

Biotechniki w rozrodzie kotowatych – stan wiedzy, perspektywy i wyzwania^{*)}

WOJCIECH NIŻAŃSKI, NATALIA MIKOŁAJEWSKA,
AGNIESZKA PARTYKA, MAŁGORZATA OCHOTA

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Niżański W., Mikołajewska N., Partyka A., Ochota M.

Biotechnologies in the reproduction of felines: State of knowledge, prospects and challenges

Summary

Owing to a drastic decline in the population of wild cats and a growing interest among cat breeders, the development of assisted reproductive techniques for felines has been an important subject of research over the last decade. In this paper we describe the present state of knowledge and prospects for development in this field. The paper is divided into sections dealing with the collection and preservation of semen, artificial insemination, oocyte collection, *in vitro* fertilization and cryopreservation of eggs. The paper also discusses the apoptotic events occurring in gametes, which are crucial for the development of assisted reproductive techniques.

Keywords: assisted reproductive techniques, cryopreservation, domestic cat, wild felids

W ostatnich latach obserwuje się na świecie, w tym w Polsce, szczególne zainteresowanie naukowe zagadnieniami rozrodu kotowatych (2, 15). Jest to spowodowane rosnącą od wielu lat populacją wartościowych pod względem hodowlanym kotów rasowych i w związku z tym rosnącym zapotrzebowaniem na stosowanie u tego gatunku technik wspomaganego rozrodu, wzorem psa domowego. Kojarzenie osobników dobranych pod względem hodowlanym, konserwacja i transport gamet oraz tworzenie rezerwy genetycznej cennych samców to wymogi dzisiejszych czasów, podyktowane zapotrzebowaniem ze strony ogromnej rzeszy hodowców kotów.

Z drugiej strony, wyniki prac dotyczących rozrodu kota domowego (*Felis domesticus*) stanowią cenną bazę naukową, możliwą do aplikacji w dziedzinie rozrodu dzikich kotowatych (4, 26). Warto przypomnieć, iż populacja dzikich kotowatych jest alarmująco niska, a wszystkie gatunki przedstawicieli rodziny *Felidae* zagrożone są wyginięciem. Prace dotyczące praktycznych metod wspomaganego rozrodu kota domowego są niezwykle cenne z punktu widzenia możliwości wdrożenia biotechnik rozrodu celem ratowania populacji zwierząt dzikich. Prowadzenie badań na zwierzętach dzikich jest bardzo trudne ze względu na wspomnianą wcześniej niską liczebność ich populacji. Kot domowy jest bardzo dobrym i łatwo osiągalnym mo-

delem biomedycznym do badań nad dzikimi kotowatymi, choć z punktu widzenia techniki badawczej nie jest gatunkiem łatwym. Wiele zespołów badawczych na całym świecie prowadzi badania nad rozrodem kota domowego (1, 3, 10, 12, 24, 29), aby później wprowadzać wypracowane procedury u zwierząt dzikich, żyjących w naturze lub utrzymywanych w ogrodach zoologicznych. W Polsce tego rodzaju badania w odniesieniu do omawianego gatunku prowadzone były niezwykle rzadko (11, 26).

Podstawowymi biotechnikami rozrodu, znajdującymi w perspektywie zastosowanie zarówno w zakresie potrzeb dotyczących hodowli kota domowego, jak i ratowania populacji zwierząt dzikich zagrożonych wyginięciem, są: pobieranie i konserwacja nasienia, sztuczna inseminacja, pobieranie i dojrzwienie oocytów *in vitro*, zapłodnienie pozaustrojowe, transfer zarodków oraz konserwacja komórek jajowych (24, 31).

Pobieranie i konserwacja nasienia

Największą przeszkodą metodyczną od początku zainteresowania naukowego omawianą dziedziną była niezwykle trudna technika pobierania nasienia od samców kota domowego. Stosowano w tym celu elektroejakulację, sztuczną pochwę lub pobieranie nasienia najądrzowego po zabiegu usunięcia gonad męskich (1, 4, 31-34). Niestety, żadna z powyższych technik nie jest wolna od wad. Elektroejakulacja jest metodą trud-

^{*)} Opracowanie wykonane w ramach projektu finansowanego przez MNiSW/NCN N N308 576540.

