kullanılan GnRH analogları diğer yöntemlere karşı bir avantaj sağlamaktadır. Agonistler, doğal GnRH'yı taklit ederek farklı güçlerle ön hipofizden gonadotropinlerin salınımını uyarır, bunu takiben gonadotropin salgısının artışı ve piki sebebiyle başlangıçta alevlenme etkisi ortaya çıkar. Ancak, uygulamadan yaklaşık 10-15 gün sonra hipogonadotropik hipogonad durumu oluşur. Bu amaçla, son yıllarda sıklıkla tercih edilen GnRH agonistleri, östrüsün uyarılması veya baskılanması, gebeliğin sonlandırılması, endokrinolojik tanı, idrar tutamama ve meme tümörü tedavisi amacıyla güvenle kullanılmaktadır. Antagonist moleküller gonadotropinlerde yer alan GnRH almaçlarına endojen GnRH molekülü ile başarılı bir şekilde yarışarak bağlanır. Böylece almaçların işgali sonucu blokaj sağlanarak gonadotropinlerin salınımı baskılanır. Antagonistlerin uygulanması sonrası gerçekleşen bu hızlı baskılama ilk uyarım etkisi görülmeden oluştuğu için agonistlere karşı avantaj sağlar. Son yıllarda GnRH antagonistlerinin dişi kedi ve köpeklerin reprodüktif olguları üzerine yapılan çalışmaları artmış olsa da, daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır. Sunulan derlemede, GnRH analoglarının yapısı ile dişi kedi ve köpeklerde kullanım alanları hakkında genel bilgi verilecektir.

Anahtar Kelimeler: Agonist, Analog, Antagonist, Gonadotropin Salıcı Hormon, Kedi, Köpek.

Reproductive Use of the GnRH in Cats and Dogs

Abstract: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulates the pituitary secretion of both follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinising hormone (LH), and thus controls the hormonal functions of the ovarium. GnRH analogues have been produced by amino acid substitutions within the native GnRH molecule resulting in a greater potency and a longer duration of effectiveness. Generally, GnRH analogues are used safely for oestrus induction or suppression and provide an advantage over other methods. The GnRH agonists mimic the native GnRH and stimulate the release of gonadotropin with different power from adenohypophysis. Upon the GnRH agonist administration, it causes initially a flare-up effect due to gonadotropin secretion. However, hypogonadotropic hypogonadism occurs about 10-15 days after the administration of agonist. For this purpose, in recent years, GnRH agonist, as often preferred, is safely used for irreversible oestrus induction or suppression, termination of pregnancy, endocrinological diagnosis, urinary incontinence and the treatment of mammary tumour. Antagonists compete successfully with the endogenous GnRH and bind to gonadotropin GnRH receptors. Thus, upon the occupancy of the receptor, they provide blockade and suppress the secretion of gonadotropins. Upon the administration of GnRH antagonists, they rapidly down-regulate the gonadotropin level without flare-up effect and this feature provides an advantage against the agonists. In recent years, although studies on reproduction in female cats and dogs have increased, more research is needed. In the present review, the structure of the GnRH analogues and their current use in cats and dogs are given.

Keywords: Analogue, Antagonist, Cat, Dog, Gonadotropin Releasing Hormone.

✉ Mürşide Ayşe DEMİREL

Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Deneysel Hayvanları Bakım ve Deneysel Araştırmalar Ünitesi, Ankara, TÜRKİYE.
e-posta: aysedemirel@gazi.edu.tr

GİRİŞ

GnRH ya da luteinleştirici hormon salgılatıcı hormon (LHRH), hipotalamusun medyobazalindeki sekretörük nöronlardan sentezlenen ve hipotalamo-hipofizyel portal yol ile ön hipofize gelerek FSH ve LH gibi gonadotropinlerin salınımına neden olan dekapeptit yapıda bir hormondur (1). Hipotalamusun arkuat nükleusundan 56 aminoasitlik GAP (GnRH ilişkili peptit) denilen bir hormon ile birlikte salgılanır ve kromozom 8p21'deki bir gen tarafından kodlanarak 92 aminoasitli öncüsünün proteolitik yıkımı sonrası üretilerek ön hipofizden kan dolaşımına verilir. Her iki hormon da FSH ve LH üzerine farklı derecelerde uyarıcı etki yapmaktadır. GAP'ın prolaktin salınımını baskılayarak gonadotropinleri uyardığı bilinse de fizyolojik etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır (2,3).

Doğal GnRH molekülünde yer alan aminoasit dizilimlerinin değiştirilmesi sonucu geliştirilen GnRH analogları (agonist ve antagonistler), endojen GnRH'ya göre daha güçlü ve etkilidir. Reprodüktif birçok alanda güvenle kullanılan GnRH analogları diğer hormonal uygulamalara karşı bir avantaj sağlamaktadır (1). Sunulan derlemede, GnRH'nın endojen salınımı ile birlikte analoglarının dişi kedi ve köpeklerin reprodüktif alanlarında kullanımları hakkında genel bilgi verilmiştir.

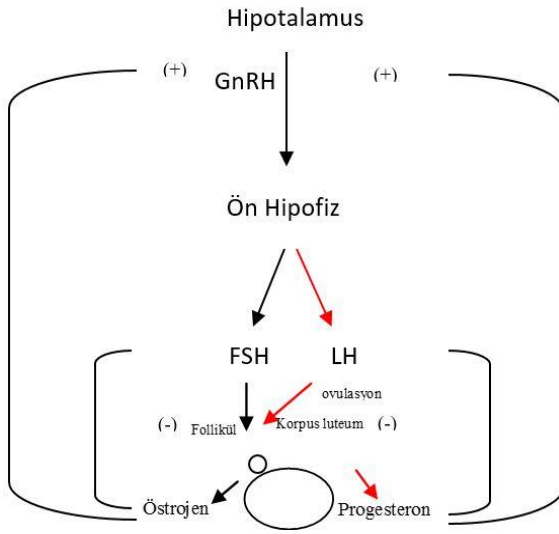
Endojen GnRH

GnRH foliküler evrenin sonlarında fazla, lüteal evrenin sonlarında ise daha az olarak salınmaktadır. Pulzasyon sıklığının nasıl düzenlendiği tam olarak açıklanamasa da beslenme, stres ve mevsimsel değişikliklerden etkilendiği bilinmektedir. Ayrıca GnRH proteazlar tarafından hızlı bir şekilde yıkımlandığı için yarılanma ömrü oldukça kısa (2-5 dakika) olup bu özellikleri 5-6, 6-7 ile 9-10 numaralı aminoasitler arasındaki bağların çabuk yıkılmasına bağlıdır (1).

