

Utvärdering av GnRH-stimulering som en metod att avgöra om en honkatt med okänd historik är kastrerad

Therése Gustavsson

**Handledare: Eva Axné
Inst. för Kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Bodil Ström-Holst
Inst. för Kliniska vetenskaper**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	3
ABSTRACT	3
INLEDNING	5
LITTERATURÖVERSIKT	7
GNRH.....	7
ÖSTRALCYKEL.....	8
<i>Östralcykelns indelning</i>	8
VAGINALCYTOLOGI	9
OVARIAN REMNANT SYNDROME	10
<i>Allmänt</i>	10
<i>Diagnostik</i>	10
STUDIER UTFÖRDA PÅ HUND.....	11
EXPERIMENTELL DEL	12
MATERIAL OCH METODER.....	12
<i>Djurunderlag</i>	12
<i>Försökets utförande</i>	12
<i>Plasmaanalyser</i>	13
RESULTAT.....	14
<i>Östradiol</i>	14
<i>Progesteron</i>	15
<i>Vaginalcytologi samt undersökning av ovarier</i>	16
<i>Östradiolvärden hos de katter som selekterades bort</i>	16
DISKUSSION	17
TACK	19
LITTERATURFÖRTECKNING	20

SAMMANFATTNING

Denna pilotstudie har gjorts för att utvärdera om det finns en signifikant skillnad mellan icke sexuellt aktiva intakta och kastrerade honkatter vad gäller bildandet av östradiol efter en exogen *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) stimulering. Syftet är att hitta ett verktyg som kan hjälpa till att diagnostisera om en hittekatt redan är kastrerad. Det finns även andra situationer där detta verktyg kan vara användbart. Ett exempel på en annan situation är när det finns en misstanke om kvarbliven ovarievävnad. Många liknande studier har utförts på tikar där GnRH-stimulering visat sig vara ett utmärkt verktyg för att säkerställa om hon är kastrerad eller ej.

Elva kastrerade samt elva intakta honkatter har ingått i denna studie där östradiol samt progesteron-koncentrationer i plasma analyserats före och 120 minuter efter en intramuskulär injektion av GnRH-analogen buserelin (Receptal®). Resultaten visade att intakta och kastrerade honkatter svarar olika på GnRH-stimulering. Endast de intakta svarade med en ökning av östradiol i blodet efter GnRH-stimulering. Östradiolvärdena överlappade mellan grupperna före, men inte efter stimulering. Denna studie visar att det är fullt möjligt att via blodprov avgöra om en honkatt har funktionella ovarier. Det räcker dock inte med att enbart analysera östradiol utan det behövs en stimulering av ovarierna för att signifikanta skillnader ska framträda. Denna studie visade även att det inte är användbart att analysera progesteron i samband med GnRH-stimulering för att skilja mellan kastrerade och intakta honkatter, då alla utom en av de 22 honkatterna låg under basala progesteronkoncentrationer både före och efter stimulering.

ABSTRACT

This study has been made to evaluate if there is a significant difference between non-estral intact versus ovariohysterectomized queens in their production of estradiol after exogenous gonadotrophin-releasing hormone stimulation. The purpose is to find a tool, which can help to diagnose if a free-roaming queen is already ovariohysterectomized or not. There are also other situations where this tool could be useful, for example to diagnose the ovarian remnant syndrome. Previous studies in bitches have shown that GnRH-stimulation is an excellent tool to diagnose the presence of ovaries in the bitch.

Eleven ovariohysterectomized and eleven intact queens have been included in this study where we have analyzed plasma estradiol and progesterone concentrations before and after a single intramuscular injection of the GnRH agonist buserelin (Receptal®). The results showed that there is a difference in the response to GnRH stimulation between intact and ovariohysterectomized queens. Only the intact queens responded with an increase in estradiol concentration after the GnRH stimulation. The estradiol concentration ranges of the two groups overlapped before but not after stimulation. This study demonstrates that it is possible to determine if a queen has functional ovaries by a blood test but that a previous stimulation of the ovaries is necessary to get a reliable result. This study also showed that progesterone is not useful to differentiate between ovariohysterectomized and intact queens as all except one of the 22 queens had basal progesterone concentrations before and after stimulation

INLEDNING

Allt fler organisationer som tar hand om hittekatter startar upp i Sverige. De flesta av dessa har som mål att alla katter ska vara kastrerade före försäljning. Därmed kan de vittna om problemet med att kunna säkerställa en honkatts sexuella status. Det är mycket svårt att skilja mellan en katt som är anöstral och en som är kastrerad (Feldman 2004). En anöstral honkatt beter sig likadant som en kastrerad. Dessutom finns det ett problem med att vissa katter brunstar tyst. Deras löpningssymtom uppfattas inte av ägaren, vilket gör att de kan uppfattas som kastrerade. I dagsläget har man endast det eventuella bukärret att tillgå för att kunna se om honkatten är kastrerad. Detta är ett mycket osäkert tecken då hon kan ha öppnats av andra anledningar än kastration. Hon kan även vara kastrerad utan att något bukärre hittas. På senare år har många nya suturmaterial som ger mycket lindrig vävnadsirritation kommit ut på marknaden. Detta tillsammans med en skicklig kirurg som endast behöver ett par cm stort buksnitt för att utföra en kastration, gör att bukärret kan bli nästintill omöjligt att upptäcka. En del praktiserande veterinärer i Sverige föredrar också att kastrera via flanksnitt där man antingen avlägsnar ovarier eller steriliserar genom att obstruera uterotubal junctions eller cornua uterina (Feldman 2004). Denna metod är dock vanligare utomlands. I och med ovanstående problematik får ett stort antal honkatter årligen genomgå en ”onödig” buköppning. En retrospektiv studie av journaler från 85 hittekatter som inkommit till, och kastrerats via Fiahemmet i Norrköping under 2006 visade att 5% av dessa öppnades i onödan. Detta är kostsamt och varje kirurgiskt ingrepp innebär en ökad risk för djurets hälsa och välbefinnande.

I Sverige är dock inte problemet så enormt som i övriga världen. För att ge ett perspektiv kan det nämnas att antalet hemlösa katter i USA antogs ligga runt 73 miljoner år 2000 (Levy JK et al. 2003). 170 000 hemlösa katter kastrerades mellan 1999-2000, bara i en organisation som betalades av ”Maddies fond” i USA. Runt om i världen har försök med TNR ”trap-neuter-return” gjorts för att minska antalet fridrivande katter. Under mycket kontrollerade former har det visat sig vara effektivt. Denna metod går ut på att alla lösgående katter samlas in, kastreras, och sedan släpps tillbaka på det ställe där de fångades in. Runt 5% är redan kastrerade vid infångandet. För att förhindra att katter buköppnas i onödan har de även i vissa av dessa områden lagt in i sin rutin att klippa av eller göra en skåra i ena öröntippen i samband med kastration. (Levy JK et al. 2003)

Denna studie syftar till att utvärdera om man får en signifikant skillnad mellan kastrerade och intakta honkatter gällandes östradiolproduktion efter stimulering med *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH). Det förväntade resultatet är att endast de intakta honkatterna, där det finns funktionell ovarievävnad närvarande, svarar på injektionen med ökade östradiolkoncentrationer i blodet. Flera liknande studier har gjorts på hundar i andra länder, där det visat sig vara ett utmärkt verktyg för att säkerställa om en tik med okänd bakgrund är kastrerad eller ej (Jeffcoate 1993, Beijerink et al 2007, Buijtels et al 2006). I Sverige har vi inte problem med herrelösa hundar utan det växande problemet är hemlösa katter, och hittills har ingen studie av denna karaktär utförts på katt.

