



1869

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКАТА

Институт по биология и имунология на размножаването

„Акад. Кирил Братанов”

Мадлена Нанева Андреева

**ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ПОРОДНИТЕ ОСОБЕНОСТИ ПРИ ОВЦЕ
ВЪРХУ КРИТОЛЕРАНТНОСТТА НА СПЕРМАТОЗОИДИТЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен

„Доктор”

*Специалност: Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на
размножаването*

Шифър 04.02.01

Научен ръководител: доц. д-р Росен Стефанов

Научен консултант: доц. д-р Никола Методиев

София, 2020

Дисертационният труд е написан на 150 страници и включва 14 таблици, 30 фигури и 18 снимки.

Научно жури:

Вътрешни членове:

Доц. Росен Стефанов – ИБИР-БАН

Доц. Пламен Тодоров – ИБИР - БАН

Външни членове:

Проф. Стайка Лалева – Земеделски институт – Ст.Загора

Проф. Васко Герзилов – АУ – Пловдив

Доц. Албена Александрова – ИНБ - БАН

Защитата на дисертационният труд ще се състои наот.....часа в заседателната зала на Института по биология и имунология на размножаването „акад. Кирил Братанов“. Материалите по защитата се намират на разположение в библиотеката на ИБИР-БАН.

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците не съответстват на тези в дисертационния труд.



1869

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКАТА

Институт по биология и имунология на размножаването

„акад. Кирил Братанов”

Мадлена Нанева Андреева

**ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ПОРОДНИТЕ ОСОБЕНОСТИ ПРИ ОВЦЕ
ВЪРХУ КРИТОЛЕРАНТНОСТТА НА СПЕРМАТОЗОИДИТЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен

„Доктор”

*Специалност: Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на
размножаването*

Шифър 04.02.01

Научен ръководител: доц.д-р Росен Стефанов

Научен консултант: доц. д-р Никола Методиев

София, 2020

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	Въведение.....	5
II.	Цел и задачи.....	7
III.	Материал и методи.....	8
IV.	Резултати и обсъждане.....	9
V.	Заклучение.....	33
VI.	Изводи.....	35
VII.	Приноси на дисертационния труд.....	36
VIII.	Препоръки за практиката.....	37
IX.	Списък на научни публикации, участия и проекти във връзка с темата на дисертационния труд.....	37

Използвани съкращения:

На кирилица:

ОС - Оксидативен стрес

СПБМ – Синтетична популация българска млечна порода

ТБК – Тиобарбитурова киселина

На латиница:

CAT – Каталаза

CASA - Компютърно-асистиран спермоанализ

γ GT – Гама-глутамил трансфераза

GPx - Глутатион пероксидазата

LDH – Лактат дехидрогеназа

MDA – Малон диалдехид

NPM - Сперматозоидите с непрогресивна движение

PM- Сперматозоиди с прогресивно движение

ROS – (reactive oxygen species) - Реактивни форми на кислорода

SOD – Супероксид дисмутаза

STR – Индекс на праволинейност

VAP – Average path velocity (скорост за изминаване на средно разстояние)

VCL - Curvilinear velocity (скорост на криволинейно движение)

VSL - Straight line velocity (скорост на праволинейно движение и крайната точка отпътя)

WOB - Индекс на осцилация – трептене

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Създадените от човека през вековете породи са неделима част от биологичното разнообразие на планетата. Съхранението на генетичен материал от високопродуктивни породи селскостопански животни или редки и изчезващи видове представлява важно звено в репродуктивната биология.

Голямото значение на овцевъдството за производството на суровини за вътрешния и европейския пазар налага динамизиране на процесите за генетично усъвършенстване на овците от различните продуктивни направления. За целта държавата, фирмите, развъдните асоциации внасят от чужбина изключително ценни разплодни животни.

Отглеждането на овце се осъществява най-вече от дребните животновъди, ето защо използването на репродуктивни технологии е ограничено. Това води до влошаване на крайните продукти, получени от овце, като вълна, месо и мляко. Въпреки това, днес се прилагат все повече техники, които позволяват значителни промени в продуктивността на потомството. Една от тези техники е изкуственото осеменяване, важен инструмент в животновъдството, който позволява да се подобри генетичното качество на потомството, като се избират родители с желани фенотипни и генотипни характеристики.

Понастоящем съществуват определени техники, които могат да ни помогнат да повишим репродуктивната ефективност, като по този начин получаваме по-големи икономически ползи от овцефермите, включително криоконсервация на сперма и изкуствено осеменяване, като биотехнологии, които могат да се прилагат във всички производствени системи (**Ruiz et al., 2015**).

Криоконсервирането на спермата е от съществено значение за асистираната репродукция, което позволява запазването на генетичен материал за неопределен период от време (**Essawe et al., 2018**). През последните 50 години са разработени и усъвършенствани множество техники с цел постигане на раждания чрез прилагане на замразени-размразени спермални дози (**Watson, 1979**). По този начин е постигнат голям напредък в криосъхранението на сперма от бици. При други видове, като овце, резултатите по отношение на фертилността са силно променливи и непоследователни. Счита се, че механизмите на увреждане на сперматозоидите при замразяване-размразяване са многофакторни, включително: студов шок, осмотичен стрес,

вътреклетъчно образуване на ледени кристали, оксидативен стрес и комбинации от тези състояния (**Watson, 1995**). Установено е, че при овцете могат да се класифицират две групи сперма - с добра и с лоша криотолерантност.

Настоящият дисертационен труд има за цел да изследва потенциала за замразяване и размразяване на сперма от кочове, от различни породи. Изследванията и заключенията са на база подвижност на сперматозоидите, жизнеспособност, морфологичен статус, антиоксидантна защита и ензимни промени.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е да се проучи влиянието на породата върху криотолерантността на сперматозоиди от кочове.

За изпълнение на целта са разработени следните 4 задачи:

1. Изследване на спермалните показатели преди замразяване и след размразяване.
 - 1.1 Определяне на мотилитета (Static, NPM, PM).
 - 1.2 Определяне на кинематичните (скоростните) параметри (Rapid, Medium, Slow, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB).
 - 1.3 Определяне процента на витални сперматозоиди.
 - 1.4 Определяне на морфологичния статус на сперматозоидите.
2. Проучване на антиоксидантната ензимна защита на сперматозоидите от изследваните породи кочове чрез определяне активността на супероксид дисмутаза (SOD) и каталаза (CAT) преди замразяване и след размразяване на еякулатите.
3. Изследване нивата на липидна пероксидация чрез определяне на концентрацията, на малон диалдехид преди замразяване и след размразяване на еякулатите.
4. Определяне на активността на ензимите - лактат дехидрогеназа (LDH) и гама-глутамил трансфераза (γ GT) преди замразяване и след размразяване на еякулатите.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследванията бяха проведени в продължение на 3 години (2017 – 2019) с разплодници от четири различни породи, от три животновъдни обекта – Овцеферма на фирма Мегастрой ООД гр.Брезник (порода Лакон), ЗП Добринка Шумчева (Софийска порода) и ПЕБ към ИНЖ Костинброд (породи Ил дьо Франс и Синтетична популация българска млечна) намиращи се на територията на Република България.

Общият брой на изследвани кочове, по породи е:

- Ил дьо Франс – 15 коча
- Лакон – 14 коча
- Синтетична популация българска млечна – 15 коча
- Софийска (Елинпелинска) – 12 коча

В експериментите бяха включени еякулати от клинично здрави животни, по време на осеменителната им кампания. Разплодниците бяха с нормално развити полови органи, изравнени по възраст, поставени под еднакъв режим на хранене, гледане и полово използване, съобразени с нормативните изисквания.

1. Всички проби са получени по метода на изкуствената вагина, разреждени с разреждител 6А-Ж и криоконсервирани по метода на Cassou (1965).
2. Анализа на спермата – спермоанализатор (SCA, Microptic, Spain).
3. Определяне виталитета на сперматозоидите – Bright Vit тест.
4. Определяне на морфологичния статус на сперматозоидите – натривки оцветени със Sperm Blue и тристепенно оцветяване (еозин, конгорот и генцианвиолет).
5. Определяне активността на SOD – метод на Beauchamp and Fridovich (1971).
6. Определяне на САТ – метод на Aebi (1970).
7. Определяне на нивата на липидна пероксидация - метод на Hunter et al. (1963).
8. Определяне активността на LDH и γ GT – UV кинетичен метод.
9. Статистическа обработка – IBM SPSS 23

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изследване на спермалните показатели преди замразяване и след размразяване.

1.1 Определяне на мотилитета (Static, NPM, PM).

Реакцията на сперматозоидите към криоконсервацията и оплодителната способност на замразена-размразена сперма варира при различните видове. Изучаването на различията в криотолерантността на сперматозоидите между породите и индивидите вместо между видовете може да разкрие източници на променливост в криотолерантността на сперматозоидите (Waterhouse et al., 2006).

В получените от нас резултати обща подвижност (NPM и PM) (табл. 1) на сперматозоиди преди замразяване и след размразяване е в рамките на стандартния диапазон, тъй като резултатите ни бяха сравнени с минималната стойност за подвижност на сперматозоидите от коч (60%) описани от Garner and Hafez (1982).