GnRH, ovaryumlardaki FSH ve LH reseptörlerine bağlanarak foliküler olgunlaşmayı

sağlar. Ayrıca hipofiz ve hipotalamusa geri tepki işlevi gösteren östrojen ve progesteronun üretilmesini sağlar. Östrojen hormonu hipofiz ve hipotalamusa etki ederek gonadotropin salgılarının miktarını değiştirebilse de pulslarının sıklığı üzerine etkisi yoktur. Periferik kandaki östrojen düzeyi yükseldikçe hipotalamus ve hipofiz üzerine olumsuz başa tepki yaparak FSH'nın sentez ve salınımını düşürür. Ayrıca ovaryumlarda inhibin üretiminin artmasıyla da FSH üretimini daha da azaltır. Foliküller içerisinde FSH reseptörü yoğun olan ve östrojen içeriği en fazla olan folikül, FSH azalmasından etkilenmeksizin, büyümeye devam ederek dominant folikül halini alırken, diğer foliküller atreziye uğrar. Artarak belirli bir seviyeye gelen östrojen düzeyi, GnRH salınımı üzerine başa tepki yaparak, ovulasyon öncesi LH ve FSH dalgasına neden olur. LH'daki ani yükselme FSH'ya göre çok daha fazladır. Yüksek düzeyde LH'ya maruz kalan dominant folikülde granüloza hücreleri lüteinize olmakta, progesteron üretimi başlamakta ve ovulasyon meydana gelmektedir. Siklusun bu dönemindeki ani LH artışı folikül duvarındaki prostaglandin ve proteolitik enzim düzeyinde artışa neden olarak sekonder oositin folikül duvarında açılan bir delikten atılmasına neden olur. Ovulasyondan sonra yırtılan foliküldeki granüloza ve teka interna hücreleri LH etkisi altında sırasıyla granüloza lutein ve teka lütein hücrelerine dönüşerek korpus lüteumu oluşturur. Korpus lüteumdan salgılanan progesteron ile birlikte inhibin, aktivin ve follistatin de merkezi olumsuz başa tepki etkiyle FSH ve LH sekresyonunu azaltır. Progesteronun etkisiyle azalan FSH başka folikül seçilmesini ve gelişmesini inhibe etmektedir. Fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşmez ise korpus lüteum prostaglandin F₂ alfa (PGF₂α)'nın etkisiyle regrese olur. Daha sonra progesteron ve östrojenin kandaki düzeylerinin azalmasıyla birlikte merkezi olumsuz başa tepki ortadan kalkar ve GnRH'nın etkisiyle FSH yeniden yükselerek başka bir grup folikülün gelişmeye başlamasını sağlar. Ancak

fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşirse korpus luteum büyüyerek gebelik korpus luteumu adını alır (Şekil 1) (4,5).



Şekil 1. Hipotalmo-hipofizyel-ovaryum aksisinde meydana gelen temel hormonların başa tepki mekanizması. GnRH: Gonadotropin Salıcı Hormon; FSH: Folikül uyarıcı hormon; LH: Lüteinleştirici hormon (4,5).

Figure 1. The feedback mechanisms of the principal hormones involved in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon; FSH: Follicle stimulating hormone; LH: Luteinising hormone (4,5).

GnRH Analogları

Reprodüksiyonda ekzojen GnRH uygulamalarına ihtiyaç duyulması bu hormonun sentetik analoglarının üretimine sebep olmuştur. Schally ve arkadaşları tarafından 1971 yılında GnRH'nin izolasyonu ve kimyasal yapısı belirlenmiş ve bu çalışma 1977 yılında Nobel Ödülü kazandırmıştır. O tarihten itibaren GnRH'nin agonist-antagonist olmak üzere 3000'den fazla analogu geliştirilmiştir. Doğal GnRH molekülündeki aminoasitlerin yer değiştirmesiyle üretilen GnRH analogları doğal GnRH'ya göre daha etkili ve yarılanma ömrü daha uzundur. Böylece almaçlarındaki ilgilerinin artırılması ve yıkılma süresinin azaltılması sağlanmıştır (1).

Sentetik GnRH analogları, peptid yapısından dolayı gastrointestinal sistemde peptidaz yıkılmasından oldukça kolay etkilenirler. Bu

nedenle GnRH analogları parenteral olarak uygulanmalıdır. Ancak son yıllarda beşeri hekimlikte kullanılmak üzere peptid olmayan GnRH antagonistleri de geliştirilmiştir (6,7).

Yapılan çalışmalarda, GnRH analoglarının uygulanmasını takiben hipofiz bezi ile gonadal fonksiyonların hızlı bir şekilde eski haline döndüğü ve kan biyokimyasal-hematolojik parametrelerde önemli bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (7).

GnRH Agonistleri

Doğal GnRH'nin yapısında bulunan 1, 2, 3, 6 ve 10 numaralı aminoasitlerin önemli fonksiyonlarda görev aldıkları bilinmektedir. Pozisyon 2 ve 3'deki aminoasitler gonadotropin salınımında, pozisyon 6 enzimatik yıkılma, pozisyon 1, 6 ve 10'da olanlar ise üç boyutlu yapının korunmasında görev alırlar. Bu aminoasitlerde yapılan değişikliklerle agonistler üretilmektedir. Altı numaralı aminoasidin pozisyonunun veya C terminaline glisin-amid yerleştirilmesi, 9 nolu aminoasidin alkilasyonu ya da 10 nolu aminoasidin silinmesiyle doğal GnRH'ya göre yarılanma ömrü daha uzun ve etkili GnRH agonistlerinin üretilmesi sağlanmaktadır (6,8). Aminoasitlerde yapılan bu yer değiştirmeler tekli ya da ikili olabilmektedir. GnRH agonistlerinin günlük enjeksiyonlarla uygulanabilen kısa etkili formülasyonları olabildiği gibi, deri altı implant veya kas içi depo enjeksiyonları olarak kullanılabilen uzun etkili formülasyonları da bulunmaktadır. Veteriner alanda en sık kullanılan agonistler; leuprorelin, buserelin, nafarelin, histrelin, goserelin, triptorelin ve deslorelin'dir (6).

