

Effect of a long-acting deslorelin implant (Suprelorin® 4.7 mg) on semen characteristics, body weight, serum biochemical and haematology profile in adult male Beagle dogs

Literature review and a prospective study

L. Müller^{1,2*}
L. Mester²
A. Nagy¹
R. Hanácsék³
F. Janett⁴
S. Cseh¹
I. M. Reichler⁴
O. Balogh⁴

1. Állatorvostudományi Egyetem, Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika, H-1078 Budapest István u. 2.

*e-mail: muller.linda@univet.hu

2. ATRC Aurigon, Toxikológiai Kutatóközpont Kft., Dunakeszi

3. Imperial Állatkórház Bt., Eger

4. Clinic of Reproductive Medicine, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich, Svájc

Deslorelin tartalmú implantátummal (Suprelorin® 4,7 mg) végzett kémiai kasztráció hatása a spermaminőségre, a testtömegre, a vér egyes biokémiai paramétereire és a vérképre ivarérett Beagle kan kutyákban

Irodalmi összefoglaló és saját tapasztalatok

Müller Linda^{1,2*}, Mester László², Nagy Anna¹, Hanácsék Richárd³, Janett Fredi⁴, Cseh Sándor¹, Reichler Iris Margaret⁴, Balogh Orsolya⁴

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők ivarérett kan kutyák esetében tanulmányozták a deslorelin-tartalmú implantátummal végezhető kémiai kasztráció hatását a spermaminőségre, beleértve a spermiumok DNS-integritását. Emellett, ismerte a sebészi ivartalanítás anyagcserére kifejtett hatásait, vizsgálták a testtömeg és egyes biokémiai paraméterek, köztük a glükóz és a trigliceridek szintjének alakulását a kémiai kasztrációt követően. Közleményükben áttekintik a kémiai kasztráció hatásairól eddig megjelent publikációkat, ill. összegzik saját tapasztalataikat.

SUMMARY

Background: Semen characteristics in frequently collected samples after insertion of a Suprelorin® 4.7 mg (Virbac, France) implant have not been reported yet.

Objectives: to determine the effects of Suprelorin® 4.7 mg on the quality of semen collected twice weekly, and on metabolic function and health by body weight (BW) changes and serum biochemical (glucose, triglycerides, ALT, AP, BUN, creatinine, total protein, albumin, albumin/globulin ratio, electrolytes) and haematology analysis.

Materials and Methods: Five adult healthy male Beagles (31-46 months old, 10.4-13.9 kg) housed together and fed the same ration throughout the study were implanted subcutaneously with 4.7 mg Suprelorin® (d0). Semen was collected twice weekly. DNA fragmentation index (% DFI) was determined with *Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA™)*. BW measurements and blood sampling were performed on d0, d21, and biweekly until d112. Data was analysed with general linear model with repeated measures.

Results and Discussion: BW was stable and haematology and biochemical parameters remained in the normal range. In 4 dogs semen could be collected until d10 and until d17 in the last dog. No changes in ejaculate volume, sperm concentration, total number of spermatozoa, progressive motility, morphology and % DFI (1.33-4.50% frozen-thawed 0 h, 1.49-6.66% frozen-thawed after 3 h incubation at 38 °C) were detected ($P \geq 0.112$). As semen quality was not significantly influenced, matings may result in viable offspring until aspermia occurs. Under controlled feeding conditions, 4.7 mg Suprelorin® administration does not result in BW changes and in any alterations of blood parameters.

KISÁLLAT

Társállataink esetében a sebészi ivartalanítás a populációszabályozás legfontosabb eszköze, ill. egyéb, nem csak a reproduktív szerveket érintő betegségek megelőzésére és kezelésére is gyakran alkalmazott műtéti beavatkozás. A szervezet egészére kifejtett hatásait áttekintő szakirodalom hosszú évtizedekre nyúlik vissza, így előnyös hatásai mellett egyre pontosabb képet kapunk a gonádok eltávolításának negatív hatásaiért felelős folyamatokról, hormonális eltérésekről is. Ezek mélyebb ismerete mellett, elismerve az ivartalanítás jelentőségét, egyre nagyobb hangsúlyt kap az alternatív módszerek kutatása, ugyanakkor alkalmazásuk rövidebb múltja eddig még nem tette lehetővé hatásuk teljes körű megismerését. Kan kutyák esetében a sebészi kasztráció során a herék eltávolítását követően már 4 órán belül szignifikánsan csökken a tesztoszteron koncentrációja a vérben (23). A herében termelő tesztoszteron és ösztrogén negatív feedback hatásának kiesése miatt a gonadotrop hormonok (a luteinizáló hormon [LH] és a follikulus stimuláló hormon [FSH]) szérumszintje nő. A gonadotrop hormonok koncentrációjának emelkedése mindkét nem esetében megfigyelhető, bár nőivarban sokkal nagyobb különbségek mérhetőek az ivartalanítás előtti értékekhez képest (1, 24).

Társállataink esetében a sebészi ivartalanítás a populációszabályozás legfontosabb eszköze

Kasztrációt követően már 4 órán belül szignifikánsan csökken a tesztoszteron koncentrációja a vérben

Többféle, reverzibilis, műtéti beavatkozást nem igénylő, kémiai alapú ivartalanítási módszer létezik

