

АВТОРСКА СПРАВКА ЗА ПРИНОСНИЯ ХАРАКТЕР НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ НА ГЛ. АС. ДЕСИСЛАВА АБАДЖИЕВА

за конкурс по позиция - академична длъжност „доцент“, специалност 04.02.01. „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването“, професионално направление 6.3. „Животновъдство“, област на висше образование 6, „Аграрни науки и ветеринарна медицина“

Авторската справка за приносен характер е направена въз основа на представените научни материали, отразяващи фундаментални и приложно-научни изследвания в областта на биология и биотехника на размножаването и развъждането на селскостопански животни. Новостта, която дават получените данни и достоверността им, са резултат от използване на съвременни методи за изследване, като имунохистохимия, ELISA, генно-експресионен анализ, утвърдени софтуерни програми за статистическа обработка на резултати, др.

Справката използва 27 публикации, 55% от които са публикувани в рецензирани списания, а на 8 от тях гл. ас. Десислава Абаджиева е първи автор. Включени са и 30 научни съобщения, над 70% от които презентирани на международни форуми.

Научните приноси могат да бъдат систематизирани в следните направления:

I. Фундаментални проучвания върху метаболитния статус и физиологичния комфорт при животните

Развитието и растежът са физиологични процеси, които се влияят от много фактори като порода, хранене, технология на отглеждане, сезонност и др.

Репродуктивната система е особено чувствителна към енергийния резерв и метаболитния статус на организма. През последните години се открива ролята на така наречените "метаболитни" хормони - лептин и грелин, които осъществяват взаимодействие между енергийните резерви и репродукцията. Характеризирани са промените в нивата на грелин, прогестерон, естрадиол в кръвните серуми на женски свине от различни кръстоски, преди и след пубертета им. Значително по-високо ниво на прогестерон и естрадиол ($P < 0.001$) са установени при женски Large White x Landra (LWxL) и Danube White x Landrace (NBG) на възраст 210 дни сравнено със стойностите им на възраст от 165 дни. Има слаба негативна зависимост между нивата на грелин и

прогестерона в периода преди пубертета, докато в пост-пубертета е установена положителна корелация между двата хормона при изследваните породи. Оригинален принос на този научен труд е характеризиранието на промени в кръвните нива на половите хормони прогестерон и естрадиол и метаболитния хормон грелин преди и след пубертета на млади свине от новосъздадената кръстоска NBG, като тези резултати се сравняват с хормоналната характеристика на LWxL кръстоската (**публ. № 15**).

Мониторингът на хуманното отношение към животните, изисква повече проучвания върху модела на хормоналните вариации, изхождайки от голямо разнообразие от стресори, на които са подложени животните. Изследвани са съпътстващи стрес-ефекти от социално разстройство, върху динамиката на плазменото ниво на кортикостерон и хетерофилно:лимфоцитно съотношение при кокошки от породата Lohman, за които е установено че се увеличават. Промененото съотношение на кръвните клетки може да служи като надежден показател за статута на благосъстоянието на птиците, но не дава информация за различните нива на стрес. Комбинирането на този показател с измерване на плазмения кортикостерон, дава изчерпателна представа за благополучието на домашните животни, което има съществено значение и за тяхното репродуктивно здраве (**публ. № 20**).

Проследена е ролята на глюкагон, като стресов фактор за метаболизма, инжектиран в гръдния мускул на 7 седмични пилета (порода Lohmann) в дози от 50 µg/птица и 100 µg/птица. Екзогенният глюкагон стимулира надбъбречната функция и упражнява контрол върху стреса, като повишава плазмените нива на кортикостерон. Промени в хормоналните съотношения водят до дисбаланс в динамиката на плазмения холестерол, което е косвено доказателство за това, че глюкагонът е стресов фактор на метаболизма (**публ. № 2**).