Agonistler, doğal GnRH'yı taklit ederek farklı güçlerle hipofizden gonadotropinlerin salınımını uyarırlar. GnRH agonistleri uygulandığında, ilk başta gonadotropin salgısının artışı ve piki sebebiyle maksimal uyarım (flare up) etkisi ortaya çıkar. Bu etki özellikle yüksek GnRH ve düşük östradiol seviyelerinin artmış gonadotropin uyarımı yaptığı erken foliküler dönemde daha belirgindir. Ancak uygulamadan yaklaşık 10-15 gün sonra hipogonadotropik hipogonad durumu oluşur. Uzun etkili veya tekrarlayan kısa etkili agonistlerin

uygulanmaları sonucu öncelikle gonadotropin salgısı artar, ancak sonrasında hipofiz bezinde bulunan GnRH reseptörlerinde desensitizasyon ve down regülasyon meydana gelerek fizyolojik pulsatil GnRH sekresyonu baskılanır, gonadotropinlerin ve gonadal hormonların sekresyonu inhibe edilir. Östrusun baskılanmasından önce meydana gelen bu alevlenme etkisi agonistler için istenmeyen bir etkidir. Bu durum FSH ve LH'nin aşırı salınımı sonucu östrüs ve ovulasyonun uyarılmasına, gonadal baskılanmanın gecikmesine neden olur ki bu durum dezavantaj olarak kabul edilir. Ayrıca bu ilk uyarım, hormona bağlı hastalığı olan olgularda klinik semptomların şiddetlenmesine de neden olabilir. Bu bilgiler ışığı altında, süperagonist denilen ve fertilitiyi uyardığı bilinen güçlü agonistlerin aynı zamanda anti-reproduktif farmakolojik etkinliklerinin olduğu da söylenilebilir (6,9,10).

Kedi ve Köpeklerde GnRH Agonistlerinin Endikasyonları

Kedi ve köpeklerde östrüs siklusunun kontrolü üremenin denetlenmesinde oldukça önem arz etmektedir. Bu amaçla, önceki yıllarda "güvenli ve etkili" olarak östrusun baskılanması veya uyarılmasında başarı şansı oldukça düşüktü. Siklik etkinliğin baskılanması için kontraseptif ajanlar kullanılsa da hormona bağlı hastalıklar dahil bir çok yan etkiye neden olduğu için son yıllarda yerini GnRH agonistlerine bırakmış ve bu alanda istenilen sonuçlar elde edilmiştir (11).

Östrusun Uyarılması: Erken ya da orta dönem anöstrüsteki köpeklerde her 90 dakika bir intravenöz GnRH (0.2-0.5 ug/kg) kullanılarak spontan proöstrüstan önce görülen LH piki taklit edilebilir. Bu süre içerisinde başlangıçta meydana gelen LH ve FSH dalgası doğal proöstrüsta olduğu gibi giderek azalır. LH dalgasını takiben östradiol seviyesi, vajinal sitoloji ve dış genital organlarda görülen değişikliklerle köpeğin proöstrüsta olduğu görülür. GnRH uygulamasını takiben 10-14 gün içerisinde östrüs evresi başlar (12). Ayrıca, GnRH agonisti olan Leuprolide intranasal spreyinin (Leupron Depot) östradiol 17-β ile birlikte östrusu %71.4 oranında uyardığı, klinik olarak herhangi bir yan etkiye neden

olmadığı ancak uygulama sırasında köpeklerin strese girdiği belirlenmiştir (13). Mevsimsel olarak anöstrüs döneminde bulunan kedilerde tek doz veya iki doz GnRH agonisti uygulayarak östrusun uyarılmasının amaçlandığı bir çalışmada, ovaryumlarda foliküler gelişmenin sınırlı olduğunu, kedileri östrüsa getirmede ve ovulasyonu sağlamada yetersiz kaldığı görülmüştür (14). Ayrıca östrüsteki kedilerde 12 saat arayla iki doz 5-25 mg GnRH agonisti uygulandığı zaman LH salınımıyla birlikte ovulasyonu uyarılmadığı görülmektedir. Kedilerde ovulasyon, vajinada bulunan LH almaçlarının çiftleşme ya da mekanik uyarımı sonrası (provoke ovulasyon) meydana geldiği unutulmamalıdır. Bu nedenle GnRH enjeksiyonu ile birlikte vajinanın mekanik uyarımı da yapılmalıdır (15).

Östrusun uyarılmasında kullanılan kısa etkili agonistler, uygulama süresince sık enjeksiyonlarına ve hospitalizasyona gerek duyulduğu için masraflı olup klinik olarak pratik değildir. Bu etkilerinden yola çıkılarak GnRH agonistleri için önemli bir gelişme kaydedilmiş ve deri altı ozmotik ya da silastik implantlar veya kas içi depo enjeksiyonları olarak uygulanan yavaş salınımlı agonistler elde edilmiştir. GnRH agonistlerinin bu şekilde hazırlanan formülasyonları ile 3-12 ay GnRH sabit dozda salınmaktadır (16). İlk olarak 1996'da köpeklerde kullanılmak üzere geliştirilen GnRH'nin uzun süreli salınım formülü (buserelin-silastic implant) 10-14 gün boyunca uygulanmış, proöstrusun uyarıldığı, spontan ovulasyon ve gebelikte başarı sağlandığı görülmüştür (12). Diöstrüsteki köpeklerde olduğu gibi anöstrüsteki köpeklerde de 5-7 gün boyunca dinoprost (50-250 µg/kg, 12 saat ara ile) uygulandıktan sonra 3-5 gün süre ile vulva mukozasının altına yerleştirilen deslorelin implantı (2.1-1.05 mg) 7-9 gün içerisinde östrüsü uyarılmaktadır (17). Walter ve ark., (18)'i, anöstrüsteki köpeklerde bacağı medial bölümüne deri altı olarak yerleştirilen 4.7 mg deslorelin implantı ile 3-10 gün içerisinde östrusun uyarıldığı ve ovulasyondan 9-19 gün sonra gebelik şekillendiğini bildirmişlerdir. Deslorelin asetat içeren implantların dışında leuprolide asetat içeren implantlar ile de başarılı sonuçlar alınmaktadır (19).