A sebészi kasztráció alternatívájaként többféle, reverzibilis, műtéti beavatkozást nem igénylő, kémiai alapú módszert is kifejlesztettek. A nyolcvanas évek elejétől számos publikáció született a hosszú hatású gonadotropin-releasing hormon [GnRH] agonisták ilyen irányú alkalmazásáról (5). Ezek a nemi működésért felelős hipotalamikus neurohormon-analógok képesek biológiai választ kiváltani a hipofízisbeli GnRH-receptorokon, és így az LH és az FSH felszabadulását indukálni. A kezdeti stimuláló („flare-up”) hatást követően azonban bekövetkezik az agyalapi mirigy deszenzitizációja a GnRH-receptorok csökkenő kifejeződésén (downregulációján) keresztül, ami egy átmeneti hipogonadizmushoz vezet (7, 34). Az adenohipofízis LH- és FSH-termelő sejtjeinek a GnRH hatásával szembeni megváltozott válaszkészsége mellett kimutatták a Leydig-sejtek LH-val szembeni érzéketlenségét is (13). A hosszú hatású GnRH-analógok hatásmechanizmusából következik, hogy a downreguláció kialakulása után mind a nemi hormonok, mind a gonadotropin hormonok szintje alacsony lesz. Ilyen GnRH-szuperagonista a deslorelin-acetát is, amit állatorvosi vonalon Trigg és mtsai alkalmaztak először (32, 33). Az implantátum beültetését követő kezdeti stimuláló, „flare-up” hatást a perifériás tesztoszteronszint emelkedése jellemzi. A tesztoszteron csúcskoncentrációja a kezelést követő 40. percben mérhető, majd pár órás (12) vagy napos (13, 22) perzisztálás után alapszintre csökken. Más szerzők hosszabb, még a 9–17. napon is mérhető tesztoszteron-emelkedési hullámról számoltak be (27). Az ezt követő progresszív csökkenés során a tesztoszteronszint a 11. (22), 22–33. (4), ill. a 64–75. napra (27) a méréshatár alá csökken. A deslorelin-kezelést követő tesztoszteronszint-csökkenés eredményeként átlagosan a 4–6. hétre azoospermia alakul ki (33). A kezelt állatokban a herék sorvadása figyelhető meg, a spermatogenezis a spermatogóniumok fázisában elakad (5). A deslorelin adagjától függetlenül (3, 6 és 12 mg-os implantátumok beültetését követően, azonos mértékben) romlani kezd az ejakulátum minősége 22. mások szerint 28–35 nappal az implantációt követően. Kezdetben csökken az ejakulátum mennyisége, majd csökken a spermiumok motilitása és koncentrációja, ill. akár 80%-ig megemelkedik a hibás alakú, főleg másodlagos rendellenességeket mutató spermiumok aránya. Az implantációt követően a spermavétel átlagosan a 35. napig lehetséges (14, 22, 31). Trigg és mtsai (2006) a hágómozgások megléte alapján elbírált libidó 50%-os csökkené-

A GnRH-szuperagonista deslorelin a receptorok kifejeződésének csökkenésén keresztül éri el hatását

Csökken az ejakulátum mennyisége, a spermiumok motilitása és koncentrációja, romlik a sperma minősége, majd megszűnik a libidó

Más vizsgálatok az állatok libidóját változtatatlannak ítélték

A GnRH-analógok anyagcserére, táplálékfelvételre kifejtett hatásaival kevésbé foglalkozik a szakirodalom

Sebészi ivartalanítást követően mindkét ivarban jellemző az elhízás

A hosszú hatású deslorelin-implantátum részletes metabolikus hatásait máig nem írták le

A deslorelin tartalmú implantátum hatásait vizsgálták a beültetést követő 4 hónapon keresztül

sét, majd megszűnését írták le a 22., ill. a 30–35. napon (31). Ezzel szemben JUNAIIDI vizsgálatában (2009) az ejakulációnak a 35. nap körül jelentkező elmaradása mellett az állatok libidóját változatatlannak ítélték, mert azok továbbra is erekciót és hágómozgásokat mutattak a sikertelen mintavételek alkalmával is (14). A szakirodalom ugyanakkor nem egységes abban a tekintetben, hogy a „flare-up” időszakra jellemző átmeneti tesztoszteronszint-emelkedés klinikai szinten is detektálható-e. A spermaminőség kezdeti javulásáról számoltak be ROMAGNOLI és mtsai (2012), akik 6-ból 4 kutyánál megnövekedett ejakulátum-mennyiséget és progresszív motilitást, 3 kutyában pedig megnövekedett összpermiumszámot írtak le a 4,7 mg-os deslorelin implantátum beültetését követően (27). A deslorelin implantátumnak a spermiumok DNS-integritására gyakorolt esetleges hatásáról sem az azoospermia kialakulásáig eltelt időszakban, sem a down-regulációt követően a spermatermelés visszaállításának idejére vonatkozóan nincsenek adatok.

Míg a GnRH-analógok reproduktív szervekre kifejtett hatása jól ismert, a nem reproduktív szervrendszereket és folyamatokat érintő, pl. az anyagcserére, táplálékfelvételre kifejtett hatásaival kevésbé foglalkozik a szakirodalom annak ellenére, hogy a sebészi ivartalanítás a legjelentősebb rizikófaktor társállataink elhízásának hátterében (16, 20). A gonádok eltávolítása mind nőivarú, mind hímivarú kutyák esetében befolyásolja a anyagcsere-folyamatokat, de ennek pontos háttere, valamint a beavatkozás időpontjának jelentősége máig sem tisztázott (25). Szuka kutyákban a sebészi ivartalanítást követően ~30%-kal csökken az energiaszükséglet, ugyanakkor nő a táplálékfelvétel és csökken az állatok aktivitása (8, 9, 10, 11, 28), így már 90 nappal az ivartalanítást követően testtömeg-gyarapodás mérhető (8). Ivartalanított kan kutyákban is megfigyelhető a megnövekedett táplálékfelvétel és az aktivitás csökkenése, gyakoribb az elhízás és ehhez kapcsolódóan a cukorbetegség kialakulásának valószínűsége (3, 18, 19, 21). RENAULD és mtsainak megfigyelései szerint (1980) 4 hónappal a kasztrációt követően a kan kutyák kondíciója és pajzsmirigyműködése nem változott, viszont 10 hónappal a beavatkozást követően az állatok testtömeg-növekedést, elhízást mutattak (26). Vizsgálataik szerint a hiperglikémiára adott inzulinválasz intenzívebb a kasztrált állatokban, ill. az ivartalanítás segíti a zsír raktározását azáltal, hogy hiperglikémia mellett is növeli a szövetek szabadzsírsav-felvételét a vérből, ill. hipoglikémia esetén gátolja a lipolitikus válasz kialakulását (26). Férfiakban a GnRH-agonisták alkalmazása növeli a testzsír mennyiségét, a vér koleszterin- és trigliceridszintjét, és csökkenti a sovány testtömeget, valamint az inzulinérzékenységet (29, 30). Bár kan kutyákban megfigyelték kémiai kasztrációt követően a tesztoszteronszint csökkenését kísérő fokozódó étvágyat (6, 17), a hosszú hatású deslorelin-implantátum részletes metabolikus hatásait máig nem írták le.