Фундаментални проучвания са проведени върху породата Източнобалканска свиня, от гледна точка на получаване на информация и за запазването ѝ като генетичен ресурс на България. Усъвършенстването на репродуктивния им потенциал е постигнато чрез специално подхранване в условия, доближаващи се до естествените им, дори в неразмножителен сезон, но след подбор на нерези с доказано влияние върху получаването на по-голям брой живородени прасенца (**науч. съобщ. № 3**).

Методически приносен характер има **науч. съобщ. № 12**, изразяващ се в разработване на лабораторен подход за оценка на метилирането на гени, по-конкретно ESR1 в свински яйчници. Ген ESR1 се свързва с броят приплоди при различни породи свине. Получените резултати показват, че в рамките на анализираната област на ESR1

ген (425bp) всички CpG острови са метилирани. Тези резултати позволяват да се предположи, че е възможна промяна на експресията на този ген чрез епигенетичен механизъм.

Създаден бе математически модел, чрез който се определя ефекта на пола върху окачествяване на месо от различен произход. Това е нов и интересен начин на изследване в биологията, който дава допълнителна характеристика към разглеждане на биологични субекти, като се имат предвид всички фактори, които те са предизвикали. Чрез анализ на физикохимични параметри за пилешко месо от различен произход (линия С, хибридно червено Bro и синтетична популация Label) и референтни стойности на същите параметри при 180 мъжки и женски обекта се установи, че биологичните разстояния, изчислени както за гръдния мускул, така и за бедрения, при женския пол са по-ниски от тези при мъжките и за трите произхода. Направения математически модел има практическо приложение и резултатите могат да бъдат използвани от специалистите по хранене (**публ. № 19**).

II. Изследвания на продуктивни и биохимични параметри в организма на животни, третирани с хранителни добавки

Репродуктивната функция е силно чувствителна към метаболизма. Известно е, че фертилноста се определя от мултивариабилен пакет, включващ не само половите хормони, но също така и биохимичните метаболити. През последните години интерес предизвиква третирането с хранителни добавки, които се явяват модерни заместители на досега използваните нутритивни антибиотици и хормони, за подобряване на здравния статус и повишаване на репродуктивния потенциал. Проследени са метаболизма и продуктивни параметри при селскостопански животни и птици, като ефект от следните хранителни добавки:

➤ Spirulina platensis (СП)

Доказано е, че микро-водораслото СП обогатено с фикоцианин, каротеноиди, желязо и селен подпомага изграждането на имунния отговор при ваксинация срещу високорисковия вирус на хеморагичната болест (RHDV), който води до 100% смъртност при заразените. По-бързо и по-високо продуциране на специфични антитела срещу RHDV е наблюдавано при третирани зайци с цялата биомаса от водораслото (**публ. № 3**). Анализът, базиран на полови различия при зайци приемали СП (1g/животно), доказва повишена концентрация на еритроцити и стойностите за

хемоглобин при мъжки зайци, но не и при женските. Диетичният ефект на добавката върху кръвните показатели се изразява в по-нисък холестерол при мъжките, спрямо женските, които имат по-добра продуктивност (**науч. съобщ. № 18**).

При женски свине СП значително увеличава интензитета на растеж и намалява конверсията на хранителните вещества. При дневен прием в доза 3g/глава дневно, тя стимулира хемопоезата с повишаване броят на еритроцити и нивото на хемоглобин. (**публ. № 11**). Положителна корелация е установена между грелин и прогестерон във всички групи свине, получавали 2 или 3 g /ден, обаче, между естрадиол и грелин само при третирани със СП. Това позволява да се приеме, че добавката влияе на яйчниците по метаболитния път грелин-естрадиол. Получените резултати доказват значението на метаболитния хормон грелин в контрола над ключови аспекти на репродуктивната функция (**публ. № 6**). СП, включена в основна дажба на прасенца, след отбиването им води до подобряване на здравния статус, намалявайки храносмилателните разстройства, и активирайки образуването на еритроцити (със 17% повече от контролата) в кръвта (**науч. съобщ. № 17**).

