



Döstrus Döneminde Olan Köpeklere GnRH Antagonisti (Cetrorelix) Uygulamalarının Progesteron Değerine Etkisinin Araştırılması*

H. Tuğba YÜKSEL¹, Örsan GÜNGÖR²

* Bu araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 0161-YL-13 proje kodu ile desteklenmiştir.

¹Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Işıklı Köyü, 09016, AYDIN.

²Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı. İstiklal Yerleşkesi, 15340, BURDUR.

Özet

Yapılan çalışmanın amacı, döstrus dönemindeki köpeklere GnRH antagonisti uygulamalarının progesteron değerine etkisinin araştırılmasıdır. Araştırmada, seksüel siklusun döstrus dönemindeki 15 dişi köpek kullanıldı. Bu köpekler rasgele olarak, uygulama grubunda 8, kontrol grubunda 7 köpek olacak şekilde iki gruba ayrıldı. Kontrol grubuna alınan köpeklere herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. Seksüel siklusun döstrus döneminde olan köpeklere, döstrusun 5-10. gün aralığında GnRH antagonisti olan Cetrorelix, 5 gün süreyle deri altı yolla boyun derisi altına uygulandı. Progesteron değerinin belirlenmesi amacıyla tüm köpeklerden 5 gün süreyle (uygulamadan hemen önce kan alınıp sonra enjeksiyon yapılarak) günde bir olmak üzere kan alındı. İlaç uygulaması sonrasında köpeklerde herhangi bir yan etkiye rastlanmadı. Kontrol grubundaki köpeklerin, 5 gün süreyle alınan kanlardan elde edilen ortalama P4 değerlerine bakıldığında, günlük progesteron değerleri arasında önemli bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Uygulama grubundaki köpeklerin ortalama P4 değerleri 5. günde 1 ng/ml seviyesine yaklaştı. Kontrol ve uygulama gruplarındaki köpeklerin P4 değerlerine bakıldığında ilk (ilaç uygulanmadan alınan örnekler) ve ikinci gün değerleri arasında bir fark görülmedi ($p>0.05$). Üçüncü gün P4 değerleri arasındaki fark önemliydi ($p<0.05$). Dört ve 5. günlerdeki P4 değerleri arasındaki fark ise çok önemli bulundu ($p<0.001$). Sonuç olarak, GnRH antagonisti olan Cetrorelix'in, lokal ve sistemik yan etkilere neden olmayan ve uygulama sonrası 5. gün içerisinde köpeklerde gebeliğin devamı için gereken P4'ü kritik değeri olan 2 ng/ml'nin altına düşürdüğü ortaya konuldu.

Anahtar kelimeler: Köpek, GnRH antagonist, progesteron.

The Investigation of Effectiveness of a GnRH Antagonist Cetrorelix to Progesterone Levels on Bitches in Diestrus.

Summary

The purpose of this study was to investigate the effect of GnRH antagonist administration to progesterone values in diestrus bitches. Fifteen diestrus bitches were used in research. These were randomly allocated to two groups, 8 bitches served as treatment group and 7 bitches served as controls. As a control group's bitches weren't made any medical administration. Bitches which were in term of diestrus of sexual cycle, was administered GnRH antagonist as s.c. during 5 days between 5 and 10 days of diestrus. For the determination of the progesterone values, the blood samples were taken from all bitches during 5 days one time per day (samples were taken before administration). None of the bitches presented side effect after drug administration. In control group, when blood was taken from bitches during 5 days was researched for main P4 values, didn't present significant difference among daily P4 values ($p>0.05$). P4 values of bitches of treatment group approached 1ng/ml on fifth day. When in control and treatment group's bitches was researched for P4 values, first and second day values weren't observed significant difference ($p>0.05$). Difference between P4 values were important on third day ($p<0.05$). Difference between P4 values were found very significant between fourth and fifth days ($p<0.001$). As a result; Cetrorelix which is GnRH antagonist didn't cause local or systemic side effect and was revealed that 2 ng/ml which was critical P4 value for maintain bitches pregnancy, may reduce on fifth day after treatment.