Östrusun Baskılanması: Anöstrüstaki köpeklerde, düşük ve tekrarlayan dozda veya pulsatil olarak uygulanan GnRH ovaryum aktivitesini ve ovulasyonu uyarırken, proöstrüs ve östrüsta yüksek dozda tek uygulama ovulasyonu ve başlayan proöstrüs veya östrüsü sonlandırmaktadır. Uzun salınımlı GnRH agonisti olan azagyl-nafarelin implantının hem yetişkin hem de prepubertal köpeklerde 1 yıl süreyle östrüsü baskıladığı görülmüştür (9,20,21). Benzer olarak Kutzler ve Wood (8), köpeklerde nafarelinin (32 mg) veya azagyl nafarelinin (16 mg) deri altı implantlarının ya da günlük enjeksiyonlarının pubertası ya da östrüsü ertelediği, uygulamadan 2-18 hafta sonra siklik etkinliğin normale döndüğünü bildirmiştir.

Yavaş salınımlı deslorelin implantı köpeklerde östrüsü doza bağlı olarak 6-27 aya kadar geri dönüşümlü olarak baskılayabilir. Anöstrüstaki köpeklere uygulanan deslorelin östrusun baskılanmasından önce 7-10 gün içerisinde proöstrüs/östrüs bulgularının görülmesine neden olur. Bu akut etki diöstrüs süresince (plazma progesteron düzeyi >5 ng/ml) ya da öncesinde progesteron (2 mg/kg, 14 ya da 21 gün süreyle) uygulaması yapılmışsa görülmez (8,9,22). Ancak av köpeklerinde yapılan bir çalışmada, deslorelin implantının progesteron ile birlikte uygulandığı aynı protokolda implant uygulamasından sonra proöstrüs/östrüs belirtilerinin görüldüğü bildirilmiştir. Diğer çalışmalara göre bu çalışmanın farklı sonucu tam olarak açıklanamasa da uygulanan bu hormonlara karşı hipofiz bezinin ve ovaryumun duyarlılığının ırka bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (23). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, köpeklerde pubertas öncesi dönemde (4 aylık) deslorelin implantı uygulamalarında da östrüsü uyarılmadığı görülmüştür (9,22). Bu bulgular ışığı altında, gebeliği önleme amacıyla kullanılan GnRH agonist implantlarının başlangıçtaki uyarıcı etkisi bilinmeli ve klinik pratikte kullanılırken bu özelliği dikkate alınmalıdır (24).

Retrospektif olarak yapılan bir çalışmada, yaşı ileri olan köpeklerde östrüsü baskılamak için kullanılan deslorelin implantının uzayan uterus kanamasına neden olduğu belirtilmiştir (25). Ayrıca,

7 yaşlı bir köpekte 4.7 mg deslorelin implantı östrüsü baskılamak için uygulandığında, 3 ay sonra uzayan östrüs (10 hafta), foliküler kist ve piyometra görüldüğü bildirilmiştir. Bu nedenle, deslorelin implantı uygulamadan önce köpeğin yaşı bilinmeli, klinik ve ultrasonografik muayenesi yapılmalı ve progesteron konsantrasyonu belirlenmelidir. İmplant, progesteron konsantrasyonu ≥ 16 pmol/L olduğu zaman uygulanmalıdır (26). Köpeklerden elde edilen bu sonuçlara dayanılarak azagyl-nafarelin implantı kedilerde de kullanılmış, güvenli ve geri çevrilebilir bir şekilde en az 3 yıl östrüsü ve ovulasyonu baskıladığı saptanmıştır (27). Kedilerde yapılan çalışmalarda, 20 mg azagyl-nafarelin implantının 6-9.5 mg deslorelin implantlarına göre daha uzun süreli östrüsü baskıladığı görülmüştür (28,29). 6 mg'lık deslorelin implantı ile 8 ay (28); 9.5 mg'lık deslorelin ile 16-18 ay (29) %100 gebeliği önlediği belirtilmiştir. Ayrıca prepubertal kedilere 4.7 mg deslorelin implantı uygulaması ile pubertas yaşının ertelendiği ve vücut gelişimi üzerine olumsuz bir etkisi olmadığı görülmüştür (30).

Gonadotropin salınımının baskılanmasında bir diğer seçenek GnRH karşıtı immünizasyondur. Kedi veya köpekler GnRH aşısı ile immünize edildiği zaman GnRH'yı nötralize eden antikolar sentezlenir. Böylece GnRH'nın antero-hipofizdeki almaçlarına bağlanması önlenerek gonadotropin sentezi baskılanır (31). Ticari olarak geliştirilen GonaCon™ ve Canine Gonadotropin Releasing Factor Immunotherapeutic® kedi ve köpeklere uygulanmış ve östrüs baskılamada ve gebelik sonlandırmada başarılı sonuçlar alınmıştır (28,32,33). GnRH immünizasyonunda da östrüs baskılama geri çevrilebilir etkilidir (34,35).

Gebelik Oranı ve Süresine Etkisi: Köpeklerde yapılan çalışmalarda (22,36), deslorelin implantı ile uyarılan östrüs sonrası çiftleşmelerde gebeliğin başarısız olduğu ve yaklaşık 40-50 gün içinde düşük LH konsantrasyonu ve korpus luteumun regresyonuyla birlikte abort görüldüğü belirtilmiştir. Deslorelin implantının sürekli kullanımıyla progesteron seviyesinin azalmasına bağlı olarak meydana gelen gebelik kayıplarından kaçınmak için ovulasyondan önce (LH piki) (37) veya sonra (38) implant

çıkarılmalıdır. Anöstrusun erken dönemlerinde implantın kullanılması ya da ovulasyondan çok önce implantın çıkarılması anovülator östrusun meydana gelmesine neden olabilir (38). Deslorelin implantından sonra gebelik oranı %65'e kadar ulaşsa da, erken doğum görülme oranı daha yüksektir (37,38).