➤ Tribulus terrestris (ТТ)

Проведените изследвания доказват положително влияние на продукта Vemoherb-T (екстракт от ТТ) върху метаболизма при птиците. В доза от 10 mg/kg телесно тегло дневно, той намалява значително нивата на глюкоза ($P < 0,001$) на кокошки носачки в сравнение с контролна група. Серумният общ холестерол тенденциозно се понижава в експерименталната група (**публ. № 17**).

При токачки (*Numida meleagris*), ТТ също понижава нивото на общите триглицериди ($P < 0,05$), холестерол ($P < 0,01$) и глюкоза ($P < 0,01$; $P < 0,001$ съответно за мъжки и женски птици) в кръвния серум. Достоверно ($P < 0,01$) се повишават стойностите за протеин, калция, нивото на хемоглобина в кръвния серум на третираните птици и от двата пола (**публ. № 8**). Съдържанието на холестерол в яйчния жълтък се понижава ($P < 0,05$) при третираните кокошки, а мастно-киселинния анализ показва добра балансираност в полза на линолова киселина (**публ. № 18**).

➤ Препарат EXTRACT (смес от риган, цинамон, капсацин)

Съдържанието на холестерол намалява, а това на фосфолипидите значително се повишава в яйчения жълтък, без да се повлиява мастно-киселинния профил на кокоши яйца от добавянето на 0.02% EXTRACT (смес от риган, цинамон, капсацин, съдържащи антиоксидантни свойства и около 80% етерични масла), (**публ. № 25**).

➤ Препарат НАТСТИМ 40

Полибактериален имуностимулатор (НАТСТИМ 40) във водата за пиене на кокошки носачки има потенциала да увеличава нивата на холестерол, фосфолипиди, общи липиди в жълтъка на яйцата, с което изследване се затвържава модела на Грам отрицателната инфекция с продължителна инфузия на липополизахариди (**публ. № 24**).

➤ Сух дестилат от пшенични зърна (DDGSw)

Много важно в регулирането на процесите на смилаемост за стомашната микрофлора са суровите влакна (CF), които заемат специално място в диетиката на подрастващи зайци. Диети със сух дестилат от пшенични зърна (DDGSw) в комбинация от ливадно сено или слама подобряват значително концентрациите на урея в кръвта, холестерол, триглицериди, АЛАТ и АСАТ. Тези резултати допринасят за обяснение на метаболизма на липидите в организма, подобрената активност на микробите в цекума и съответно здравословното състояние като цяло (**публ. № 22**).

III. Подобряване на репродуктивния потенциал на селскостопански животни, чрез прилагане на биологично активни вещества

Повишаване на репродуктивния потенциал при женски животни, чрез използването на естествени нехормонални препарати е възможно благодарение на това, че биологично активните компоненти, повлиявайки метаболитните процеси в половите жлези (засилена обмяна на веществата, повишена антиоксидантна защита, др.), могат да подобрят качеството и количеството на яйцеклетките, и оплодителния им капацитет. Това въздействие се осъществява или чрез връзката киспептин-гонадотропни рецептори и изменение на хормоналния статус, или чрез директно транспортиране на активните вещества от добавките с кръвния поток до овариите (**обзорна публ. № 23**).

➤ *Spirulina platensis* (СП)

Spirulina platensis (СП) е потенциален хранителен източник, поради богатия ѝ на протеини, минерали, микро- и макроелементи състав. Малко са проучванията за ефекта на добавката над репродуктивните показатели, но в **обзорна публ. № 26** са събрани достъпните литературни данни за ефекта на СП върху репродуктивните функции при различни селскостопански видове, като се съобщава че тя повишава теглото на новородени, подобрява качеството на гаметите, др. Проведен опит с мишки, получавали добавките селенопиран и СП, показва провокирана яйчникова функция на експерименталните животни. Биохимичен анализ на яйчникова тъкан показва увеличена активност на митохондриалния ензим цитохром С-оксидаза. На базата на това

откритие, се счита че механизмът на въздействие на активните компоненти от храната върху половите жлези, вероятно е свързан с изменение активността на митохондриите в яйчниците (**публ. № 1**).