Keywords: Bitch, GnRH antagonist, progesterone

Giriş

Köpeklerde istenmeyen gebeliklerin sonlandırılması için hızlı müdahalede bulunmak, etkili, güvenilir, yan etkisi olmayan ve tek uygulamayla abortif etki sağlamak esas amaçlardır (1, 2). Köpeklerde istenmeyen gebeliklerin sonlandırılması için çok fazla yöntem kullanılmakta, ancak hiçbiri belirtilen şartları tek başına sağlayamamaktadır (3-5). Bu nedenle halen farklı ilaç ve uygulama yöntemlerinin geliştirilmesi için araştırmalar devam etmektedir (6). LH ve FSH salınımını direkt olarak inhibe eden GnRH antagonistleri de bu amaçla kullanılmaya başlanan ilaçlardan biridir. GnRH antagonistleri mevcut GnRH hormonundaki aminoasitlerden birden fazlasının yer değiştirmesiyle ortaya çıkabilmektedir. Mevcut GnRH antagonistleri ilgili reseptöre bağlandıktan sonra yarışmalı baskılama yaparlar ve fizyolojik GnRH'nın bağlanmasına izin vermezler (7-9). Ancak köpeklerde abortun uyarılması için yeterli araştırma yapılmamıştır ve bu nedenle GnRH antagonistlerinin köpek reproduktif sistemi üzerine etkileri üzerine yeterli bilgi yoktur (10). Progesteronun sürekliliği, gebeliğin başlatılması ve devamı için gereklidir (11). Köpeklerde, plazma progesteron konsantrasyonları gebeliğin korunması için ≥ 2 ng/ml olmalıdır. Progesteron seviyesinin 48 saatten uzun süreyle kanda 2 ng/ml' nin altına düşmesiyle birlikte gebeliğin erken dönemlerinde abortus ya da embriyonik rezorbsiyon meydana gelmektedir (12, 13). Progesteron; endometriyumun değişiklikleri ve endometriyal bez sekresyonları, endometriyal bütünlüğün sağlanması ve plasantanın bağlılığını sağlar. Ayrıca uterusun kontraktilesini baskılar. Özellikle östrojenlerin uterojenik aktivitesini önlemesi nedeniyle östral fazın sonunda düşer, fakat LH dalgasından sonraki yaklaşık 10-15. günlerde tekrar önemli bir artış yapar (6, 14). LH ve prolaktinin ikisi de köpekte luteotropik olarak

önerilmektedir; bu durumda bu hormonların CL'un desteklenmesinde temel ve gerekli bir hormon olduğu görülmektedir (3,15). Concannon (2), LH'nın köpeklerdeki ana luteotropik faktör olduğunu öne sürmüştür. GnRH antagonistlerinin veya GnRH'nın baskılanmasından sonraki uygulamaları takiben CL'un engellendiğini göstermiştir. GnRH antagonist uygulamaları yeterli dozda olduğunda plazma LH konsantrasyonunu düşürür (16).

Bu araştırma, GnRH antagonisti olan Cetorelix'in, köpeklerde istenmeyen gebeliklerin erken dönem sonlandırılmasında etkinliğini ortaya koymak amacıyla bir ön çalışma niteliğindedir.

Materyal ve Metot

Hayvan Materyali

Çalışmanın hayvan materyalini, 2013 yılında, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne ve özel bir Veteriner Kliniğine getirilen, seksüel siklusun diöstrus evresinde olan 15 dişi köpek oluşturdu. Bu köpekler rastgele olarak, uygulama grubunda 8, kontrol grubunda 7 köpek olacak şekilde iki gruba ayrıldı. Araştırmada kullanılan köpeklerde yaş ve ırk özeliği aranmadı.

Köpeklerin Seksüel Siklusunun Döneminin Belirlenmesi

Köpeklerin östrus siklusları, seksüel siklusun hangi evresinde olduğu ve ovulasyon zamanları hasta sahibinden alınan gözlem yoluyla ayrıca vaginal sitoloji yöntemi (Papanicolaou boyama yöntemi) ile takip edilerek belirlendi.

Köpeklere İlaç Uygulanması

Kontrol grubundaki köpeklere olarak uygulan köpeklere herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. Seksüel siklusun diöstrus döneminde olan köpeklere, diöstrusun 5-10. günde GnRH antagonisti olan Cetrotide (0.25 mg Cetorelix asetat, Sereno İlaç, Türkiye), 5 gün süreyle 0.25 mg

dozda deri altı yolla boyun derisi altına uygulandı. İlk uygulama çift doz (0.5 mg) olarak yapıldı.

Kan Örneklerinin Toplanması ve Alınan Kanların Değerlendirilmesi

Progesteron düzeyindeki değişimlerin belirlenmesi amacıyla köpeklerden, ilaç uygulamasının hemen öncesinden başlanarak, günlük olarak 5 gün süreyle günde bir olmak üzere 5 ml kan alındı. Alınan kanlar, 3000 d/dk'da 15 dk santrifüje (Hettich, Universal 3R) edilerek kan plazması ayrıldı ve değerlendirilinceye kadar -20 °C'de saklandı. Plazma P4 değerleri ticari bir kit (Progesteron ELISA kitleri DRG International Inc., USA), kullanılarak belirlendi.

