

Криоконсервация эпидидимального семени домашнего кота

С.Я. Амстиславский¹✉, Е.Ю. Брусенцев¹, В.И. Мокроусова^{1, 2}, Е.А. Кизилова^{1, 2}, В.В. Кожевникова^{1, 2},
В.А. Напримеров^{1, 3}, И.Н. Рожкова¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

Домашний кот (*Felis silvestris catus*) используется в качестве модельного объекта для разработки эффективных методов криоконсервирования семени исчезающих видов кошачьих. В исследовании представлено сравнение двух коммерчески доступных криопротекторных смесей CaniPlus Freeze (CPF) и SpermFreeze (SF), используемых для криоконсервации семени домашнего кота (*Felis silvestris catus*). Семя получали из каудальных эпидидимисов взрослых самцов и замораживали с помощью CPF либо SF. Жизнеспособность замороженно-оттаянных сперматозоидов оценивали методом VitalScreen; морфологический анализ семени проводили с использованием окраски гематоксилином и эозином; в обоих случаях окраску сочетали со световой микроскопией. Доля живых сперматозоидов после замораживания с применением CPF и SF достоверно не различалась: $32.3 \pm 4.4\%$ для CPF и $43.3 \pm 4.0\%$ для SF. Доля морфологически нормальных сперматозоидов после процедур замораживания–оттаивания семени домашнего кота составила $26.0 \pm 2.3\%$ для CPF и $23.9 \pm 1.9\%$ для SF. В обоих случаях не было достоверных отличий по этому показателю от интактного (не подвергавшегося замораживанию) семени, в этой группе доля сперматозоидов с нормальной морфологией составила $29.0 \pm 4.1\%$. Наиболее частыми были аномалии хвоста, а также комбинированные аномалии; наиболее редкими – аномалии головки. Доля сперматозоидов с аномалиями головки, шейки, хвоста, комбинированных не различалась при сравнении каждой из трех групп между собой по названным категориям. Результаты данной работы свидетельствуют о том, что обе криопротекторные смеси могут быть использованы для замораживания семени домашнего кота, несмотря на то, что CPF создавали для замораживания семени псовых, а SF – для замораживания семени человека (до сих пор эту криопротекторную смесь использовали исключительно в репродуктивной медицине). Можно заключить, что метод криоконсервации семени кошачьих с использованием каждой из этих двух коммерчески доступных криопротекторных смесей применим для криоархивирования существующих пород домашних кошек.

Ключевые слова: домашний кот; эпидидимальные сперматозоиды; криоконсервация.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Амстиславский С.Я., Брусенцев Е.Ю., Мокроусова В.И., Кизилова Е.А., Кожевникова В.В., Напримеров В.А., Рожкова И.Н. Криоконсервация эпидидимального семени домашнего кота. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):646-650. DOI 10.18699/VJ17.281

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Amstislavsky S.Ya., Brusentsev E.Yu., Mokrousova V.I., Kizilova E.A., Kozhevnikova V.V., Naprimerov V.A., Rozhkova I.N. Cryopreservation of epididymal semen of domestic cat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):646-650. DOI 10.18699/VJ17.281 (in Russian)

Received 25.05.2017
Accepted for publication 18.09.2017
© AUTHORS, 2017

✉ e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Cryopreservation of epididymal semen of domestic cat

S.Ya. Amstislavsky¹✉, E.Yu. Brusentsev¹,
V.I. Mokrousova^{1, 2}, E.A. Kizilova^{1, 2},
V.V. Kozhevnikova^{1, 2}, V.A. Naprimerov^{1, 3},
I.N. Rozhkova¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Domestic cat (*Felis silvestris catus*) is used as a model species for developing effective methods of wild felids' semen cryopreservation. The present study represents a comparison of domestic cat semen cryopreservation with two commercially available cryoprotectant agents (CPAs): CaniPlus Freeze (CPF) and SpermFreeze (SF). Semen was collected from the caudal epididymises of adult males and frozen with CPF and SF, correspondingly. The viability of frozen-thawed spermatozoa was evaluated by VitalScreen kit, staining with hematoxylin and eosin was performed for analysis of the spermatozoa morphology; both analyses were combined with the light microscopy. The viability rate of the frozen-thawed semen cryopreserved with CPF and SF did not differ: $32.3 \pm 4.4\%$ for CPF and $43.3 \pm 4.0\%$ for SF. Total percentage of morphologically normal spermatozoa after freezing and thawing domestic cat semen was $26.0 \pm 2.3\%$ for CPF and $23.9 \pm 1.9\%$ for SF. In both cases, there were no differences from non-frozen semen, in the latter group the total percentage of spermatozoa with normal morphology was $29.0 \pm 4.1\%$. The most frequent anomalies were the anomalies of tail, and the rarest anomalies were head defects. The percentages of spermatozoa with anomalies of the head, mid piece, tail and combined did not differ in these three groups. Taken together these results suggest that both CPAs are suitable for the purpose of domestic cat semen freezing and cryopreservation, although CPF was designed for Canidae semen cryopreservation and SF was developed for human semen freezing and so far was used exclusively in reproductive medicine. It might be concluded that these two commercially available cryoprotectant media are applicable for the purposes of domestic cat breeds' semen cryopreservation.