СП в доза 1g/животно за 120 дни преди коитуса подобрява физиологичното състояние на животните, като повишава нивото на хемоглобина и намалява холестерола, но не засяга пряко плодовитостта на зайците в първото поколение (**науч. съобщ. № 1**). Установи се ефектът на СП върху фоликулогенезата и експресионните модели на растежните фактори костен морфогенетичен протеин 15 (BMP15) и растежен фактор 9 (GDF9) в яйчниците от майките и тяхното потомство - F1. С морфометрична оценка на яйчниците се откри увеличено овариално тегло, обосновано с по-голяма плътност на първични и вторични фоликули в яйчниците на експерименталните майки и тяхното потомство. В яйцеклетките е увеличена mRNA експресията и на двата гена, а в кумулусните клетки – само на bmp15. Ново откритие е, че увеличената експресия на bmp15 се унаследява от майките в тяхното поколение. Тези данни потвърждават, че диетата на зайкини, допълнена с СП по време на полово съзряване, освен че повлиява благоприятно фоликулогенезата при майки чрез увеличена експресия на специфичните за ооцитите гени, също така упражнява и трансгенеративен ефект върху фоликулогенезата при F1 поколение (**публ. № 7, науч. съобщ. № 5, № 19**).

Добавянето на СП в доза от 3g/на глава предизвиква по-ранна овулация на свине при сравнение с група получавала 2g/на глава добавка за опитен период от 120 дни. В яйчниците са наблюдавани по-голям брой фоликули с размери над 6 mm ($8\pm 1,1$ спрямо $4\pm 0,8$ при контрола) и жълти тела ($7\pm 2,1$ спрямо $3\pm 0,4$ при контрола), (**публ. № 11, науч. съобщ. № 11**).

➤ Tribulus terrestris (ТТ)

Добавката ТТ засяга пряко овариалната активност и променя фоликулогенезата по дозо-зависим начин след 42-дневен период на прием при зайци. Най-висока яйчникова активност без патологични промени се наблюдава след третиране с доза 2,5 mg/kg живо тегло от екстракта. 10 mg/kg ТТ провокира фоликуларна атрезия: във вторичните фоликули са наблюдавани дегенерирани клетки, а в третичните - атретични телца (**науч. съобщ. № 10**). Афродизиакът ТТ е проучен и върху експресията на gdf9 и bmp15 в ооцитите и кумулусните клетки, използвайки полимеразна верижна реакция в реално време (RT-PCR), а локализирането на протеините GDF9 и BMP15 в тъканите на яйчниците - определено, чрез имунохистохимичен анализ в две поколения женски зайци. Транскриптите на BMP15 и GDF9 бяха открити в ооцитите и кумулусните

клетки на зайци от всички групи. ТТ причини намаляване на нивото на *bmp15* mRNA в ооцити и увеличаване в кумулусните клетки. Нивото на *gdf9* mRNA е значително увеличено както в ооцитите, така и в кумулусните клетки. Приносът се изразява в доказаната чувствителност на BMP15 и GDF9 към биоактивните съединения на ТТ (публ. № 4).

При токачки (*Numida meleagris*) на 32-седмична възраст, доза от 10 mg/kg сух екстракт води до по-висок интензитет на полагање ($P < 0.05$), по-големи тегла на яйцата ($P < 0.001$) и тегло на жълтъка ($P < 0.01$). Фактът, че експерименталните птици имат със 7,1% по-висока плодовитост на яйцата е показателно за положителният ефект на ТТ (публ. № 21).

➤ Селенопиран (Se)

Съществен микро елемент в диетата на животните поради високите си антиоксидантни свойства се явява селенът, елемент от ензима глутатион пероксидаза (GPx). Той играе важна роля в репродуктивните процеси на двата пола.

