

Współczesne poglądy na możliwości stymulacji rui i owulacji u kotowatych poddanych technikom wspomaganego rozrodu*)

SYLWIA PROCHOWSKA, MAŁGORZATA OCHOTA, WOJCIECH NIŻAŃSKI

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Prochowska S., Ochota M., Niżański W.

Current views on the possibility of the stimulation of estrus and ovulation in felines submitted to assisted reproductive techniques

Summary

The use of assisted reproductive techniques in wild felids (*Felidae*) is currently the subject of research in many scientific centers all around the world. Despite the described success, the pregnancy rates obtained as the result of artificial insemination or embryo transfer are low and the litters are small, which is a limiting factor for wider use of reproduction biotechnology in wild felids. The lack of sufficient knowledge about endocrinology of individual members of the *Felidae* family and the inability to optimize female hormonal stimulation is given as a reason of failure by many authors. This paper presents methods of control of ovarian cycle in wild animals, characteristic features of reproduction of the family *Felidae*, and methods of the induction of estrus and ovulation. The paper also draws attention to endocrine disorders that occur in felines after hormonal stimulation and describes attempts to minimize them by prestimulatory down-regulation of ovarian activity.

Keywords: ovarian cycle, felines, estrus and ovulation stimulation

Biotechnologia rozrodu kotowatych (*Felidae*) stanowi obecnie dynamicznie rozwijającą się dziedzinę nauki. Spowodowane jest to, z jednej strony, wzrastającą presją ze strony hodowców kotów rasowych, z drugiej – rosnącym zainteresowaniem wielu organizacji zajmujących się ratowaniem ginących gatunków dzikich kotowatych. Spośród 37 przedstawicieli rodziny *Felidae* 36 gatunków jest zagrożonych wyginięciem na części lub całym obszarze swojego występowania, a próby rozmnażania osobników trzymanyh w niewoli napotykaają szereg trudności i często kończą się niepowodzeniem (7). Nic więc dziwnego, że wiele ośrodków na całym świecie prowadzi badania nad biotechnikami rozrodu kota domowego, podkreślając, że osiągnięcia w tej dziedzinie będą miały kluczowe znaczenie dla ratowania populacji zwierząt dzikich.

Niestety, skuteczność sztucznej inseminacji czy embriotransferu u dzikich kotowatych jest niska w porównaniu do rezultatów osiąganych u kota domowego (30). Niski odsetek uzyskiwanych ciąży oraz mało liczne mioty (9, 29) są największym ograniczeniem w rutynowym stosowaniu wym. technik w rozrodzie dzikich kotowatych.

Wielu autorów podkreśla, że możliwą przyczyną tego stanu rzeczy jest brak dostatecznej i dogłębnej znajomości endokrynologicznych aspektów rozrodu poszczególnych przedstawicieli rodziny *Felidae* (37) oraz trudności dotyczące stymulacji hormonalnej samicy (7, 14, 30, 39, 40). Z tego powodu opracowanie poświęcono endokrynnym aspektom stosowania biotechnik rozrodu.

Metody kontroli cyklu

Monitorowanie aktywności jajników stanowi istotny element badań nad rozrodem kotowatych. Jest podstawą do poznania gatunkowo-specyficznej charakterystyki cyklu, a także pozwala na zastosowanie biotechnik rozrodu w optymalnym momencie oraz na ocenę skuteczności zastosowanych protokołów (3).

Do ustalenia statusu hormonalnego samicy oraz do określenia charakterystyki cyklu wykorzystywane są takie metody, jak: obserwacja wystąpienia charakterystycznych objawów rujowych (37, 42), oznaczenie poziomu hormonów płciowych w surowicy (2, 34-37) oraz pomiar stężenia hormonów płciowych i ich metabolitów w kale (5-8, 20, 25-27, 33).

Należy zaznaczyć, że ze względu na niepodważalne zalety pomiaru metabolitów hormonów płciowych

*) Opracowanie wykonane w ramach projektu finansowanego przez MNiSW NCN N N308 576540.

w kale, takie jak: łatwość pozyskania próbek, brak konieczności wprowadzenia zwierzęcia w znieczulenie, nieinwazyjność, mniejsza zależność otrzymanych wyników od dobowych wahań hormonów, stało się to metodą z wyboru w endokrynologii zwierząt dzikich (3, 17).