Abortun Uyarılması: Köpeklerde gebelik süresince LH'nın progesteronun luteal sekresyonunda gerekli olduğunun bilinmesi ile deslorelinin LH salınımını baskılayarak, gebeliğin devamı için gerekli olan progesteronu ortadan kaldıracak şekilde düşünülmiştir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada, köpeklerde çiftleşmeyi takip eden 20-25. günde subkutan deslorelin implantı ile progesteron seviyesinin düşmeye başladığı, 8. günde gebeliğin devamı için gerekli olan miktarın altına düştüğü ve 10. günde tek doz PGF2α uygulaması ile birlikte gebeliği sonlandırdığı görülmüştür. Bu uygulama, diğer abort indüklemeye protokollerine göre tekrarlayan enjeksiyonlara gerek duyulmaması nedeni ile daha pratik ve ucuz olup anne köpek üzerinde stres yaratmadığı bildirilmiştir (39).

Endokrinolojik Tanı: Son yıllarda, kedi ve köpeklerde reproduktif alanda fizyolojik ve patolojik olguların saptanması amacıyla endokrinolojik tanı yöntemlerine sıklıkla başvurulmaktadır. GnRH agonisti uygulanmasının öncesi ve sonrası serum östradiol-progesteron düzeyinde görülen değişiklikler klinisyenin tanı koymasına yardımcı olmaktadır (5,40). Özellikle de ovaryum kalıntısı sendromlu kedi ve köpeklerde tanıyı kesinleştirmektedir. Bu amaçla, köpeklere 2.2 µg/kg dozda GnRH agonisti uygulandıktan 1-2 hafta sonra serum progesteron düzeyi ölçülmekte, kalıntı dokunun varlığında ovulasyonun uyarılmasını takiben serum östradiol seviyesi düşerken, serum progesteron seviyesi artmaktadır (41). Benzer durum kediler için de geçerli olup, 25 µg GnRH agonisti intramüsküler uygulandıktan 5 gün sonra, remnant doku varlığında kan östrojen azalırken progesteron seviyesinin arttığı görülür (42).

İdrar Tutamama: Köpeklerde üriner sistemde FSH ve LH reseptörleri kadar GnRH'nın da reseptörleri olduğu bilinir. Bu hormonlar idrar kesesi ve/veya

üretral işlevleri etkiler. Ovaryohistektomi sonrası hormonal değişime bağlı olarak köpeklerin %10-20'sinde idrar tutamama olgusu görülür. Operasyonu takiben seks steroid hormonlarda azalmayla birlikte FSH ve LH'da artış meydana gelir. Bu nedenle tedavide östrojen, alfa-adrenerjik alfa agonistleri kullanılsa da son yıllarda GnRH agonistlerinin implant formları uygulanarak da başarılı sonuçlar elde edilmiştir. İdrar tutamamanın patofizyolojik mekanizmasında hipotalamik-hipofizel hormonların rolü belirtilse de, bu hormonların etkisi üretral sfinkterde değişikliğe neden olmamaktadır. Çünkü GnRH tedavisiyle gonadotropin sekresyonundaki baskılamaya idrar kesesindeki kapasiteyi artırmaktadır (43).

Meme Tümörü Tedavisi: Kedi ve köpeklerde meme tümörünün gelişiminde östrojen ve progesteron gibi ovaryum kaynaklı hormonlarla birlikte epidermal büyüme faktörünün de önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Pagnini ve ark., (44) in vitro yaptıkları bir çalışmada, GnRH agonisti goserelinin epidermal büyüme faktörünün uyarıcı etkisini engelleyerek tümör hücrelerinin çoğalmasını baskılayabildiğini bildirmişlerdir. Köpeklere her 21 günde bir 60 µg/kg s.c. depo goserelin 12 ay süresince uygulandığı zaman sirkülasyondaki östradiol ve progesteron seviyesini düşürerek anöstrüs dönemindeki seviyesinde tutar. Bu hormonların düşük seviyede kalması memede gelişen tümörün büyümesini durdurduğu gibi küçülmesini de sağlayabilir. Bununla birlikte, meme tümörü tedavisinde uzun süre etkili olan goserelinin kolay uygulanabilir olması ve yan etkisinin bulunmaması diğer tedavi seçeneklerine göre avantaj sağlamaktadır (45). Ancak agonistlerin uygulanmasından sonraki uyarıcı etkinin (flare up) oluşacağı ve bu durumun hormona bağlı hastalıklarda olumsuzluk yaratacağı da unutulmamalıdır.

GnRH Antagonistleri

Agonistler doğal GnRH'dan yapısal olarak çok da farklı olmalarına karşın, antagonistlerin aminoasit dizilimi (1,2,3,4,5,6,8,10) doğal GnRH'ya göre değişiklik gösterir. Bu nedenle antagonistler, agonistlerinden farklı bir mekanizma ile çalışır.

Gonadotrop GnRH reseptörlerine bağlanan antagonist moleküller spesifik zar reseptörlerin işgali için endojen GnRH molekülü ile başarılı bir şekilde yarışır. Antagonistler tarafından reseptörlerin işgali ile blokaj sağlanır ve gonadotropinlerin salınımı baskılanır. GnRH antagonistinin etkisi; hayvanın türüne ve cinsiyetine, bulunduğu üreme dönemine, preparatın dozuna, uygulanma sıklığı ve süresine göre değişiklik gösterebilir. Antagonistler tarafından hipofizde görülen bu hızlı baskılama ilk uyarım etkisi (flare up) gerçekleşmeden meydana gelir ve bu özelliği ile agonistlere karşı avantaj sağlar. Ancak uzun süreli kullanımlarında reseptörlerde down regülasyona neden olduğu da bilinmelidir (6,46,47).