Табл. 1 Подвижност на сперматозоидите преди замразяване и след размразяване на еякулатите.

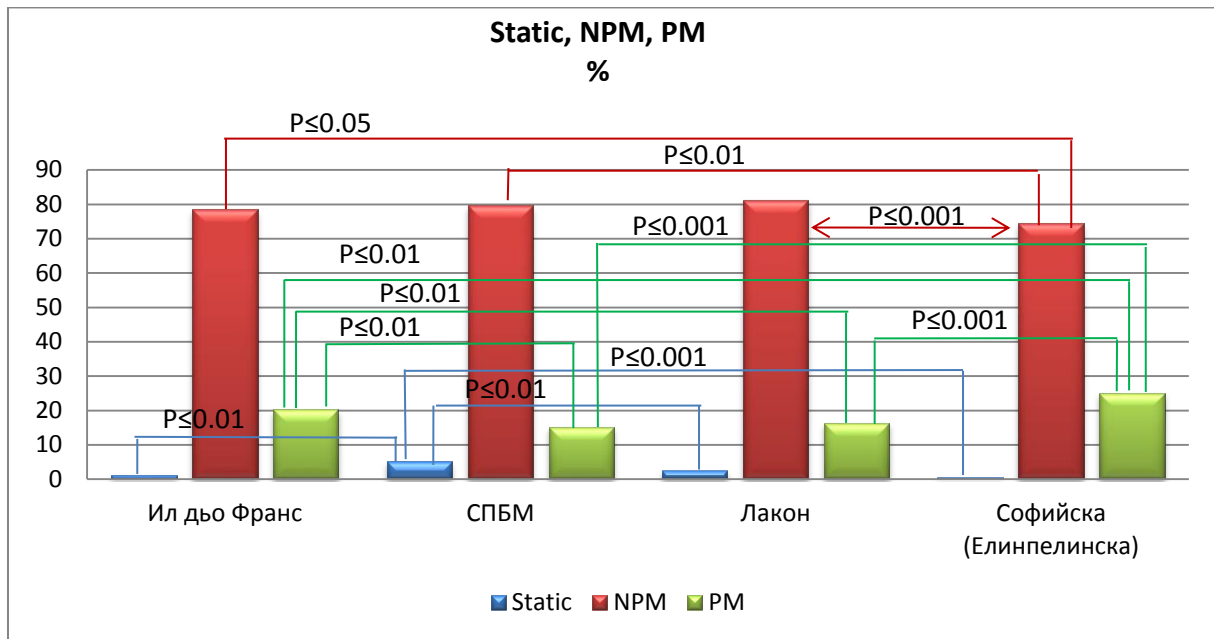
Порода	Подвижност преди замразяване			Подвижност след размразяване		
	X± SE			X± SE		
	Static,%	NPM,%	PM,%	Static,%	NPM,%	PM,%
Ил дьо Франс n=38	1.22± 0.48	78.58± 1.19	20.20± 0.96	35.52±4.70 ***	56.24± 4.04 ***	8.24±0.93 ***
СПБМ n=38	5.16± 1.28	79.66± 1.41	15.18± 0.84	46.17±5.54 ***	48.89± 5.34 ***	4.94±0.46 ***
Лакон n=34	2.42± 0.78	81.25± 1.28	16.33± 1.11	43.68±2.96 ***	51.19±2.89 ***	5.13±0.19 ***
Софийска (ЕП) n=32	0.56± 0.35	74.43± 1.03	25.01± 1.02	29.09±3.92 ***	63.51±3.93 *	7.40±0.32 ***

Забележка: Достоверност: *P≤0.05; ***P≤0.001;

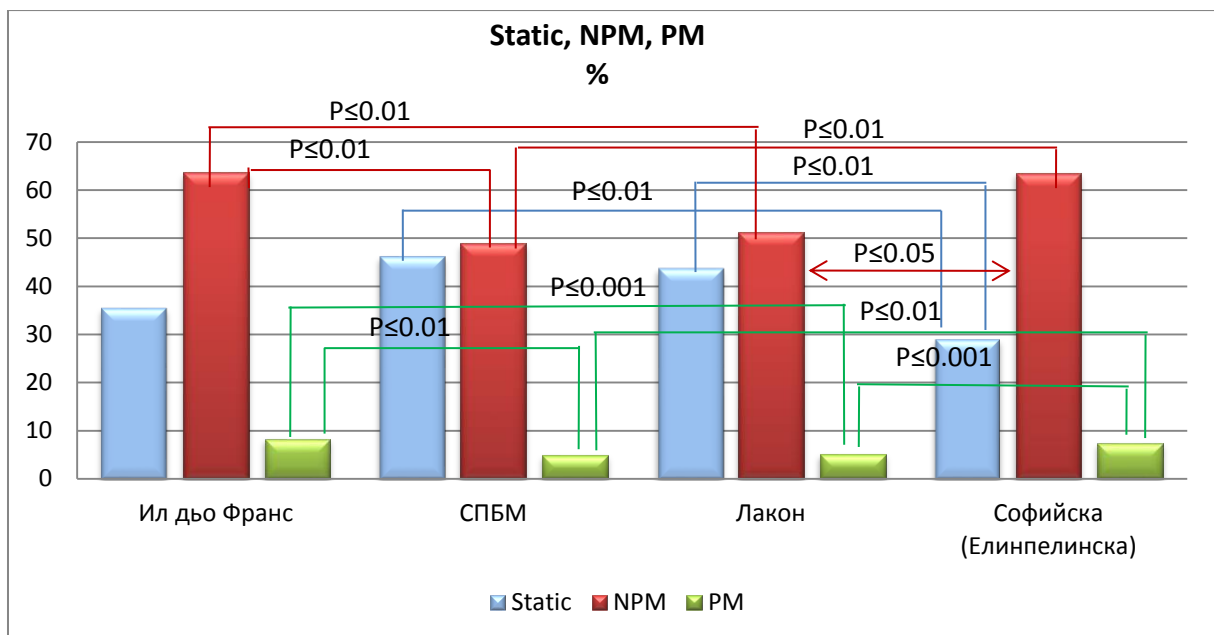
Преди замразяване установихме обща подвижност между 98 - 99% при различните породи, която е по-висока от получените резултати при Mahmuda et al. (2015) и Toker et al. (2016). Подвижността, функционалността на плазмените мембрани, целостта на акрозомите и жизнеспособността на сперматозоидите след размразяване обикновено намаляват (Ozkavukcu et al., 2008). Общата подвижност, която получихме след размразяване е 55 - 70%, т.е. понижението е с 30 - 45% при

различните породи. По-ниски от нашите резултати за подвижност след размразяване са описали Nijs et al. (2009) и Gungor et al. (2018).

На фиг. 1 са представени достоверни разлики между породите преди замразяване, а на фиг. 2 след размразяване на еякулатите. Породата оказва влияние в подвижността на сперматозоидите както преди, така и след криоконсервация.



Фиг.1 Достоверни разлики между породите преди замразяване.



Фиг.2 Достоверни разлики между породите след размразяване.

1.2 Определяне на кинематичните (скоростните) параметри (Rapid, Medium, Slow, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB).

Оценката на кинематичните (скоростните) параметри е отражение на способността на сперматозоидите да мигрират през женския генитален тракт и да взаимодействат с яйцеклетката по време на оплождането (Abadjieva et al., 2014).

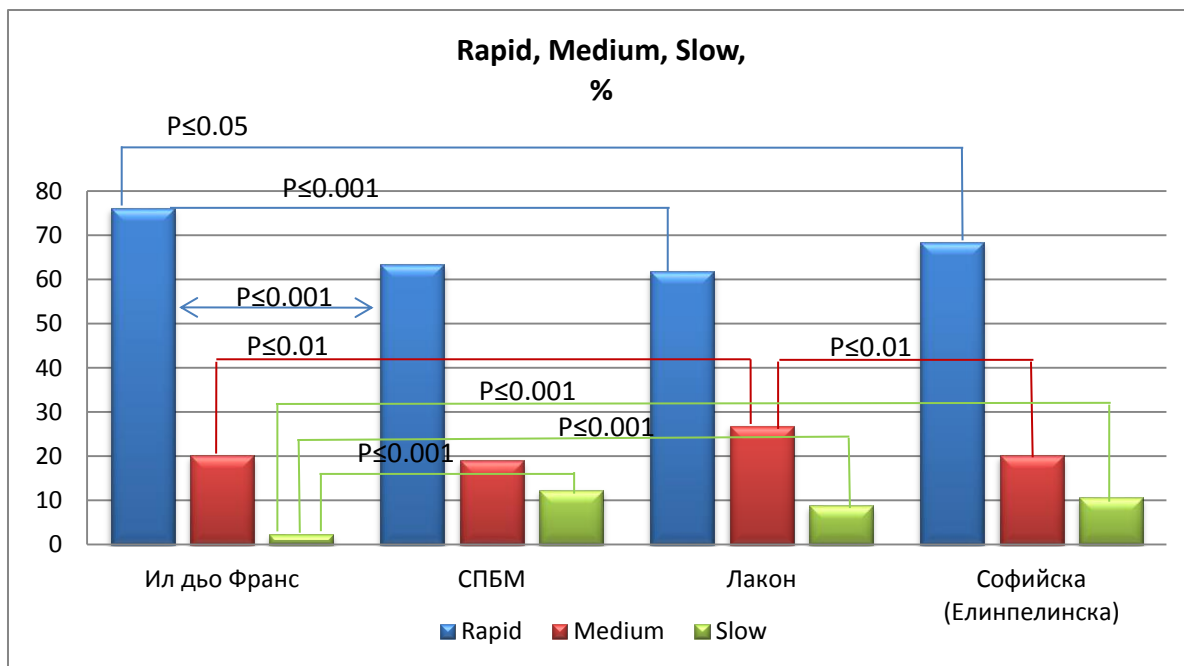
При анализ на кинематичните (скоростните) параметри преди замразяване и след размразяване, получихме средни стойности за четирите породи при параметрите – Rapid, Medium и Slow представени в табл. 2.