Fizjologia cyklu samic rodziny *Felidae*

Wspomniane wcześniej badania, pomimo że w większości przeprowadzone na małej liczbie osobników, pozwoliły na poznanie charakterystyki cyklu rujowego i profilu hormonalnego większości przedstawicieli rodziny *Felidae*. Generalnie można przyjąć, że cykl jajnikowy tzw. małych kotów (podrodzina *Felinae*) trwa 10-20 dni (5, 8, 17, 19, 20, 26, 27, 33, 38), natomiast u tzw. dużych kotów (podrodzina *Pantherinae*) jest dłuższy, bo ok. 3-4-tygodniowy (7, 16, 29, 34, 35, 37). Ruja u wszystkich kotowatych charakteryzuje się dużą rozpiętością czasu trwania – od 2 do 10 dni (5, 7, 8, 16, 17, 19, 26, 27, 29, 33-35, 37, 38). Długość ciąży koreluje dodatnio z masą ciała danego przedstawiciela *Felidae*. U najmniejszych kotowatych ciąża trwa ok. 60-63 dni (19, 20), u średnich (np. u pumy (*Puma concolor*), geparda (*Acinonyx jubatus*), pantery mglistej (*Neofelis nebulosa*), pantery śnieżnej (*Panthera uncia*)) trwa ok. 90-100 dni (2, 6-8, 24-26), a u największych (lwa (*Panthera leo*) i tygrysa (*Panthera tigris*)) ok. 110 dni (10, 16, 36). Długość nieciążnej fazy lutealnej równa jest od 1/2 do 2/3 długości ciąży (2, 7, 8, 16, 25, 33). Pomimo zbieżności ogólnego wzorca należy mieć na uwadze różnice międzygatunkowe w obrębie podrodziny oraz wyjątki od podanej reguły, np. u pumy, zaliczanej do *Felinae*, cykl jajnikowy trwa ok. 23 dni (2).

Istotne różnice w obrębie rodziny *Felidae* występują w czasie trwania sezonu rozrodczego. Najkrótszym, trzymiesięcznym okresem aktywności rozrodczej charakteryzuje się manul (*Otocolobus manul*) (5), najdłuższym zaś (9 miesięcy) pantera mglista (7). Niektóre z *Felidae* wykazują cykliczną aktywność jajnikową przez cały rok, jak np. lew (36), lampart (*Panthera pardus*) (35), gepard (8), puma (2), margaj (*Leopardus wiedii*), ocelot (*Leopardus pardalis*).

Poszczególne przedstawiciele kotowatych różnią się także pod względem częstości występowania spontanicznej owulacji. W początkach badań nad kotem domowym stwierdzono, że należy on do gatunków o indukowanej owulacji, jednak z czasem kolejne badania pokazywały, że częstotliwość spontanicznej owulacji może sięgać nawet 67% (18). Wśród dzikich kotowatych widoczne są duże różnice międzygatunkowe oraz osobnicze pod tym względem (3). Do gatunków, u których spontaniczna owulacja notowana jest relatywnie często, należą: lew (36), pantera mglista (7, 22, 24, 29), lampart (35), margaj (27), manul (5), taraj (*Prionailurus viverrinus*) (33), kot czarnołapy (*Felis nigripes*) (19). Z kolei u gepardów (8, 26), kota tygrysięgo (27), ocelota (27), pantery śnieżnej (34),

jaguara (*Panthera onca*) (42), pumy (2), tygrysa (16, 37) i kota arabskiego (*Felis margarita*) (19) nie odnotowano występowania takiego fenomenu lub zdarza się on bardzo rzadko.

Zmiana owulacji z indukowanej na spontaniczną może nastąpić pod wpływem trzymania samic w parach (29, 36, 35), zmiany środowiska lub stresu związanego z obezwładnianiem zwierzęcia czy zabiegami weterynaryjnymi (33).