Antagonistler agonistlerle eş zamanlı olarak ortaya konulmasına karşın üretiminin pahalı olması nedeniyle ticari preparatlarının geliştirilmesi daha fazla zaman almıştır. Ayrıca GnRH antagonistlerinin ilk ürünü zayıf etkili olup neredeyse gelişimlerini daha da durduracak yan etkiler göstermiştir. Bu nesil antagonistler, GnRH reseptörlerinin istenilen düzeyde baskılanmasını sağlamak için günlük olarak yüksek dozlarda uygulanmaları gerekmektedir. Bununla birlikte, sınırlı düzeyde erişilebilirlik özelliğine sahip olup oldukça hidrofobik oldukları için enjeksiyon bölgesinde de nodül geliştirdiği saptanmıştır. Mast hücre degranülasyonuna bağlı olarak lokal veya sistemik alerjik yan etkiler gösterip ödeme ve anafilaktik reaksiyonlara da yol açmışlardır. Son yıllarda GnRH antagonistlerinin düşük histaminerjik etkili, proteolizis mekanizmasını baskılayan ve reseptör ilgisini artıran ve kabul edilebilir uzun etkili (≤ 10 gün) olan üçüncü nesil antagonistler (cetorelix, abarelix, ganirelix, antarelix (teverelix), degarelix, ozarelix, ornirelix, azaline B ve acyline) geliştirilmiştir. Bu antagonistlerin enjeksiyon bölgesinde kaşıntı, kızarıklık ve şişkinlik gibi yan etkilerinin daha az olduğu ve böyle yan etkiler gelişse bile 2 saatten daha az bir sürede geçtiği belirlenmiştir (6,47,48).

Kedi ve Köpeklerde Kullanılan GnRH Antagonistleri

GnRH antagonistlerinin farmakolojik blokaj etkileri, yardımcı üreme teknikleri de dahil olmak

üzere, kontrasepsiyon, steroidal hormonlara bağlı hastalıklar (neoplastik veya non-neoplastik) gibi bir çok alanda tercih edilmektedir (6). Köpeklerde ilk olarak 1980 yılında 1. kuşak GnRH antagonistlerinin etkili bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir (20). Ancak son yıllarda daha güvenli ve etkili olan 3. kuşak GnRH antagonistleri tercih edilmektedir (48).

Foliküler Evre ve Ovulasyona Etkisi

Erişkin köpeklerde proöstrüsün ilk günlerinde (<3 gün) uygulanan GnRH antagonisti (acyline) ile östrüs baskılanarak ovulasyon önenebilir (49). Bu köpeklerde, tipik östrüs davranışları görülmezken proöstrüs kanaması ile vulva ödemi azalmaktadır. Uygulamadan 14 gün sonra ovulasyonun olmadığı ve progesteronun bazal seviyede olduğu dikkati çekmektedir. Acyline (330 $\mu\text{g}/\text{kg}$) uygulandıktan 24.8 ± 2.0 gün sonra spontan olarak normal östrüs siklusu meydana gelir. Ancak köpeklerde daha kısa süreli (19.5 ± 2.7 gün) östrüs baskılanmak istenirse acyline dozu daha düşük (110 $\mu\text{g}/\text{kg}$) olarak verilebilir (6).

Acyline proöstrüsün ilk günlerinde (<3 gün) dişi kedilere uygulandığı zaman ne foliküler fazı ne de östrüs süresi aralığını kısalttığı görülmüştür. Uygulamayı takiben östrüs davranışlarında bir değişiklik görülmezken fertil erkek kediyle çiftleştiği ancak ovulasyon ve gebelik şekillenmediği saptanmıştır (50). Kedilerde 3. kuşak yeni bir GnRH antagonisti olan antide, 15 gün arayla 6 mg/kg uygulandığı zaman östradiol dalgasının başlamasını önlediği ancak tedavinin başlangıcında henüz devam eden östrojen dalgasını kısaltmayı başaramadığı belirtilmiştir. Böylece gerek gonadal hormonların üretimi ve salınımının gerekse ovulasyonun baskılanmasında etkili olmadığı düşünülmüştür (51).

Kistik Endometriyal Hiperplazi-Piyometra Kompleks (CEH-P) Tedavisinde Kullanımı

Köpeklerde oldukça yaygın olarak görülen CEH-P olgusu, progesteronun etkisi ile birlikte endometriyumun bakteriyel enfeksiyonudur. CEH-P, köpeklerde yaşamı tehdit eden bir hastalık olabilir ve çoğu zaman radikal tedavi ovaryohistektomidir. Ancak operasyonun endike olmadığı bazı

durumlarda medikal tedavi gerekebilmektedir (52,53). Yukarıda da bahsedildiği gibi, antagonistlerin uygulanması sonucu gonadotropinlerde hızlı bir azalma meydana gelir ve serum progesteron bazal seviyeye (<1 ng/ml) iner. Antagonistlerin bu özelliğinden yola çıkarak CEH-P'li köpeklerde yapılan bir çalışmada, antibiyotik tedavisine ek olarak GnRH antagonisti olan acyline 330 µg/kg deri altı olarak uygulanmış ve bu süreçte serum progesteron konsantrasyonunun düştüğü, kornu uteri boyutlarının küçüldüğü saptanmıştır. Böylece, GnRH antagonistlerinin antibiyotik uygulamasıyla birlikte CEH-P olgularında medikal tedavi olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (54).

Gebelikte Lüteal Evreye Olan Etkisi

Yaklaşık 25-35 günlük gebe köpeklere yukarıda belirtilen acyline protokolü (11,49,55) veya detirelix (2 mg/kg) uygulandığında serum progesteron seviyesinin devamlı olarak azaldığı ve 6.4±1.3 gün sonra gebeliği sonlandırdığı görülmüştür. Antagonistin uygulanması ile abort arasındaki süre gebeliğin yaşına ve köpeğin GnRH antagonistine verdiği yanıtı göre değişiklik gösterir. Luteolizisin GnRH antagonisti ile uyarılan gonadotropin baskılanmasına bağlı olarak meydana geldiği düşünülürse, köpeklerde gebeliğin devamlılığını sağlayan corpus luteümda LH'nin gerekliliğini doğrulamaktadır. GnRH antagonistleri sadece LH'yi değil aynı zamanda FSH'yı da inhibe ettiği için bu yönde daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır (11,55). Aynı antagonist protokolü kedilerde erken (20-25 gün), orta (26-45 gün) ve ileri (>45 gün) dönem gebeliklerde uygulandığı zaman gebeliğin devam ettiği ve sağlıklı yavrular doğduğu görülmüştür. Bu kedilerde antagonist uygulamasını takip eden 14 gün boyunca serum progesteron düzeyinin normal aralıkta olduğu belirlenmiştir. Böylece kedilerde gonadotropinlerin gebeliğin herhangi bir döneminde korpus luteümü desteklemediği ve acyline gebeliğin herhangi bir döneminde lüteal işlevini etkilemediği söylenebilir. Gonadotropinlerin benzer durumu gebe olmayan kedilerin luteal fazı için de tanımlanmıştır (50).

