

# Poszukiwania nowych metod niechirurgicznej antykoncepcji u małych zwierząt

Andrzej Max

Rozród zwierząt ma wiele różnych aspektów medycznych, organizacyjnych, prawnych i etycznych. W hodowli jednym z głównych problemów jest niepłodność lub niska plenność. Szczególnie dramatycznie jest to wyrażone w przypadku gatunków zwierząt ginących lub zagrożonych wyginięciem, wobec których wdrażane są zaawansowane programy reprodukcyjne, w tym z zastosowaniem technik wspomaganego rozrodu i biotechnologii rozrodu. Z drugiej strony pojawia się zagadnienie niekontrolowanego wzrostu liczebności innych gatunków, zwłaszcza na pewnych obszarach, co dotyczy zarówno zwierząt dzikich, jak i domowych, w tym także wtórnie zdziczałych. W szczególności odnosi się to do psów i kotów. Szacuje się, że światowa populacja kotów osiągnęła ok. 600 mln, z których 80% żyje w stanie wolnym. Te drapieżniki zabijają rocznie miliardy ptaków i ssaków (1, 2, 3). Szacunkowa liczba psów na świecie wynosi od 700 mln do miliarda (2, 4). Także one w pewnych rejonach stanowią główne zagrożenie antropogeniczne dla dzikiej przyrody (5).

Problem nadmiernej liczebności niektórych grup zwierząt narasta, poszukuje się zatem coraz innych metod antykoncepcji, zarówno czasowej (dla zwierząt potencjalnie przeznaczonych do reprodukcji), jak i trwałej, która prowadziłaby do ograniczenia wielkości populacji wybranych gatunków zwierząt, w tym mięsożernych zwierząt domowych. Próby te mają różny stopień zaawansowania, często o charakterze pilotażowym. Są one ukierunkowane m.in. na rozwiązania organizacyjne (6, 7) oraz biologiczno-medyczne, jak oddziaływanie na szlaki hormonalne (8) lub na pierwotne komórki rozrodcze – gonocyty (9) czy wykorzystanie wektorów do wprowadzania genów warunkujących długotrwałe wstrzymanie czynności rozrodczych jako tzw. antykoncepcja wektorowa (10, 11, 12). Jednocześnie szeroko zakrojone akcje antykoncepcyjne sprzyjają ograniczeniu chorób szerzących się drogą płciową. Wdraża się programy służące opracowywaniu nowych metod niechirurgicznej sterylizacji zwierząt, przeznaczając na to miliony dolarów (13). W badaniach wstępnych wykorzystuje się w pierwszej kolejności zwierzęta laboratoryjne, głównie gryzonia, by następnie stosować je w praktyce u innych gatunków. Poniżej przedstawiono wybrane procedury, które zostały już eksperymentalnie zastosowane u zwierząt domowych.

## Melatonina

Wiele gatunków zwierząt cechuje się sezonowością czynności rozrodczych, co jest dostosowane do warunków klimatycznych w miejscu bytowania

### Looking for new, non-surgical methods of contraception in small animals

Max A.

Methods of conservative and surgical contraception are currently used in dogs and cats. Castration of numerous animals is money- and time-consuming. Pharmacological contraception is characterized by varying effectiveness and inconstant duration of efficacy. Both kinds of procedures carry some risk of adverse effects. New solutions are constantly being attempted. This article presents selected methods that have already been experimentally applied in carnivorous domestic animals. The use of melatonin, estrogens, contraceptive vaccines and gene therapy was described.