En annan situation där det skulle vara användbart att mäta östradiolkoncentrationerna efter stimulering med GnRH är vid misstanke om kvarlämnad funktionell ovarievävnad efter kastration, så kallat *ovarian remnant*

syndrome (ORS). En vedertagen metod som används idag för att diagnostisera ORS bygger på GnRH-stimulering. Den måste utföras under misstänkt östrus. Under östrus stimuleras de mogna folliklar till ovulation med hjälp av GnRH-stimulering. Två till tre veckor senare kan eventuellt förhöjda progesteronvärden ses (Wallace 1991). Denna metod innebär att man måste veta när katten är i östrus, vilket kan vara svårt. Flera veterinärbesök krävs samt att det tar flera veckor innan svar. Med den undersökta metoden skulle diagnostiken av ORS underlättas. Man behöver inte pricka in östrus och undersökningen kan utföras under en dag.

I dagsläget finns inte heller några studier gjorda på hur högt i östradiol en anöstral honkatt kan nå efter en GnRH injektion, vilket denna studie även ämnar svara på.

LITTERATURÖVERSIKT

GnRH

Gonadotropin releasing hormone är ett endogent hormon uppbyggt av tio aminosyror. Det produceras i hypothalamus. Därifrån transporteras det via ett portalt vensystem ner till främre loben av hypofysen där det stimulerar till frisättning av LH (*luteinizing hormone*) samt FSH (*follicle stimulating hormone*). GnRH har en halveringstid på två till fyra minuter vilket gör att det bryts ner mycket snabbt i blodet. GnRH-frisättningen från hypothalamus sker i huvudsak på två sätt. Det första är en basal sekretion som är lindrigt pulsativ, men regelbunden, och som förekommer hos båda könen. Det andra är när östradiolet hos ett hondjur i brunst når ett visst tröskelvärde. Då frisläpps en stor mängd GnRH på en gång (positiv feedback). Denna frisläppning skapar i sin tur LH-toppen som gör att mogna folliklar ovulerar. Hos en honkatt räcker inte de ökade östradiolkoncentrationerna under löpningen för att ovulation ska ske utan det krävs att katten paras. Parningen ger signaler från könsvägarna som stimulerar neuronerna i hypothalamus till GnRH-frisättning. LH nivåerna blir då så höga att ovulation kan ske. Frisättningen av GnRH regleras av flera olika faktorer. De GnRH-producerande neuronerna i hypothalamus påverkas i slutet av brunstcykeln genom positiv feedback av de stigande östradiolkoncentrationerna i blodet. Även yttre påverkan från miljön, som tid på året, sociala faktorer samt signaler från mekanoreceptorer i hud och könsvägar stimulerar dessa neuron till produktion av GnRH. Östradiolet har även tidigt i brunstcykeln en negativ feedback på både hypothalamus- och hypofysnivå. Progesteron utgör däremot bara en negativ feedback på GnRH-utsöndringen i hypothalamus. Vilka vägar som har den mest betydande reglerande funktionen varierar mellan olika djurslag. (Sjaastad et al 2003, Cunningham & Klein 2007)

GnRH frisätter enligt ovan två hormoner från hypofysen. Dessa båda hormoner skiljer sig åt funktionsmässigt. FSH gör att folliklarna växer till medan LH gör att folliklarna mognar ytterligare och ovulerar. Vilket som är mest aktivt varierar under brunstcykeln. För att rätt hormon ska utsöndras vid rätt tidpunkt krävs det en reglerande faktor. I granulosa-cellerna i de växande folliklarna produceras, i stigande mängd, hormonet inhibin, vilket motverkar utsöndringen av FSH från hypofysen. (Sjaastad et al 2003, Cunningham & Klein 2007).

Vid kastration rubbas den normala hormonbalansen då ovarierna avlägsnas. Framförallt är det den negativa feedback som östradiolet har på hypothalamus som spelar roll. När den försvinner, finns det inget som hämmar GnRH-frisättningen varpå de, som är kastrerade, går med en mycket högre koncentration av både LH samt FSH (Cunningham & Klein 2007, Beijerink et al 2007)

I dagsläget används GnRH i vissa länder till att inducera ovulation hos honkatter som man inte vill ska löpa så ofta (Gilbert 1987). De blir efter denna behandlig pseudodräktiga. Man vet att LH-koncentrationerna är dosberoende av GnRH. I ett försök ovulerade en av fyra, två av fyra samt fyra av fyra honkatter som fått 5, 10 respektive 25 µg GnRH (gonadorelin) intramuskulärt när de befann sig i östrus (Chakraborty 1979). I detta försök såg man även att LH-svaret låg betydligt lägre hos anöstrala honkatter.

I studien utförd i detta arbete ges GnRH när det inte förväntas finnas några mogna folliklar som kan ovulera. Vi kan då anta att det GnRH som vi ger stimulerar till en FSH stegring som i sin tur aktiverar små folliklar som sen går i atresi, till östradiolproduktion. Den östradiolproduktionen kan fångas upp med hjälp av blodprov.

Östralcykel

Honkatten är säsongsmässigt polyöstral. De börjar sin cykel en till två månader efter vintersolståndet, i de tempererade zonerna, och cyklar därefter normalt sett kontinuerligt fram till en till två månader före vintersolståndet (Feldman 2004). Östralcykeln är vanligen c:a 20 dagar lång, men kan variera mellan allt från sju till 42 dagar (Christiansen 1999). Honkatten har inducerad ovulation (Stabenfeldt & Pedersen 1991), vilket gör att hennes cyklade, och cykelns indelning, skiljer sig en del från andra vanligt förekommande domesticerade djur som till exempel hund. Den största skillnaden ligger i att om inte honkatten bli parad i östrus, sker vanligen heller ingen ovulation med efterföljande golkroppsbildning, och därmed ingen progesteronproduktion.

Östralcykelns indelning

hos katt samt dess viktigaste hormonvariationer (Johnston et al 2001):

Proöstrus: c:a en dag. Upptäcks bara hos c:a 18%. Honkatten visar östrusbeteenden, men tillåter inte parning. Östradiolkoncentrationerna i serum börjar snabbt stiga som en följd av växande folliklar. Östradiol når under denna period värden på > 70 pmol/l (Feldman 2004).