SONUÇ

GnRH agonistleri uygulandığında, başlangıçta gonadotropin salgısının artışı ve pik seviyesine ulaşması sebebiyle güçlü bir uyarım etkisi meydana gelir. Ancak daha sonra reseptörlerde meydana gelen duyarsızlığa bağlı olarak gonadotropinlerde baskılanma söz konusu olur. Agonistlerin bu özelliğinden yola çıkarak geri dönüşümlü bir şekilde östrusun uyarılması ya da baskılanması amacıyla güvenle kullanılabilir. Bu etkisinin yanı sıra, son yıllarda gebeliğin sonlandırılması, endokrinolojik tanı, idrar tutamama ve meme tümörü tedavisi amacıyla da tercih edilmektedir. GnRH antagonistlerinin herhangi bir yan etkiye neden olmadan, geri dönüşümlü olarak köpeklerde östrusun baskılanmasına neden olması bir avantaj olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bu amaçla kullanılan GnRH antagonistleri, gonadotropinlerin salınımını başlangıçta uyardıktan doğrudan baskılaması da bu grup analoglar için bir üstünlük sayılmaktadır. Bununla birlikte, antagonistler gebeliğin ikinci yarısından sonra istenmeyen gebeliklerin sonlandırılmasında ve CEH-P olgularında da güvenle tercih edilebilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Gobello C., 2007. New GnRH analogs in canine reproduction. *Animal Reproduction Science*, 100, 1-13.
2. Dodson WC., 1996. Adjunctive gonadotropin releasing hormone analog therapy. In "Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology", Ed., EY Adashi, JA Rock, Z Rosenwaks, 2183, Lippincott-Raven Philadelphia.
3. Parker KL., Schimmer BP., 2001. Pituitary hormones and their hypothalamic releasing factors. In "Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics", Ed., JG Hardman, LE Limbird, 10th ed., 1541-1562, New York: McGraw Hill Co.
4. Noakes D., 2001. Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. In "Veterinary Reproduction and Obstetrics", Ed., DE Noakes, TJ Parkinson, GCW England, 3-57, W.B. Saunders Harcourt Pub.Lim.

5. Beijerink NJ., Buijtel JJ., Okkens AC., Kooistra HS., Dieleman SJ., 2007. Basal and GnRH-induced secretion of FSH and LH in anestrus versus ovariectomized bitches. *Theriogenology*, 67, 1039-1045.
6. Gobello C., 2012. Effects of GnRH antagonists vs agonists in domestic carnivores, a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 373-376.
7. Padula AM., 2005. GnRH analogues-agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science*, 88, 115-126.
8. Kutzler M., Wood A., 2006. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66, 514-525.
9. Trigg TE., Doyle AG., Walsh JD., Swangchanuthai T., 2006. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, 66, 1507-1512.
10. Corrada Y., Hermo G., Johnson CA., Trigg TE., Gobello C., 2006. Short-term progestin treatments prevent estrus induction by a GnRH agonist implant in anestrus bitches. *Theriogenology*, 65, 366-373.
11. Valiente C., Diaz JD., Rosa DE., Mattioli G., García Romero G., Gobello C., 2009. Effect of a GnRH antagonist on GnRH agonist-implanted anestrus bitches. *Theriogenology*, 72, 926-929.
12. Concannon PW., Lasley B., Vanderlip S., 1997. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrus dogs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 51, 41-54.
13. Hatoya S., Torii R., Wijewardana V., Kumagai D., Sugiura K., Kawate N., Tamada H., Sawada T., Inaba T., 2006. Induction of fertile oestrus in bitches by an intranasal spray of gonadotrophin-releasing hormone agonist. *Veterinary Record*, 158, 378-379.
14. Öcal H., Aydın M., 1999. Anöstrus dönemindeki kedilere uygulanan GnRH'in ovaryum aktivitesi üzerine etkisi. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13, 391-398.
15. Pineda MH., 2001. Reproductive patterns of cats. In "Veterinary Endocrinology and Reproduction", 505-521, Iowa State Press.
16. Concannon PW., Temple M., Montanez A., Newton L., 2006. Effects of dose and duration of continuous GnRH-agonist treatment on induction of estrus in beagle dogs: Competing and concurrent up-regulation and down-regulation of LH release. *Theriogenology*, 66, 1488-1496.
17. Kutzler MA., 2007. Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*, 68, 354-374.
18. Walter B., Otdorff C., Brugger N., Braun J., 2011. Estrus induction in Beagle bitches with the GnRH-agonist implant containing 4.7 mg Deslorelin. *Theriogenology*, 75, 1125-1129.
19. Inaba T., Tani H., Gonda M., Nakagawa A., Ohmura M., Mori J., Torii R., Tamada H., Sawada T., 1998. Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology*, 49, 975-982.
20. Vickery BH., McRae GI., Good Pasture JC., Sanders LM., 1989. Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 39, 175-187.
21. Rubion S., Desmoulin PO., Riviere-Godet E., Kinziger M., Salavert F., Rutten F., Flochlay-Sigognault A., Driancourt M.A., 2006. Treatment with a subcutaneous GnRH agonist containing controlled release device reversibly prevents puberty in bitches. *Theriogenology*, 66, 1651-1654.
22. Wright PJ., Verstegen JP., Onclin K., Jöchle W., Armour AF., Martin GB., Trigg TE., 2001. Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 57, 263-268.
23. Sung M., Armour AF., Wright PJ., 2006. The influence of exogenous progestin on the occurrence of proestrous or estrus signs, plasma concentrations of luteinizing hormone