**Keywords:** dog, cat, contraception, infertility, non-surgical methods.

zwierząt. Jednym z głównych czynników regulacyjnych jest fotoperiod, który zależnie od gatunku działa stymulująco lub hamująco na funkcje gonad (14, 15). W relacji środowisko – gonady pośredniczy hormon szyszynki – melatonina, której wydzielanie rośnie w warunkach małego oświetlenia (dnia krótkiego), maleje zaś wraz z intensyfikacją oświetlenia, czyli podczas długiego fotoperiodu. Zatem melatonina może, zależnie od gatunku, pobudzać lub wstrzymywać czynność gonad. O ile u psów nie występuje wyraźna sezonowość rozrodu, o tyle koty należą do zwierząt sezonowo poliestralnych, a ich aktywność reprodukcyjna jest stymulowana długim dniem świetlnym (przy niskim stężeniu melatoniny), hamowana zaś, gdy krótki dzień wiąże się z wysokim stężeniem tego hormonu. Z uwagi na to znane działanie melatoniny hamujące aktywność gonad u gatunków fotowrażliwych, w tym u kotów, postanowiono sprawdzić, czy egzogenna melatonina może być wykorzystana jako środek antykoncepcyjny. Stosowano u kotek melatoninę iniekcyjnie (16) i doustnie (17, 18), uzyskując przejściową supresję czynności jajników bez negatywnego wpływu na przyszłą płodność. Kolejnym krokiem było zastosowanie podskórnego implantu z melatoniną (18 mg) w celu zahamowania rui u kotek, co okazało się skuteczne, a mianowicie gdy implant wprowadzono do 60 dni (podobnie jak przy codziennym doustnym podawaniu melatoniny w dawce 4 mg/dzień/kota), w porównaniu do 19 dni u zwierząt kontrolnych (18). W innym doświadczeniu działanie melatoniny okazało się dwukrotnie dłuższe po wprowadzeniu implantu podczas *interoestrus*, co wydłużyło ten okres do średnio 113 dni w porównaniu do 61 dni po wprowadzeniu implantu podczas rui (19). Według doświadczeń francuskich zastosowanie implantu

melatoniny (Melovine 18 mg, Ceva) u 42 kotek spowodowało wstrzymanie rui u 33 z nich na okres od 21 do 277 (śr. 86) dni. Powrót rui był nasilony w marcu, a 12 kotek wydało potomstwo. Objawów ubocznych nie obserwowano (20). Zaaplikowanie implantu kotkom rasy turecki van w późnym sezonowym anoestrus spowodowało wydłużenie okresu bezruchowego u pięciu spośród sześciu zwierząt (21). Pewien efekt hamujący zaobserwowano także u kocurów, chociaż spermatogeneza nie została w pełni wstrzymana (22). Melatonina bywa też polecana jako jeden z leków do stosowania w terapii zaburzeń behawioralnych u psów i kotów (23). Na rynkach światowych są obecne implanty przeznaczone dla zwierząt zawierające 12–24 mg melatoniny (24, 25). Wydaje się, że antykoncepcja z udziałem melatoniny może być wykorzystana u kotów do czasowego zahamowania płodności.

### Estrogeny

Kolejnym pomysłem było zablokowanie aktywności kisspeptyny – podwzgórzowego neurohormonu biorącego udział w dojrzewaniu płciowym, rozwoju i czynności gonad, co ma prowadzić do niepłodności. Okazało się, że można to osiągnąć, podając estrogeny noworodkom, co początkowo wykazano u szczurów (26, 27), a następnie u psów. Szczepionkom noworodkom płci żeńskiej rasy beagle wprowadzono silikonowe kapsułki zawierające benzoestan estradiolu. Spowodowało to zmniejszenie rozwoju pęcherzyków jajnikowych oraz znaczące zahamowanie ekspresji kisspeptyny w podwzgórzu, bez negatywnych skutków zdrowotnych. Autorzy sądzą, że daje to podstawy dla rozwoju dalszych badań nad tą procedurą jako metodą farmakologicznej sterylizacji, w szczególności samic psów i kotów (28).

### Szczepionka antykoncepcyjna

W pewnych sytuacjach w organizmie powstają przeciwciała skierowane przeciw własnym antygenom (autoprzeciwciała) lub izoprzeciwciała (inaczej: alloprzeciwciała) – przeciwko antygenom innego osobnika tego samego gatunku. Jeżeli skutkuje to związaniem/unieczynnieniem cząsteczek lub struktur czynnych reprodukcyjnie, prowadzi do niepłodności immunologicznej, znanej u ludzi i zwierząt. Analogicznie więc jednym z pomysłów na uzyskanie efektu antykoncepcyjnego jest celowe wzbudzenie w organizmie samca lub samicy produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko białkom/peptydom kluczowym dla czynności rozrodczych. Polega to na przygotowaniu immunogennej formy wybranego antygeny (np. z udziałem adjuwantu, czyli substancji wzmacniającej odpowiedź układu immunologicznego), która po wprowadzeniu zwierzęciu spowoduje po pewnym czasie jego niepłodność, będąc tym samym szczepionką antykoncepcyjną. Komercyjną szczepionką blokującą GnRH stał się koniugat gonadoliberyny z adjuwantem pod nazwą GonaCon lub GonaCon-Equine. Preparaty te