Östrus: normalt c:a sju dagar (tre till 16 dagar) (Feldman 2004). Honkatten tillåter parning och visar kraftiga brunstbeteenden. Folliklarna växer till ytterligare. För att dessa ska ovulera krävs det att katten paras. Via nervimpulser från vagina stimuleras hypothalamus till GnRH-frisättning som i sin tur stimulerar hypofysen till LH-frisättning. Det krävs ofta flera parningar för att LH-frisättningen ska bli så hög att ovulation sker. Man vet att det inte bara är mängden LH i blodet som är avgörande för att ovulation ska ske, utan även durationen då LH-koncentrationerna ligger över de basala (Chakraborty 1979). Ovulation sker vanligtvis 24 till 36 timmar efter upprepade parningar (Gilbert 1987). Den maximala östradiolkoncentrationen ligger vanligtvis runt 180 pmol/l, men kan variera från 90-290 pmol/l (Feldman 2004). En honkatt som cyklar, men som inte ges tillfälle att para, har normalt sett ingen ökning av progesteronkoncentrationerna. Östradiol stiger en till två dagar före östrus, ligger högt under hela follikelfasen på tre till 18 dagar och sjunker sedan drastiskt tre dagar efter den maximala toppen. (Shille et al. 1979).

Interöstrus (postöstrus): tiden mellan två follikelvågor om ingen ovulation har skett. Normalt åtta till tio dagar. Ingen sexuell aktivitet ses. Östradiolkoncentrationer på < 70 pmol/l (Feldman 2004). Utan parning stannar LH samt progesteron på basala koncentrationer (Gilbert 1987)

Diöstrus (pseudodräktighet/dräktighet): perioden efter ovulation då honkatten är i lutealfas. Varar c:a 40 dagar hos den pseudodräktiga, men 60 dagar hos den dräktiga katten. Progesteronkoncentrationerna ligger mellan 16 och 80 nmol/l med

två toppar runt dag elva samt dag 21 (Gilbert 1987), varav den senare toppen brukar vara något mindre hos den pseudodräktiga. Den höga LH-toppen avtar redan efter två dagar. Under resten av diöstrus ligger LH på basala koncentrationer. Östradiol ligger också på basala koncentrationer. Dock stiger det något veckan före förlossning (Gilbert 1987).

Anöstrus: Perioden då ingen cyklisk aktivitet förekommer. Infaller vanligtvis under de mörka månaderna mellan oktober till januari i de nordligare breddgraderna. Östradiol samt progesteronkoncentrationer är basala, normalt < 55 pmol/l respektive < 5 nmol/l (Feldman 2004).

Laktation: Tiden då honkatten ger di till sina kattungar. Östradiol ligger lågt under laktationen, men stiger efter avvänjning varpå honkatten börjar att brunsta. Det tar i genomsnitt fyra veckor efter avvänjningen innan honkatten börjar brunsta normalt igen (Feldman 2004). Progesteron ligger kvar på en konstant koncentration runt 3 nmol/l. Två veckor efter avvänjning, när prolaktinkoncentrationerna åter har sjunkit till sina basala koncentrationer, så stiger de basala LH-koncentrationerna (Gilbert 1987).

Många honkatter kan även ha så kallat tyst östrus, vilket innebär att honkatten cyklar hormonellt utan att visa några beteendeförändringar. Detta är relativt vanligt under de varma sommarmånaderna (Herron 1986). Honkatten kan då uppfattas som kastrerad. För att veta när en honkatt som brunstar tyst är i brunst krävs återkommande vaginalcytologiprover samt östradiolanalyser.

Vaginalcytologi

Med hjälp av vaginalcytologi går det på ett billigt, enkelt och ett förhållandevis säkert sätt att avgöra om en honkatt befinner sig under östradiolpåverkan, det vill säga har follikulär aktivitet (Feldman 2004, Stabenfeldt & Pedersen 1991). Östradiolets effekt på vaginalepitelet medför att flera lager med förhornade epitelceller bildas. Detta gör att det morfologiska utseendet på de avstötta epitelcellerna ändras (Johnston et al 2001). Under anöstrus utgörs provet av 50-100% intermediärceller samt mycket debris. Övriga celler är parabasalceller, men det kan även förekomma enstaka superficialceller med eller utan kärna (Johnston et al 2001). När folliklar börjar växa till och katten träder in i östrus förändras utseendet på vaginalcytologin mycket snabbt. Det tar tre dagar från det att östradiolet börjat stiga tills det framträder ett typiskt utseende på vaginalcytologin för att vara i östrus (Ström Holst et al 2000). Mycket mindre debris, c:a 40-60% av cellerna (80% enl. Ström Holst et al 2000) utgörs då av superficialceller med eller utan kärna och mindre än 10% är parabasalceller. Det är sällan det förekommer erythrocyter eller leukocyter i vaginalutstryk från katt (Johnston et al 2001). Till skillnad från hund så är vaginalepitelet hos katt maximalt förhornat redan i samband med östradioltoppen och håller sig sedan relativt konstant under hela östrus (Johnston et al 2001). Viss skillnad föreligger mellan de olika stadierna i östrus, men det kan med säkerhet bara avgöras om en katt är i östrus eller inte östrus (Ström Holst et al 2000, Stabenfeldt & Pedersen 1991). Cytologiutstryket kan färgas med de flesta vanligt förekommande infärgningsmetoderna, men den som flera författare rekommenderar är *Diff-Quik* färgning (Johnston et al 2001).

Ovarian remnant syndrome

Allmänt

Ovarian remnant syndrome är inget patologiskt tillstånd utan en komplikation till kastration (Wallace 1991). Oftast är anledningen att all funktionell ovarievävnad ej avlägsnats vid kastration, men det finns även enstaka honkatter med funktionell ektopisk ovarievävnad. Det räcker med att en liten bit av ovarievävnaden blir kvar i katten. Den växer till och blir hormonproducerande igen. Honkatten cyklar och visar full brunst. Hon tillåter ofta parning, men kan ej bli dräktig. Ofta kan det dröja över ett år efter kastrationen innan brunstcykeln återkommer (Wallace 1991). ORS är vanligare på katt än hund. Försök har gjorts där det har sytts fast delar av en ovarie i kröset i samband med kastration på katter. Några månader senare öppnades katterna igen och vävnaden hade då vuxit och visade tecken på aktivitet hos 88.9% av djuren (DeNardo et al 2001). Den studien visar att det även räcker med att tappa en bit ovarievävnad i buken för att *ovarian remnant syndrome* ska utvecklas.

Diagnostik

Det finns idag fyra diagnostiska metoder för att upptäcka funktionell ovarievävnad (Wallace 1991).