ną, wymaga pełnego znieczulenia, stoi w sprzeczności z szeroko pojętym dobrostanem zwierząt i nie jest akceptowana z powodów etycznych przez wielu badaczy i hodowców. Ponadto nie zawsze jakość nasienia uzyskanego tą metodą jest zadowalająca. Pobieranie przy użyciu sztucznej pochwy jest bardzo trudne technicznie i wymaga obecności samicy w okresie rui. Ponadto metoda ta nie może być zastosowana u dzikich kotowatych. Pobieranie nasienia najądrzowego jest możliwe do przeprowadzenia z istoty rzeczy jedynie jeden raz w życiu samca. Plemniki uzyskuje się poprzez wykonanie wielu nacięć w okolicy ogona najądrza i zanurzenie tkanki w medium zoptymalizowanym dla plemników, np. w rozrzedzalniku opartym na buforze Tris. Plemniki wykazujące ruch postępowy uwalniają się do medium i mogą być bezpośrednio lub po oczyszczeniu metodą migracji wstępującej – „swim up” poddane dalszym procedurom. Ze względu na możliwość tylko jednokrotnego wykorzystania tej techniki w życiu samca nie nadaje się ona do wykorzystania u zwierząt hodowlanych. Stosowana może być jednak u dzikich kotowatych w celu stworzenia rezerwy genetycznej padłych lub kastrowanych samców. W tym zakresie jest ona niezwykle cenną metodą biotechniczną i będzie prawdopodobnie wykorzystywana w dalszym ciągu w dużym zakresie w odniesieniu do tej grupy zwierząt.

W ostatnich latach opracowano nowatorską, niezwykle prostą i atraumatyczną metodę pobierania nasienia od samców kota domowego z cewki moczowej (4, 34). Metoda ta polega na podaniu medetomidyny – środka z grupy alfa-mimetyków stosowanych do bezpiecznego znieczulenia zwierząt. Leki alfa-mimetyczne wywierają wpływ kurczący na mięśniówkę gładką dróg wyprowadzających nasienie, powodując uwolnienie pozajądrowych rezerw plemników. Stwierdzono, że dawka ok. 150 mcg/kg m.c. powoduje wyrzut plemników do cewki moczowej w ilości odpowiedniej do pozyskania nasienia i jego konserwacji. Metoda ta może stanowić doskonałą technikę pobierania nasienia od kotów hodowlanych i dzikich kotowatych. Jest możliwe wielokrotne jej stosowanie u zwierząt hodowlanych, co daje sposobność wielokrotnej konserwacji dawek inseminacyjnych pochodzących od danego osobnika celem tworzenia banków nasienia cennych genetycznie samców. Metodę tę można zastosować u dzikich kotowatych, u których współcześnie podanie środka znieczulającego nie stanowi w praktyce żadnej przeszkody. Stwarza zatem możliwość przygotowywania dawek inseminacyjnych również od cennych samców zwierząt dzikich w aspekcie tworzenia ich rezerwy genetycznej.

Przeprowadzono pierwsze prace dotyczące oceny właściwości pobranego w ten sposób nasienia za pomocą metod mikroskopowej oceny konwencjonalnej, dokonano prób mrożenia tego rodzaju nasienia oraz porównano jego jakość z nasieniem pozyskanym za pomocą elektroejakulacji (31, 32).

U kotowatych stosuje się zwykle procedury krio-konserwacji nasienia oparte o technologie stosowane również u psowatych. Pierwsze próby mrożenia nasienia kota przewidywały wykorzystanie rozrzedzalnika laktozowego (15). Najczęściej wykorzystywane rozrzedzalniki oparte są na buforze Tris lub TEST (15, 34). Najkorzystniejsze wyniki jakości porozmrożeniowej stosuje się przy dodatku do rozrzedzalnika 20% (obj.) żółtka jaja kurzego, 4-8% (obj.) glicerolu i 1% (obj.) substancji zawierających laurylosiarczan sodu, takich jak Equex STM lub Orvus ES Paste (1, 22, 28, 33). Nasienie zwykle konfekcjonowane jest w 0,25 ml słomkach i mrożone w statycznych parach azotu lub urządzeniu do programowanego zamrażania (15). Na podstawie analizy dostępnego piśmiennictwa można sformułować konkluzję, iż najlepsze wyniki jakości porozmrożeniowej *in vitro* oraz najlepsze wyniki prób biologicznych udało się uzyskać przy zastosowaniu rozrzedzalnika Tris–kwas cytrynowy–glukoza/fruktoza–żółtko jaja kurzego–glicerol z dodatkiem Equex STM i konfekcjonowaniu w słomkach (1, 8, 33).