zostały zatwierdzone przez amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (U.S. Environmental Protection Agency) do zastosowania u mulaków białogonowych (*Odocoileus virginianus*) oraz koni i osłów (29, 30, 31). Szczepionka GonaCon podana jednorazowo kotkom spowodowała roczną niepłodność u 93%, a u 73, 53, i 40% trwała ona odpowiednio przez 2, 3 i 4 lata (32), u kocurów zaś średnio 14 miesięcy (33). Ocena bezpieczeństwa tej szczepionki wypadła korzystnie (34). Powstał też pomysł jednoczesnego podawania szczepionki antykoncepcyjnej z komercyjną szczepionką przeciw wściekliznie u psów w celu ograniczenia rozrodczości populacyjnej (35, 36). Możliwości wykorzystania antykoncepcyjnego wykazała też szczepionka Canine Gonadotropin Releasing Factor Immunotherapeutic (Pfizer) pierwotnie przeznaczona do leczenia łagodnego rozrostu stercza u psów (37).

Immunizacja 8–9-tygodniowych kociąt rekombinowaną szczepionką na bazie GnRH stymulowała produkcję przeciwciał anti-GnRH na okres co najmniej 20 miesięcy, hamując czynność gonad u obu płci (38). Zachęcające wyniki uzyskano po zastosowaniu u psów samców nowej rekombinowanej szczepionki anti-GnRH, która okazała się immunogenna, powodując produkcję swoistych przeciwciał, obniżenie stężenia testosteronu i redukcję zachowań płciowych (39). Z kolei komercyjna szczepionka Improvac (Zoetis) przeznaczona dla świń hamowała czynność jąder u kocurów, co przejawiało się spadkiem wartości parametrów nasienia, zmniejszeniem objętości jąder o 49% i prawie całkowitym zanikiem wyrostków kolczystych prącia (40).

Szczególną formą jest antykoncepcja wektorowa, wykorzystująca mikroorganizmy jako wektory wprowadzające do organizmu docelowego obce czynniki w celu sprowokowania produkcji przeciwciał. Na przykład immunogenne białko niechorobotwórczego wirusa sprzężone z GnRH może wzbudzić produkcję przeciwciał anti-GnRH blokujących płodność (41).

Opisany powyżej mechanizm antykoncepcji immunologicznej anti-GnRH należy odróżnić od działania powszechnie stosowanych analogów GnRH (implantów), których przedłużone uwalnianie skutkuje odczuleniem przysadki i spowodowaniem jej niewrażliwości na endogenną gonadoliberynę.

Innym kierunkiem jest immunizacja samic antygenami osłonki przejrzystej (*zona pellucida*), będącej glikoproteinową błoną otaczającą początkowo oocyt, a po jego zapłodnieniu zarodek we wczesnych stadiach rozwojowych. Osłonka przejrzysta odgrywa także istotną rolę w zapłodnieniu, gdyż są w niej zlokalizowane receptory dla plemników. Związanymi przeciwciałami antygenów osłonkowych miałyby działać antykoncepcyjnie. Podjęto próby wykorzystania do immunizacji suk sprzężonych z adiuwantem osłonek psich, świńskich, a także rekombinowanych frakcji glikoprotein osłonkowych, uzyskując produkcję swoistych przeciwciał i częściowe zablokowanie płodności (42, 43, 44). Celem perspektywicznym jest uzyskanie na tej podstawie szczepionki antykoncepcyjnej (45, 46, 47).

## Terapia genowa

Rozwój technik molekularnych pozwala na ingerencję w ekspresję genów w chorym organizmie w celu uzyskania efektu leczniczego. Uzyskuje się to przez wprowadzenie do komórek obcych kwasów nukleinowych. W medycynie człowieka stosuje się ten rodzaj terapii w chorobach genetycznych, nowotworowych, zakaźnych, kardiologicznych. Odniesienie do tych doświadczeń spowodowało, że jedną z najnowszych koncepcji ograniczenia rozrodczości zwierząt stało się wykorzystanie w tym celu terapii genowej polegającej na wprowadzeniu do organizmu fragmentu DNA (transgenu) za pomocą wektora wirusowego w celu spowodowania długotrwałej lub permanentnej niepłodności (48). Jednym z kandydatów do zastosowania tej procedury stał się hormon antymüllerowski (AMH). Jest to glikoproteina, która odgrywa istotną rolę w embriogenezie i kształtowaniu się płci płodu, ale także u osobników dorosłych obu płci bierze udział w endo- i egzokrynowej regulacji czynności gonad (49).