- (1) Vaginalcytologi när katten visar brunst.
- (2) Östradiolanalys under brunst. Östradiolkoncentrationer över 73 pmol/l visar på follikulär aktivitet. Detta prov måste tas tidigt i brunsten. I en studie utförd av Wallace (1991) visade det sig att östradiolkoncentrationerna sjunker snabbt och katten kan visa brunst flera dagar efter att östradiolkoncentrationerna är tillbaka till de ursprungliga. I samma studie mättes östradiol under brunst hos sju honkatter som diagnostiserats med ORS. Fyra, av dessa sju, hade då värden under 73 pmol/l. Även i en annan svensk studie visade det sig att östradiolkoncentrationerna varierar från basala värden till > 180 pmol/l vid första dagen de visar brunst (Chatdarong 2006b). Detta talar för att det ej är tillräckligt att enbart mäta östradiol för att diagnosticera ORS. Det är lätt att få ett prov som talar för att det ej finns någon ovarievävnad även om så är fallet. I kombination med vaginalcytologi kan dock analys av östradiol vara en bra metod. Då katten har inducerad ovulation och därmed inte med säkerhet bildar en gulkropp är det, till skillnad från hund, ej värdefullt att mäta progesteronkoncentrationer några veckor efter brunst (Wallace 1991).
- (3) Mäta progesteronkoncentrationer, två till tre veckor efter exogen stimulering med GnRH eller hCG. Stimuleringen görs när katten är i brunst. Då finns mogna folliklar som kan ovulera. Progesteronkoncentrationer på > 6,4 nmol/l talar för att det finns funktionell ovarievävnad närvarande (Wallace 1991). En studie gjord på tio katter med *ovarian remnant syndrome* visade att alla katter fick en signifikant progesteronökning sju dagar efter en enstaka hCG injektion intramuskulärt, en till tre dagar efter brunstens början (England 1997). Det har dock visat sig att ett stresspåslag kan ge betydande progesteronfrisättning från binjurarna. I en studie gjord av Chatdarong et al (2006) analyserades progesteron på fem kastrerade honkatter efter en intravenös injektion av 0,125 mg ACTH. Fyra av fem låg någon gång under de efterföljande tre timmarna på progesteronvärden mellan 4-7 nmol/l. Den femte låg även innan ACTH injektion på 9,4 nmol/l, men steg ytterligare till 16,3 nmol/l efter ACTH.
- (4) Det sista alternativet är att göra en laparotomi och ta en biopsi samt eliminera

misstänkt vävnad. Om då katten slutar att cykla talar det för att all vävnad nu är borta. Detta är enklast att utföra under brunst då ovarierna är aktiva och därmed enklare att upptäcka, men blödningsrisken är då också betydligt större (Wallace 1991).

Studier utförda på hund.

De flesta studier som gjorts på GnRH är utförda på hund. 1993 gjordes en liknande studie som den utförd i detta arbete. I den studien ingick 28 beaglar av varierande sexuell status (Jeffcoate 1993). Blodprov togs före och 60 minuter efter stimulering med GnRH. Samtliga tikar fick en standard dos på 0,16 µg busserelin intravenöst. Blodproverna analyserades sedan med avseende på östradiol, progesteron samt LH. Det enda värde som med säkerhet kunde identifiera om tiken var kastrerad eller ej var östradiolkoncentrationerna. Ingen överlappning förekom på östradiolkoncentrationerna i plasman mellan intakta och kastrerade tikar 60 minuter efter stimulering, förutom på en tik, som inte steg över den maximala östradiolkoncentrationen hos de kastrerade. Ingen av de kastrerade svarade med en höjning av östradiolkoncentrationerna medan alla de intakta steg, men i varierad grad beroende på var i östralcykeln de befann sig. Progesteronkoncentrationerna steg endast på ett fåtal individer, oavsett sexuell status, och värdena överlappade både före och efter stimulering mellan kastrerade och intakta. Ingen hund kom heller upp i de progesteronkoncentrationer som med säkerhet talar för att det finns funktionell ovarievävnad, det vill säga > 6,4 nmol/l (Wallace 1991).

LH däremot skiljer sig en hel del mellan intakta och kastrerade. I och med kastrationen förlorar tiken den negativa feedbacken på hypothalamus varpå LH- samt FSH-koncentrationerna kan stiga obehindrat (Beijerink et al 2007). LH-koncentrationerna hos de kastrerade tikarna i Jeffcoates studie (1993) låg generellt markant över de intakta både före och efter stimulering, men viss överlappning förekom. LH bör därför ej analyseras enskilt utan mer användas för att konfirmera resultaten av en östradiolanalys (Jeffcoate 1993, Buijtel et al 2006). I en annan studie mättes LH- samt FSH-koncentrationerna efter stimulering med GnRH där fyra intakta samt fyra kastrerade tikar fick 10 µg/kg intravenöst av gonadorelin (Beijerink et al 2007). Där visade det sig att FSH skulle kunna vara användbart till att skilja mellan intakta och kastrerade. Både FSH och LH steg efter stimulering hos de intakta medan endast LH steg hos de kastrerade. Det vill säga att en utebliven stegring av FSH, trots initialt högre värden, skulle tala för att tiken är kastrerad. Man såg även i denna studie att FSH-värdena hos de intakta tikarna aldrig överskred de värden som de kastrerade visade. Detta skulle kunna innebära att man även utan stimulering kan mäta FSH-koncentrationerna för att avgöra om en tik är kastrerad eller ej. I denna rapport avrådde man ifrån att använda LH då det utsöndras pulsativt. Enstaka värden kan därmed lätt misstolkas.

Flera andra studier konfirmerar resultaten av de ovanstående. I en relativt ny studie av Buijtel et al (2006) fick sex anöstrala och sex kastrerade tikar av olika ras 10 µg/kg gonadorelin intravenöst, vilket också gav signifikant förhöjda östradiolkoncentrationer på de intakta, men ej de kastrerade tikarna.

EXPERIMENTELL DEL

Material och metoder

Djurunderlag

Material har samlats från totalt 25 honkatter. Av dessa valdes elva kastrerade samt elva anöstrala/interöstrala eller diöstrala ut för att ingå i studien. Målet med denna studie var att jämföra icke sexuellt aktiva hondjur med kastrerade. Inklusionskriterierna för de kastrerade var att de ej skulle ha visat några tecken på *ovarian remnant syndrome* och för de intakta, att de ej skulle visat tecken på att vara i brunst, vara dräktiga eller laktera. I alla dessa tillstånd står honkatten under en hormonell påverkan som kunde tänkas interagera med denna studie. De katter som befann sig i dessa tillstånd kunde med relativ stor säkerhet selekteras bort innan blodprovstagning. Däremot kunde det i målgruppen ingå katter som hade ovulerat och därmed befann sig i diöstrus. Detta på grund av att det inte går att diagnosticera ovulation via vaginalcytologi utan först efter progesteronanalys av plasma.