Табл. 2 Скоростни параметри за бързи (Rapid), умереноподвижни (Medium) и бавноподвижни (Slow) сперматозоиди преди замразяване и след размразяване на еякулатите.

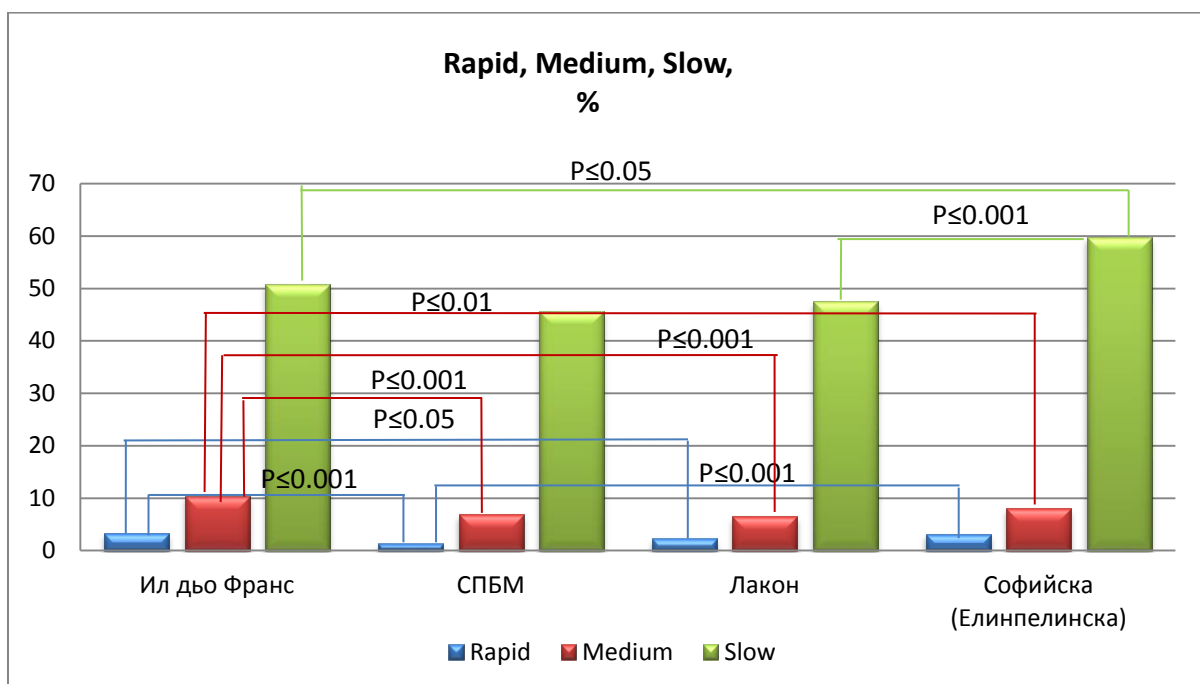
Порода	Скоростни параметри преди замразяване X± SE			Скоростни параметри след размразяване X± SE		
	Rapid	Medium	Slow	Rapid	Medium	Slow
	%	%	%	%	%	%
Ил дьо Франс n=38	76.18± 2.93	20.23± 2.52	2.37± 0.56	3.26± 0.30 ***	10.42±0.72 ***	50.80±1.59 ***
СПБМ n=38	63.48± 3.38	19.02± 2.16	12.34± 2.13	1.34±0.40 ***	6.90±1.13 ***	45.59±2.03 ***
Лакон n=34	61.85± 1.99	26.90± 1.20	8.83± 1.03	2.28±0.34 ***	6.55±0.39 ***	47.49±2.10 ***
Софийска (ЕП) n=32	68.51± 1.21	20.27± 1.37	10.66± 0.68	3.16±0.32 ***	8.02±0.37 ***	59.73±1.67 ***

Забележка: Достоверност: ***P≤0.001;

Достоверните разлики между породите при изследване на скоростните параметри Rapid, Medium и Slow преди замразяване са представени на фиг.3, а след размразяване на фиг. 4.



Фиг.3 Достоверни разлики между породите преди замразяване.



Фиг.4 Достоверни разлики между породите след размразяване

При анализ на скоростните параметри преди замразяване и след размразяване, получихме средни стойности за четирите породи при параметрите – VCL, VSL, VAP представени в табл. 3.

Табл. 3 Кинематични показатели за криволинейна скорост, праволинейна скорост и средна скорост на пътя (VCL, VSL и VAP) на сперматозоидите от изследваните породи кочове преди замразяване и след размразяване.

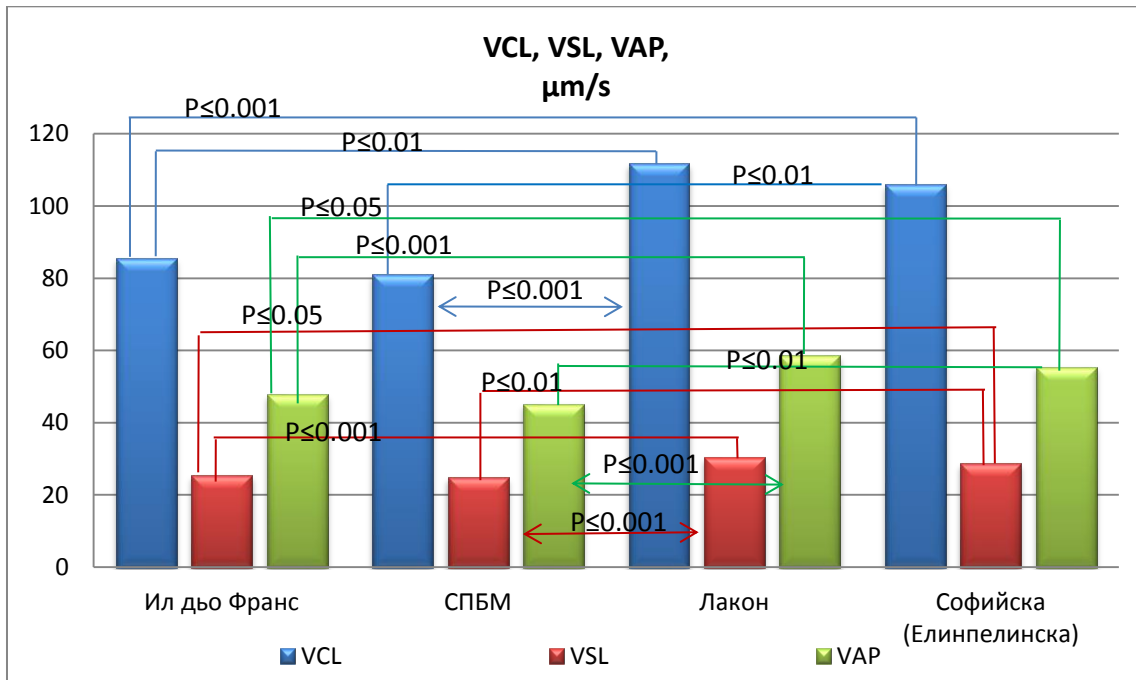
Порода	Скоростни параметри преди замразяване X± SE			Скоростни параметри след размразяване X± SE		
	VCL µm/s	VSL µm/s	VAP µm/s	VCL µm/s	VSL µm/s	VAP µm/s
Ил дьо Франс n=38	85.42 ± 5.35	25.44 ± 1.17	47.77 ± 2.60	32.40 ± 1.31 ***	13.35 ± 0.39 ***	21.71 ± 0.76 ***
СПБМ n=38	80.99 ± 6.84	24.95 ± 1.28	45.22 ± 3.19	30.70 ± 1.73 ***	13.78 ± 0.80 ***	20.57 ± 1.05 ***
Лакон n=34	111.71 ± 4.01	30.41 ± 0.69	58.61 ± 1.63	24.77 ± 1.48 ***	14.10 ± 1.40 ***	18.87 ± 1.56 ***
Софийска (ЕП) n=32	105.98 ± 4.02	28.76 ± 0.71	55.48 ± 1.65	31.16 ± 2.63 ***	16.09 ± 0.79 ***	23.02 ± 1.52 ***

Забележка: Достоверност: ***P≤0.001;