Sztuczna inseminacja

Pierwsze zabiegi sztucznej inseminacji u kotów przeprowadzono ponad 30 lat temu (31). Niestety, jak dotąd biotechniki rozrodu u tego gatunku miały charakter eksperymentalny, a ich wykorzystanie w praktyce jest niezwykle ograniczone (28, 31). Pomimo licznych badań w tym zakresie i ogromnego zainteresowania wielu środowisk hodowlanych i naukowych aplikacja powyższych prac w odniesieniu do kotów rasowych i dzikich kotowatych jest niewielka. Procedury biotechniczne stosowane są w praktyce rzadko i w sposób przypadkowy. Jest to spowodowane faktem, iż zabieg sztucznej inseminacji jest technicznie niezwykle trudny. Dotyczy to zwłaszcza inseminacji domacicznej. Wykorzystanie nasienia poddanego konserwacji wymaga zastosowania domacicznego zdeponowania nasienia. Trudność ta została częściowo opanowana dzięki opracowaniu skutecznej metody kateteryzacji szyjki macicznej przez Chatdaronga i wsp. (2). Zaproponowana technika inseminacji domacicznej wymaga jednak dużych umiejętności manualnych, co każe patrzeć z pesymizmem na szybką perspektywę upowszechnienia tej procedury. W tym zakresie atrakcyjną alternatywą sztucznej inseminacji jest laparoskopowy transfer zarodków po przeprowadzeniu procedury pozyskania, dojrzewania oocytów i zapłodnienia *in vitro*. Należy mieć na względzie dość wysoką skuteczność tego rodzaju zabiegu notowaną już od wielu lat (24).

Pozyskiwanie komórek jajowych, dojrzewanie i zapłodnienie pozaustrojowe

Badania dotyczące pozyskiwania oocytów u kotowatych, ich dojrzewania (*in vitro* maturation – IVM) i zapłodnienia *in vitro* (*in vitro* fertilization – IVF) pro-

wadzone są od wielu lat. Prace mające na celu określenie optymalnych mediów służących dojrzewaniu oocytów i rozwojowi zarodków kota domowego w warunkach pozaustrojowych trwają nieprzerwanie w wielu jednostkach badawczych na świecie (4, 24, 34). Wśród warunków dojrzewania autorzy proponują środowisko powietrza z 5% zawartością CO₂ lub środowisko 90% N₂ z 5% zawartością CO₂ i 5% zawartością O₂ oraz temperaturę od 38°C do 38,5°C. Hodowle prowadzi się w medium do dojrzewania, np. TCM 199 lub SOF z dodatkiem gonadotropin (5, 11, 23). Inkubacja oocytów w tych warunkach przez okres 24 godzin pozwala uzyskać około 50-70% mejotycznie kompetentnych oocytów w metafazie II podziału mejotycznego. Po 18-godzinnej inkubacji z plemnikami około 30-50% oocytów ulega zapłodnieniu. W czasie dalszej inkubacji trwającej do 7 dni stadium blastocysty osiąga maksymalnie do 20% zarodków (4, 12, 26, 30). Inną, coraz częściej stosowaną w badaniach nad rozrodem kotowatych, techniką zapłodnienia pozaustrojowego jest ICSI (intracytoplasmic sperm injection). Polega ona na wstrzyknięciu plemnika do komórki jajowej w stadium metafazy II. Uzyskiwane przy użyciu tej metody odsetki zapłodnień są nieco wyższe niż w przypadku IVF (około 40-60% zapłodnień, 25% blastocyst) (18), lecz do wykonania iniekcji niezbędne jest posiadanie kosztownego sprzętu do mikromanipulacji. Do technik IVM/IVF/ICSI selekcjonuje się jedynie najlepszej jakości oocyty posiadające ciemną, jednorodną cytoplazmę, otoczone kilkoma warstwami komórek wzgórka jajonośnego, ponieważ w takiej sytuacji istnieje najwyższa szansa na prawidłowy ich rozwój (18). Skuteczność zapłodnienia *in vitro* oceniana jest zwykle poprzez ocenę zmian morfologicznych zachodzących podczas bruzdkowania (podział na 2 lub więcej blastomerów). Dodatkowo ocenę skuteczności dojrzewania i zapłodnienia pozaustrojowego można przeprowadzić przy użyciu metod fluorescencyjnych z użyciem barwników typu: DAPI, Hoechst lub jodek propidyny. W zabarwionych komórkach jajowych lub zarodkach oceniamy obecność ciała kierunkowego, świadczącego o dojrzałości jądrowej oocytu, dwóch przedjądrzy lub podziału na blastomery (4). Ponadto zapłodnione i podlegające podziałom komórkowym zarodki można oceniać przy użyciu mikroskopu odwróconego lub utrwalac, barwić i oceniać przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego na dowolnym etapie rozwoju. Ocena odsetka zarodków, które rozwinęły się do stadium moruli lub blastocysty, jest niezwykle istotna z punktu widzenia badań związanych z transferem zarodków (4, 34).