SAJÁT VIZSGÁLAT

Célul tűztük ki a 4,7 mg deslorelin tartalmú implantátum (Suprelorin® 4,7 mg, Virbac, Franciaország) spermamennyiségre és -minőségre, beleértve a hímvasejtek DNS-fragmentációjának mértékét (% DFI; Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA™), valamint a testtömegre és a vér egyes biokémiai és hematológiai paramétereire gyakorolt hatásának vizsgálatát ivarérett kan kutyákban a beültetést követő 4 hónapon keresztül (flare-up és teljes downreguláció időszaka). A 4,7 mg-os Suprelorin®-implantátum egyes biokémiai és hematológiai paraméterekre kifejtett hatásának vizsgálata, beleértve a metabolikus állapot tükröző éhomi glükóz- és trigliceridszinteket, nem csak az általános egészségi állapot jellemzése, hanem az elhízásra való hajlam felderítése céljából is fontos.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokat 5, Beagle fajtájú, kísérleti célra tenyésztett és tartott kan kutyán végezték

Az implantátum beültetését megelőzően egyhetes időközzel kétszer, majd a beültetést követően hetente kétszer történt spermavétel

Rendszeresen végezték testtömegmérést, valamint a hematológiai és a biokémiai paraméterek vizsgálatát

A sperma minőségi vizsgálatait, a spermiumok DNS-töredezettségének meghatározásával egészítették ki

Munkánk során 5, Beagle fajtájú, kísérleti célra tenyésztett (Marshall Ltd.) és tartott (ATRC Aurigon Kft., Dunakeszi, működési engedély száma: 9/1/2014; engedély PEI/001/4557-4/2014, Pest megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügy Igazgatósága) örökbefogadásra szánt, 31–46 hónapos, 10,4–13,9 kg testsúlyú, 2/5–3/5 kondícióbesorolású kan kutyát kezeltünk, vizsgáltunk, majd ivartalanítottunk. Az állatok a vizsgálatot megelőzően rendszeres állatorvosi felügyelet (részletes fizikális- és vérvizsgálat) alatt álltak, ami alapján egészségesek voltak és korábban reprodukív funkciót érintő vizsgálatban nem vettek részt. Az állatokat csoportban, 14 m² nagyságú, hasonló alapterületű kifutóval rendelkező boxban tartottuk. Folyamatos ivóvízellátás mellett napi egy alkalommal (11:00 órakor) kaptak teljes értékű száraztápot (Ecopet Natural, Farmina Pet Foods, 300g/egyed), egészségi állapotukat pedig napi rendszerességgel ellenőriztük. Az állatok fizikális vizsgálatát, beleértve a testtömegmérést, valamint a vér- és spermaminták gyűjtését a reggeli órákban, 8 és 9 óra között végeztük 22 órás koplaltatást követően. Szőrnýrás és a bőr alapos fertőtlenítése után 4,7 mg deslorelin tartalmú (ami megfelel 0,34–0,45 mg/ttkg adagnak) implantátumot (Suprelorin®) ültettünk az állatok bőre alá, a lapockák közötti területre, a gyártó által a készítményhez csomagolt applikátor segítségével. Az implantátum beültetését megelőzően egyhetes időközzel, két alkalommal történt spermavétel (-14. és -7. nap) az állatok szoktatása és a kezdeti spermaminőség ellenőrzése céljából, majd a beültetést (0. nap) követően heti két alkalommal addig, amíg a spermavétel lehetséges volt. Testtömegmérést, valamint a hematológiai és a biokémiai paraméterek vizsgálatát a kísérletbe vonáskor, és azt követően a 21. napon, majd kéthetente, ill. a kísérlet befejezésekor a 16. héten (112. nap) végeztük el, amikor az állatok sebészi kasztráción estek át. A vérvétel a *vena cephalica antebrachii*-ből történt a szakma szabályainak megfelelően. A vérmintákat aktivátort-, ill. EDTA-t tartalmazó vérvételi csövekben 10 percen belül a laboratóriumba szállítottuk a hematológiai vizsgálathoz. A szérummintákat a vérvételt követően fél órán belül elvégzett, 1500/perc fordulatszámra történő centrifugálás után a biokémiai paraméterek meghatározásáig hűtve tároltuk. A hematológiai paraméterek közül vizsgáltuk a vörösvérsejteket jellemző hematokrit [PCV], vörösvérsejt-térfogat [MCV], átlagos hemoglobin tartalom [MCH], átlagos hemoglobin koncentráció [MCHC] értékeit, a fehérvérsejtek egyes populációit, valamint a vérlemezkeszámot. A biokémiai paraméterek közül minden állat mintáiból meghatároztuk az alanin amino-transzferáz [ALT], alkalikus foszfatáz [AP], kreatinin, karbamid, karbamid-nitrogén [BUN], triglicerid, totál protein és albumin szinteket, ill. az albumin/globulin arányt. Emellett mértük az ionizált klorid, -kálium, -nátrium, valamint össz-kalcium szinteket.

A spermamintákat egy hetes szoktatási periódust követően, ivarzó szuka jelenléte nélkül, manuális stimuláció útján, frakcionált spermavétel során gyűjtöttük. Meghatároztuk az ejakulátum spermiumban gazdag 2. frakciójának mennyiségét, Bürker-kamra segítségével a spermiumok koncentrációját, a spermiumok számát a teljes ejakulátumban, és fénymikroszkópos vizsgálattal elbíráltuk a minták progresszív motilitását. A spermiumok morfológiai vizsgálatát *Spermac*®-kal (FertiPro N.V., Belgium) festett keneteken végeztük, kenetenként 200 spermium elbírálásával. A spermiumok DNS-töredezettségének meghatározására az ejakulátum spermiumban gazdag frakciójából 200–500 µL-t közvetlenül a mintavételt követően folyékony nitrogénben fagyasztottunk és az SCSA™-vizsgálatig abban tároltunk. Ehhez a spermaminta előkészítése, valamint maga a vizsgálat egy már korábban leírt módszer szerint zajlott (35) EXPO32 ADC XL 4 Color™ szoftver-rel felszerelt Coulter EPICS XL áramlási citométer használatával (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Németország). Az adott spermaminta DNS-töredezettségét a felolvasztás után azonnal mért, és a felolvasztás után 38 °C-on 3 órás inkubációt követően meghatározott DNS-fragmentációs indexszel (% DFI) jellemeztük.