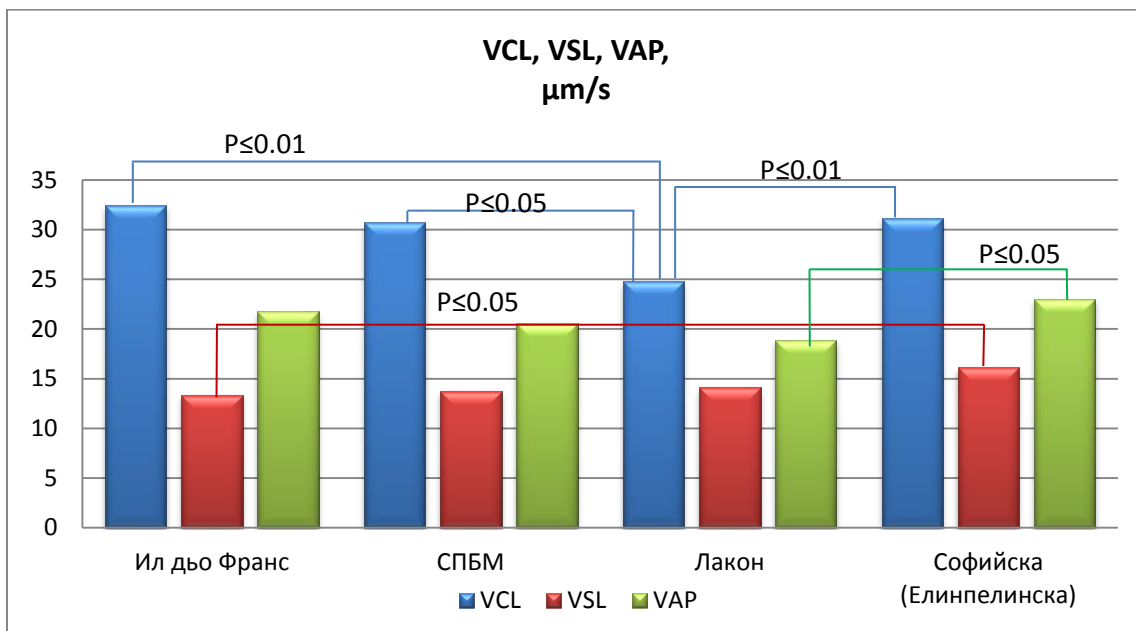
В изследванията на настоящата работа се наблюдава, че при породата Лакон преди замразяване на еякулатите стойностите за VSL и VAP са по-високи в сравнение с другите три породи. След размразяване по-високи стойности се запазват при автохтонната порода Софийска (ЕП), което е показател за способността на клетките да изминават по-голямо разстояние за по-малко време.

От друга страна, значението на променливи като жизнеспособност и криволинейна скорост (VCL) са докладвани като индикатор за оплодителна способност при кочовете (Santolaria et al., 2015). В настоящите експерименти след процеса на криоконсервация най-много беше повлиян и понижен този показател при порода Лакон, а най-високи стойности се установиха при породите Ил дьо Франс и Софийска (ЕП). Също така е доказано, че спермата на кочовете с висока оплодителна способност има и по-високи стойности на жизнеспособност, VCL и VSL от тази на кочове с по-ниска оплодителна способност (Vicente-Fiel et al., 2014).

На фиг. 5 са представени достоверните разлики между породите преди замразяване, а на фиг. 6 след размразяване на еякулатите при изследване на кинематичните показатели VCL, VSL и VAP.



Фиг. 5 Достоверни разлики между породите преди замразяване.



Фиг. 6 Достоверни разлики между породите след размразяване.

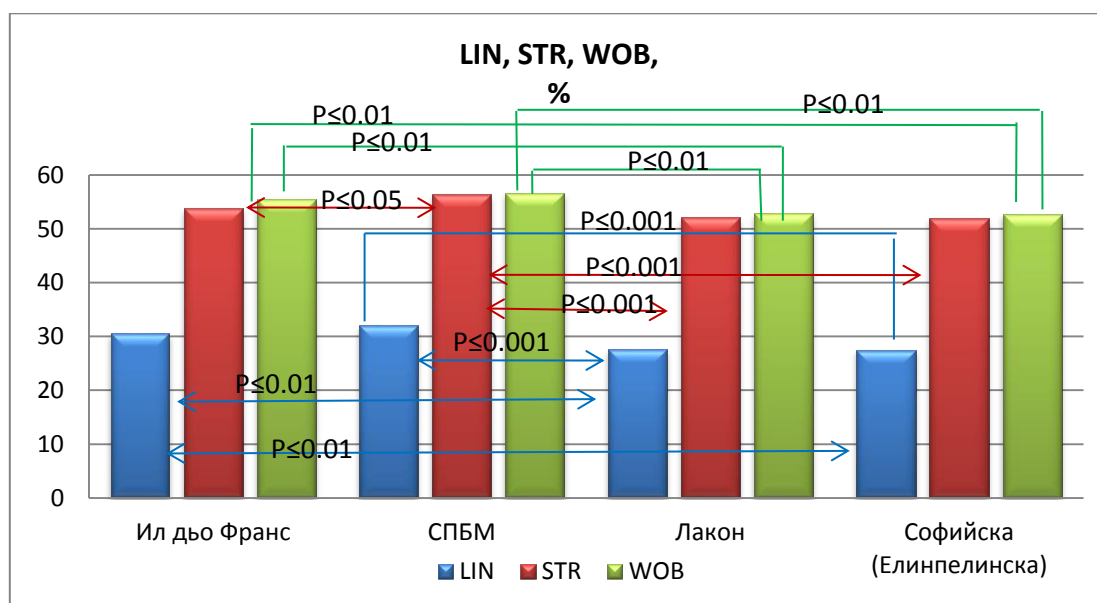
При анализ на кинематичните (скоростните) параметри преди замразяване и след размразяване, получихме средни стойности за четирите породи при параметрите – LIN, STR, WOB представени в табл. 4.

Табл. 4 Кинематични показатели за индекс на линейност, индекс праволинейност и осцилация (трепене) (LIN, STR и WOB) на сперматозоидите от изследваните породи кочове преди замразяване и след размразяване.

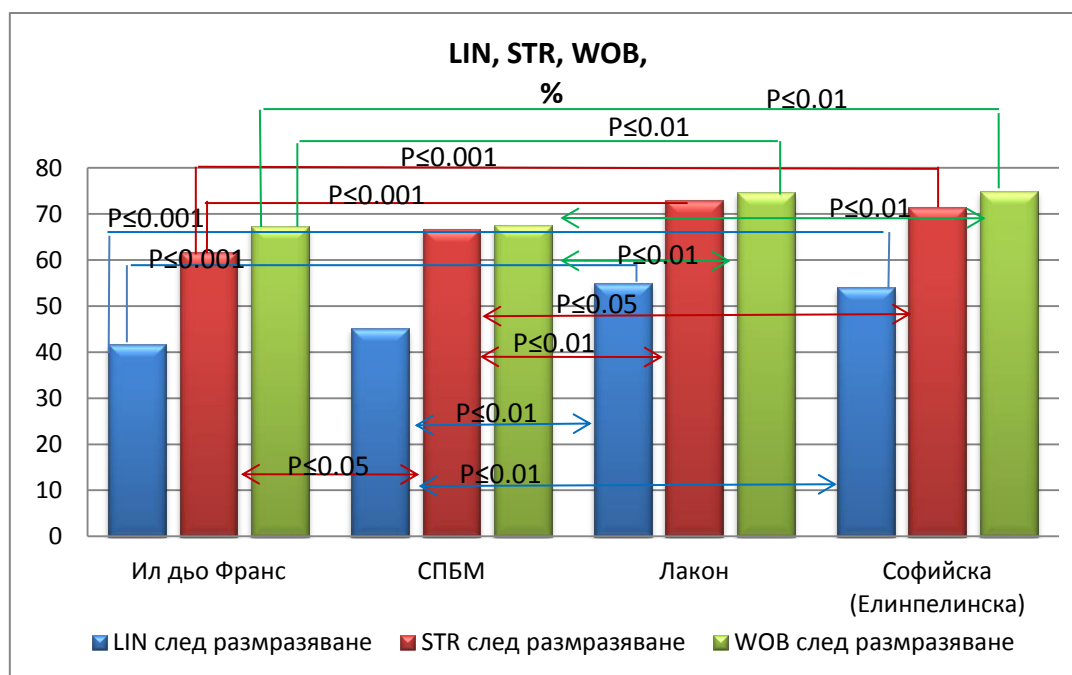
Порода	Скоростни параметри преди замразяване X± SE			Скоростни параметри след размразяване X± SE		
	LIN %	STR %	WOB %	LIN %	STR %	WOB %
Ил дьо Франс n=38	30.55 ± 0.85	53.79 ± 0.75	55.58 ± 0.79	41.72 ± 1.07 ***	61.79 ± 0.86 ***	67.33 ± 0.84 ***
СПБМ n=38	32.08 ± 1.17	56.36 ± 1.33	56.73 ± 0.97	45.24 ± 1.54 ***	66.76 ± 0.97 ***	67.56 ± 1.49 ***
Лакон n=34	27.58 ± 0.72	52.09 ± 0.63	52.87 ± 0.69	55.09 ± 2.91 ***	73.01 ± 1.58 ***	74.64 ± 2.63 ***
Софийска (ЕП) n=32	27.48 ± 0.72	52.01 ± 0.49	52.73 ± 0.88	54.00 ± 2.89 ***	71.44 ± 2.42 ***	75.01 ± 1.80 ***

Забележка: Достоверност: ***P≤0.001;

На фиг. 7 и 8 са представени достоверните разлики между породите преди замразяване и след размразяване на еякулатите при изследване на кинематични показатели LIN, STR и WOB.