Kriokonserwacja komórek jajowych

Bardzo istotną częścią technik wspomaganego rozrodu jest kriokonserwacja komórek jajowych. Możliwość czasowego rozdzielania procesu pobierania komórek jajowych od procesu zapłodnienia byłaby znacznym ułatwieniem w pracach nad zapłodnieniem

pozaustrojowym dzikich kotowatych. Niestety, ze względu na budowę komórki jajowej osobników rodziny *Felidae* charakteryzującą się dużą zawartością lipidów w ooplazmie, zdekondensowaną chromatyną oraz stosunkowo dużym pęcherzykiem zarodkowym w porównaniu z innymi gatunkami, komórki te są trudnym materiałem do kriokonserwacji (14). Pośród technik kriokonserwacji stosowanych u kotowatych wyróżnia się wolne mrożenie programowane oraz witrifikację. Pierwsza metoda polega na stopniowym, kontrolowanym obniżaniu temperatury w urządzeniu do programowanego zamrażania, po uprzedniej inkubacji oocytów w mediach z kilkuprocentowym dodatkiem substancji kriochronnych. Druga polega na zanurzeniu komórek jajowych w ciekłym azocie, po krótkotrwałej inkubacji w wysoko stężonych (około 30-40%) substancjach kriochronnych. Każda z powyższych metod posiada zarówno swoich zwolenników, jaki i przeciwników, a odsetki zapłodnień uzyskanych po ich zastosowaniu są w obu przypadkach nadal niskie w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt lub człowiekiem, dlatego konieczne są dalsze badania w tej dziedzinie (15).

Zjawiska apoptotyczne w gametach zwierząt kotowatych

W komórkach gametogenicznych obserwowany jest różny stopień nasilenia zjawisk peroksydacji lipidów i apoptozy. Zjawiska apoptotyczne podczas procesu spermatogenezy uzależnione są od wielu czynników, m.in. oddziaływania reaktywnych form tlenu, pory roku u zwierząt z wyrażoną sezonowością rozrodu, zmian zwyrodnieniowych w gonadach, oddziaływania substancji toksycznych, stanu zdrowia zwierzęcia, obecności procesów patologicznych w narządzie płciowym, np. zapalenia itp. (7, 9, 27). W nasieniu poddanym procedurom biotechnicznym nasilenie procesów proapoptotycznych uzależnione jest od wyjściowej jakości pobranego nasienia, warunków postępowania z nasieniem w warunkach *in vitro*, metody konserwacji, optymalizacji procesu mrożenia-rozmrażania, oddziaływania reaktywnych form tlenu (7, 20, 27). Peroksydacja lipidów i białek, uszkodzenia błon i kwasów nukleinowych, do których dochodzi podczas pobierania i konserwacji nasienia pod wpływem niekorzystnych warunków środowiska w warunkach *in vitro*, w tym oddziaływania wolnych rodników, prowadzi do uruchomienia zjawisk prowadzących do destrukcji komórek w sposób nasuwający przypuszczenie uruchomienia przemian analogicznych do apoptozy. Procesy te prowadzić mogą do powolnej dezintegracji komórek i utraty ich prawidłowej funkcji w stopniu uniemożliwiającym zdolność do zapłodnienia. Ocena nasilenia powyższych zjawisk w nasieniu kotów poddanym procedurom biotechnicznym poruszana była dotychczas w dostępnym piśmiennictwie niezwykle rzadko (26). Jest powszechnie wiadome, że źródłem czynników ochronnych, dekapacytacyjnych i chronią-