Av de 22 utvalda katterna var 14 hittekatter från Fiahemmet i Norrköping varför deras historik är okänd. Alla dessa hade genomgått en veterinärbesiktning innan de provtogs. Övriga åtta kom från privata hem. Endast en raskatt var representerad, resten var huskatter. Åldern varierade från uppskattat åtta månader till 18 år. Vikten låg mellan 2,3-4,4kg. Minst fyra av de intakta honkatterna hade fått ungar inom de senaste fem månaderna, dock för senast tio veckor sedan.

Tre stycken katter selekterades bort efter blodprovstagning på grund av osäker sexuell status. Två av dem sållades bort först efter kastration då en hade misstänkta uterus/ovarierester kvar i buken samt en hade folliklar vilket tyder på att hon var i brunst. Den tredje hade ett litet misstänkt bukärr som upptäcktes först i samband med rakning vid kastration. Beslut togs om att avvakta buköppning trots osäkerhet om tidigare kastration. Denna katt öppnades därmed aldrig.

Materialet samlades in i Östergötland, Sverige under juli till november 2007. Den etiska ansökan blev godkänd av Uppsala Djurförsöksetiska nämnd 2007-05-25. Diarienummer C 114/7. Tillståndet gäller till och med 2010-05-25. Djurskyddsmyndigheten gav dispens för användandet av icke destinationsuppfödda katter 2007-06-04. Varje enskild djurägare fick del av studien och lämnade skriftligt tillstånd för användandet av deras djur.

Försökets utförande

På varje katt samlades det vid ett och samma tillfälle in ett 0-blodprov från vena cephalica i heparinrör. Därefter injicerades 0,4 µg/kg av GnRH-analogen buserelin (Receptal®, 0,1 ml/kg) intramuskulärt i nackmuskeln. 120 minuter efter GnRH-injektionen togs ett nytt blodprov från vena cephalica, också det i heparinrör. Mellan provtagningarna förvarades katten i sin transportbur eller liknande för att få lugn och ro. I Sverige finns ännu inget GnRH-preparat registrerat för användning på katt därför användes Receptal®, vilket är registrerat för nötkreatur samt häst. Buserelin är en betydligt mer potent GnRH-analog än till exempel gonadorelin som vanligtvis använts till katter internationellt.

För att veta när honkatten når den maximala östradiolproduktionen och därmed den optimala tidpunkten att ta blodprov på efter GnRH-injektionen togs det på den första intakta honkatten tre prover; 0-prov samt efter 60 minuter och 120 minuter. Dessa analyserades omedelbart. Eftersom denna katt hade en högre östradiolkoncentration vid 120 minuter valde vi denna tidpunkt för övriga katter.

Heparinrören centrifugerades för att kunna avskilja heparinplasman. Plasman förvarades fryst i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i väntan på analys.

Två olika metoder användes för att verifiera om de intakta var i östrus eller ej i samband med provtagningen. Ovarierna från de fyra katter som provtogs i samband med kastration sparades i formalin. De inspekterades vid ett senare tillfälle på förekomsten av folliklar eller gulkroppar. Den andra metoden omfattade vaginalcytologi. Det utfördes på de nio honkatter som inte kastrerades i direkt anslutning till provtagningen. En bomullspinne fuktad med NaCl fördes in i vagina. Därefter rullades den över ett objektsglas och färgades med *Diff Quick*.

För att fånga upp de katter som eventuellt befann sig i diöstrus användes progesteronanalys.

Plasmaanalyser

Analysen av heparinplasman utfördes på Universitetsdjursjukhuset, Klinisk kemiska laboratoriet i Uppsala under november 2007. Alla prover, exklusive det inledande blodprovet som analyserades vid försökets början, kördes vid samma tillfälle då resultatet av analysomgångarna kan skilja sig åt. Östradiol analyserades med en *radioimmunoassay* (Double antibody Estradiol; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Metoden användes enligt tillverkarens rekommendation med modifiering enligt Mwanza (2000) och utvärderat för kattserum. Progesteron analyserades via en *solid phase radioimmunoassay* (Coat-A-Count Progesterone; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Även den användes enligt tillverkarens rekommendation och var utvärderad för kattserum.

Resultat

Plasmakoncentrationerna av östradiol samt progesteron hos de 22 honkatterna som ingått i studien är sammanfattade i tabell 1.

Tabell 1. Plasmakoncentrationer av östradiol samt progesteron, före och efter GnRH-stimulering hos de 22 honkatterna som ingått i studien. Medelvärde inom parentes.

	Kastrerade honkatter (n = 11 östradiol) (n = 11 progesteron)		Intakta honkatter (n = 11 östradiol) (n = 8 progesteron)	
	0-prov, före GnRH	120 min-prov, efter GnRH	0-prov, före GnRH	120 min-prov, efter GnRH
Östradiol (pmol/l)	4-9 (5,9)	4-9 (6,1)	5-21 (12,5)	12-41 (22,5)
Progesteron (nmol/l)	<0,6-3,3 (0,8)	<0,6-2 (0,8)	<0,6-13,9 (2,2)	<0,6-18,3 (2,6)
Östradiol maximum före eller efter GnRH (pmol/l)		5-9		12-41

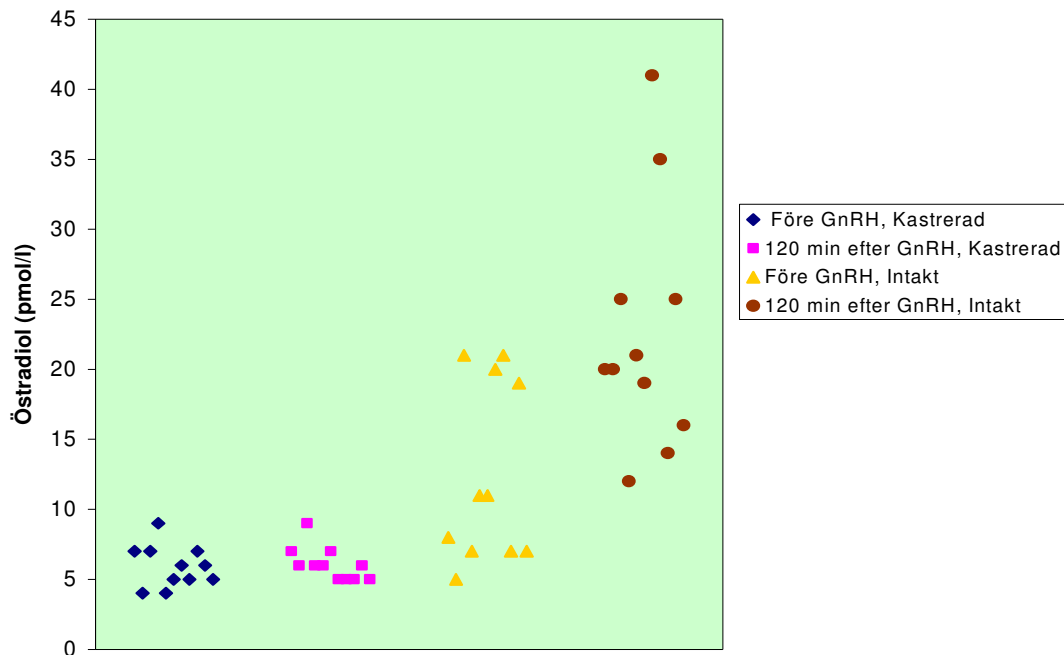
Östradiol

Analysen av östradiol visade att endast de intakta honkatterna svarade tydligt på en GnRH-stimulering. De ökade sin östradiolkoncentration i blodet med 20 till 300%, 120 minuter efter GnRH-injektionen. Fyra av de kastrerade hade högre värden efter än före stimulering, tre hade lägre värden och resten låg kvar på samma östradiolvärde.