Częstość występowania spontanicznej owulacji jest bardzo istotna z punktu widzenia zastosowania biotechnik rozrodu, gdyż zaobserwowano, że spontaniczna owulacja mająca miejsce tuż przed zastosowaniem stymulacji hormonalnej powoduje gorszą odpowiedź jajników na zastosowane gonadotropiny (7, 38, 43) oraz jest odpowiedzialna za nieskuteczne unasiennianie (24).

Sterowanie cyklem rozrodczym

Biorąc pod uwagę charakterystyczne cechy rozrodu kotowatych, umiejętność precyzyjnego sterowania cyklem rozrodczym nabiera kluczowego znaczenia w kontekście zastosowania takich technik, jak: sztuczna inseminacja (AI – artificial insemination), zapłodnienie i hodowla zarodków *in vitro* (IVF – in vitro fertilization, EC – embryoculture) czy transfer zarodków (ET – embriotransfer) (30).

Ponieważ niektóre gatunki kotowatych wykazują sezonowość rozrodu i należą do tzw. samic długiego dnia, można pobudzić aktywność jajników za pomocą zwiększenia ekspozycji na światło do minimum 12 godzin dziennie (5, 7, 37). Nie jest to jednak metoda precyzyjna i niezawodna, dlatego w biotechnikach rozrodu w celu indukcji rui i owulacji stosuje się metody farmakologiczne.

Stymulacja hormonalna

Do stymulacji dojrzewania pęcherzyków stosuje się gonadotropinę kosmówkową żrebnych kłaczy (eCG) (1, 14, 16, 24, 32) oraz hormon folikulotropowy pozyskany od świń (pFSH) (9, 15, 43). Z kolei w celu wywołania dojrzewania pęcherzyków i indukcji owulacji używa się ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG) (13, 32, 43) oraz hormonu luteinizującego pozyskanego od świń (pLH) (9). Były również próby zastosowania gonadoliberyny (GnRH) (4, 42) oraz jej analogów (29).

Wadą hormonów przysadkowych (pFSH, pLH) jest konieczność ich wielokrotnego podania (1-2 razy dziennie przez 3-6 dni), a stres związany z powtarzającymi się iniekcjami może odbić się negatywnie na odpowiedzi jajników na stymulację (9), dlatego też są rzadziej stosowane. Z kolei przedłużone działanie eCG i hCG może być odpowiedzialne za nadmierną stymulację jajników, czego nie zauważono przy stosowaniu pFSH u gepardów (43) i tygrysów (9).

Najczęściej używany protokół zakłada pojedynczą iniekcję eCG, z następującą 80-84 godz. po niej iniek-

Tab. 1. Przykładowe protokoły stymulacji rui i owulacji u kotowatych

Gatunek	Masa ciała	Indukcja dojrzewania pęcherzyków	Indukcja owulacji	Źródło
Kot domowy (<i>Felis catus s. domesticus</i>)	ok 3 kg	eCG 100 IU eCG 150 IU pFSH 20 mg 1 × dziennie przez 5 dni	hCG 75 IU po 80 godz. hCG 100 IU po 80-84 godz. hCG 250 IU 2.-3. dnia rui	(18, 17, 21) (14, 39) (15)
Kot czarnołaty (<i>Felis nigripes</i>)	0,8-1,2 kg	eCG 100 IU	hCG 75 IU po 84-86 godz.	(20)
Kot piaskowy (<i>Felis margarita</i>)	1,4-3,1 kg	eCG 150 IU	hCG 100 IU po 84-86 godz.	(20)
Manul (<i>Otocolobus manul</i>)	2,5-3,5 kg	eCG 100 IU eCG 300 IU	hCG 75 IU po 80 godz. hCG 150 IU po 80 godz.	(5)
Taraj (<i>Prionailurus viverrinus</i>)	8 kg	eCG 150 IU	hCG 100 IU po 80 godz	(33)
Pantera mglista (<i>Neofelis nebulosa</i>)	11-23 kg	eCG 50-100 IU	hCG 75 IU po 80 godz.	(7, 22, 29)
Ocelot (<i>Leopardus pardalis</i>)	12-16 kg	eCG 200 IU eCG 400 IU eCG 500 IU	hCG 150 IU po 80 godz. hCG 150 IU po 80 godz. hCG 250 IU po 80 godz.	(40)
Gepard (<i>Acinonyx jubatus</i>)	30-45 kg	eCG 200 IU eCG 400 IU pFSH 10 mg 1 × dziennie przez 5 dni	hCG 100 IU po 80 godz. hCG 250 IU po 80 godz. hCG 500 IU, 6. i 7. dzień	(8, 23, 24) (23, 24) (43)
Puma (<i>Puma concolor</i>)	35-50 kg	eCG 100 lub 200 IU eCG 1250 IU	hCG 100 IU po 80 godz. hCG 1000 IU po 72 godz.	(1) (2)
Lew (<i>Panthera leo</i>)	100-160 kg	eCG 1600 IU	hCG 1000 IU po 71-74 godz.	(32)
Tygrys (<i>Panthera tigris</i>)	100-160 kg	eCG 1000 IU eCG 2500 IU pFSH 20 IU, po 14 h – 15 IU, po 24 h – 10 IU, po 24 h – 5 IU	hCG 750 lub 1000 IU po 80 godz. hCG 2000 IU po 84 godz. pLH 25 IU po 80 godz. pierwszej iniekcji pFSH	(10, 16) (12) (9)