cych plemniki przed peroksydacją lipidów jest plazma nasienia. Plemniki stanowiące rezerwy pozajądrowe i pozyskane za pomocą cewnikowania, jak i pozyskane bezpośrednio z najądrzy pozbawione są niemal zupełnie plazmy. Stąd odpowiedzi wymaga pytanie, czy potencjalnie większe narażenie gamet na oddziaływanie czynników proapoptotycznych i ograniczenie oddziaływania czynników antyapoptotycznych nie powoduje nasilenia procesów destrukcyjnych i nie uniemożliwia wykorzystania plemników do celów biotechnicznych. Z drugiej strony, jeśli nasilenie powyższych zjawisk powodujących zmiany w komórkach podobne do obserwowanych podczas apoptozy jest szczególnie duże, należałoby podjąć pracę nad ich ograniczeniem w nasieniu pobranym omawianymi metodami. Procesy apoptotyczne związane są z uwolnieniem cytochromu c z błon mitochondrialnych. Uruchamia to szlak aktywacji kaspaz. Udział w programowanej śmierci komórki biorą m.in. kaspazy 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9. Wśród efektów uruchomienia szlaku apoptotycznego najłatwiejsze do detekcji są: przesunięcie fosfatydylloseryny na zewnątrz plazmolemy, fragmentacja DNA i zmiany potencjału mitochondrialnego. Wśród najważniejszych czynników regulujących nasilenie procesów apoptotycznych są białka grupy Bcl-2 pro- i antyapoptotyczne. Białka proapoptotyczne, m.in. Bax, Bad, Bak, indukują kaspazozależny rozpad struktury DNA. Białka hamujące powyższe procesy, tzw. białka antyapoptotyczne, to m.in. Bcl-2l i Bcl-xl (9, 19). Określenie stopnia ekspresji genów białek pro- i antyapoptotycznych uzupełnione o ocenę markerów apoptozy i aktywność kaspaz daje możliwie komplementarny i miarodajny obraz nasilenia procesów apoptotycznych i działania systemu regulacji tych zjawisk.

Kontrowersje budzi twierdzenie, iż w transkrypcyjnie nieaktywnych ejakulowanych plemnikach poddanych konserwacji, szczególnie kriokonserwacji, zachodzi klasyczny szlak apoptotyczny. W plemnikach ejakulowanych bowiem wykryto obecność tylko niektórych substancji biorących udział w procesie programowanej śmierci komórki. Z drugiej strony, potwierdzono, iż kriokonserwacja powoduje wiele zmian destrukcyjnych gamet, które są specyficzne dla apoptozy i jako takie łatwo mogą być wykrywane za pomocą stosowanych dość powszechnie testów *in vitro* służących ocenie nasilenia procesu apoptotycznego. Udowodniono, że mrożenie-rozmrażanie męskich gamet indukują procesy, takie jak: spadek potencjału transbłonowego mitochondrium, wzrost przepuszczalności błon i aktywację kaspaz (16, 17). Zaproponowano, aby zjawiska te objąć nazwą „zmiany podobne do apoptozy” (apoptosis-like changes). Zmiany te przypominają następstwa mechanizmów zachodzących podczas fazy wykonawczej (efektorowej) i wczesnej fazy degradacyjnej (zniszczenia) apoptozy komórek somatycznych. Obniżenie potencjału transbłonowego mitochondrium prawdopodobnie powoduje uwalnianie czynników proapoptotycznych w gametach (16, 25).