Östradiolkoncentrationerna hos den första intakta honkatten låg vid 0-prov, 60 minuter samt 120 minuter på 8, 12 samt 20 pmol/l.

Östradiolkoncentrationerna före och efter GnRH-stimulering hos de kastrerade låg inom ett intervall på 4 till 9 pmol/l med ett medelvärde efter GnRH på 6,1 pmol/l. Hos de intakta var intervallet 5 till 41 pmol/l med ett medelvärde efter GnRH på 22,5 pmol/l. Östradiolkoncentrationerna överlappade mellan grupperna före, men inte efter GnRH-stimulering (se figur 1). De maximala värdena antingen före eller efter GnRH-stimulering hos varje individ visade att kastrerade låg på koncentrationer < 9 pmol/l och intakta på > 12 pmol/l (tabell 1).

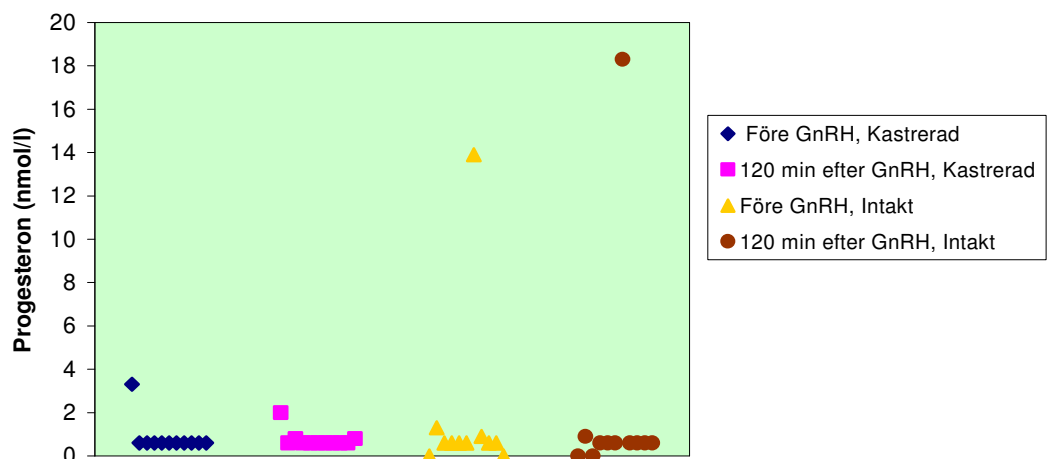
Figur 1. Östradiolkoncentrationer före och efter stimulering med GnRH hos de elva intakta och elva kastrerade honkatter som ingått i studien.



Progesteron

Stimulering med GnRH hade inte någon effekt på progesteronproduktionen hos vare sig kastrerade eller intakta (se tabell 1, figur 2). Av de 19 honkatter som det kunde göras fullständig progesteronanalys på, hade 15 katter < 0,6 nmol/l både före och efter GnRH-stimulering. En intakt honkatt hade initiala värden på 13,9 nmol/l och 18,3 nmol/l vid provet efter GnRH-stimuleringen (se figur 2). Detta innebär att hon hade aktiva gulkroppar vid provtagningstillfället och befann sig i diöstrus till skillnad från övriga katter i studien. De övriga fyra honkatterna, med något högre progesteronkoncentrationer, befann sig alla under det som räknas som basala värden, < 5 nmol/l (Feldman 2004).

Figur 2. Progesteronkoncentrationer före och efter stimulering med GnRH hos de elva intakta (två katter enbart ett värde och en katt inget värde) och 11 kastrerade honkatter som ingått i studien.



Vaginalcytologi samt undersökning av ovarier

Samtliga av de nio vaginalcytologiprover som togs från intakta honkatter var icke förhornade och visade därmed att dessa ej var i östrus vid provtagning. Av de fyra honkatter som blev kastrerade och fick sina ovarier undersökta hade en katt tydliga folliklar. En annan katt hade rester kvar efter en tidigare kastration, dock ingen ovarievävnad. Dessa två katter selekterades bort från studien då de inte uppfyllde inklusionskriterierna.

Östradiolvärden hos de katter som selekterades bort

Tre katter selekterades bort från studien efter att provtagningen utförts. Dessa prover analyserades ändå avseende östradiol och progesteron. Varken hos katten med uterusrester eller den med osäker sexuell status förekom det någon östradiolstegring efter GnRH-stimulering. De låg på 4 och 7 pmol/l före respektive 5 och 7 pmol/l efter. Den tredje katten som hade synliga folliklar på sina ovarier hade en östradiolkoncentration på 62 pmol/l före och 72 pmol/l efter stimulering. Dessa östradiolvärden bekräftar att hon befann sig i östrus. Detta är en 16% stegring efter stimulering, vilket är lägre än vad som observerats på de inaktiva honkatterna. Alla tre låg på basala progesteronkoncentrationer.

DISKUSSION

Denna studie bevisar att det är fullt möjligt att via analys av östradiol i plasma, avgöra om en honkatt har funktionella ovarier. Det räcker dock inte med att enbart analysera östradiol utan det behövs en stimulering av ovarierna för att signifikanta skillnader ska framträda. Östradiol steg hos samtliga intakta honkatter efter GnRH-stimulering, medan de kastrerade hade varierande värden som snarare kan hänvisas till dygnsvariationer än ett konsekvent svar på GnRH. Det förekom inga överlappningar mellan kastrerade och intakta efter stimulering. Vi får då ett preliminärt "cut-off" värde på 11 pmol/l, men antalet katter i denna studie är för få för att man ska kunna veta säkert var gränsen mellan kastrerade och intakta går. Risken för att få falskt positiva eller negativa svar utifrån detta "cut off" värde kan därför inte uteslutas. Vi kan dock dra slutsatsen att: **Kastrerade katter har vanligen östradiolkoncentrationer på < 10 pmol/l och värdena är inte högre 2 timmar efter stimulering med GnRH. Katter med östradiolkoncentrationer på ≥ 12 pmol/l före eller efter GnRH-stimulering har sannolikt ovarievävnad.**

Provsvaren från de katter som ej ingått i studien styrker resultaten av denna studie ytterligare. Två av dessa tre katter låg på östradiolkoncentrationer på < 7 pmol/l. Detta skulle enligt resultaten av denna studie tyda på att de ej hade någon funktionell ovarievävnad kvar i kroppen. Den tredje var i östrus och hade därmed värden långt över 12 pmol/l.