Фиг.7 Достоверни разлики между породите преди замразяване.



Фиг.8 Достоверни разлики между породите след размразяване.

1.3 Определяне процента на витални сперматозоиди.

Оценката на виталитета (жизнеността) на сперматозоидите също е един от основните елементи на анализа на сперматозоидите и е особено важен за проби, в които има много статични сперматозоиди, за да се разграничат мъртвите сперматозоиди от статично живите сперматозоиди (Björndahl et al., 2004).

При определяне броя на витални сперматозоиди преди замразяване получихме резултати (табл.5), които са по-високи от публикуваните от Ivanova et al. (2019), но автори като Bedriñana et al. (2017) установяват резултати близки до нашите при изследване на кочове от различни породи.

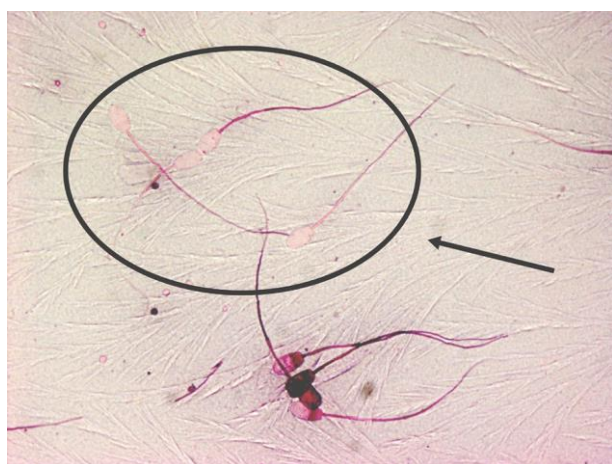
След размразяване получихме резултати по-ниски от тези при Guerrero et al. (2009) и установени от Hernández et al., (2012). Намаляване на жизнеспособността на сперматозоидите след замразяване-размразяване е наблюдавано и от други автори (Salmon and Maxwell, 1995).

Табл.5 Витални сперматозоиди преди замразяване и след размразяване.

Порода	Живи сперматозоиди преди замразяване % X± SE	Живи сперматозоиди след размразяване % X± SE	Мъртви сперматозоиди преди замразяване % X± SE	Мъртви сперматозоиди след размразяване % X± SE
Ил дьо Франс n=12	87.25±2.26	80.83±1.89 ***	12.75 ± 2.26	19.16 ± 1.89 ***
СПБМ n=12	77.83 ± 1.60	65.83 ± 1.61***	22.16 ± 1.60	34.17±1.67 ***
Лакон n=12	81.00 ± 2.07	70.08±3.11**	19.00±2.07	29.91±3.11 **
Софийска (ЕП) n=12	84.91±0.90	76.75±1.05 ***	15.08±0.90	23.25±1.05 ***

Забележка: Достоверност: **P≤0.01; ***P≤0.001;

На снимки 1 и 2 са представени сперматозоиди оцветени с виталити тест – Bright Vit.



Снимка 1 Живи сперматозоиди
Увеличение 100x

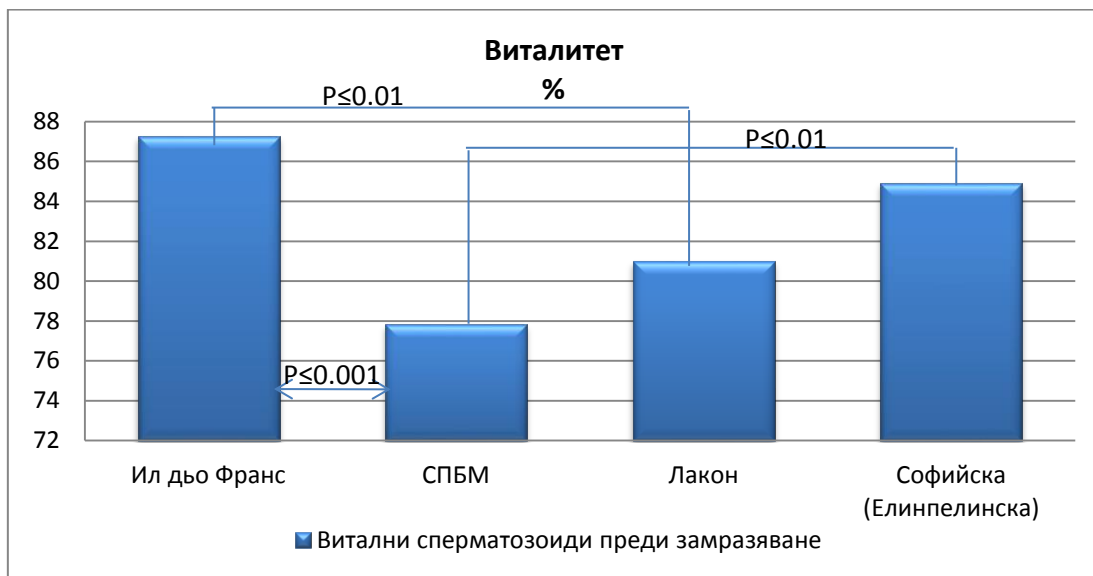


Снимка 2 Мъртъв сперматозоид
Увеличение 100x

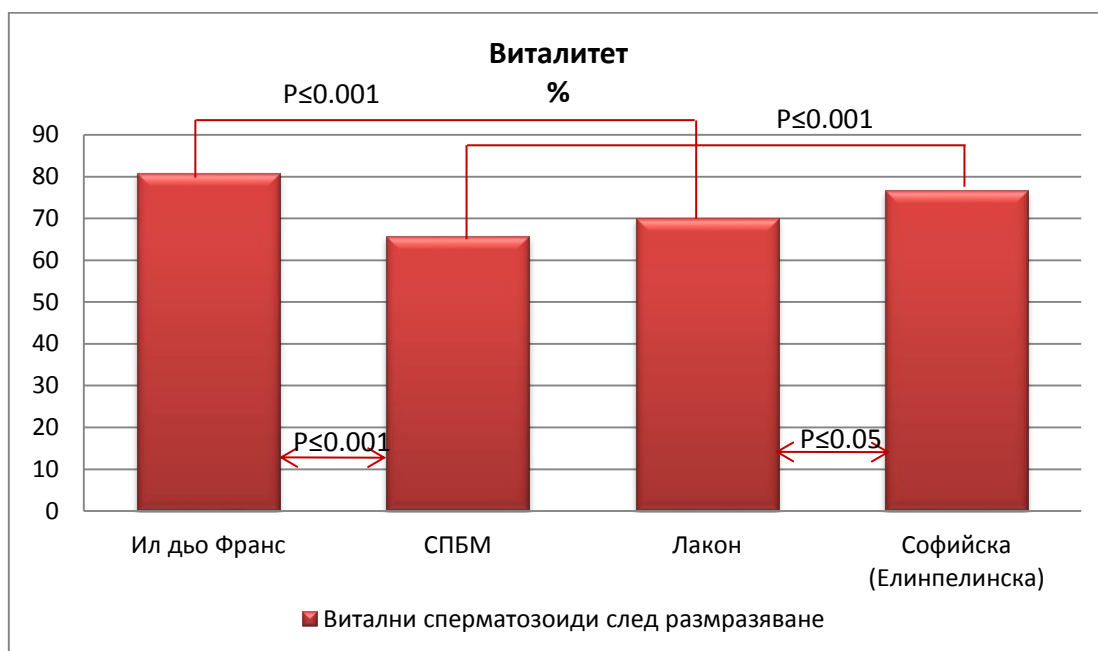
Замразяването и процесите на размразяване могат да причинят необратими щети на спермата от кочове. Според **Medeiros et al. (2002)**, сравнително висок процент (40 - 60%) сперматозоиди запазват подвижността си след криоконсервация, но само около 20 - 30% остават биологично функционални. При получените от нас резултати процентът на витални сперматозоиди е по-нисък от получените резултати за подвижността на сперматозоидите. Приемаме го за възможно, тъй като автоматичното определяне на мотилитета свежда до минимум грешките, които са възможни при субективния метод

за определяне на виталитета. Отчитаме също и възможността мембраната на част от живите сперматозоиди да е пропуснала боя.

По отношение на виталитета на сперматозоидите преди замразяване и след размразяване, се установи значителна разлика между породите, представена на фиг. 9 и 10. Други автори също са изследвали и установили достоверни разлики между породите при изследвани на спермалните показатели (Aisen, 2004; Pelayo, 2019).



Фиг.9 Достоверни разлики между породите преди замразяване.