cją hCG (30). Metoda ta została opracowana dla kota domowego jako postępowanie przed sztuczną inseminacją (21), a następnie zaadaptowana dla dzikich kotowatych i z powodzeniem (ciąża) zastosowana m.in. u: geparda (23, 24), pantery mglistej (22), tygrysa (12), pumy (1, 2) i ocelota (40). Przykładowe dawkowanie przedstawiono w tab. 1.

Owulacja u kota domowego następuje po 25-30 godzinach od iniekcji hCG (21). U dzikich kotowatych może wystąpić w podobnym czasie – po 24-26 godz. (2, 12, 43), lecz zwykle występuje później – ok. 37(40)-48 godz. od iniekcji hCG (1, 2, 10, 22, 23, 32). Znajomość momentu wystąpienia owulacji ma istotne znaczenie – kotki inseminowane po owulacji (31-50 godz. po iniekcji hCG) produkują nawet ponad 10-krotnie więcej zarodków, a prawdopodobieństwo uzyskania ciąży wzrasta ponad trzykrotnie w porównaniu do kotek inseminowanych przed owulacją (21). Może być to spowodowane hamującym wpływem znieczulenia na owulację (21-23, 31) i/lub samego zabiegu sztucznej inseminacji (21, 31).

Zaburzenia towarzyszące stymulacji hormonalnej

Niestety, odpowiedź samicy na podanie egzogennych gonadotropin jest różna u różnych gatunków dzikich kotowatych (24), jak również pomiędzy poszczególnymi osobnikami (12). Najlepsza odpowiedź cechuje gepardy. U nich odsetek ciąż uzyskanych w wyniku sztucznej inseminacji jest najwyższy (8, 23), porównywalny z uzyskiwanym u kota domowego. U pozostałych gatunków (oraz u części gepardów i kotów domowych) stymulacja hormonalna wiąże się z szeregiem zaburzeń endokrynologicznych, mogących

odbijać się negatywnie na późniejszym rozwoju ciąży i zarodka.

Najczęściej obserwowanymi nieprawidłowościami są: nadmierna stymulacja jajników, objawiająca się dojrzewaniem większej liczby pęcherzyków oraz formowaniem licznych ciałek żółtych (14, 17, 20, 31, 41), podwyższone i/lub przedłużone stężenie estrogenów przed owulacją (2, 12, 16, 17, 21, 33, 38, 40), przedwczesna i/lub nadmierna sekrecja progesteronu (7, 14-16, 33, 38, 40), przedłużona nieciążowa faza lutealna z podwyższonym stężeniem progesteronu oraz niewydolność lutealna jajników prowadząca do przedwczesnej luteolizy (17). Zaburzenia te są związane z występującą ok. 5-7 dni po pierwszej dodatkowej falą dojrzewania pęcherzyków i owulacji z powstaniem ciałek żółtych (12, 14, 17, 21, 38, 39). Wytworzone w ten sposób nieprawidłowe środowisko hormonalne wpływa negatywnie na jakość oocytów (15) i zarodków (31), transport zarodków (17) oraz rozwój ciąży (12), co w efekcie daje zmniejszoną skuteczność biotechnik rozrodu i małą liczebność otrzymanych w ten sposób miotów (14, 29).