GnRH-stimulering har i denna studie inte gett någon effekt på progesteronkoncentrationerna i blodet vare sig hos kastrerade eller anöstrala/interöstrala intakta. En av de intakta honkatterna befann sig däremot i diöstrus i samband med provtagningen. Hon ökade sina progesteronkoncentrationer i blodet från 13,9 nmol/l till 18,3 nmol/l vid provet efter GnRH stimuleringen. Om den höjningen beror på GnRH stimulering bör vara osagt. Kanske kan de aktiva gulkropparna svara på stimulering med GnRH och öka sin progesteronproduktion, men det mest troliga är att skillnaden beror på en normal dygnsvariation eller ett stresspåslag. Nämnas bör att en av de fyra katterna med något högre progesteronvärden var en kastrerad honkatt (nr 1 i figur 2). Hon låg initialt med en progesteronkoncentration på 3,3 nmol/l som sedan sänktes till 2,0 nmol/l efter stimulering. Detta är sannolikt ett svar på stress. ACTH från hypofysen i samband med till exempel stress vid hantering har i studier visat sig inte bara stimulera binjuren till kortisonfrisläppning utan även simultant släppa ut dess prekursor progesteron (Chatdarong 2006a). I denna studie var de förhöjda progesteronkoncentrationerna i serum efter ACTH stimulering likvärdiga mellan inaktiva intakta och kastrerade honkatter. Detta talar för att progesteronet härrör från binjuren i dessa fall.

Som bekant utövar progesteron en negativ feedback på hypothalamus. Man skulle då kunna misstänka att en honkatt, som har progesteronproducerande gulkroppar, skulle visa ett lägre östradiol svar efter GnRH-stimulering gentemot till exempel anöstrala honkatter. Så var inte fallet i denna studie. Den diöstrala honkatten steg från 20 till 41 pmol/l, det vill säga 100%.

Generellt sett är det lägre värden för östradiol under svenska förhållanden än som anges i internationell litteratur bland annat Feldman (2004), Gilbert (1987) och Johnston et al (2001). Till exempel anges det tidigare i detta dokument att basala östradiolvärden ligger under 55 pmol/l (Feldman 2004), vilket är väl högt vid jämförelse med resultaten av den aktuella studien och flera andra svenska studier (Chatdarong et al 2005, 2006b). Det högsta östradiolvärde som fåtts på de intakta anöstrala honkatterna i denna studie är 21 pmol/l. Medelvärdet ligger på 12,5 pmol/l. I Chatdarongs studie (2005) fick man fram ett medelvärde på östradiol hos inaktiva honkatter på 13 pmol/l (8-26 pmol/l) ifrån 16 provtagna katter. Det anges också att östradiolvärdena under östrus varierar från 90-290 pmol/l (Feldman 2004). I Chatdarongs studie (2005) fick man ett medelvärde på 47,7 pmol/l (14-113 pmol/l) hos sex provtagna honkatter med follikulär aktivitet. En av de bortsorterade intakta honkatterna, där vi såg folliklar på ovarierna, hade som mest 72 pmol/l i östradiol vilket knappt överstiger interöstrala koncentrationer enligt internationella referenser.

Tidigare studier har visat att utsöndringen av LH är beroende av dosen GnRH hos katt (Chakraborty 1979) vilket även gäller för östradiol hos tik (Jeffcoate 1993). Östradiolsvaret varierar nämligen på intakta tikar beroende på var i östralcykeln de befinner sig (Jeffcoate 1993), samt vilken dos av GnRH som administreras (Van Haaften et al 1994). Ju närmare östrus tiken kommer desto högre blir östradiolsvaret (Jeffcoate 1993, Van Haaften et al 1994). I en studie gjord av Buijtelts et al (2006) så hävdar man att 0,16 µg av buserelin som en engångsdos intravenöst till tikar, vilket användes i studien gjord av Jeffcoate (1993), inte är tillräcklig för att ge en signifikant höjning av östradiolvärdena för att kunna skilja mellan intakta och kastrerade tikar trots att buserelin är mer potent än gonadorelin. I Buijtelts egna studie användes 10 µg/kg av gonadorelin intravenöst, vilket han anser vara en tillräcklig dos för att kunna skilja mellan grupperna. Man måste dock komma ner i så låga doser som 0,01 µg/kg gonadorelin för att ingen eller mycket liten respons ska framträda (Van Haaften et al 1994). Med andra ord, vilket preparat och dos som är den bäst lämpade för denna typ av undersökning är ännu ej utvärderat. Oftast styrs valet av preparat av vad som är inregistrerat i landet. I den aktuella studien gavs honkatterna 0,4 µg/kg av buserelin intramuskulärt (en betydligt högre dos än vad som användes i till exempel Jeffcoates (1993) studie) vilket visade sig fungera bra. Icke aktiva ovarier stimulerades till en tydligt ökad östradiolproduktion. Ökningen var signifikant nog för att skilja mellan intakta och kastrerade. Ingen av de 25 honkatterna som provtogs kom upp i östruskoncentrationer på denna dos GnRH och inga bieffekter har heller observerats.

Det är osäkert om östradiolsvaret hos en honkatt med *ovarian remnant syndrome* kan förväntas ligga lika högt som hos de intakta honkatterna. Tidigare undersökningar har visat att det hos tikar ofta förekommer cystiska förändringar på dessa ovarierester (Okkens et al 1981 refererad av Buijtelts et al 2006). Hur dessa cystiska förändringar svarar på GnRH-stimulering är fortfarande oklart. Det faktum att det oftast bara handlar om små delar av ovarierna som blivit kvar och som sedan revaskulariserats och blivit hormonproducerande igen gör att vi skulle kunna misstänka att östradiolsvaret är lägre hos dessa individer jämfört med de helt intakta djuren. Får man ett tydligt östradiol svar är diagnosen klar, men utebliven stegring, är inte det samma som fri från ovarievävnad. Vidare studier

behövs därmed, speciellt på djur där man redan diagnosticerat ORS, för att med säkerhet kunna använda detta verktyg vid diagnostik av *ovarian remnant syndrome*.