Doświadczalnie dorosłym kotkom zaaplikowano w iniekcji domięśniowej konstrukt kociego AMH przy użyciu wirusa AAV (ang. Adeno-Associated Virus) jako wektora. Spowodowało to przedłużoną ekspresję AMH w mięśniach kotek z ponadfizjologicznym poziomem wydzielania tego hormonu. W wymiarze klinicznym skutkowało to zahamowaniem follikulogenezy i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych, brakiem owulacji i niepłodnością (12).

## Podsumowanie

Nieustannie trwają poszukiwania bezpiecznych i skutecznych metod antykoncepcji u zwierząt. Dotyczy to zarówno czasowego wstrzymania aktywności rozrodczej, jak również wywołania długotrwałej albo dożywotniej niepłodności. W szczególności dąży się do ograniczenia populacji zwierząt wolno żyjących lub zdziczałych zwierząt domowych, stanowiących zagrożenie zdrowotne dla ludzi i innych zwierząt oraz z uwagi na drapieżny tryb życia zagrażających pewnym gatunkom, przyczyniających się nawet do ich ekstynkcji. Metody farmakologiczne, a także te bazujące na inżynierii genetycznej, w tym z wykorzystaniem sztucznej inteligencji, mają zastąpić droższe i czasochłonne zabiegi chirurgiczne, zwłaszcza że coraz częściej zwraca się uwagę na ich skutki uboczne.