W plemnikach buhajów potwierdzono obecność czynnika proapoptycznego Bax, jednak ilości czynnika antyapoptycznego Bcl-2 są śladowe lub ich brak. Podobnie okazało się, że plemniki ejakulowane zawierają cytochrom c oraz czynnik indukujący apoptozę AIF (apoptosis inducing factor), który zaangażowany jest w aktywację kaspazy 9. Natomiast w ejakulowanych plemnikach buhaja nie wykryto kaspazy 8 zaangażowanej w szlak błonowy oraz kaspazy 3 – niezwykle istotnego czynnika fazy efektorowej apoptozy (16, 17). Rozważa się zatem, iż być może szlak zjawisk podobnych do apoptozy, obserwowany jako wynik kriokonserwacji, jest szlakiem alternatywnym, w którym zaangażowane są: kaspaza 7 i kaspaza 10 (17). Kluczowy dla powyższych rozważań wydaje się fakt, że w plemnikach ejakulowanych wykryto prokaspazę 9 i aktywną formę kaspazy 9 zaangażowane w szlak mitochondrialny apoptozy. Co więcej, kriokonserwacja plemników powoduje dalsze zwiększenie puli aktywnej kaspazy 9, co pozwala wysunąć hipotezę, iż prawdopodobnie kriokonserwacja nasila mitochondrialny szlak apoptozy (35). Godny podkreślenia jest fakt, że proces mrożenia-rozmrażania przyczynia się do aktywacji kaspazy 3 i kaspazy 8 w plemnikach człowieka (21).

Reasumując należy stwierdzić, że proces kriokonserwacji plemników indukują wiele zjawisk typowych dla apoptozy i wzmacnia aktywność czynników proapoptycznych. Istnieją przesłanki nasuwające przypuszczenie uruchomienia szlaku mitochondrialnego programowanej śmierci komórek w wyniku konserwacji nasienia. Z drugiej strony, dotychczas nie potwierdzono w ejakulowanym nasieniu wielu czynników niezbędnych dla prawidłowego przebiegu apoptozy. Przychylić się zatem można do ostrożnego twierdzenia, że pojedyncze specyficzne przejawy apoptozy wykrywane dość łatwo w plemnikach poddanych kriokonserwacji za pomocą testów *in vitro*, traktować należy nie jako dowód uruchomienia pełnego szlaku programowanej śmierci komórki, a raczej jako wskaźniki przydatne w ocenie zmian jakości nasienia w trakcie konserwacji.

Podsumowanie

Od 1979 r., kiedy grupa Kraemer i wsp. (13) dokonała skutecznego embriotransferu zarodków kota domowego, poczyniono duży postęp w dziedzinie technik wspomaganego rozrodu zwierząt kotowatych. W 1988 r. (6) udało się uzyskać pierwszy miot uzyskany po embriotransferze zarodków zapłodnionych pozaustrojowo. Ponadto udało się uzyskać mioty 9 gatunków dzikich kotowatych po embriotransferze zarodków zapłodnionych pozaustrojowo, co potwierdza zasadność prac nad technikami wspomaganego rozrodu jako narzędzia w walce o ratowanie populacji ginących gatunków (23). Nadal istnieje wiele niewiadomych oraz wyzwań związanych z opisaną w powyższej pracy dziedziną, dlatego zarówno ze względu na

ochronę ginących gatunków, jak i postęp hodowlany, badania nad rozwojem technik wspomaganego rozrodu zwierząt kotowatych powinny być istotnym celem nauk weterynaryjnych w XXI wieku.