Spekuluje się, że dodatkowa fala pęcherzyków spowodowana jest przedłużonym działaniem eCG i hCG (14), które pozostają w krążeniu, odpowiednio, co najmniej 120 godz. i 96 godz. (41). Udowodniono, że hCG u kotów ma działanie nie tylko luteotropowe, ale też stymuluje wzrost pęcherzyków jajnikowych (41) i może być (przynajmniej częściowo) odpowiedzialny za tworzenie dodatkowej fali pęcherzyków po owulacji. Za tym argumentem przemawia fakt, że stosowanie jedynie hCG prowadzi do indukcji rui oraz wytworzenia pęcherzyków i ich dojrzewania w ta-

kim samym stopniu, jak podanie jedynie eCG (41). Ponadto próba przerwania działania eCG za pomocą przeciwciał neutralizujących zakończyła się u kotów niepowodzeniem (39). Hipotezę potwierdza również fakt, że u kotek uzyskano 4 razy więcej dobrej jakości zarodków i blastocyst, gdy stymulowano ruję za pomocą eCG, a następnie dopuszczano do naturalnego krycia, niż u kotek krytych w naturalnej rui. Natomiast zastosowanie hCG po naturalnym kryciu powodowało wzrost odsetka niezapłodnionych oocytów w porównaniu do kotek krytych naturalnie (31).

Istotne znaczenie dla powodzenia technik wspomaganego rozrodu ma dawka gonadotropin. Wyższe dawki hCG skutkowały nasileniem degeneracji zarodków oraz niższym odsetkiem zapłodnień w warunkach *in vitro* (14). Z kolei skrajnie wysokie lub niskie dawki eCG/hCG powodowały powstanie dwóch rodzajów ciałek żółtych: małych, uważanych za niedorozwinięte oraz dużych, rozwiniętych. Zastosowanie średnich dawek powodowało wykształcenie jedynie dużych ciałek żółtych (23, 24, 38). Ciężę udało się uzyskać u samicy z największą liczbą dużych ciałek żółtych i najmniejszą liczbą niezowulowanych pęcherzyków.

W badaniach niektórych autorów (31) protokół eCG/hCG powodował zwiększony odsetek niezapłodnionych i degenerujących oocytów oraz zarodków niskiej jakości, nawet pomimo tego, że profil hormonalny nie różnił się od grupy kontrolnej (naturalna ruja i kopulacja).

Również odstęp pomiędzy podaniem eCG i hCG ma znaczenie dla uzyskanych wyników zapłodnień. Badania Goodrowe i wsp. (14) wykazały, że lepsze wyniki IVF uzyskuje się przy odstępnie czasu pomiędzy podaniem eCG i hCG wynoszącym 80 godz. niż 72 godz. i przy niższych dawkach hCG, pomimo że u samic nie było różnic w stężeniu estrogenów i progesteronu. Donoghue i wsp. (11) stwierdzili, że najbardziej przydatne oocyty do procedury IVF można pozyskać przy odstępnie czasu pomiędzy podaniem eCG a hCG wynoszącym 80-92 godz.

Gorsza odpowiedź, a w szczególności coraz słabsza odpowiedź na kolejne zastosowania tego samego protokołu wynikać może z wykształcenia odpowiedzi immunologicznej przeciwko obcogatunkowym białkom zawartym w wymienianych środkach (9). Powtarzanie protokołu stymulacji gonadotropinami eCG/hCG w odstępach czasu > 6-8 mies. nie powodowało obniżenia odpowiedzi na nie, a te same dawki powodowały podobną odpowiedź jajników (24, 40). Trwają prace nad stworzeniem specyficznego kociej FSH (9).

„Wyciszenie” jajników przed zastosowaniem protokołu stymulacji hormonalnej

U kota domowego udowodniono, że najwyższa skuteczność odpowiedzi na gonadotropiny występuje wówczas, gdy są one podawane w *interoestrus*, kiedy jajniki są „wyciszone” (3). Howard i wsp. (24) wysu-

nęli hipotezę, że relatywnie wysoka skuteczność ART u gepardów może być spowodowana występowaniem u tych zwierząt niezwiązanych z sezonowością okresów braku aktywności jajników (8).