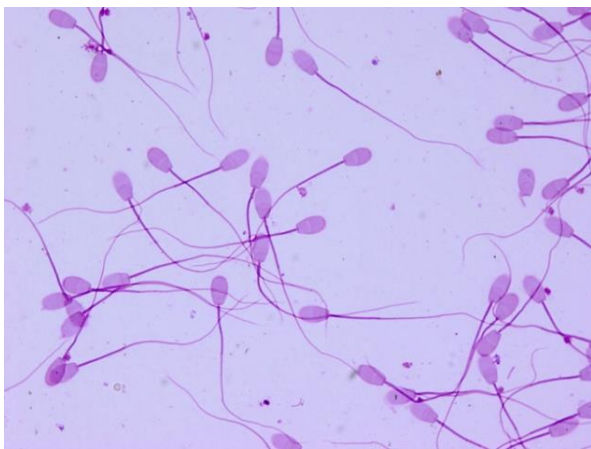


Фиг.10 Достоверни разлики между породите след размразяване.

1.4 Определяне на морфологичния статус на сперматозоидите.

Морфологичната преценка на сперматозоидите е друг от основните методи за оценка на качеството на еякулатите. Установена е положителна зависимост между оплождането и процента на сперматозоиди с нормална морфология. Делът на морфологично абнормалните сперматозоиди корелира отрицателно с оплодителната способност (**Söderquist, 1991**).

На табл. 6 са представени получените от нас резултати относно морфологичния статус на сперматозоидите при процеса на замразяван-размразяване. На снимки 12-15 са изобразени нормални и абнормални сперматозоиди.



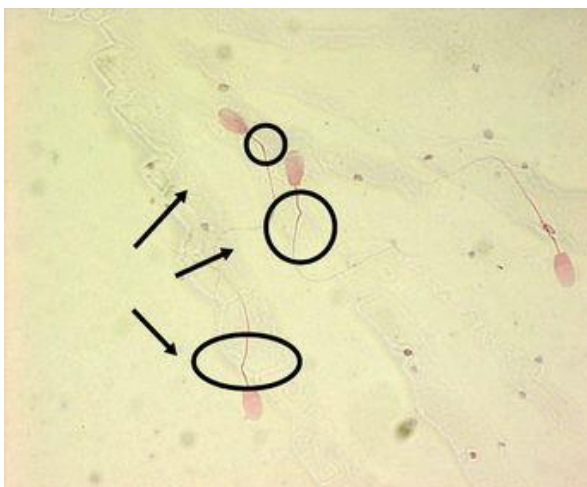
Снимка 12 Нормални сперматозоиди

Увеличение: 100x



Снимка 13 Увреждане в главата

Увеличение: 100x



Снимка 16 Увреждане в средна част

Увеличение: 100x



Снимка 17 Увреждания в опашката

Увеличение: 100x

Табл. 6 Морфологичен статус на сперматозоидите преди замразяване и след размразяване.

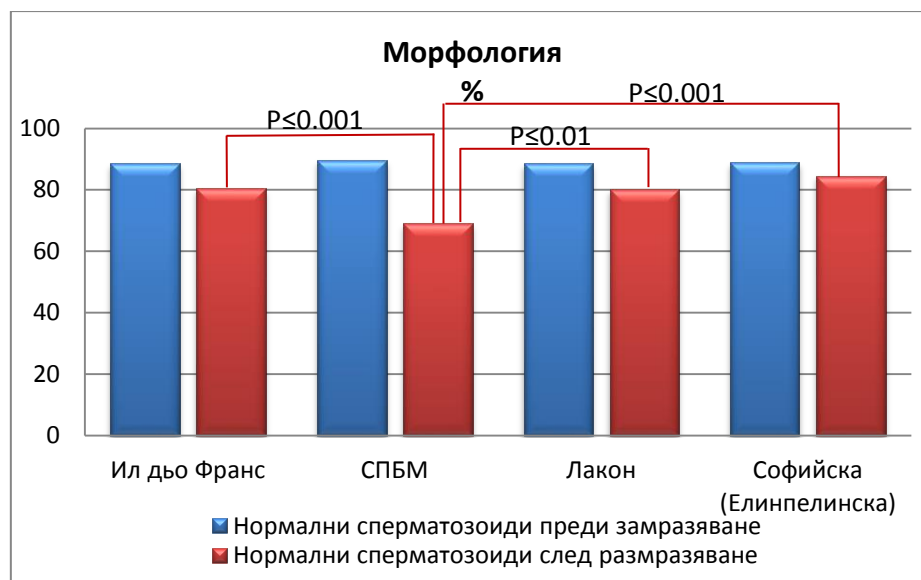
		П О Р О Д И			
		Ил дьо Франс n=12	СПБМ n=15	Лакон n=10	Софийска (ЕП) n=11
Преди замразяване % X± SE	Норм.	88.58 ±1.66	89.46±1.47	85.60±2.37	88.90±1.36
	Увр.в глава	0.33±0.18	3.06±0.47	1.50±0.63	1.18±0.32
	Увр.в ср. част	1.50±0.35	2.93±0.54	2.40±0.37	4.18±0.78
	Увр.в опашка	9.41±1.49	4.46±0.81	10.50±2.52	4.54±0.89
	Цитоплаз. капчица	0.16±0.11	0.06±0.06	0	1.18±0.61
След размразяване % X± SE	Норм.	80.41±1.76 ***	69.00±2.45***	80.10±3.00 **	84.54±1.90 ns
	Увр.в глава	0.58±0.22ns	4.46±0.86ns	2.60±0.88ns	3.90±0.82 **
	Увр.в ср. част	8.91±1.18***	9.66±1.07 ***	1.00±0.39*	4.36±0.54ns
	Увр.в опашка	10.00±1.07ns	16.80±2.59 ***	16.30±3.43**	7.09±1.78ns
	Цитоплаз. капчица	0.08±0.08ns	0.06±0.06ns	0	0.09±0.09ns

Забележка: Достоверност: *P≤0.05; **P≤0.01; ***P≤0.001; ns – няма достоверност

Подобни на нашите резултати за процентът на морфологично нормални сперматозоиди преди замразяване получават **Hernandez et al. (2012)** и **Carvajal-Sernal et al. (2018)**, при изследване на морфологичния статус на сперматозоидите на кочове от различни породи. Резултатите ни за процента нормални сперматозоиди при Софийска (ЕП) порода се различават от резултатите получени от **Червенков и кол. (2012)** за същата порода. След размразяване на еякулатите установихме понижаване на

процентът нормални сперматозоиди, но се увеличиха сперматозоидите с увреждания в опашката, което потвърждава твърдението на **Söderquist (1991)**, че при сперматозоиди с голям процент увреждания в опашката подвижността се понижава. Резултатите ни са близки и до получените от **Mahmuda et al. (2015)**, които изследват процента на нормални сперматозоиди при кочове преди замразяване и след размразяване.

При изследване на нормални сперматозоиди при процеса на замразяване - размразяване (фиг. 11), се установи, че ефекта на породата повлиява само след процеса на криоконсервация, но не и преди нея.



Фиг.11 Достоверни разлики между породите върху нормалните сперматозоиди преди замразяване и след размразяване.

2. Проучване на антиоксидантната ензимна защита на сперматозоидите от изследваните породи кочове чрез определяне активността на супероксид дисмутаза (SOD) и каталаза (CAT) преди замразяване и след размразяване на еякулатите.

Антиоксидантна ензимна система на спермата включва като основни ензими супероксид дисмутазата (SOD), каталазата (CAT), глутатион пероксидазата (GPx) и глутатион редуктазата (**Sikka, 2004**). Действайки съвместно, тези ензими предотвратяват развитието на ОС, който се проявява в образуване на липидни пероксиди, окисление на бази, на ДНК, белтъчно окисление.

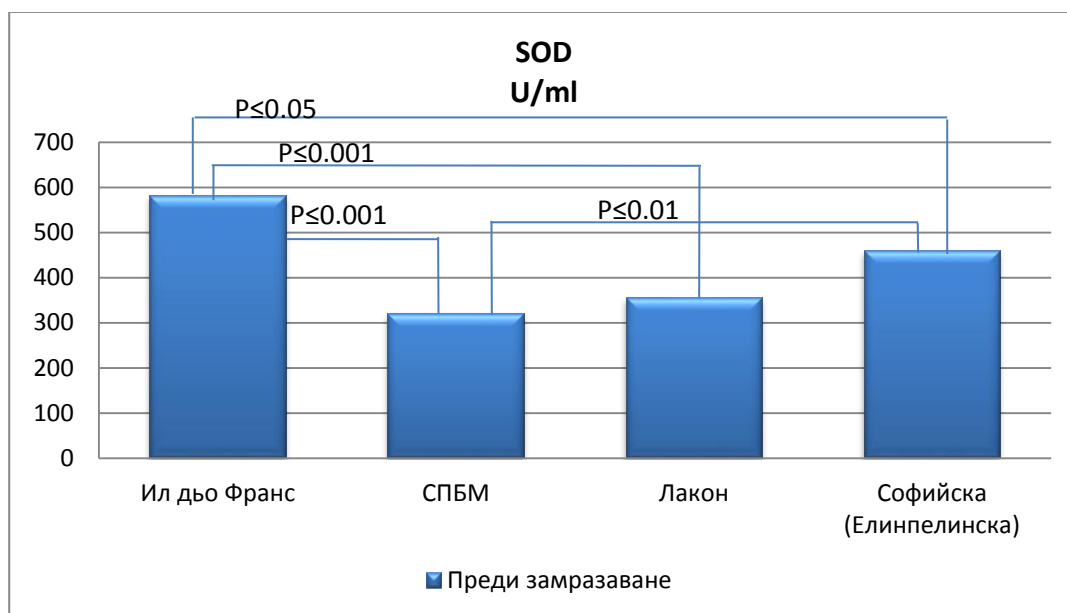
При получените от нас резултати преди замразяване и след размразяване (табл. 7) установихме, че процесът на криоконсервация понижава активността на SOD. Получените стойности на ензима преди замразяване са с около 40 - 50% по-висока активност отколкото след размразяване. Тези резултати потвърждават данните на **Marti et al. (2013)**, които измерват 65% по-ниска активност на SOD след криоконсервация на сперма от кочове. Резултатите ни са в съответствие и с получените от **Lasso et al. (1994)**, които установяват, че активността на SOD от човешки сперматозоиди винаги е била по-ниска след криоконсервация, отколкото в свеж еякулат.