Key words: domestic cat; epididymal spermatozoa; cryopreservation.

Домашний кот (*Felis silvestris catus*) является модельным объектом для разработки эффективных методов криоконсервирования семени исчезающих видов кошачьих (Wildt et al., 1992; Luvoni, 2006; Amstislavsky et al., 2012). Это самый популярный вид среди домашних питомцев, который также используется как лабораторное животное (Driscoll et al., 2009; Agca, 2012). Существует около 100 различных пород домашнего кота, но только половина из них подтверждена Международной федерацией кошек – FIFe (www.fifeweb.org). Искусственное осеменение со свежим, охлажденным и замороженным семенем домашнего кота проводилось различными методами (Zambelli et al., 2002; Luvoni, 2006; Tsutsui, 2006; Rijsselaere, Van Soom, 2010), но до сих пор нет рутинного метода криоконсервации семени кошачьих. В настоящее время транспортировка охлажденного/замороженного семени используется гораздо реже для котов, чем для собак (Johnson et al., 2001). Принимая это во внимание, следует разработать надежный метод криоконсервации семени кошачьих, применимый как для криоархивирования существующих пород домашних котов, так и для создания криобанков находящихся под угрозой исчезновения и уязвимых видов Felidae. В качестве криопротекторов для замораживания семени кошачьих часто используются глицерин и яичный желток (Zambelli et al., 2002; Luvoni, 2006), однако разрабатываются и альтернативные методы. CaniPlus Freeze (CPF) был создан для замораживания семени представителей семейства Canidae (www.minitube.de) и успешно применялся не только для собаки (Hidalgo et al., 2014), но и для бурого медведя (Gomes-Alves et al., 2014), а также хомяков рода *Phodopus* (Амстиславский и др., 2016). Существует также запатентованная эффективная криопротекторная смесь SpermFreeze (SF), которая широко используется в репродуктивной медицине (www.fertipro.com). Несмотря на эффективное применение этой криопротекторной смеси для замораживания сперматозоидов человека (Bandularatne, Bongso, 2002), она еще не применялась к другим видам млекопитающих.

Помимо домашнего кота, в семействе Felidae насчитывается 38 видов (Johnson et al., 2006; O'Brien et al., 2008). В настоящее время для сохранения генетического разнообразия диких кошек *ex situ* используются как традиционные подходы, так и более современные методы, например создание криобанков генетических ресурсов (Comizzoli et al., 2009; Амстиславский и др., 2015, 2017; Jewgenow et al., 2017). Семя 27 видов/подвидов диких кошачьих было успешно криоконсервировано хотя бы один раз, по другим представителям семейства кошачьих данные по замораживанию семени в литературе отсутствуют (Fickel et al., 2007; Амстиславский и др., 2017). Эффективность замораживания семени диких видов кошачьих в подавляющем большинстве случаев ниже, чем у домашнего кота (Амстиславский и др., 2017). Более того, с самцами диких кошачьих часто приходится работать вне комфортных условий лаборатории. В связи с этим поиск надежного способа замораживания семени кошачьих с применением имеющихся на рынке готовых криопротекторных смесей представляется особенно актуальной задачей, причем домашний кот является наиболее доступной моделью для ее решения.

Цель данного исследования – сравнение жизнеспособности эпидидимального семени домашнего кота после замораживания с использованием криопротекторных смесей CPF и SF.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В работе использовали семенники с эпидидимисами от десяти взрослых домашних котов, полученные из ветеринарных клиник г. Новосибирска. Семя от каждого из самцов было заморожено как с CPF, так и с SF. В качестве контроля использовали семя этого же кота, не подвергавшееся замораживанию. В эксперименте по оценке жизнеспособности сперматозоидов после их криоконсервации использованы образцы от десяти самцов, а для оценки морфологии сперматозоидов – от восьми самцов.