Инжектиране веднъж месечно интрамускулно с маслен разтвор от препарат селенопиран (9-фенилсиметричен октахидроселеноксантен) в доза 0.1 mgSe/kg живо тегло осигурява физиологично количество селен в организма на свине. Установена е положителна корелация между съдържанието на селен в яйчниците и теглото им ($r = 0,76$, $P < 0,05$). Значително увеличение е отчетено за нивото на селен в кръвта ($P < 0,05$), както и по-висока активност на GPx ($142,61 \pm 6,6$ спрямо $122,28 \pm 3,4$ U/gTP, $P < 0,05$) в яйчниците на опитните свине. Експресията на γ -глутамил трансептидаза (GGT) в клетките на овариалния кортекс, фоликуларния флуид и в еритроцитите на кръвоносните съдове в яйчниците при третираните женски свине е доказателство за активен транспорт на глутатион от кръвта до яйчникова тъкан. Изследването доказва, че третирането със Se повишава антиоксидантната защита на яйчниците при женски животни (публ. № 12, науч. съобщ. № 9, 13, № 15).

Чрез електронна микроскопия се доказва наличието на липидни капчици (LD), равномерно разпределени в близост до митохондриите, опаковани в цитоплазмата на ооцити в антралните фоликули в яйчници на свине, приемали Se. За разлика от тях, в контролната група тези структури изглеждат различни и произволно разпределени в цитоплазмата. Следователно, третирането със Se индуцира хетерогенност по размер, разпределение и липиден състав в антралните фоликули, което дава яснота за потенциалната роля на добавката в промяна на липидния профил в яйчниците през фоликулогенезата (науч. съобщ. № 6).

При мъжки животни, органичното съединение Se, инжектиран в доза 0.1 µg/kg живо тегло, води до засилена антиоксидантна защита на сперматозоидите срещу генериране на свободни радикали и осигурява техния прогресивен мотилитет. Въпреки приложението на добавката 45 дни преди началото на размножителния сезон, се отчита повишено ниво на Se по кръвния поток, повишаващо качеството на семенната течност при кочове (**науч. съобщ. № 2**).

➤ Каротиноиди

Каротиноидите, известни с антиоксидантна и имуностимулаторна роля, се използват широко към дажбите на кокошки носачки за подобряване на продуктивни и репродуктивни качества. Установи се, че носливостта не се изменя от включването на 2 g чист лутеин, който има значение за ембрионалното развитие. От друга страна синтетичен каротиноид (авизант) понижава люпимостта на яйцата, докато лутеина води до 1,15% повече излюпени пилета (**публ. № 27**).

IV. Репродуктивни биохетнологии

➤ суперовулация и получаване на ембриони

Прилагането на репродуктивните биотехнологии за бързо възстановяване на застрашени видове или за запазване на генетични ресурси цели получаването на голям брой висококачествени ембриони. Известно е, че резултатът от индуцираната суперовулация не винаги е равен на броя на получените ембриони. Успешното оплождане от овулираните ооцити е резултат от действието на сложни фактори, включително качеството на гаметите. Процесът на гаметогенеза е чувствителен период към епигенетичните промени. Изследванията показват, че в процеса на зреене се осъществява епигенетично репрограмиране и на ооцити, и на сперматозоиди, което има отношение към ранното ембрионално развитие. Биологично активни компоненти на храната могат да повлияят активността на ензимите, отговорни за епигенетичните промени (**науч. съобщ. № 24**). В този случай научен интерес представляват проучванията на възможностите и механизмите за влияние върху гаметите, успешното им оплождане и добив на ембриони.