Podejmowano próby hormonalnego „wyciszenia” (quiescence) jajników u kotowatych. U kota domowego dowiedziono, że zahamowanie aktywności gonad przed zastosowaniem stymulacji hormonalnej wpływało pozytywnie na powodzenie technik wspomaganego rozrodu (38). Wśród preparatów stosowanych do tego celu wymienić można progestageny stosowane doustnie przez 38 dni (altrenogest) (38) lub w postaci implantu usuwanego chirurgicznie po 38 dniach (levonogestrel) (28). Stosowano również z powodzeniem melatoninę (30 mg dziennie p.o. przez 30 dni) (18), analogi GnRH (octan leuprolidu) (29) lub antagonistów GnRH (antide, dwie iniekcje co 15 dni, pierwsza 39 dni przed stymulacją) (28). Niestety, nie sprawdza się to u wszystkich kotowatych – podanie octanu leuprolidu u pantery mglistej spowodowało gorszą odpowiedź jajników na stymulację hormonalną oraz brak owulacji u większości badanych samic (29). U kotów lepsze efekty osiągnięto przy stosowaniu w celu „wyciszenia” jajników progestagenów niż antagonistów GnRH (28).

Podsumowanie

Jakkolwiek techniki wspomaganego rozrodu stanowią potężne narzędzie w ratowaniu ginących kotowatych, u podstaw ich zastosowania leży gruntowna znajomość fizjologii rozrodu danego gatunku. Według wielu autorów relatywnie niska skuteczność sztucznej inseminacji i innych technik wspomaganego rozrodu u dzikich kotowatych spowodowana jest trudnościami w opracowaniu optymalnej metodyki stymulacji jajników. Z tego powodu dogłębne poznanie charakterystyki endokrynologii rozrodu danego gatunku, opracowanie skutecznych protokołów indukcji dojrzewania pęcherzyków i owulacji, produkcja oczyszczonych, specyficznych dla kotowatych gonadotropin oraz badania nad przedstymulacyjnym „wygaszaniem” aktywności jajników mają dla dalszego postępu w tej dziedzinie kluczowe znaczenie i najwyższy priorytet.

Piśmiennictwo

1. Barone M. A., Wildt D. E., Byers A. P., Roelke M. E., Glass C. M., Howard J. G.: Gonadotrophin dose and timing of anesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). *J. Reprod. Fert.* 1994, 101, 103-108.
2. Bonney R. C., Moore H. D. M., Jones D. M.: Plasma concentrations of oestradiol-17 and progesterone and laparoscopic observations of the ovary in the puma during oestrus, pseudopregnancy and pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 1981, 63, 523-531.
3. Brown J. L.: Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology* 2006, 66, 25-36.
4. Brown J. L., Goodrowe K. L., Simmons L. G., Armstrong D. L., Wildt D. E.: Evaluation of the pituitary-gonadal response to GnRH, and adrenal status, in the leopard (*Panthera pardus japonensis*) and tiger (*Panthera tigris*). *J. Reprod. Fert.* 1988, 82, 227-236.
5. Brown J. L., Graham L. H., Wu J. M., Collins D., Swanson W. F.: Reproductive endocrine responses to photoperiod and exogenous gonadotropins in the Pallas' cat (*Otocolobus manul*). *Zoo Biol.* 2002, 21, 347-364.