Piśmiennictwo

- Axner E., Hermansson U., Linde-Forsberg C.: The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2004, 84, 179-191.
- Chatdarong K., Axner E., Manee-In S., Thuwanut P., Linde-Forsberg C.: Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen. *Theriogenology* 2007, 68, 1326-1333.
- Filliers M., Rijsselaere T., Bossaert P., Causmaecker V. de, Dewulf J., Pope C. E., Van Soom A.: Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4°C) on sper quality. *Theriogenology* 2008, 70, 1550-1559.
- Filliers M., Rijsselaere T., Bossaert P., Zambelli D., Anastasi P., Hoogewijs M., Van Soom A.: In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. *Theriogenology* 2010, 74, 31-39.
- Freistedt P., Stojkovic P., Wolf E., Stojkovic M.: Energy status of nonmatured and in vitro-matured domestic cat oocytes and of different stages of in vitro-produced embryos: enzymatic removal of the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts. *Biol. Reprod.* 2001, 65, 793-798.
- Goodrowe K. L., Wall R. J., O'Brien S. J., Schmidt P. M., Wildt D. E.: Developmental competence of domestic cat follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 1988, 39, 355-372.
- Grunewald S., Reinhardt M., Blumenauer V., Hmeidani A. F., Glander H.-J., Paasch U.: Effects of post-density gradient swim-up on apoptosis signaling in human spermatozoa. *Andrologia* 2010, 42, 127-131.
- Hermansson U., Axner E.: Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. *Theriogenology* 2007, 67, 1239-1248.
- Jeong Y.-J., Kim M.-K., Song H.-J., Kang E.-J., Ock S.-A., Kumar B. M., Balasubramanian S., Rho G.-J.: Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 2009, 58, 181-189.
- Jewgenow K., Neubauer K., Blottner S., Scon J., Wildt D. E., Pukazhenti B. S.: Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the teratospermic domestic cat. *J. Andrology* 2009, 30, 460-468.
- Kątska-Książkiewicz L., Ryńska B., Kania G., Smorąg Z., Gajda B., Pieńkowski M.: Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes. *Theriogenology* 2003, 59, 1567-1574.
- Karja N. W. K., Otoi T., Murakami M., Fahrudin M., Suzuki T.: In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology* 2002, 57, 2289-2298.
- Kraemer D. C., Flow B. L., Schriver M. D., Kinney G. M., Pennycook J. W.: Embryo transfer in the nonhuman primate, feline and canine. *Theriogenology* 1979, 11, 51-62.
- Luvoni G. C.: Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reprod. Nutr. Dev.* 2000, 40, 505-512.
- Luvoni G. C.: Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 2006, 66, 101-111.
- Martin G., Cagnon N., Sabido O., Sion B., Grizard G., Durand P., Levy R.: Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Hum. Rep.* 2007, 22, 380-388.
- Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R.: Cryopreservation induces an apoptotic-like mechanism in bull sperm. *Biol. Reprod.* 2004, 71, 28-37.
- Opiela J., Kątska-Książkiewicz L.: Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego. Cz. II. Regulacja dojrzałości cytoplazmatycznej i genomowej. *Biotechnologia* 2005, 69, 151-162.
- Opiela J., Kątska-Książkiewicz L.: Rola białek rodziny BCL-2 w kontroli apoptozy w pęcherzykach jajnikowych. *Biotechnologia* 2006, 72, 90-96.
- Ortega-Ferusola C., Garcia B. M., Gallardo-Bolanos J. M., Gonzales-Fernandez, Rodriguez-Martinez H., Tapia J. A., Pena F. J.: Apoptotic markers can be used to forecast the freezability of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2009, 114, 393-403.
- Paasch U., Sharma R. K., Gupta A. K., Grunewald S., Mascha E. J., Thomas A. J. Jr, Glander H. J., Agarwal A.: Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2004, 71, 1828-1837.
- Ponglowhapan S., Chatdarong K.: Effects of Equex STM paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology* 2008, 69, 666-672.
- Pope C. E.: Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 2000, 53, 163-174.
- Pope C. E., McRae M. A., Plair B. L., Keller G. L., Dresser B. L.: In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J. Reprod. Fert.* 1997, 51, 69-82.
- Ravagnan L., Roumier T., Kroemer G.: Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cell Physiol.* 2002, 192, 131-137.
- Siemieniuch M., Dubiel A.: Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 99, 135-144.
- Thuwanut P., Chatdarong K., Techakumphu M., Axner E.: The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology* 2008, 70, 233-240.
- Tsutsui T.: Artificial insemination in the domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology* 2006, 66, 122-125.
- Vilaverde A. I. S. B., Melo C. M., Martin I., Ferreira T. H., Papa F. O., Taconeli C. A., Lopes M. D.: Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). *Anim. Reprod. Sci.* 2009, 114, 434-442.
- Wood T. C., Wildt D. E.: Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1997, 110, 355-360.
- Zambelli D.: Feline semen collection, freezing and insemination. *Proc. 7th EVSSAR Congress, Louvain Le Neuve, 14-15 May 2010, s. 26-28.*
- Zambelli D., Cunto M., Prati F., Merlo B.: Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology* 2007, 68, 796-803.
- Zambelli D., Iacono E., Raccagni R., Merlo B.: Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. *Theriogenology* 2010, 74, 886-892.
- Zambelli D., Prati F., Cunto M., Iacono E., Merlo B.: Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology* 2008, 69, 485-490.
- Zou H., Li Y., Liu X., Wang X.: An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 11549-11556.

Adres autora: dr hab. Wojciech Nizański prof. nadzw., pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław; e-mail: wojciech.nizanski@up.wroc.pl