Приложение на биологично активни вещества *Spirulina platensis* (СП) и селенопиран в *in vivo* условия при женски мишки преди суперовулация по стандартен протокол на 30-и ден от експеримента, рефлектира върху качеството и количеството на

овулиралите ооцити и получените ембриони, съответно 24.5 ± 14.5 в групата със селенопиран, 22.0 ± 9.3 в групата със СП (**публ. №1, науч. съобщ. № 7**).

Комбинирана биодобавка от артишок и витамин Е в доза от 1.5mg/kg живо тегло за 30 дни преди хормоналното третиране (стандартен протокол за суперовулация), води до-голям добив на овулирала ооцити и 3 пъти по-висока генна експресия на DNMT1 и mtDNMT1. Поради извънредното съзряване на ооцитите, провокирано от суперовулацията, не всички те успяват да завършат епигенетичното си репрограмане (**науч. съобщ. № 25**).

След оплождането, генома преминава през серия епигенетични промени, като модификацията на хистоните чрез метилиране или ацетиране, което води до структурна промяна на хроматина. Този процес се катализира от група ензими наречани метилтрансферази (Su(var)3-9, SetDB1) и ацетилази, от основно значение за развиващия се ембрион. Отговорните гени са силно експресирани в периода преди имплантирането и се смята, че те регулират метилирането на ембрионалния хроматин. Установено е, че индуцирани метаболитни промени (като диабет) при женски зайци водят до понижена експресия ($P < 0.05$) на ген Su(var)3-9 при експерименталните бластоцисти в етапи на гаструлация 0 и 3 в сравнение с контролните бластоцисти. За ген SetDB1 се отчита свръхекспресия ($P < 0.05$) в предимплантационните ембриони от диабетни зайци в етапи на гаструлация 0 и 1. Това изследване доказва, че метаболитните промени могат да модулират действията на хистоно-модифициращите ензими и следователно да повлияят динамиката на хроматина. Деструкцията на SetDB1 може да доведе до промяна на епигенетичните модели и може да бъде една от причините за наблюдаваното забавяне в развитието на преимплантационни заешки ембриони при бременност с метаболитно нарушение (**науч. съобщ. № 30**).

Орегонин е полифенолно вещество, извлечено от кора на *Alnus incana* (L.), и има антиоксидантна, противовъзпалителна и противоракова активност. Приносът на изследването се изразява в пилотни изследвания над експресията на ДНК метилтрансферази в миши ембрио- фибробласти – клетъчна линия NIH/3T3 и MEF клетки, в зависимост от концентрацията и чистотата на орегонин (диарилхептаноид), и от клетъчният генотип. В доза 50 μM експресията на Dnmt1 при двата типа клетки се понижава. Обаче, регулацията на mtDnmt1 и Dnm3b mRNA транскриптите е различна: в NIH/3T3 се понижаваха, докато в MEF се повишава. Орегонин в доза от 100 μM повишава всички метилтрансферази при MEF клетките, докато при NIH/3T3 - само Dnmt1 и mtDnmt1. (**науч. съобщ. № 21, № 22**). Данните са препотвърдени при клетъчна

линия NIH/3T3, като е установено и влиянието на суров екстракт (вещество с 60% орегонин и смес от други диарилхептаноиди) в доза 100 μM , който повишава Dnmts3a и 3b. Орегонинът, извлечен от *Alnus incana*, има добър потенциал за използване като епигенетичен агент за модулирането на процесите на метилиране на ДНК. (**науч. съобщ. № 20, патент**).

➤ **анализ на гамети**

Сперматозоидите от нерези се характеризират със сравнително високото съдържание на ненаситени мастни киселини и нисък антиоксидантен капацитет на семенната плазма. Потвърдено е че оксидативният стрес води до повишаване на нивата на SOD и GSH-Px, когато се инкубирани или с H_2O_2 или $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$, но не осигуряват достатъчно защита върху сперматозоидите и процента на прогресивно подвижните сперматозоиди се понижава, а морфологичните аномалии се увеличават (**публ. № 5, науч. съобщ. № 29**).