Табл. 7 Активност на супероксид дисмутаза (SOD) преди замразяване и след размразяване.

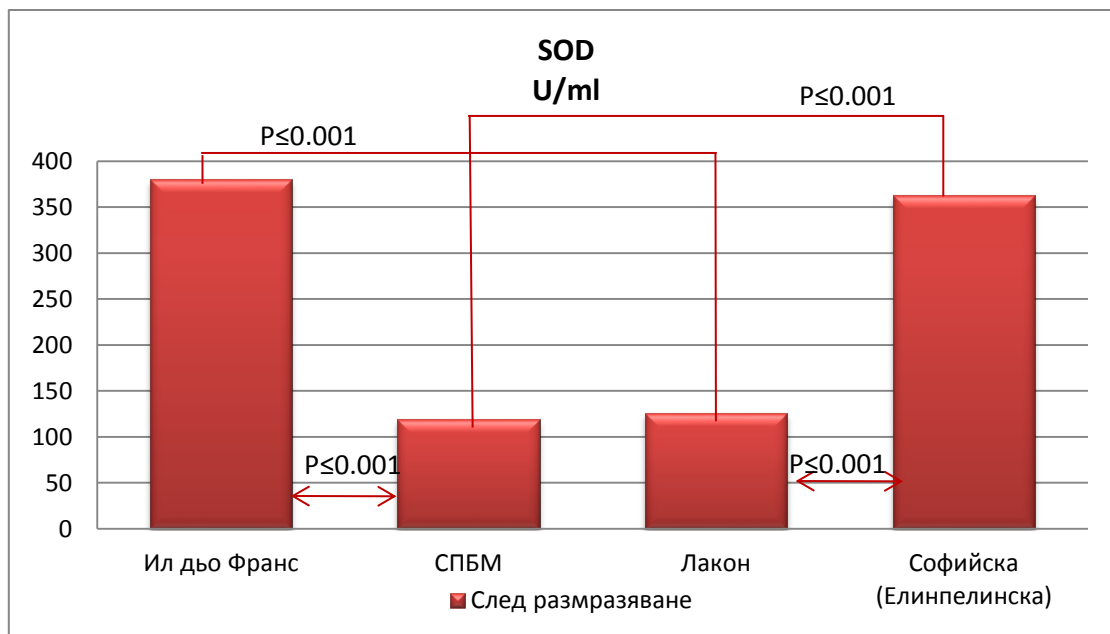
Порода	SOD преди замразяване U/ml X± SE	SOD след размразяване U/ml X± SE
Ил дьо Франс n=12	581.84 ± 23.78	380.16 ± 35.28***
СПБМ n=11	321.68 ± 7.05	119.06 ± 19.29***
Лакон n=10	354.86 ± 46.91	126.07 ± 20.28**
Софийска (ЕП) n=10	459.58 ± 61.27	363.29 ± 54.33**

Забележка: Достоверност: **P≤0.01; ***P≤0.001;

По отношение активността на ензима SOD (преди замразяване) бяха открити достоверни разлика между породите (фиг. 12), които се запазиха и след размразяване на еякулатите (фиг. 13).



Фиг.12 Достоверни разлики между породите преди замразяване.



Фиг.13 Достоверни разлики между породите след размразяване.

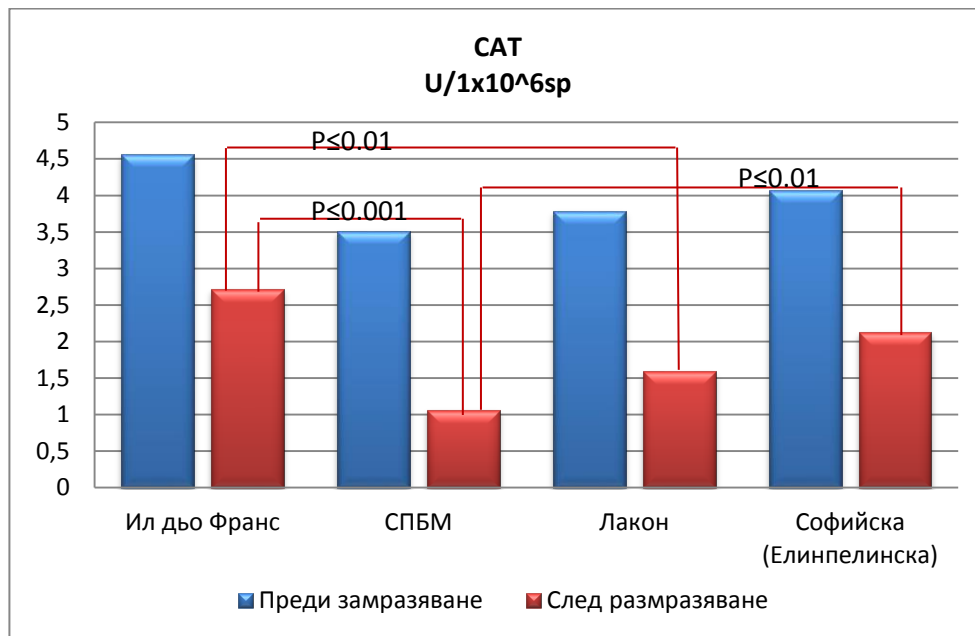
Наличието на антиоксидантния ензим САТ е доказано в спермата на коч (Trincherо et al., 1990). Резултатите за активността на ензима в свежи еякулати на кочове, които получихме (табл. 8) са близки до резултатите, които е получил Asadpour (2012) при инбредни кочове. Каталазата помага за поддържане на мембранната цялост на акрозомата и стабилизира плазмолемата на сперматозоидите (Maxwell and Stojanov, 1996). Добавянето на каталаза в разредителите подобрява параметрите ѝ (Cámara et al., 2011). След процеса на криоконсервация установихме понижена активност на ензима САТ. Тези резултати са в съгласие с установените резултати от Marti et al. (2013) и Стефанов (2007), че криоконсервацията понижава активността на ензима.

Табл. 8 Активност на каталаза (САТ) преди замразяване и след размразяване.

Порода	САТ преди замразяване U/1x10 ⁶ sp X± SE	САТ след размразяване U/1x10 ⁶ sp X± SE
Ил дьо Франс n=12	4.56 ± 0.58	2.72 ± 0.33***
СПБМ n=12	3.51 ± 0.29	1.06 ± 0.13***
Лакон n=10	3.79 ± 0.38	1.59 ± 0.19***
Софийска (ЕП) n=10	4.07 ± 0.31	2.13 ± 0.36**

Забележка: Достоверност: **P≤0.01; ***P≤0.001;

На фиг. 21 е представен ефектът на породата върху активността на CAT преди замразяване и след размразяване на еякулатите. Достоверна разлика между породите не беше установена преди криоконсервация, а само след нея между Ил дьо Франс със СПБМ ($P \leq 0.001$) и Лакон ($P \leq 0.01$); СПБМ и Софийска (ЕП) ($P \leq 0.01$).



Фиг. 14 Достоверни разлики между породите преди замразяване и след размразяване.

3. Изследване нивата на липидна пероксидация чрез определяне на концентрацията на малон диалдехия преди замразяване и след размразяване на еякулатите.

Липидната пероксидацията на мембраните, на клетките е една от най-честите прояви на ОС, поради особеностите на състава и локализацията им. Окислителното модифициране на липидите води до загуба на подвижността на сперматозоидите и намалена оплодителна способност. Съществува хипотеза, че причина за индуциране на ОС в сперматозоидите е намалена антиоксидантна защита срещу липидна пероксидация или некордониране между SOD, GPx и CAT (Shiva et al., 2011).

В резултат на липидната пероксидация структурата и целостта на мембраната се нарушава, което води до намаляване на подвижността и увеличаване на морфологичните дефекти на сперматозоидите, което засяга оплодителната им способност (Salamon and Maxwell, 2000; Huang et al., 2000; Hsieh et al., 2006). Това

може отчасти да обясни по-ниската заплодяемост от замразена-размразена сперма, в сравнение със свежа сперма (Bilodeau et al., 2001).