Användandet av GnRH-stimulering och analys avseende östradiol för att skilja mellan en intakt och en kastrerad honkatt har i dagsläget vissa begränsningar. De organisationer som har mest fördel av detta redskap drivs oftast ideellt. Pengar är därför en viktig aspekt. Marginalerna för hur mycket man kan kosta på en individ är mycket små. Idag är priserna på en normal honkattskastration enormt pressade. Flertalet djursjukhus har subventionerade priser för att minska trycket av icke kastrerade katter. En honkattskastration kostar normalt mellan 500-1000 kr. En buköppning går snabbt och man får omedelbart ett säkert besked om honkattens sexuella status. Generellt sett är det också ganska få biverkningar, men som sagt tidigare, innebär det alltid en ökad risk för djurets hälsa. Det är onekligen förenat med viss smärta och obehag att buköppnas. Så kan de onödiga kirurgiska ingreppen minskas är det en fördel. I dagsläget skulle en östradiolundersökning inklusive provtagning hos veterinär samt analys på Universitetsdjursjukhuset, Klinisk kemiska laboratoriet, Uppsala kosta c:a 1000 kr. Laboratoriet kör i dagsläget östradiolanalyserna varannan vecka vilket innebär en viss väntan på analys svar. Om dessa värden skulle visa på att honkatten ej är kastrerad så måste hon ändå öppnas. Den totala kostnaden för att få henne kastrerad skulle då bli det dubbla. Dessa marginaler finns oftast inte. Rekommendationen blir att inte använda denna metod som en rutinundersökning utan endast i tveksamma fall. Det är dock inte bara organisationer som tar emot hittekatter. Många privatpersoner som tar emot en hittekatt kostar gärna på sin blivande familjemedlem en mildare undersökning till att börja med än en buköppning.

TACK

Det krävs en stor insats och förståelse från många personer för att ett arbete som detta ska kunna genomföras. Jag vill speciellt tacka organisationen Fiahemmet i Norrköping med Inger Ydrenius i spetsen för att de hjälpt till med att skaffa fram katter till studien samt utstått en hel del extra rivsår. Tack till alla privatpersoner som ställt upp med sina katter. Tack till Norsholms Djursjukhus för utlåning av provtagningsmaterial samt till all personal som tålmodigt varit hållhjälp och inte en gång suckat över eventuella förseningar i deras arbete. Tack till Universitetsdjursjukhuset, Klinisk kemiska laboratoriet i Uppsala för analyserna av proverna samt för att jag fick vara med och lära vid analysdagen.

Sist, men största tacket till mina handledare som sprudlar av positiv anda. Utan er hjälp hade detta arbete aldrig blivit till.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Beijerink NJ et al (2007). Basal and GnRH-induced secretion of FSH and LH in anestrous versus ovariectomized bitches, *Theriogenology*, vol. 67, Elsevier Inc, ss. 1039-1045.
- Buijtel JJCWM et al (2006). Effects of Gonadotrophin releasing Hormone Administration on the Pituitary-Ovarian Axis in Anoestrous vs Ovariectomized Bitches, *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 41, The Authors. Journal compilation, Blackwell Verlag. ss. 555-561.
- Chakraborty PK, Wildt DE & Seager SWJ (1979). Serum Luteinizing Hormone and Ovulatory Response to Luteinizing Hormone-releasing Hormone in the Estrous and Anestrous Domestic Cat, *Laboratory Animal Science*, vol. 29, ss. 338-344.
- Chatdarong K et al (2005). Hystero-graphic appearance and uterine histology at different stages of the reproductive cycle and after progesteragen treatment in the domestic cat, *Theriogenology*, Elsevier Inc, vol. 64, ss. 12-29.
- Chatdarong K et al (2006a). The effect of ACTH stimulation on cortisol and progesterone concentrations in intact and ovariohysterectomized domestic cats, *Theriogenology*, vol. 66, Elsevier Inc, ss. 1482-1487.
- Chatdarong K et al (2006b). Cervical patency during non-ovulatory estrus cycles in domestic cats, *Theriogenology*, Elsevier Inc, vol. 66, ss. 804-810.
- Christiansen Ib J (1999). *Reproduktion hos hund og kat*, DSR Forlag, ss. 481-531.
- Cunningham JG, Klein BG (2007). *Veterinary Physiology*, 4th ed, Saunders Elsevier, USA, ss. 469-471.
- DeNardo GA et al (2001). Ovarian remnant syndrome: Revascularization of free-floating ovarian tissue in the feline abdominal cavity, *Journal of the American Animal Hospital Association*, vol. 37, ss. 290-296.
- England GCW (1997). Confirmation of ovarian remnant syndrome in the queen using hCG administration, *Veterinary Record* 141, ss. 309-310.
- Feldman EC & Nelson RW (2004). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 3rd ed, Saunders, USA, ss. 1016-1045.
- Gilbert RO & Bosu WTK (1987). Clinical Reproduction Endocrinology of the Dog and Cat. I Drazner FH (red.). *Small Animal Endocrinology*, Churchill Livingstone, USA, ss. 341-372.
- Herron MA (1986). Feline physiology of reproduction. I Burke TJ (red). *Small animal reproduction and infertility, a clinical approach to diagnosis and treatment*. Lea & Febiger, ss. 13-23.
- Jeffcoate IA (1993). Gonadotrophin-releasing hormone challenge to test for the presence of ovaries in the bitch, *Journals of Reproduction & Fertility Ltd.*, Suppl. 47, ss. 536-538.
- Johnston SD, Root Kustritz MV & Olson PNS (2001). *Canine and Feline Theriogenology*, WB Saunders, USA, ss. 389-486.
- Levy JK, Gale DW & Gale LA (2003). Evaluation of the effect of a long-term trap-neuter-return and adoption program on a free-roaming cat population, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 222, ss. 42-46.
- Okkens AC, Dieleman SJ, Van Der Gaag I (1981). Gynaecologische complicaties na ovario-hysterectomie bij de hond ten gevolge van: 1. Het incompleet verwijderen van de ovaria. 2. Een ontsteking van uterus-cervixstomp, *Tijdschr Diergeneeskde*, vol. 106, ss. 1142-1158.

- Sjaastad ØV, Hove K & Sand O (2003). *Physiology of Domestic Animals*, Scandinavian Veterinary Press, Oslo, s 624.
- Shille VM et al (1979). Follikular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 β concentration in plasma: Relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*, vol. 21, ss. 953-963.
- Stabenfeldt G.H. & Pedersen N.C. (1991). Reproduction and Reproductive Disorders. I Pratt PW (red.). *Feline Husbandry: Diseases and Management in the Multiple Cat Environment*, American Veterinary Publications, Goleta, Kap. 3, ss 129-140.
- Ström Holst B, Kolander C & Axné E (2000). Time relationship between plasma concentrations of oestradiol-17 β , oestrus behaviour and vaginal cytology in the female cat, Proc 14th, *International Congress on Animal Reproduction*, Stockholm, 1:28.
- Van Haaften et al (1994). Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch, *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 101, ss. 221-225.
- Wallace MS (1991). The Ovarian Remnant Syndrome in the Bitch an Queen, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, vol. 21, ss. 501-507.