6. Brown J. L., Wasser S. K., Wildt D. E., Graham L. H.: Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biol. Reprod.* 1994, 51, 776-786.
7. Brown J. L., Wildt D. E., Graham L. H., Byers A. P., Collins L., Barrett S., Howard J. G.: Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. *Biol. Reprod.* 1995, 53, 93-102.
8. Brown J. L., Wildt D. E., Wielebnowski N., Goodrowe K. L., Graham L. H., Wells S., Howard J. G.: Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. *J. Reprod. Fert.* 1996, 106, 337-346.
9. Crichton E. G., Bedows E., Miller-Lindholm A. K., Baldwin D. M., Armstrong D. L., Graham L. H., Ford J. J., Gjorret J. O., Hyttel P., Pope C. E., Vajta G., Loskutoff N. M.: Efficacy of Porcine Gonadotropins for Repeated Stimulation of Ovarian Activity for Oocyte Retrieval and In Vitro Embryo Production and Cryopreservation in Siberian Tigers (*Panthera tigris altaica*). *Biol. Reprod.* 2003, 68, 105-113.
10. Donoghue A. M., Byers A. P., Johnston L. A., Armstrong D. L., Wildt D. E.: Timing of ovulation after gonadotrophin induction and its importance to successful intrauterine insemination in the tiger (*Panthera tigris*). *J. Reprod. Fert.* 1996, 107, 53-58.
11. Donoghue A. M., Johnston L. A., Munson L., Brown J. L., Wildt D. E.: Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 1992, 46, 972-980.
12. Donoghue A. M., Johnston L. A., Seal U. S., Armstrong D. L., Tilson R. L., Wolff P., Petrini K., Simmons L. G., Gross T., Wildt D. E.: In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol. Reprod.* 1990, 43, 733-744.
13. Dresser B. L., Kramer L., Reece B., Russell P. T.: Induction of ovulation and successful artificial insemination in a Persian leopard (*Panthera pardus saxicolor*). *Zoo Biol.* 1982, 1, 55-57.
14. Goodrowe K. L., Wall R. J., O'Brien S. J., Schmidt P. M., Wildt D. E.: Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 1988, 39, 355-372.
15. Goodrowe K. L., Howard J. G., Wildt D. E.: Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol-17 beta and progesterone profiles in domestic cats (*Felis catus*) at natural or induced oestrus. *J. Reprod. Fert.* 1988, 82, 553-561.
16. Graham L. H., Byers A. P., Armstrong D. L., Loskutoff N. M., Swanson W. F., Wildt D. E., Brown J. L.: Natural and gonadotropin-induced ovarian activity in tigers (*Panthera tigris*) assessed by fecal steroid analyses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006, 147, 362-370.
17. Graham L. H., Swanson W. F., Brown J. L.: Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. *Theriogenology* 2000, 54, 1117-1131.
18. 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.
19. Herrick J. R., Bond J. B., Campbell M., Levens G., Moore T., Benson K., D'Agostino J., West G., Okeson D. M., Coke R., Portacio S. C., Leiske K., Kreider C., Polumbo P. J., Swanson W. F.: Fecal endocrine profiles and ejaculate traits in black-footed cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2010, 165, 204-214.
20. Herrick J. R., Campbell M., Levens G., Moore T., Benson K., D'Agostino J., West G., Okeson D. M., Coke R., Portacio S. C., Leiske K., Kreider C., Polumbo P. J., Swanson W. F.: In Vitro Fertilization and Sperm Cryopreservation in the Black-Footed Cat (*Felis nigripes*) and Sand Cat (*Felis margarita*). *Biol. Reprod.* 2010, 82, 552-562.
21. Howard J. G., Barone M. A., Donoghue A. M., Wildt D. E.: The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J. Reprod. Fert.* 1992, 96, 175-186.
22. Howard J. G., Byers A. P., Brown J. L., Schwartz R. J., Evans M. Z., Barrett S. J., Evans M. Z., Schwartz R. J., Wildt D. E.: Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Zoo Biol.* 1996, 15, 55-69.
23. Howard J. G., Donoghue A. M., Barone M. A., Goodrowe K. L., Blumer E. S., Snodgrass K., Starnes D., Tucker M., Bush M., Wildt D. E.: Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J. Zoo Wildl Med.* 1992, 23, 288-300.
24. Howard J. G., Roth T. L., Byers A. P., Swanson W. F., Wildt D. E.: Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Biol. Reprod.* 1997, 56, 1059-1068.