Elde Edilen Bulguların İstatistik Değerlendirmesi

Elde edilen verilerin hesaplanmasında SPSS® (SPSS, 17.0) programı kullanılmıştır. Verilerde ortalama değer ve standart sapma hesaplandı. Gruplar arası farklılıklar "Student T test" yöntemi ile karşılaştırıldı.

Bulgular

İlaç uygulaması sonrasında köpeklerde her hangi bir yan etkiye rastlanmadı. Araştırmada elde edilen bulgular, tablo ve grafikler halinde verilmiştir. Kontrol grubundaki köpeklerin, 5 gün süreyle alınan kanlardan elde edilen ortalama P4 değerlerine bakıldığında, günlük progesteron değerleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

Uygulama grubundaki köpeklerin, ortalama P4 değerlerinde, ilaç uygulaması yapılan günler ilerledikçe azalma belirlenmiş ve uygulama sonrası 5. günde 1 ng/ml seviyesine yakın bir değere yaklaştığı görülmüştür (Tablo 2).

Kontrol ve uygulama gruplarındaki köpeklerin P4 değerlerine bakıldığında ilk (ilaç uygulanmadan alınan örnekler) ve ikinci gün değerleri arasında bir fark görülmedi ($p>0.05$). Uygulama grubunda, üçüncü günden itibaren P4 değerleri arasındaki fark önemliydi ($p<0.05$). Dört ve 5. günlerdeki P4 değerleri arasındaki farkın ise çok önemli bulunmuştur ($p<0.001$, Grafik 1).

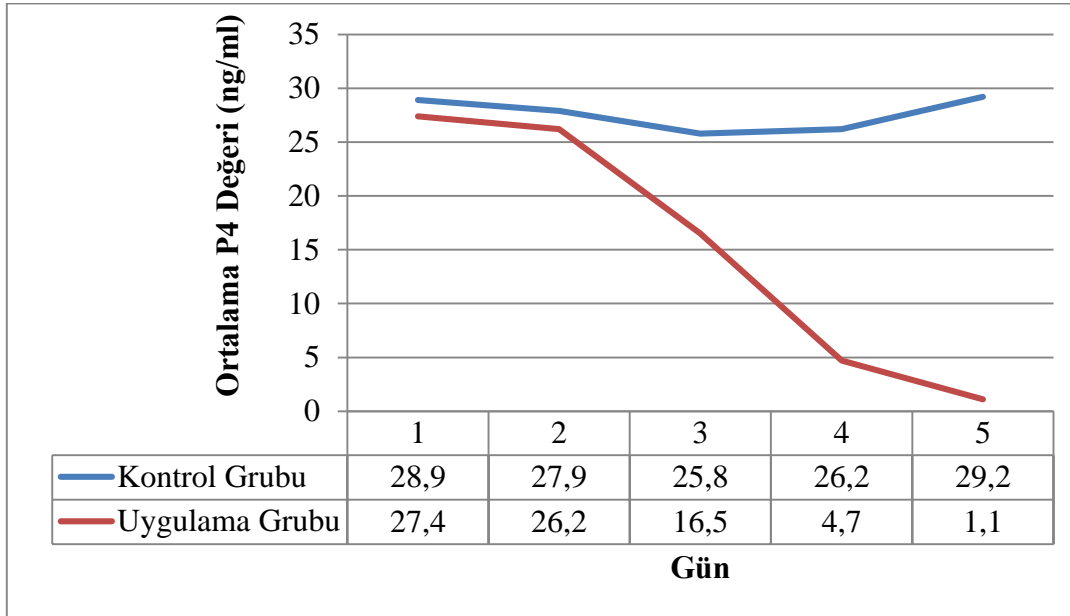
Tablo 1: Araştırmada kontrol grubu olarak kullanılan köpeklerin P4 değerleri (ng/ml).

Köpeğin Adı	0.gün	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün
Patates	31.4	20.6	26.8	28	28.8
Lessy	19.5	19.2	14.4	15.5	26.1
Keş	40	40	40	40	40
Akan	28.6	33.2	24	25.5	25
Steffy	34.3	31.4	30.1	33.4	33.8
Gök	28.6	28	24.2	22.2	22
Şeker	20.3	23.5	21.7	19.2	19.5
Ortalama	28.9^a	27.9^a	25.8^a	26.2^a	29.2^a
	±	±	±	±	±
	7,3	7,4	7,8	8,4	7,0

Tablo 2: Araştırmada uygulama grubu olarak kullanılan köpeklerin P4 değerleri (ng/ml).