A kísérlet végén eltávolított heréket kórszövetteni vizsgálattal értékelték

A kapott adatokat statisztikai módszerekkel elemezték

Az állatok testtömege nem változott szignifikánsan a vizsgálat ideje alatt

Az implantátum beültetését követően négy állat esetében a 10. napig, egy állatnál pedig a 17. napig volt lehetséges a spermavétel

A herék kórszövetteni vizsgálata minden állatban igazolta a spermatogenezis leállítását

A kasztráció során eltávolított heréket 24 órás 10 % neutrális pufferolt formalinnal, +4 °C-on történő fixálást követően, felmenő alkoholsorban (30, 50, 70%) dehidráltuk, végül paraffinba ágyasztuk. A kórszövetteni értékelést a metszetek hematoxinin-eozin festését követően fénymikroszkóppal végeztük.

A spermaminőség mutatóit (ejakulátum mennyisége, spermiumkoncentráció, összes spermiumszám az ejakulátumban, progresszív motilitás, morfológia, % DFI), valamint az állatok testtömegének változását az idő függvényében általánosított lineáris modell elemzéssel vizsgáltuk, ismételt mérések vizsgálata alapján. A spermaminőség paramétereit a 0. és 10. nap között (0., 3., 7., 10. napon, a progresszív motilitás esetében a 0., 3., 7. napon), míg a testtömeg változását a 0. naptól a vizsgálat végéig (112. nap) elemeztük. Az adatok statisztikai értékelését SPSS 22.0 szoftverrel (SPSS Inc., Chicago, USA) végeztük. Szignifikáns eltérést $p < 0,05$ érték esetében állapítottunk meg.

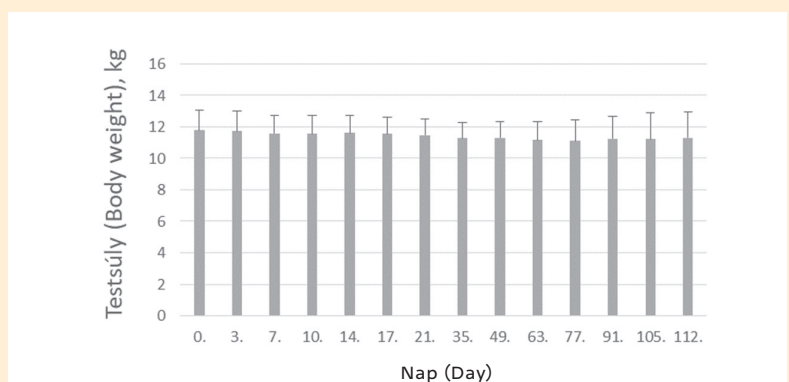
EREDMÉNYEK

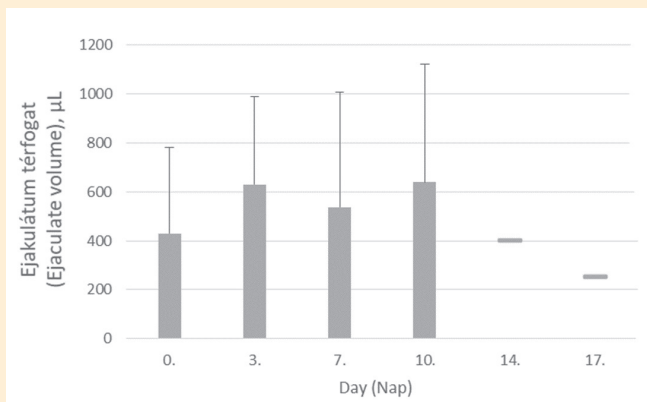
A fizikális vizsgálat, valamint a vérérvizsgálat alapján az állatok egészségesnek bizonyultak a kísérletbe vonástól a vizsgálat végéig. A vérkép, valamint a vér egyes biokémiai paraméterei minden egyednél az élettani tartományban voltak a vizsgálat teljes időtartama alatt. Az implantátum beültetése után egy állatnál sem figyeltünk meg helyi reakciót.

Az állatok testtömege nem változott szignifikánsan ($p = 0,204$) a vizsgálat ideje alatt (1. ábra). Az ötből négy állat esetében kis mértékű ($\pm 3\%$) testtömegváltozást láttunk a vizsgálat végén a 0. napon végzett méréshez képest, míg egy állatnál 14%-os csökkenést mértünk. Az implantátum beültetését követően négy állat esetében a 10. napig, egy állatnál pedig a 17. napig volt lehetséges a spermavétel. A 21. napon már egyik kutya sem adott spermát. A 0., 3., 7. és 10. napi spermamintákban nem volt szignifikáns különbség az ejakulátum térfogatát ($p = 0,590$; 2. ábra), a spermiumok koncentrációját ($p = 0,898$; 3. ábra), az ejakulátumban lévő összes spermium számát ($p = 0,991$; 4. ábra), a progresszív motilitást ($p = 0,779$; 5. ábra) és a normál spermiumalakok %-os arányát (0–7. nap között; $p = 0,213$) illetően. A rendellenes spermiumalakok aránya 10% alatti volt minden állatban, kivéve egy kutyát, ahol a 10. napi utolsó spermamintában a proximális plazmacseppet hordozó alakok aránya 88% volt. Az SCSA™ vizsgálat alapján ($n = 4$) a spermiumok DNS-fragmentációs indexe nem változott szignifikánsan (0. óra, $p = 0,112$; 3. óra, $p = 0,226$; 6. ábra). A % DFI 1,33–4,50% között volt a felolvasztás után azonnal mért, és 1,49–6,66% közé esett a 3 órával később elemzett mintákban. Az deslorelin implantátum behelyezését követő 16. héten eltávolított herék kórszövetteni vizsgálata minden állatban igazolta a spermatogenezis leállítását (7. ábra).