## Piśmiennictwo

- <https://www.smithsonianmag.com/smart-news/scientists-develop-new-birth-control-for-female-cats-no-surgery-necessary-180982319/>
- <https://worldanimalfoundation.org/cats/how-many-cats-are-in-the-world/>
- Loss S., Will T., Marra, P.: The impact of free-ranging domestic cats on wildlife of the United States. *Nat. Commun.* 2013, 4, 1396.
- <https://petkeen.com/how-many-dogs-are-there-statistics/>
- Yen S.C., Ju Y.T., Shaner P.J.L., Chen H.L.: Spatial and temporal relationship between native mammals and free-roaming dogs in a protected area surrounded by a metropolis. *Scientific reports* 2019, 9(1), 8161.
- Benka V.A., Boone J.D., Miller P.S., Briggs J.R., Anderson A.M., Sloomaker C., Slater M., Levy J.K., Nutter F.B., Zawistowski S.: Guidance for management of free-roaming community cats: a bioeconomic analysis. *J. Feline Med. Surg.* 2022, 24, 975–985.
- Luzardo O.P., Zaldivar-Laguía J.E., Zumbado M., Travieso-Aja M.D.M.: The role of veterinarians in managing community cats: A contextualized, comprehensive approach for biodiversity, public health, and animal welfare. *Animals (Basel)*. 2023, 13. DOI: 10.3390/ani13101586.
- Wilsterman K., Bentley G.E., Comizzoli P.: RFRP3 influences basal lamina degradation, cellular death, and progesterone secretion in cultured preantral ovarian follicles from the domestic cat. *PeerJ*. 2019, 7. DOI: 10.7717/peerj.7540.
- Fraser B.A., Miller K., Trigg N.A., Smith N.D., Western P.S., Nixon B., Aitken R.J.: A novel approach to nonsurgical sterilization; application of menadione-modified gonocyte-targeting M13 bacteriophage for germ cell ablation in utero. *Pharmacol. Res. Perspect.* 2020, 8. DOI: 10.1002/prp2.654.
- Li J., Olvera A.I., Akbari O.S., Moradian A., Sweredoski M.J., Hess S., Hay B.A.: Vectored antibody gene delivery mediates long-term contraception. *Curr. Biol.* 2015, 25. DOI: 10.1016/j.cub.2015.08.002.
- Hay B.A., Li J., Guo M.: Vectored gene delivery for lifetime animal contraception: Overview and hurdles to implementation. *Theriogenology* 2018, 112, 63–74.
- Vansandt L.M., Meinsohn M.C., Godin P., Nagykerly N., Sicher N., Kano M., Kashiwagi A., Chauvin M., Saatcioglu H.D., Barnes J.L., Miller A.G., Thompson A.K., Bateman H.L., Donelan E.M., González R., Newsom J., Gao G., Donahoe P.K., Wang D., Swanson W.F., Pépin D.: Durable contraception in the female domestic cat using viral-vectored delivery of a feline anti-Müllerian hormone transgene. *Nat. Commun.* 2023, 14. DOI: 10.1038/s41467-023-38721-0.
- Rhodes L.: New approaches to non-surgical sterilization for dogs and cats: Opportunities and challenges. *Reprod. Domest. Anim.* 2017, 52 Suppl 2, 327–331.
- Max A.: Fotoperiod i melatonina w rozrodzie ssaków: gryzonie, króliki, koty. *Życie Wet.* 2015, 90, 35–38.
- Max A.: Fotoperiod i melatonina w rozrodzie ssaków: konie, owce, ludzkie. *Życie Wet.* 2015, 90, 97–100.
- Leyva H., Madley T., Stabenfeldt G.H.: Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretion of oestrogen, and coital responses in the domestic cat. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1989, 39, 135–142.
- Graham L.H., Swanson W.F., Wildt D.E., Brown J.L.: Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. *Theriogenology* 2004, 61, 1061–1076.
- Faya M., Carranza A., Priotto M., Graiff D., Zurbriggen G., Diaz J.D., Gobello C.: Long-term melatonin treatment prolongs interestrus, but does not delay puberty, in domestic cats. *Theriogenology* 2011, 75, 1750–1754.
- Gimenez F., Stornelli M.C., Tittarelli C.M., Savignone C.A., Dorna I.V., de la Sota R.L., Stornelli M.A.: Suppression of estrus in cats with melatonin implants. *Theriogenology* 2009, 72, 493–499.
- Furthner E., Roos J., Niewiadomska Z., Maenhoudt C., Fontbonne A.: Contraceptive implants used by cat breeders in France: a study of 140 purebred cats. *J. Feline Med. Surg.* 2020, 22, 984–992.
- Gulyuz F., Tasa I., Uslu B.A.: Effects of melatonin on the onset of ovarian activity in Turkish van cats. *J. Anim. Vet. Ad.* 2009, 8, 2033–2037.
- Núñez Favre R., Bonauro M.C., Praderio R., Stornelli M.C., de la Sota R.L., Stornelli M.A.: Effect of melatonin implants on spermatogenesis in the domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Theriogenology* 2014, 82, 851–856.
- Zań R., Roliński Z., Kowalski C., Zadrzyńska I., Andrychiewicz J., Duda M., Opielak G.: Uspokajające i przeciwłkowe działanie melatoniny w niektórych przypadkach zaburzeń behawioralnych u psów i kotów. *Med. Weter.* 2013, 69, 96–101.
- melatoninimplants.us
- <https://www.ceva.asia/Products/Sheep-and-Goats/Reproduction-Management>
- Navarro V.M., Sánchez-Garrido M.A., Castellano J.M., Roa J., García-Galiano D., Pineda R., Aguilar E., Pinilla L., Tena-Sempere M.: Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 2009, 150, 2359–2367.
- Minabe S., Sato M., Inoue N., Watanabe Y., Magata F., Matsuda F., Uenoyama Y., Ozawa H., Tsukamura H.: Neonatal estrogen causes irreversible male infertility via specific suppressive action on hypothalamic Kiss1 neurons. *Endocrinology* 2019, 160, 1223–1233.
- Park C.J., Minabe S., Hess R.A., Lin P.P., Zhou S., Bashir S.T., Barakat R., Gal A., Ko C.J.: Single neonatal estrogen implant sterilizes female animals by decreasing hypothalamic KiSS1 expression. *Sci. Rep.* 2023, 13. DOI: 10.1038/s41598-023-36727-8.
- <https://biotechnologia.pl/biotechnologia/antykoncepcja-dla-zwierzat-w-zastrzyku,15676>
- Miller L.A., Gionfriddo J.P., Fagerstone K.A., Rhyhan J.C., Killian G.J.: The single-shot GnRH immunocontraceptive vaccine (GonaCon) in