Получение семени, замораживание и оттаивание. Семенники с эпидидимисами получали после стандартных процедур орхиэктомии и транспортировали при +4 °C в фосфатном буферном растворе Дульбекко (DPBS) в Институт цитологии и генетики СО РАН. Органы промывали DPBS. Затем каудальную часть эпидидимиса отделяли, переносили в чашку Петри с каплей 500 мкл среды FertiCultIVF (FertiPro, Бельгия), измельчали и помещали в термостат при 37 °C на 20 мин. После этого жидкость собирали пипеткой и переносили в пробирку.

Семя домашнего кота (50 мкл) смешивали со 100 мкл раствора CPF (Minitube, Германия). Аналогично 100 мкл семени смешивали с 70 мкл раствора SF (FertiPro, Бельгия). Затем образцы выдерживали при +4 °C в холодильнике в течение двух часов и замораживали в 0.25 мл пластиковых соломинах (Cryo Bio System, Франция), как описано ниже.

Пластиковые соломины с образцами семени помещали в коробку из пенопласта на высоту 5 см над уровнем жидкого азота (LN₂) в течение 20 мин, затем погружали в LN₂. Замороженные соломины с образцами семени помещали в криохранилище и выдерживали при –196 °C не менее недели.

Процедуру оттаивания семени проводили, как описано ранее (Амстиславский и др., 2016). Соломины с образцами доставали из LN₂ и выдерживали в течение 10 с при комнатной температуре (~25 °C), а затем помещали в водяную баню на 30 с при 37 °C.

Оценка жизнеспособности сперматозоидов. Жизнеспособность сперматозоидов после криоконсервации оценивали с помощью световой микроскопии Nikon Eclipse E200 (Nikon, Япония) в сочетании с окрашиванием эозин-нигрозинном при помощи набора VitalScreen (FertiPro, Бельгия). Мертвые сперматозоиды при этом окрашиваются в красный цвет эозином, а нигрозин создает фиолетовый фон для облегчения подсчета живых сперматозоидов, которые не окрашиваются (Blom, 1950; Zambelli et al., 1993).

Морфологический анализ образцов семени проводили с использованием световой микроскопии после высушивания и фиксации мазков семени с использованием 4 % формальдегида (pH 7.4–7.6), промывки в ddH₂O и последующего стандартного окрашивания гематоксилином-эозином при использовании световой микроскопии

с применением Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss, Германия). Изображения получены и проанализированы с использованием оборудования и инфраструктуры ЦКП МАБО СО РАН (<http://www.bionet.nsc.ru/labs/viv/index.php?id=113>).

Статистический анализ. Доля живых сперматозоидов, а также морфологически нормальных и аномальных форм сперматозоидов представлена как среднее ± ошибка среднего. Среди аномальных форм сперматозоидов посчитана доля отдельных типов аномалий: аномалии головки, шейки, хвоста, комбинированных. Сравнение проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Жизнеспособность сперматозоидов после замораживания и криоконсервации была оценена с помощью теста VitalScreen (рис. 1). Данный тест показал, что после криоконсервации семени с применением CPF доля жизнеспособных сперматозоидов была снижена (32.3 ± 4.4) по сравнению с интактным семенем (48.6 ± 5.7 ; $p < 0.05$). Замораживание семени с использованием SF, напротив, не приводило к снижению доли жизнеспособных сперматозоидов (43.3 ± 4.0).

Образцы семени, замороженные двумя способами, не отличались по доле морфологически нормальных и ано-

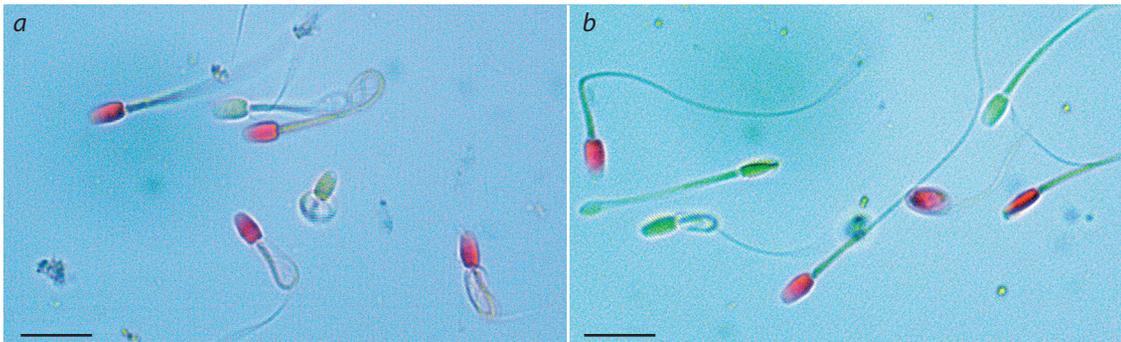


Fig. 1. Assessment of the viability of frozen-thawed domestic cat spermatozoa after staining with VitalScreen.