1. ÁBRA. Az állatok ($n = 5$) testtömegének alakulása (átlag- és szórásértékek) a vizsgálat ideje alatt a 4,7 mg-os Suprelorin®-implantátum beültetésétől (0. nap) a sebészi kasztrációig (112. nap)

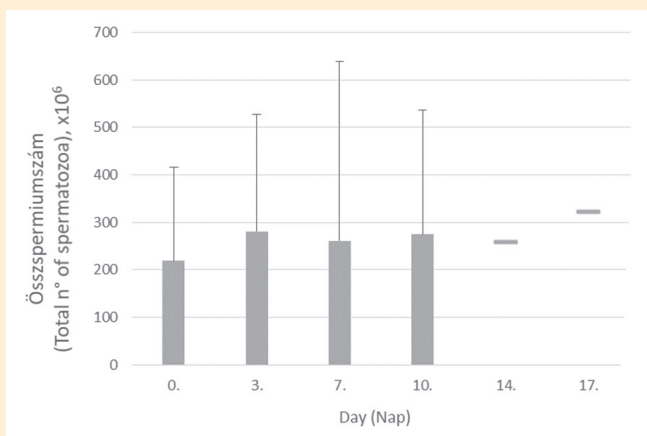
FIGURE 1. Body weight of the animals ($n = 5$) during the study period from the time of 4.7 mg Suprelorin® implant insertion (day 0) until surgical castration (day 112). Data are given as mean and standard deviation





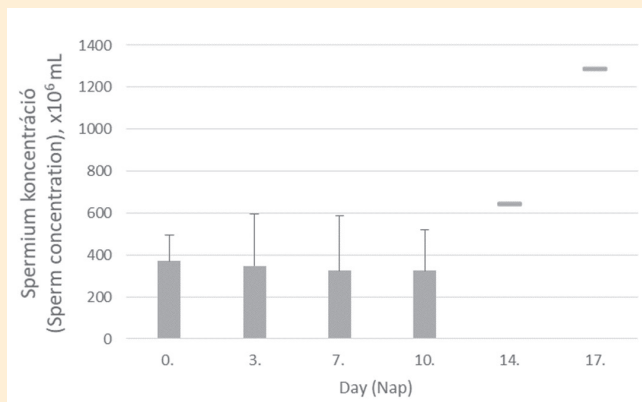
2. ÁBRA. Az ejakulátumtérfogat alakulása (átlag és szórás értékek) a 4,7 mg-os Suprelorin®-implantátum beültetését (0. nap) követően a 10. napig 5 kutyában; a 13. és 17. napi értékek egy egyed mintái. A 21. napon és azt követően már egyik kanttól sem lehetett spermát venni

FIGURE 2. Ejaculate volume from the time of 4.7 mg Suprelorin® implant insertion (day 0) until day 17. Data are given as mean and standard deviation of 5 dogs from day 0 to day 10, and individual data of one dog on day 13 and day 17, which still ejaculated. No ejaculates could be collected from any of the dogs from day 21 onwards



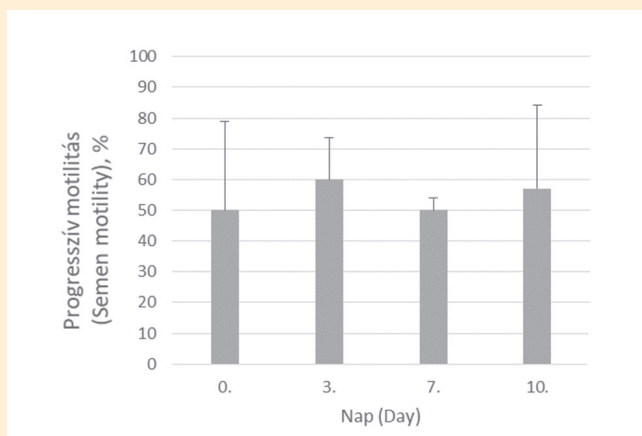
4. ÁBRA. Az ejakulátumban levő összes spermium számának alakulása (átlag és szórás értékek) a 4,7 mg-os Suprelorin®-implantátum beültetését (0. nap) követően a 10. napig 5 kutyában; a 13. és 17. napi értékek egy egyed mintái. A 21. napon és azt követően már egyik kanttól sem lehetett spermát venni

FIGURE 4. Total number of spermatozoa in the ejaculate from the time of 4.7 mg Suprelorin® implant insertion (day 0) until day 17. Data are given as mean and standard deviation of 5 dogs from day 0 to day 10, and individual data of one dog on day 13 and day 17, which still ejaculated. No ejaculates could be collected from any of the dogs from day 21 onwards



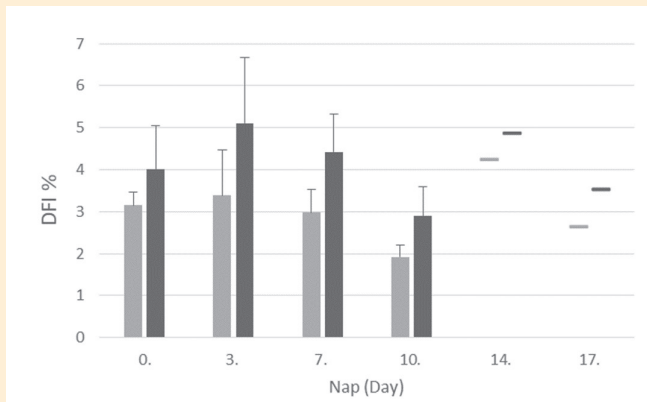
3. ÁBRA. Az ejakulátumban levő spermiumok koncentrációjának változása (átlag és szórás értékek) a 4,7 mg-os Suprelorin®-implantátum beültetését (0. nap) követően a 10. napig 5 kutyában; a 13. és 17. napi értékek egy egyed mintái. A 21. napon és azt követően már egyik kanttól sem lehetett spermát venni

FIGURE 3. Sperm concentration from the time of 4.7 mg Suprelorin® implant insertion (day 0) until day 17. Data are given as mean and standard deviation of 5 dogs from day 0 to day 10, and individual data of one dog on day 13 and day 17, which still ejaculated. No ejaculates could be collected from any of the dogs from day 21 onwards