В еякулати на нерези, след съхранение при 15°C в продължение на 72 часа, намаляват нивата на ензимите LDH-X и GGT. По-силна корелация е установена между активността на LDH-X и подвижността на сперматозоидите. С времето на съхранение, намаляват сперматозоидите с прогресивен мотилитет, което кореспондира с редуциране на ензимната активност (**публ. № 9, науч. съобщ. № 27**). Положителна корелация е установена между подвижността и концентрацията на сперматозоидите и активността на алкална фосфатаза (AP, $r = 0.63$) и лактат дехидрогеназа (LDL, $r = 0.66$) във водоразтворим екстракт, както и в екстракт Triton-X 100. Въпреки използването на различни разреждатели - BTS и BTS Gold, активностите на AP и LDL могат да се използват като биологични маркери за окачествяване на семенна течност (**науч. съобщ. № 8**).

Изследване върху влиянието на сезона при кочове от новата порода Синтетична популация българска млечна, допринасящо за успеваемостта на осеменяването в практиката, потвърди, че през размножителния сезон кинематичните параметри на сперматозоидите са по-добри, с по-високи оплодителни способности (**публ. № 10, науч. съобщ. № 23**).

Разреждателите за семенна течност, съдържат различни захари в състава си, което рефлектира върху подвижността на сперматозоидите. При кочове е установено, че разреждател в комбинация от дизахариди (захароза и лактоза) и тризахариди (рафиноза) запазва по-висока подвижност на сперматозоидите след съхранение при 4°C за 24 часа

и 48 часа. Този разредител се препоръчва в практиката за осеменяване на овце, тъй като увеличава степента на бременност след изкуствено осеменяване (**публ. № 13, науч. съобщ. № 14**).

Оценката на качеството на сперматозоидите в последователни еякулати е важна за прогнозиране успеваемостта на случната кампания, тъй като в практиката един разплодник се използва за осеменяване на множество женски. При кочове от порода П-de-France на различна възраст е установено, че концентрацията на сперматозоидите и активността на алкалната фосфатаза в третия последователно получен еякулат намаляват. Във втория активността на алкалната фосфатаза се запазва, но намалява обема и концентрацията на сперматозоидите. Това дава основание да се препоръча за практиката употребата на първия, а по необходимост - втория еякулат (**публ. № 16**). Препоръчително е ограничено използване на семенен материал от млади кочове за изкуствено осеменяване, поради занижена концентрация на сперматозоидите и активността на алкална фосфатаза (**науч. съобщ. № 28**).

Честотата на събиране на семенна течност е фактор, ограничаващ качеството на сперма при жребци след размразяването ѝ. Потвърждава се, че за Източнобългарска порода коне, редовният режим на еякулация (един път на седмица) е по-подходящ за събирането на сперма, която ще се криоконсервира (**науч. съобщ. № 16**).

Количеството и качеството на получените ооцити, подходящи за последващи *in vitro* процедури е в тясна връзка с морфологията на свинските яйчници. Стойностите на морфометричните параметри на яйчниците с corpus luteum (CL) са по-високи в сравнение с яйчниците без жълти тела ($P < 0.05$). По-голям брой кумулус-ооцитни комплекси (COCs) и ооцити с корона radiata (POCs) се добиват от яйчниците с CL. Въпреки това и двата типа яйчника могат да се използват за добив на яйцеклетки годни за *in vitro* процедури, оценени от теста за интрацелуларна активност на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа. (**публ. № 14, науч. съобщ. № 26**). COC с гранулирана цитоплазма и поне два компактни слоя кумулусни клетки са използвани за витрификация чрез използване на стандартен протокол в 0.25 ml сламки. Морфологичната им оценка след размръзване показва, че отсъствието на CL в яйчниците, от които са получени COC, положително повлиява брой възстановени ооцити и тяхната преживяемост. Анализираните параметри могат да послужат за пропоръка при избор на яйчници за производство на ембриони *in vitro* (**науч. съобщ. № 4**).