- white-tailed deer: comparison of several GnRH preparations. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008, **60**, 214–223.
31. Baker D.L., Powers J.G., Ransom J.I., McCann B.E., Oehler M.W., Brummer J.E., Galloway N.L., Eckery D.C., Nett T.M.: Reimmunization increases contraceptive effectiveness of gonadotropin-releasing hormone vaccine (GonaCon-Equine) in free-ranging horses (*Equus caballus*): Limitations and side effects. *PLoS One* 2018, **13**. DOI: 10.1371/journal.pone.0201570.
  32. Levy J.K., Friary J.A., Miller L.A., Tucker S.J., Fagerstone K.A.: Long-term fertility control in female cats with GonaCon™, a GnRH immunocontraceptive. *Theriogenology* 2011, **76**, 1517–1525.
  33. Benka V.A., Levy J.K.: Vaccines for feline contraception: GonaCon GnRH-hemocyanin conjugate immunocontraceptive. *J. Feline Med. Surg.* 2015, **17**, 758–765.
  34. Vansandt L., Kutzler M., Fischer A., Morris K., Swanson W.: Safety and effectiveness of a single and repeat intramuscular injection of a GnRH vaccine (GonaCon™) in adult female domestic cats. Proc. 8th Intern. Symp. on Canine and Feline Reprod., Paris, 2016, 225–225.
  35. Bender S.C., Bergman D.L., Wenning K.M., Miller L.A., Slate D., Jackson F.R., Rupprecht C.E.: No adverse effects of simultaneous vaccination with the immunocontraceptive GonaCon and a commercial rabies vaccine on rabies virus neutralizing antibody production in dogs. *Vaccine* 2009, **27**, 7210–7213.
  36. Vargas-Pino F., Gutiérrez-Cedillo V., Canales-Vargas E.J., Jorge F., Fuentes I., Gress-Ortega L.R., Miller L.A., Rupprecht C.E., Bender S.C., García-Reyna P., Ocampo-López J.: Concomitant administration of GonaCon™ and rabies vaccine in female dogs (*Canis familiaris*) in Mexico. *Vaccine* 2013, **31**, 4442–4447.
  37. Donovan C.E., Greer M., Kutzler M.A.: Physiologic responses following gonadotropin-releasing hormone immunization in intact male dogs. *Reprod. Domest. Anim.* 2012, **47**, Suppl. 6, 403–405.
  38. Robbins S.C., Jelinski M.D., Stotish R.L.: Assessment of the immunological and biological efficacy of two different doses of a recombinant GnRH vaccine in domestic male and female cats (*Felis catus*). *J. Reprod. Immunol.* 2004, **64**, 107–119.
  39. Siel D., Ubilla M.J., Vidal S., Loaiza A., Quiroga J., Cifuentes F., Hardman T., Lapiere L., Paredes R., Sáenz L.: Reproductive and behavioral evaluation of a new immunocastration dog vaccine. *Animals (Basel)* 2020, **10**. DOI: 10.3390/ani10020226.
  40. Ochoa J.S., Favre R.N., García M.F., Stornelli M.C., Sangache W.C., Rearte R., de la Sota L., Stornelli M.A.: Immunocontraception of male domestic cats using GnRH vaccine Improvac. *Theriogenology* 2023, **198**, 211–216.
  41. Munks M.W.: Utilizing vaccine vectors and other novel tools for feline contraception. Proc. 8th Intern. Symp. on Canine and Feline Reprod., Paris 2016, 20–21.
  42. Mahi-Brown C.A., Huang T.T. Jr, Yanagimachi R.: Infertility in bitches induced by active immunization with porcine zona pellucida. *J. Exp. Zool.* 1982, **222**, 89–95.
  43. Mahi-Brown C.A., Yanagimachi R., Hoffman J.C., Huang T.T. Jr: Fertility control in the bitch by active immunization with porcine zona pellucida: use of different adjuvants and patterns of estradiol and progesterone levels in estrous cycles. *Biol. Reprod.* 1985, **32**, 761–772.
  44. Srivastava N., Santhanam R., Sheela P., Mukund S., Thakral S.S., Mallick B.S., Gupta S.K.: Evaluation of the immunocontraceptive potential of *Escherichia coli*-expressed recombinant dog ZP2 and ZP3 in a homologous animal model. *Reproduction* 2002, **123**, 847–857.
  45. Gupta S.K., Srinivasan V.A., Suman P., Rajan S., Nagendrakumar S.B., Gupta N., Shrestha A., Joshi P., Panda A.K.: Contraceptive vaccines based on the zona pellucida glycoproteins for dogs and other wildlife population management. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011, **66**, 51–62.
  46. Levy J.K.: Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011, **66**, 63–70.
  47. Shrestha A., Srichandan S., Minhas V., Panda A.K., Gupta S.K.: Canine zona pellucida glycoprotein-3: up-scaled production, immunization strategy and its outcome on fertility. *Vaccine* 2015, **33**, 133–140.
  48. Hay B.A., Li J., Guo M.: Vectored gene delivery for lifetime animal contraception: Overview and hurdles to implementation. *Theriogenology* 2018, **112**, 63–74.
  49. Max A.: Praktyczne wykorzystanie wiedzy o hormonie antymüllerowskim. *Życie Wet.* 2017, **92**, 822–825.

---

Dr hab. Andrzej Max, emer. prof. nadzw. SGGW,  
e-mail: 1andrzejmax@wp.pl