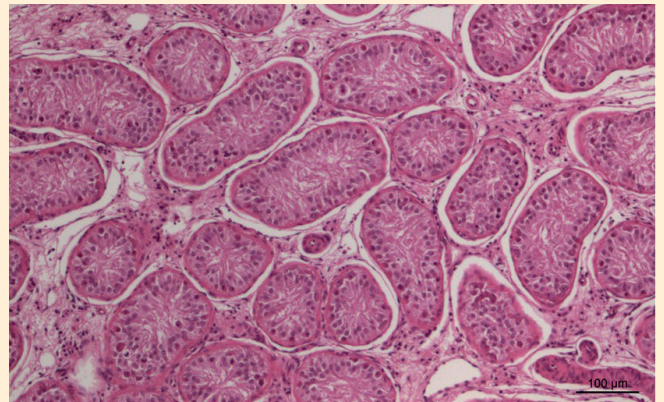
5. ÁBRA. A spermiumok progresszív motilitásának alakulása (átlag és szórás értékek) 4,7 mg-os Suprelorin®-implantátum beültetését (0. nap) követően a 10. napig 5 kutyában. Az egy egyed ejakulátumának mennyisége a 13. és 17. napon nem volt elegendő a motilitás megítéléséhez

FIGURE 5. Progressive motility of spermatozoa from the time of 4.7 mg Suprelorin® implant insertion (day 0) until day 10. Data are given as mean and standard deviation of 5 dogs. Because of insufficient ejaculate volume from the one dog on day 13 and 17, progressive motility was not assessed



6. ÁBRA. A spermaminták felolvasztása után azonnal (0. óra, világosszürke oszlopok), ill. 3 órával később (sötétszürke oszlopok) meghatározott DNS Fragmentációs Index (% DFI) értékek (átlag és szórás) a 4,7 mg-os Suprelorin®-implantátum beültetését (0. nap) követően a 10. napig 4 kutyában; a 13. és 17. napi értékek egy egyed mintái. A 21. napon és azt követően már egyik kanttól sem lehetett spermamintát venni

FIGURE 6. DNA Fragmentation Index (% DFI) evaluated from the time of 4.7 mg Suprelorin® implant insertion (day 0) until day 17. Light grey columns depict % DFI immediately after thawing and dark grey columns show % DFI 3 hours after thawing and incubation at 38 °C. Data are given as mean and standard deviation of 4 dogs from day 0 to day 10, and individual data of one dog on day 13 and day 17, which still ejaculated. No ejaculates could be collected from any of the dogs from day 21 onwards



7. ÁBRA. Hereszövet kórszövettani képe 16 héttel a 4,7 mg-os Suprelorin®-implantátum beültetését követően
A spermatogenezis teljes leállása, valamint a kanyarulat csatornák és a Leydig-sejtek sorvadása figyelhető meg H.-E., 100 ×

FIGURE 7. Histological section of testicular parenchyma (haematoxylin-eosin staining) from a deslorelin-treated dog 16 weeks after 4.7 mg Suprelorin® implant insertion showing spermatogenic arrest and atrophic seminiferous tubules and Leydig cells

MEGVITATÁS

A hosszú hatású GnRH-analógok alkalmazása kan kutyák esetében módot ad egy olyan visszafordítható meddő állapot létrehozására, amely nem jár együtt a gonadotrop hormonok (LH, FSH) szintemelkedésével, sőt azok csökkenése figyelhető meg (2). Deslorelin tartalmú implantátum alkalmazása esetén a beültetést követően annak serkentő hatása érvényesül, így átmenetileg emelkedik a gonadotrop hormonok, és ennek következményeként a tesztoszteron koncentrációja („flare-up” hatás) (12, 13, 27, 31, 33). Deslorelin (0,27–0,4 mg/kg) adagolása után a plazmatesztoszteron 60. percbeli csúcskoncentrációját követően még néhány napig nagyobb hormonszintek mérhetőek (13, 22). Ezt követően a tesztoszteronszint jelentősen csökken, és a beültetést követően a 6–25. nap között már 1 ng/mL alatti értéket mutat (33). POLISCA és mtsai szerint a 11. nap után már mérés határ alatti tesztoszteronkoncentrációk jellemzők (22), míg JUNANDI és WILIAMSON mérései szerint ez a 30. naptól következik be (12, 13). ROMAGNOLI és mtsai (2012) ugyanakkor 6 különböző fajtájú, korú (1,5–8,5 éves) és testsúlyú (7,8–42,6 kg) kan kutya vizsgálatkor a 4,7 mg deslorelin tartalmú implantátum behelyezését követően 3 állat esetében még a 9–17. napos mintákban is emelkedett tesztoszteronszinteket mértek (27). Ugyanezen szerzők megnövekedett ejakulátum-mennyiséget, progresszív motilitást és összpermiumszámot írtak le 6-ból

Számos szerző a deslorelin adagolásának kezdetén tesztoszteron-szint-emelkedést figyelt meg

Az aspermia már az implantátum behelyezése utáni 10. napon jelentkezett ötből négy kutyánál

Az aspermia előtt vett mintákban sem a sperma minősége, sem az ejakulátum mennyisége nem változott

Sem az állatok testtömege, sem a vizsgált anyagcsere- és hematológiai paraméterek nem változtak a kísérlet alatt