(a) Spermatozoa frozen in CPF; (b) spermatozoa frozen in SF. Colored spermatozoa are dead, and uncolored spermatozoa are alive. Scale bar 10 μ m.

Morphology of intact and frozen–thawed spermatozoa of a domestic cat after use of two cryoprotecting media

Characters	Intact ($n = 8$)	After cryopreservation	
		CaniPlus Freeze ($n = 8$)	SpermFreeze ($n = 8$)
Total number of spermatozoa examined	2162	2267	2400
Normal spermatozoa, %	29.0 ± 4.1	26.0 ± 2.3	23.9 ± 1.9
Abnormal spermatozoa, %	71.0 ± 4.1	74.0 ± 2.3	76.1 ± 1.9
Anomalies, %			
head	2.8 ± 0.4^a	5.1 ± 1.2^{ab}	4.1 ± 1.2^{ab}
midpiece	9.9 ± 2.2^b	5.9 ± 1.3^{ab}	5.9 ± 1.8^{ab}
tail	27.4 ± 3.3^c	25.4 ± 3.0^c	28.4 ± 3.6^c
combined	30.9 ± 3.7^c	37.6 ± 4.0^c	37.7 ± 4.3^c

Different alphabetical indices indicate significant differences. Differences are significant at a, b: $p < 0.05$; b, c: $p < 0.01$; a, c: $p < 0.001$.

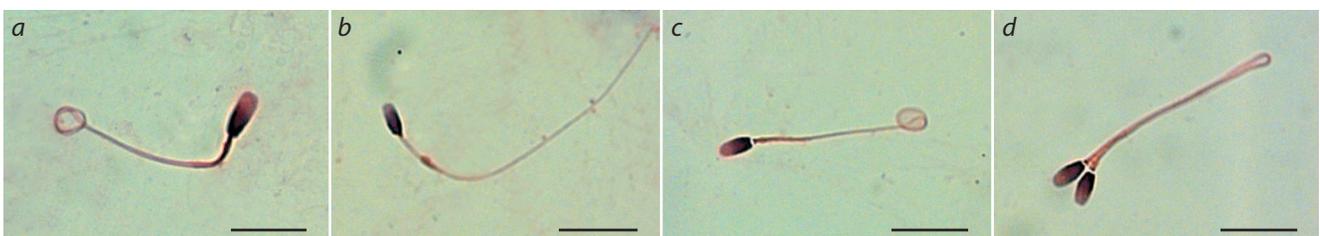


Fig. 2. Morphology of frozen-thawed spermatozoa of a domestic cat after staining with hematoxylin and eosin.

(a) Spermatozoa with combined anomalies (head and tail anomalies); (b) spermatozoa with midpiece anomalies; (c) spermatozoa with tail anomalies; (d) teratomorphic spermatozoa with combined (head and tail) anomalies. Scale bar 10 μ m.

мальных форм сперматозоидов ни друг от друга, ни от интактных образцов (таблица). Наиболее частыми были аномалии хвоста, а также комбинированные аномалии во всех трех категориях семени (рис. 2). Наиболее редкими из них были аномалии головки. Следует отметить, что доля сперматозоидов с аномалиями головки, шейки, хвоста и комбинированными аномалиями не различалась при сравнении каждой из трех групп между собой по названным категориям (см. таблицу).

Обсуждение

Применение чувствительного и объективного метода VitalScreen в качестве теста для оценки жизнеспособности сперматозоидов после процедур замораживания–оттаивания позволило нам сделать сравнение эпидидимального семени до и после криоконсервации с использованием двух разных криопротекторных смесей. Более ранние исследования подтверждают, что этот метод подходит для оценки жизнеспособности сперматозоидов разных млекопитающих (Blom, 1950), в том числе кошачьих (Zambelli et al., 1993; Vuranaamnuay, 2015).