25. Kinoshita K., Inada S., Seki K., Aiko Sasaki, Hama N., Kusunoki H.: Long-Term Monitoring of Fecal Steroid Hormones in Female Snow Leopards (*Panthera uncia*) during Pregnancy or Pseudopregnancy. *PLoS One* 2011, 6(5), e19314.
26. Kinoshita K., Ohazama M., Ishida R., Kusunoki H.: Daily fecal sex steroid hormonal changes and mating success in captive cheetahs. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, 125, 204-210.
27. Moreira N., Monteiro-Filho E. L., Moraes W., Swanson W. F., Graham L. H., Pasquali O. L., Gomes M. L., Morais R. N., Wildt D. E., Brown J. L.: Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biol.* 2001, 20, 103-116.
28. Pelican K. M., Spindler R. E., Pukazhenth B. S., Wildt D. E., Ottinger M. A., Howard J.: Progesterin Exposure Before Gonadotropin Stimulation Improves Embryo Development after In Vitro Fertilization in the Domestic Cat. *Biol. Reprod.* 2010, 83, 558-567.
29. Pelican K. M., Wildt D. E., Howard J. G.: GnRH agonist Lupron (leuprolide acetate) pre-treatments prevent ovulation in response to gonadotropin stimulation in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Theriogenology* 2006, 66, 1768-1777.
30. Pelican K. M., Wildt D. E., Pukazhenth B., Howard J.: Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology* 2006, 66, 37-48.
31. Roth T. L., Wolfe B. A., Long J. A., Howard J. G., Wildt D. E.: Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 165-171.
32. Rowlands I. W., Sadleir R. M. F. S.: Induction of ovulation in the lion (*Panthera leo*). *J. Reprod. Fert.* 1968, 16, 105-111.
33. Santymire R. M., Brown J. L., Stewart R. A., Santymire R. C., Wildt D. E., Howard J.: Reproductive gonadal steroidogenic activity in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*) assessed by fecal steroid analyses. *Anim. Reprod. Sci.* 2011, 128, 60-72.
34. Schmidt A. M., Hess D. L., Schmidt M. J., Lewis C. R.: Serum concentrations of oestradiol and progesterone and frequency of sexual behaviour during the normal oestrous cycle in the snow leopard (*Panthera uncia*). *J. Reprod. Fert.* 1993, 98, 91-95.
35. Schmidt A. M., Hess D. L., Schmidt M. J., Smith R. C., Lewis C. R.: Serum concentrations of oestradiol and progesterone, and sexual behaviour during the normal oestrous cycle in the leopard (*Panthera pardus*). *J. Reprod. Fert.* 1988, 82, 43-49.
36. Schmidt A. M., Nadal L. A., Schmidt M. J., Beamer N. B.: Serum concentrations of oestradiol and progesterone during the normal oestrous cycle and early pregnancy in the lion (*Panthera leo*). *J. Reprod. Fert.* 1979, 57, 267-272.
37. Seal U. S., Plotka E. D., Smith J. D., Wright F. H., Reindl N., Taylor R. S., Seal M. F.: Immunoreactive luteinizing hormone, estradiol, progesterone, testosterone, and androstenedione levels during the breeding season and anestrus in Siberian tigers. *Biol. Reprod.* 1985, 32, 361-368.
38. Stewart R. A., Pelican K. M., Crosier A. E., Pukazhenth B. S., Wildt D. E., Ottinger M. A., Howard J. G.: Oral Progesterin Priming Increases Ovarian Sensitivity to Gonadotropin Stimulation and Improves Luteal Function in the Cat. *Biol. Reprod.* 2012, 87, 1-11.
39. Swanson W. F., Graham K., Horohov D. W., Thompson D. L., Godke R. A.: Ancillary follicle and secondary corpora lutea formation following exogenous gonadotropin treatment in the domestic cat and effect of passive transfer of gonadotropin-neutralizing antiserum. *Theriogenology* 1996, 45, 561-572.
40. Swanson W. F., Howard J. G., Roth T. L., Brown J. L., Alvarado T., Burton M., Starnes D., Wildt D. E.: Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotropins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *J. Reprod. Fert.* 1996, 106, 87-94.
41. Swanson W. F., Wolfe B. A., Brown J. L., Martin-Jimenez T., Riviere J. E., Roth T. L., Wildt D. E.: Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 295-302.
42. Wildt D. E., Platz C. C., Chakraborty P. K., Seager S. W. J.: Oestrus and ovarian activity in a female jaguar (*Panthera onca*). *J. Reprod. Fert.* 1979, 56, 555-558.
43. Wildt D. E., Platz C. C., Seager S. W. J., Bush M.: Induction of ovarian activity in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol. Reprod.* 1981, 24, 217-222.