4, ill. 3 kutyánál, amit az emelkedő tesztoszteronszinttel magyaráztak (27). Ezzel ellentétben saját vizsgálatunkban nem láttunk szignifikáns különbséget a 0. (implantátum behelyezése) és 10. nap (utolsó ejakulátum 4-ből 5 kutya esetében) közötti spermamintákat illetően sem az ejakulátum mennyiségében, sem a spermiumok koncentrációjában, számában, progresszív motilitásában és morfológiájában. Bár nem mértünk perifériás vérbeli tesztoszteronkoncentrációkat, de egy lehetséges „flare-up” hatás jelenlétét a spermavizsgálaton keresztül nem tudtuk kimutatni. A korábbi közlemények szerint a deslorelin-tartalmazó implantátum beültetését követően 23–85 nap kell a teljes sterilitás kialakulásához, ill. kórszövettani vizsgálatok alapján a kanok 90%-ában a 41. napra a here kanyarulatot csatornáinak sorvadása látható (4, 15, 22, 27, 31). Ezzel szemben az általunk kezelt állatoknál aspermia már az implantátum behelyezése utáni 10. napon jelentkezett ötből négy kutyánál. A 13. és 17. napon már csak egy kutya ejakulált, a 21. napra pedig már egyik állat sem adott spermát. A saját vizsgálatunkban megfigyelt, a klinikai sterilitás kialakulásához szükséges egységesen rövidebb idő valószínűleg azzal magyarázható, hogy hasonló korú és testtömegű, azonos fajtájú (Beagle) állatokkal dolgoztunk, és a deslorelin-implantátum adagja is egy szűk tartományba (0,34–0,45 mg/ttkg) esett. Míg Trigg és mtsai a libidó jelentős (50%) csökkenését a 22. napon, teljes megszűnését pedig a 30–35. napon észlelték (31), a libidó csökkenése és az ejakuláció elmaradása az általunk kezelt állatokban hamarabb következett be, ami részben azzal is magyarázható, hogy kutyáink nem voltak rendszeres spermavételhez szoktatva, valamint a spermavételeket ivarzó szuka jelenléte nélkül végeztük. Míg egyes szerzők csak a spermaminőség, ezen belül is a motilitás és a spermakonzentráció jelentős csökkenését írták le (12), az általunk vett mintákban sem a spermaminőséget jellemző paraméterek, sem az ejakulátum mennyisége nem változott a vizsgálat során. Trigg és mtsai arról számoltak be, hogy hasonló adagú deslorelin-kezelés után csökkenő ejakulátummennyiség mellett a 35. napra már 70%-ra, azaz tízszeresére nőtt a rendellenes spermiumalakok aránya (31). Morfológiai eltérésként a másodlagos elváltozások, ezek közül is distalis citoplazmacseppek voltak jellemzőek, ill. kisebb arányban megjelentek a farkrendellenességek is (12). Más szerzők szerint a morfológiai eltérések gyakorisága nem változik a kezelés hatására (27). Jelentős morfológiai eltéréseket mi sem tudtunk kimutatni, és csak egy állatban láttuk a proximális plazmacseppek jelentős arányú (88%) megjelenését az utolsó, 10. napi mintában. A többi spermaminőséget jellemző paraméterhez hasonlóan a deslorelin-implantátummal történő kezelés nem befolyásolta a spermiumok DNS-fragmentációjának mértékét. A spermaminőségre gyakorolt hatás mellett vizsgálatunk része volt a kémiai kasztráció által előidézett esetleges metabolikus változások megjelenésének nyomonkövetése, különös tekintettel az elhízásra való hajlamra. Más típusú GnRH-analóggal (azagly-nafarelin) végzett kezelés során, hasonlóan a sebészi kasztrációhoz, fokozott étvágy jelentkezett az állatoknál amint a tesztoszteron-koncentrációk 0 ng/mL közeli tartományba estek (6). Az általunk vizsgált állatok testtömege nem változott jelentős mértékben a vizsgálat ideje alatt, valamint a biokémiai, beleértve a glükóz- és trigliceridszinteket, és a hematológiai paraméterek is a referenciatartományon belül maradtak. Ötből négy állat esetében $\pm 3\%$, míg egy állat esetében -14% -os testtömegváltozást rögzítettünk. A több hónapja összeszokott állatok esetében az egy egyed nagyobb mértékű fogyásának hátterében állhatott a többi, dominánsabb egyed éhségérzetének fokozódása, ami a csoportos tartás és behatárolt mértékű táplálékadagolás mellett nem jelentkezhetett az említett 3% -os testsúlyváltozásnál nagyobb mértékben.

Összességében elmondható, hogy az általunk vizsgált, egészséges, hasonló korú és testtömegű, azonos fajtájú kan kutyák esetében a 4,7 mg-os deslorelin-implantátum spermaminőségre kifejtett feltételezett „flare-up” hatá-

sát nem tudtuk igazolni. A klinikai sterilitás, vagyis az ejakuláció elmaradása, a szakirodalomban közölt adatokhoz képest rövidebb időn belül, négy állatnál az implantátum beültetését követő 10. nap, egy állatnál pedig a 17. nap után következett be. Az aspermia bekövetkeztéig a várt folyamatos spermaminőség-romlás helyett sem a hímivarsejtek DNS-fragmentációs indexe, sem az ejakulátum mennyisége, a spermiumok koncentrációja, az összes spermiumszám, a spermiumok progresszív motilitása és alakja sem változott jelentősen, vagyis ezen időszakban az állatok még termékenynek tekinthetők. Változatlan táplálékgazdálkodás mellett a 4,7 mg-os deslorelin-implantátum nem befolyásolta az állatok testtömegét, valamint a szérum egyes biokémiai értékeinek, köztük a glükóznak és a triglicerideknek a koncentrációját.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki az ATRC Aurigon Kft. Klinikopatológiai laboratóriumában dolgozó munkatársainak a laboratóriumi vizsgálatok elvégzéséért, valamint a vizsgálóhely vezetőségének és állatgondozóinak, akik lehetővé tették és segítették a vizsgálat megvalósítását. Köszönjük továbbá MATHIAS SIUDA és SARUN KEO munkáját, akik az SCSA™ analízisben segítettek. A vizsgálat részben a Kutatókár KK-UK (új kutatási téma) pályázati finanszírozásból valósulhatott meg.