В более ранних работах сообщалось, что CPF можно использовать для замораживания семени различных видов млекопитающих, включая собак, медведей и хомячков (Gomes-Alves et al., 2014; Hidalgo et al., 2014; Амстиславский и др., 2016). Наше недавнее пилотное исследование показало, что эякуляторное семя красной рыси возможно криоконсервировать с применением CPF в качестве криопротекторной смеси (Амстиславский и др., 2017). В представленной работе по исследованию эпидидимального семени домашнего кота установлено, что при применении CPF более 30 % сперматозоидов сохраняют свою жизнеспособность после криоконсервации и доля аномальных сперматозоидов при этом не увеличивается. На основании этих результатов можно утверждать о применимости CPF для замораживания сперматозоидов кошачьих. Наши собственные экспериментальные результаты и анализ литературы свидетельствуют об универсальности CPF и использования этой криопротекторной смеси для различных видов млекопитающих.

По нашим данным, SF никогда не применялся ранее с целью криоконсервации семени какого-либо вида млекопитающего помимо человека. Таким образом, в данном исследовании впервые сообщается о его успешном использовании для замораживания эпидидимального семени домашнего кота. При применении SF более 40 % сперматозоидов в среднем сохраняют жизнеспособность, причем криоконсервация не отражается на доле морфологически нормальных сперматозоидов. По данным литературы, она варьирует для эпидидимального семени у разных видов кошачьих от 25.0 до 78.5 % (Prochowska et al., 2016), и приведенные здесь результаты укладываются в этот интервал. Следует отметить, что наиболее частыми аномалиями сперматозоидов в нашем исследовании были комбинированные и аномалии хвоста, что согласуется с данными других исследований (Contri et al., 2012).

Хотя глицерин в высоких концентрациях токсичен для сперматозоидов кошачьих, в подавляющем большинстве исследований замораживание семени котиков проводилось с использованием именно этого криопротектора в кон-

центрациях 3.0–7.5 % (Luvoni, 2006). Обычно процедуры замораживания–оттаивания снижают жизнеспособность сперматозоидов эпидидимального семени домашних котиков на 20–30 % (Luvoni, 2006; Kunkitti et al., 2016; Prochowska et al., 2016).

Можно сделать вывод, что из двух криопротекторных смесей, сравниваемых в нашей работе, SF более подходит для криоконсервации эпидидимального семени домашнего кота, чем CPF. Основными компонентами SF являются глицерин и человеческий сывороточный альбумин (HSA) (Bandularatne, Bongso, 2002). HSA улучшает показатели выживаемости сперматозоидов человека после криоконсервации (Bandularatne, Bongso, 2002). Тест VitalScreen продемонстрировал, что эпидидимальное семя кота сохраняет жизнеспособность после криоконсервации как с использованием SF, так и при применении CPF, хотя в последнем случае доля жизнеспособных сперматозоидов была ниже по сравнению с интактным семенем, не подвергавшимся криоконсервации. Полученные результаты позволяют предположить, что HSA оказывает положительное влияние при криоконсервации сперматозоидов не только человека, но также и домашнего кота.

Данные нашего исследования свидетельствуют о возможности применения криопротекторных смесей CPF и SF с целью замораживания эпидидимального семени домашнего кота. Использование SF несколько более эффективно по сравнению с CPF для сохранения жизнеспособности сперматозоидов домашнего кота после процедур замораживания–оттаивания.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-03258, and State Budgeted Project 0324-2016-0002, Department of Animal and Human Genetics, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agca Y. Genome resource banking of biomedically important laboratory animals. *Theriogenology*. 2012;78:1653-1665. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.08.012.
- Amstislavsky S., Lindeberg H., Luvoni G.C. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora. *Reprod. Domest. Anim.* 2012;47:164-175. DOI 10.1111/j.1439-0531.2011.01886.x.
- Amstislavskiy S.Y., Brusentsev E.Y., Okotrub K.A., Rozhkova I.N. Embryo and gamete cryopreservation for the conservation of laboratory animal genetic resources. *Ontogenez = Ontogenesis*. 2015;46(2):67-81. DOI 10.7868/S0475145015020020. (in Russian)
- Amstislavskiy S.Y., Kizilova E.A., Brusentsev E.Y., Abramova T.O., Naprimerov V.A. Cryopreservation of epididymal semen in Djungarian (*Phodopus sungorus*, *Cricetinae*) and Campbell's (*Phodopus campbelli*) hamsters. *Zoologicheskii zhurnal = Zoological Journal*. 2016;95(5):604-613. DOI 10.7868/S0044513416050044. (in Russian)
- Amstislavskiy S.Y., Kozhevnikova V.V., Muzika V.V., Kizilova E.A. Reproductive biology and a genome resource bank of Felidae. *Ontogenez = Ontogenesis*. 2017;48(2):93-106. DOI 10.7868/S0475145017020021. (in Russian)