Köpeğin Adı	0.gün	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün
Beyaz	31,20	40,00	18,60	2,60	0,80
Rot	21,10	20,10	10,70	3,00	1,20
Wiskey	19,40	20,10	7,80	2,90	0,70
Ada	24,40	24,10	15,00	5,00	1,20
Daisy	27,40	31,50	30,00	10,90	1,30
Sibe	40,00	36,10	27,10	6,60	1,20
Melek	30,00	20,50	10,60	2,90	1,10
Barış	26,40	17,80	12,60	4,10	1,00
Ortalama	27,4^a	26,2^a	16,5^b	4,7^c	1,0^d
	±	±	±	±	±
	6,4	8,4	8,1	2,8	0,2

a, b, c : Aynı satırdaki farklı harfler P<0.01 olduğunu gösterir.

**Grafik 1:** Kontrol ve uygulama grubu ortalama P4 değerleri.

Tartışma

GnRH antagonistleri, ilk kullanıldıkları yıllarda uygulandıkları bölgede ve generalize olarak yan etkilere neden olmaktadır. Ödematöz şişkinliklere ya da neden oldukları mast hücre degranülasyonu ve histamin salınımını uyarması sonrasında aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olmaktadır. Ancak ikinci hatta üçüncü nesil antagonistler geliştirildikten sonra bu yan etkiler azaltılmış alerjen etkileri tamamen ortadan kalkmıştır (17).

Uygulama yapılan köpeklerde herhangi bir yan etkinin ortaya çıkmaması, araştırmada kullandığımız GnRH antagonisti olan Cetrorelix'in, son kuşak antagonistlerden biri olduğundanır. Ayrıca Reissmann ve ark. (10) ve Demirel ve ark. (8), cetrorelixin daha az histamin sentezletici etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan araştırmada, araştırmaya dahil edilen köpekler döstrus döneminde ve çoğunlukla da

diöstrusun 5-10. günleri arasındaydı ve P4 değerleri ilk kan alındığında ortama 28 ng/ml (en düşük 14.4, en yüksek >40 ng/ml) civarındaydı. Johnston ve ark. (18), da köpeklerde P4 değerinin ovulasyondan önce yükselmeye başladığını ve östrus sonrası 15-25. günlerde en yüksek değerine ulaştığını (15-80 ng/ml) belirtmişlerdir.

Çalışma grubundaki köpeklerde, ilaç uygulamasından 24 saat sonra P4 değerinin belirgin olarak azaldığı belirlendi. Demirel ve ark. (8), GnRH antagonistlerinin uygulanmasını takiben 24-72 saat sonra LH değerinin azalmaya başladığını belirtmişlerdir. Sunulan bu çalışmada da köpeklerde gebeliğin ilk yarısındaki luteotropik faktör olan LH'nın seviyesinin azalmasını takiben P4 değeri de düşmeye başladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte Karacan ve Çamlıbel (19), GnRH antagonistlerinin luteinize granuloza hücrelerinden P4 üretimini direk olarak baskılayabileceklerini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada GnRH antagonistlerinin P4 değerindeki azalmaya direk etkisinin olabileceği de düşünülmektedir.

Kontrol grubundaki köpeklerden 5 gün süreyle alınan kanlardan elde edilen ortalama P4 değerleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Uygulama grubundaki köpeklerin, ortalama P4 değerleri arasında günler ilerledikçe azalma belirlenmiş ve uygulama sonrası 5. günde köpeklerde gebeliğin devamı için gerekli olan değer olarak bilinen 2 ng/ml seviyesinin altına indiği görülmüştür. Bu durumun, Valiente ve ark. (17) belirttiği gibi, GnRH antagonistlerinin uygulanmasını takiben CL'un luteotropik etkiden yoksun kalarak lize olmasından dolayı şekillendiği düşünülmektedir.

Sonuç

Araştırmada elde edilen bulgular sonrasında, son kuşak GnRH antagonistlerinden olan Cetrorelix'in, lokal ve generalize yan etkilere neden olmayan ve

köpeklerde güvenle kullanılabilir olan bir antagonist olduğu belirlendi. Cetrorelix'in uygulamasını takiben, P4 değerinin, 3. günden itibaren düşmeye başladığı ve 5. gün köpeklerde gebeliğin devamı için gereken kritik değer olan 2 ng/ml'nin altına düşürebildiği saptandı. Modern bir GnRH antagonisti olan Cetrorelix'in, fazla yan etkisi bulunmayan ve köpeklerde P4 değerini baskılamak amacıyla güvenle kullanılabilir bir ilaç olduğu görüldü. Ancak gebeliğin sonlandırılması amacıyla kullanılabilirliğinin ortaya konulması amacıyla daha kapsamlı araştırmaların yapılması yararlı olacaktır.