- and estradiol in deslorelin (GnRH agonist) treated anestrous bitches. *Theriogenology*, 66, 1513-1517.
24. Ponglowhapan S., 2011. Clinical applications of GnRH agonist deslorelin in dogs and cats. *Thai Journal of Veterinary Medicine Supplement*, 41, 59-63.
25. Palm J., Reichler IM., 2010. Effectiveness of deslorelin acetate for the suppression of heat in the bitch. In: *Proc 7th EVSSAR congress*, 87, Louvain la Neuve, Belgium.
26. Arlt SP., Spankowsky S., Heuwieser W., 2011. Follicular cysts and prolonged oestrus in a female dog after administration of a deslorelin implant. *New Zealand Veterinary Journal*, 59, 87-91.
27. Rubion S., Driancourt MA., 2009. Controlled delivery of a GnRH agonist by a silastic implant (Gonazon) results in long-term contraception in Queens. *Reproduction in Domestic Animal*, 44, 79-82.
28. Munson L., Bauman JE., Asa CS., Jöchle W., Trigg TE., 2001. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 57, 269-273.
29. Toydemir TSF., Kılıçarslan MR., Olgaç V., 2012. Effects of the GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats. *Theriogenology*, 77, 662-674.
30. Risso A., Corrada Y., Barbeito C., Diaz J., Gobello C., 2012. Long-term-release GnRH agonists postpone puberty in domestic cats. *Reproduction in Domestic Animal*, 47, 936-938.
31. Fürst J., Fiebiger E., Mack D., Frick J., Rován E., 1994. The effect of active immunization against gonadotropin-releasing hormone on the ultrastructure of the rat ventral prostate. *Urological Research*, 22, 107-113.
32. Chew L., Purswell B., 2010. Use of a commercial GnRH vaccination for mismating in bitches. *Clinical Theriogenology*, 2, 361.
33. Levy JK., Friary JA., Miller LA., Tucker SJ., Fagerstone KA., 2011. Long-term fertility control in female cats with GonaCon™, a GnRH immunocontraceptive. *Theriogenology*, 76, 1517-1525.
34. Ladd A., Tsong YY., Walfield AM., Thau R., 1994. Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. *Biology of Reproduction*, 51, 1076-1083.
35. Walker J., Ghosh S., Pagnon J., Colantoni C., Newbold A., Zeng W., Jackson DC., 2007. Totally synthetic peptide-based immunocontraceptive vaccines show activity in dogs of different breeds. *Vaccine*, 25, 7111-7119.
36. Luepongkukana T., 2010. Comparison of mean serum progesterone levels and luteal period following anestrous bitches implanted with GnRH agonist, deslorelin, short- or long-term. M.Sc. Thesis. Chulalongkorn University, Thailand.
37. Kutzler M., Wheeler R., Lamb S., Volkmann D., 2002. Deslorelin implant administration beneath the vulvar mucosa for the induction of synchronous estrus in bitches. In "Proc 3rd EVSSAR congress", 96, Liege, Belgium.
38. Fontaine E., Mir F., Vannier F., Gérardin A., Albouy M., Navarro C., Fontbonne A., 2011. Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. *Theriogenology*, 76, 1561-1566.
39. Güngör Ö., Kaya M., Gürbulak K., Oral H., Kaya S., Kaçar C., 2010. Köpeklerde Gebeliğin Sonlandırılması Amacıyla GnRH Agonisti (Desloreline) ile PGF2 α Kombinasyonunun Kullanımı. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 903-908.
40. Anadol E., Baştan A., 2007. Dişi köpeklere uygulanan eksojen GnRH'nın serum östradiol 17 β düzeyi ve vagina epitelinde yaptığı sitolojik değişikliklerin incelenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54, 17-21.
41. Sontas BH., Gürbulak K., Ekici H., 2007. Ovarian remnant syndrome in the bitch: a literature review. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 39, 99-104.
42. Heffelfinger DJ., 2006. Ovarian remnant in a 2-yearold queen. *Canadian Veterinary Journal*, 47, 165-167.

43. Reichler IM., Welle M., Sattler U, Jöchle W., Roos M., Hubler M., Barth A., Arnold S., 2007. Comparative quantitative assessment of GnRH- and LH-receptor mRNA expression in the urinary tract of sexually intact and spayed female dogs. *Theriogenology*, 67, 1134-1142.
44. Pagnini U., Florio S., Crispino L., Pagnini G., Colangelo D., Rocco D., Pacilio C., Pacilio M., Macaluso M., Giordano A., 2002. Direct effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on the growth of canine mammary tumour cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85, 470-481.
45. Lombardini P., Florio S., Pagnini G., Crispino L., Avallone L., 1999. Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser(But[t])[6]-Arzgly[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22, 56-61.
46. Jiang GC., Stalewski J., Galyean R., Dykert J., Schteingart C., Broqua P., Aebi A., Aubert ML., Semple G., Robson P., Akinsanya K., Haigh R., Riviere P., Trojnar J., Junien J.L., Rivier JE., 2001. GnRH antagonists: a new generation of long acting analogues incorporating para-ureido-phenylalanines at position 5 and 6. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 453-467.
47. Herbst KL., 2003. Gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Current Opinion Pharmacology*, 3, 1-7.
48. Sukcharoen N. 2000. GnRH Antagonists: an Update. *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 12, 71-76
49. Romero GG., Valiente C., Aquilano D., Corrada Y., Gobello C., 2009. Endocrine effects of the GnRH antagonist, acyline, in domestic dogs. *Theriogenology*, 71, 1234-1237.
50. Risso A., Valiente C., Corrada Y., Romero GG., Blanco PG., de la Sota PE., Diaz JD., Gobello C. 2010. The GnRH antagonist acyline prevented ovulation, but did not affect ovarian follicular development or gestational corpora lutea in the domestic cat. *Theriogenology*, 73, 984-987.
51. Pelican KM., Wildt DE., Ottinger MA., Howard J., 2008. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. *Domestic Animal Endocrinology*, 34, 160-175.
52. Smith FO., 2006. Canine pyometra. *Theriogenology*, 66, 610-612.
53. Demirel MA., Küplülü Ş., 2010. Endotoksik Pyometralı Köpeklerde Polimiksin E - Ampisilin Kombinasyonunun Antiendotoksik Etkisinin Araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 313-318.
54. Batista PR., Blanco PG., Gobello C., 2015. Treatment of canine pyometra with the GnRH antagonist acyline: A case series. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30, 25-27.
55. Johnston SD., Kustritz MR., Olson PNS., 2001. Prevention and termination of canine pregnancy. In "Canine and Feline Theriogenology", Ed., K Ray, L Denise, 168-192, Philadelphia, Saunders.