- Bandularatne E., Bongso A. Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. *J. Androl.* 2002;23:242-249. DOI 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02621.x.
- Blom E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.* 1950;1:176-177.
- Buranaamnuay K. Determination of appropriate cryopreservation protocols for epididymal cat spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 2015; 50:378-385. DOI 10.1111/rda.12496.
- Comizzoli P., Crosier A.E., Songsasen N., Szykman Gunther M., Howard J.G., Wildt D.E. Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. *Reprod. Domest. Anim.* 2009;44:47-52. DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01373.x.
- Contri A., Zambelli D., Faustini M., Cunto M., Gloria A., Carluccio A. Artificial neural networks for the definition of kinetic subpopulations in electroejaculated and epididymal spermatozoa in the domestic cat. *Reproduction.* 2012;144:339-347. DOI 10.1530/REP-12-0125.
- Driscoll C.A., Clutton-Brock J., Kitchener A.C., O'Brien S.J. The taming of the cat. Genetic and archaeological findings hint that wildcats became housecats earlier – and in a different place – than previously thought. *Sci. Am.* 2009;300:68-75. DOI 10.1038/scientificamerican.0609-68.
- Fickel J., Wagener A., Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur. J. Wildl. Res.* 2007;53(2):81-89. DOI 10.1007/s10344-007-0089-z.
- Gomes-Alves S., Alvarez M., Nicolas M., Lopez-Uruena E., Martinez-Rodriguez C., Borragan S., de Paz P., Anel L. Use of commercial extenders and alternatives to prevent sperm agglutination for cryopreservation of brown bear semen. *Theriogenology.* 2014;82:469-474. DOI 10.1016/j.theriogenology.2014.05.015.
- Hidalgo M., Portero J.M., Demyda-Peyras S., Ortiz I., Dorado J. Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time. *Vet. Rec.* 2014; 175:20. DOI 10.1136/vr.102010.
- Jewgenow K., Braun B.C., Dehnhard M., Zahmel J., Goeritz F. Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species. *Reprod. Domest. Anim.* 2017;2:18-23. DOI 10.1111/rda.12836.
- Johnson S.D., Root Kustritz M.V., Olson P.N.S. Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia: Saunders Comp., 2001;592.
- Johnson W.E., Eizirik E., Pecon-Slattery J., Murphy W.J., Antunes A., Teeling E., O'Brien S.J. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science.* 2006;311(5757):73-77. DOI 10.1126/science.1122277.
- Kunkitti P., Axner E., Bergqvist A.S., Sjunnesson Y. *In vitro* fertilization using frozen-thawed feline epididymal spermatozoa from corpus and cauda regions. *Theriogenology.* 2016;86:1403-1408. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.04.085.
- Luvoni G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology.* 2006;66:101-111. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.03.012.
- O'Brien S.J., Johnson W., Driscoll C., Pontius J., Pecon-Slattery J., Menotti-Raymond M. State of cat genomics. *Trends Genet.* 2008; 24(6):268-279. DOI 10.1016/j.tig.2008.03.004.
- Prochowska S., Nizanski W., Partyka A. Comparative analysis of *in vitro* characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (*Felis domesticus*). *Theriogenology.* 2016;86:2063-2072. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.07.002.
- Rijsselaere T., Van Soom A. Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* 2010; 79:467-470.
- Tsutsui T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology.* 2006;66:122-125. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.03.015.
- Wildt D.E., Monfort S.L., Donoghue A.M., Johnston L.A., Howard J.G. Embryogenesis in conservation biology – or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology.* 1992;37:161-184. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90253-N](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(92)90253-N).
- Zambelli D., Bergonzoni M.L., De Fanti C., Carluccio A. Sperm morphology evaluation techniques in the cat, rabbit and dog. *Vet. Proceedings.* 1993;47:279-283.
- Zambelli D., Caneppele B., Castagnetti C., Belluzzi S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod. Domest. Anim.* 2002;37:310-313. DOI 10.1046/j.1439-0531.2002.00365.x.