Kaynaklar

1. Braakman A, Okkens AC, Haaften B. (1993). Medical methods to terminate pregnancy in the dog. The Compendium for Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 15: 1505-1512.
2. Concannon PW. (1993). Biology of Gonadotrophin Secretion in Adult and Prepubertal Female Dogs. Journal of Reproduction and Fertility. 47: 3-27.
3. Eilts BE. (2002). Pregnancy termination in the bitch and queen. Clinical Technique in Small Animal Practice. 17: 116-123.
4. Feldman EC, Davidson AP, Nelson RW, Nyland TG, Munro C. (1993). Prostaglandin induction of abortion in pregnant bitches after misalliance. Journal of American Veterinary Medical Association. 202: 1855-1858.
5. Gobello C, Castex G, Corrada Y, Klima L, de la Sota RL, Rodríguez R. (2002). Use of prostaglandins and bromocriptine mesylate for pregnancy termination in bitches. Journal of American Veterinary Medical Association. 220:1017-1019.
6. Concannon PW. (2004). Contraception in dogs and cats. 29th World congress of the World Small Anim Vet Assoc, 7-8.10.2004. Rodos, Greece.
7. Bagatell CJ, Conn PM, and Bremner WJ. (1993). Single-dose administration of the gonadotropin-releasing hormone antagonist, Nal-Lys (antide) to healthy men. Fertility and Sterility. 60: 680-685.
8. Demirel A, Bozdağ G, Gürkan T. (2006). GnRH Agonistleri ve Antagonistleri: Güncel Yönleri, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 13: 135-140.
9. Hull ME, Kenigsberg DJ. (1987). Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use. Laboratory Management. 25: 51-58.

10. Reissmann T., Schally A.V., Bouchard P., Riethmüller H., Engel J. (2000). The LHRH Antagonist Cetrorelix: A Review. *Human Reproduction*. 6: 322-331.
11. Concannon PW. (1986). Canine pregnancy and parturition. *Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice*. 16: 453-475.
12. Güngör Ö, Kaya M, Gürbulak K, Oral H, Kaya S, Kaçar C. (2010). Use of GnRH Agonist (Desloreline) in Combination with PGF2 α on the Termination of Pregnancy in Bitches. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 16: 903-908.
13. Günzel-Apel AR, Zabel S, Bunck CF, Dieleman SJ, Einspanier A, Hoppen HO. (2006). Concentrations progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short- cycling german shepherd dogs. *Theriogenology*. 66: 1431-1435.
14. Concannon PW, McCann JP, Temple M. (1989). Biology and Endocrinology of Ovulation, Pregnancy and Parturition in the Dog. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement*. 39: 3-25.
15. Kooistra HS, Okkens AC. (2002). Secretion of Growth Hormone and Prolactin During Progression of the Luteal Phase in Healthy dogs: A Review. *Molecular Cell Endocrinology*. 197:167-172.
16. Onclin K, Verstegen JP. (1997). In Vivo Investigation of Luteal Function in Dogs: Effects of Cabergoline, a Dopamine Agonist, and Prolactin on Progesterone Secretion During Mid-Pregnancy and Diestrus. *Domestic Animal Endocrinology*. 14: 25-38
17. Valiente C, Arias D, Blanco PG, Corrada Y, Gobello C, Sota PE. (2009). Comparison of Two Doses of the GnRH Antagonist, Acyline, for Pregnancy Termination in Bitches. *Reprod Dom Anim*. 44: 156- 159.
18. Johnston SD, Kustritz VR, Olson PNS. (2001). Prevention and termination of canine pregnancy., In: *Canine and Feline Theriogenology*. Ed(s): Johnston SD, Kustritz VR, Olson PNS, WB Saunders Company, Philadelphia, p: 168-192.
19. Karacan M, Çamlıbel T. (2004). Gonadotropin Releasin Hormon Analogları (Agonistler/Antagonistler) ve In Vitro Fertilizasyon Sikluslarında Kullanımı. *Kadın Doğum Dergisi*. 3: 330-344.

Yazışma Adresi:

Prof. Dr. Örsan GÜNGÖR
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner
Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı
Telefon: +90 248 2132335, +90 506 2422912
e-posta: gungororsan@hotmail.com