IRODALOM

1. DE GIER, J. – BUIJTELS, J. J. et al.: Effects of gonadotropin releasing hormone administration on the pituitary-gonadal axis in male and female dogs before and after gonadectomy. *Theriogenology*, 2012. 77. 967–978.
2. DE GIER, J.: Reproductive endocrinology of the dog: effects of medical and surgical intervention, *Utrecht University Repository (Dissertation)* 2011. 91–110. (DE GIER, J. – OKKENS, A. C. et al.: The pituitary-testicular axis in dogs before and after surgical castration or chemical castration with the GnRH agonist deslorelin)
3. EDNEY, A. T. B. – SMITH, P. M.: Study of Obesity in Dogs Visiting Veterinary Practices in the United-Kingdom. *Vet. Rec.*, 1986. 118. 391–396.
4. EMA, 2010: SCIENTIFIC DISCUSSION; Suprelorin 4.7 mg implant for dogs http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/veterinary/000109/WC500068832.pdf
5. FONTAINE, E. – FONTBONNE, A.: Clinical use of GnRH agonists in canine and feline species. *Reprod. Dom. Anim.*, 2011. 46. 344–353.
6. GOERICKE-PESCH, S. – WILHELM, E. et al.: Evaluation of the clinical efficacy of Gonazon implants in the treatment of reproductive pathologies, behavioral problems, and suppression of reproductive function in the male dog. *Theriogenology*, 2010. 73. 920–926.
7. HEBER, D. – DOBSON, R. et al.: Pituitary receptor site blockade by a gonadotropin-releasing antagonist in vivo: mechanism of action. *Science*, 1982. 216. 420–421.
8. HOUP, K. A. – COREN, B. et al.: Hilderbrant JE. Effects of sex and reproductive status on sucrose preference, food intake, and body weight of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1979. 174. 1083–1085.
9. HOUP, K. A.: Feeding and drinking behavior problems. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 1991. 21. 281–298.
10. JEUNETTE, I. – DAMINET, S. et al.: Effect of ovariectomy and ad libitum feeding on body composition, thyroid status, ghrelin and leptin plasma concentrations in female dogs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 2006. 90. 12–18.
11. JEUNETTE, I. – DETILLEUX, J. et al.: Ad libitum feeding following ovariectomy in female Beagle dogs: effect on maintenance energy requirement and on blood metabolites. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 2004. 88. 117–121.
12. JUNAIDI, A. – WILLIAMSON, P. E. et al.: Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2003. 15. 317–322.
13. JUNAIDI, A. – WILLIAMSON, P. E. et al.: Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2007. 19. 891–898.
14. JUNAIDI, A. – WILLIAMSON, P. E. et al.: Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. *Reprod. Domest. Anim.*, 2009. 44. 725–734.
15. JUNAIDI, A. – WILLIAMSON, P. E. et al.: Morphological study of the effects of the GnRH superagonist deslorelin on the canine testis and prostate gland. *Reprod. Domest. Anim.*, 2009. 44. 757–763.
16. KUSTRITZ, M. V. R.: Effects of surgical sterilization on canine and feline health and on society. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012. 47. 214–222.
17. LUDWIG, C. – DESMOULINS, P. O. et al.: Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist azagly-nafarelin as a removable implant “Gonazon”; a preclinical trial. *Theriogenology*, 2009. 71. 1037–1045.
18. LUND, E. M. – AMSTRONG, P. J. et al.: Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 2006. 4. 177–186.
19. MAARCHALKERWEERD, R. J. – ENDENBURG, N. et al.: Influence of orchietomy on canine behavior. *Vet. Rec.*, 1997. 140. 617–619.
20. MARTIN, L. J. – SILIART, B. et al.: Hormonal disturbances associated with obesity in dogs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, 2006. 90. 355–360.

21. MCGREEVY, P. D. – THOMSON, P. C. et al.: Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. *Vet. Rec.*, 2005. 156. 695–702.
22. POLISCA, A. – ORLANDI, R. et al.: Clinical efficacy of the GnRH agonist (deslorelin) in dogs affected by benign prostatic hyperplasia and evaluation of prostatic blood flow by Doppler ultrasound. *Reprod. Domest. Anim.*, 2013. 48. 673–680.
23. POST, K.: Effects of Human Chorionic Gonadotrophin and Castration on Plasma Gonadal Steroid Hormones of the Dog. *Can. Vet. J.*, 1982. 23. 98–101.
24. Reichler, I. M. – PFEIFFER, E. et al.: Changes in plasma gonadotropin concentrations and urethral closure pressure in the bitch during the 12 months following ovariectomy. *Theriogenology*, 2004. 62. 1391–1402.
25. Reichler, I. M.: Gonadectomy in cats and dogs: a review of risks and benefits. *Reprod. Domest. Anim.*, 2009. 44. (Suppl 2). 29–35.
26. RENAULD, A. – SVERDLIK R. C. et al.: Metabolic and Histological Pancreatic Changes Induced by Orchidectomy in Dogs. *Horm. Metab. Res.*, 1980. 12. 370–376.
27. ROMAGNOLI, S. – SIMINICA, A. et al.: Semen quality and onset of sterility following administration of a 4.7-mg deslorelin implant in adult male dogs. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012. 47. (Suppl 6). 389–392.
28. SCHAUF, S. – SALAS-MANI, A. et al.: Effect of sterilization and of dietary fat and carbohydrate content on food intake, activity level, and blood satiety-related hormones in female dogs. *J. Anim. Sci.*, 2016. 94. 4239–4250.
29. SMITH, M. R. – LEE, H. – NATHAN, D. M.: Insulin sensitivity during combined androgen blockade for prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006. 91. 1305–1308.
30. SMITH, M. R. – LEE, H. et al.: Metabolic changes during gonadotropin-releasing hormone agonist therapy for prostate cancer: differences from the classic metabolic syndrome. *Cancer*, 2008. 112. 2188–2194.
31. TRIGG, T. E. – DOYLE, A. G. et al.: A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, 2006. 66. 1507–1512.
32. TRIGG, T. E. – WRIGHT, P. J. et al.: Long-term reversible desexing of male dogs and oestrus postponement of bitches, using a GnRH analogue implant. *Proc. Adv. Dog Cat Exotic Carniv. Reprod. Oslo*, 2000. 21.
33. TRIGG, T. E. – WRIGHT, P. J. et al.: Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J. Reprod. Fertil.*, 2001. 57. (Suppl.). 255–261.
34. VICKERY, B. H.: Comparisons the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control. *J. Steroid Biochem.*, 1985. 23. 779–791.
35. WACH-GYGAX, L. – BURGER, D. et al.: Seasonal changes of DNA fragmentation and quality of raw and cold-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 2017. 99. 98–104.

Közlésre érkező: 2017. nov. 27.