Резултатите от настоящето проучване по отношение на степента на липидната пероксидация в спермата от различни породи кочове преди замразяване (табл. 9) съвпадат с резултатите от други изследвания в областта (Kasimanickam et al., 2006; Стефанов и кол., 2012), но са по-ниски от резултатите получени от Asadpour et al. (2012).

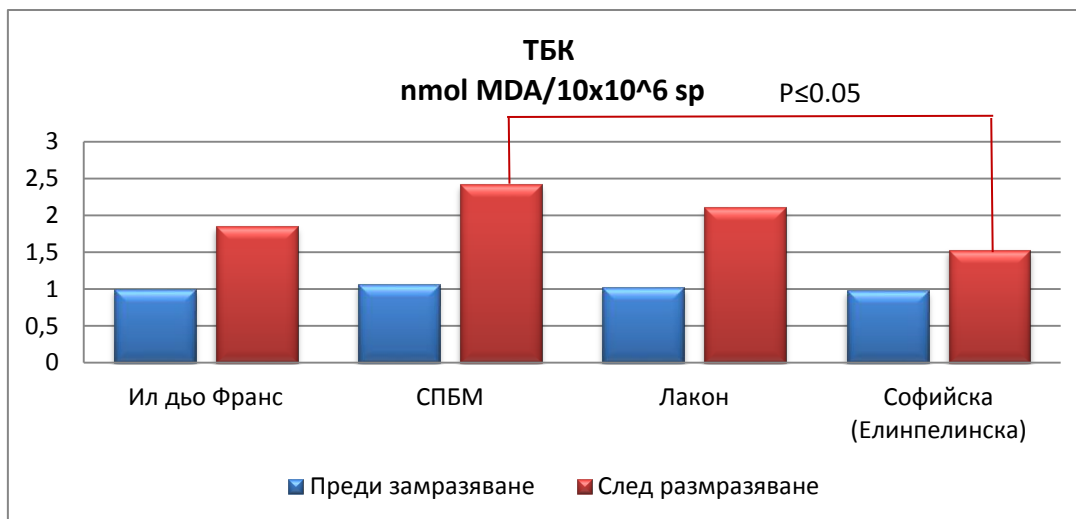
Табл. 9. Концентрация на ТБК-РС в сперматозоиди на кочовете преди замразяване и след размразяване.

Порода	ТБК-РС преди замразяване nmol MDA/10x10 ⁶ sp X± SE	ТБК-РС след размразяване nmol MDA/10x10 ⁶ sp X± SE
Ил дьо Франс n=13	1.00 ± 0.03	1.85 ± 0.14***
СПБМ n=12	1.07 ± 0.15	2.42 ± 0.31***
Лакон n=10	1.02 ± 0.39	2.11 ± 0.38 ns
Софийска (ЕП) n=10	0.98 ± 0.19	1.53 ± 0.37 ns

Забележка: Достоверност: ***P≤0.001; ns – няма достоверност

Нивата на антиоксидантите намалява по време на процеса на криоконсервиране чрез разреждане на спермата (Andrabi, 2009; Perumal et al., 2013). Затова една от стратегиите за запазване на функциите на сперматозоидите е добавяне на антиоксиданти в разредителите и средите за криоконсервация. Дозировката на антиоксидантите, по-висока от необходимата, обаче може да е токсична за сперматозоидите (Maxwell and Stojanov, 1996).

Достоверни разлики между породите при този показател преди криоконсервация не бяха установени (фиг. 15), а след криоконсервация достоверна разлика се установи само между породите СПБМ и Софийска (ЕП) (P≤0.05).



Фиг. 15 Достоверни разлики между породите в нивата на MDA преди замразяване и след размразяване.

4. Определяне на активността на ензимите - лактат дехидрогеназа (LDH) и гама-глутамил трансфераза (γ GT) преди замразяване и след размразяване на еякулатите.

Лактат дехидрогеназният изоензим C4 (LDH-C4), който е специфичен за репродуктивната тъкан се включва в метаболитни процеси, които осигуряват енергия за оцеляване, подвижност и оплодителна способност на сперматозоидите (**Blanco and Zinkham, 1963**). Резултатите, които получихме за извънклетъчната активността на ензима LDH-C4 в спермалната плазма на кочовете от изследваните породи е представена в табл. 10.

Табл. 10 Извънклетъчна ензимна активност на лактат дехидрогеназа (LDH-C4) в спермалната плазма преди замразяване и след размразяване.

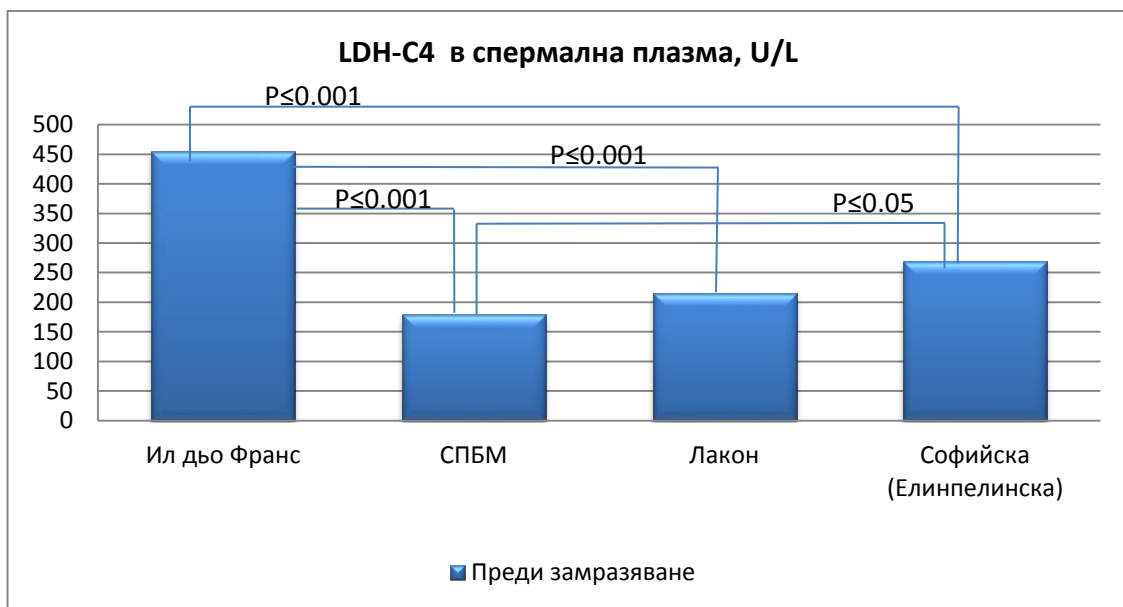
Порода	LDH-C4 преди замразяване U/L X \pm SE	LDH-C4 след размразяване U/L X \pm SE
Ил дьо Франс n=13	454.69 \pm 38.59	258.92 \pm 45.71**
СПБМ n=14	179.00 \pm 9.54	138.00 \pm 29.51ns
Лакон n=10	216.10 \pm 27.90	138.30 \pm 20.40**
Софийска (ЕП) n=12	268.16 \pm 33.41	185.25 \pm 13.67*

Забележка: Достоверност: *P<0,05; **P<0,01; ns – няма достоверност

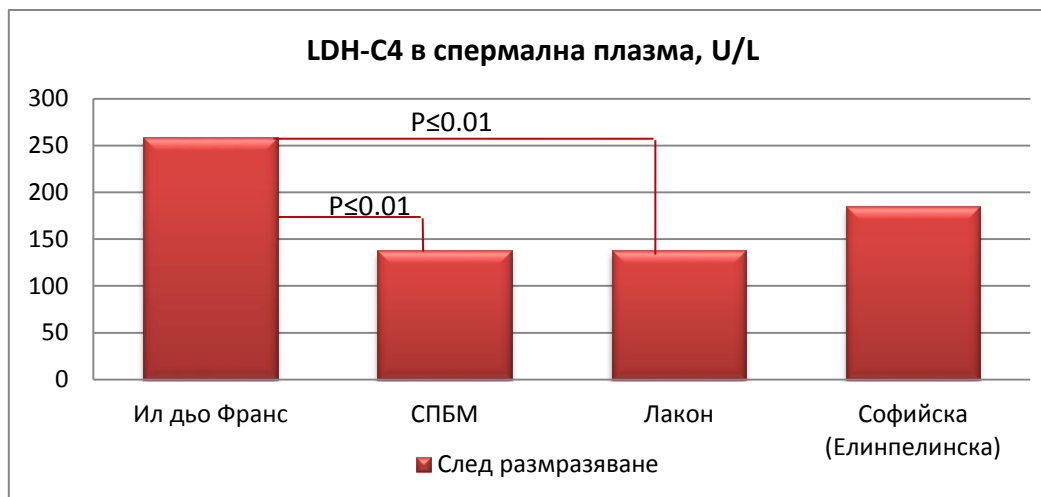
Преди замразяване на еякулатите получихме стойности, които са по-ниски от резултатите получени от **Tejaswi et al. (2016)**. По-високи от нашите резултати получават и **Zakrzewska et al. (2002)**.

В нашите резултати обаче, след процеса на криоконсервация активността на ензима в спермалната плазма на кочовете се понижава. Вероятно, криоконсервацията при проведените условия не само е довела до увреждане на сперматозоидите, но и до инхибиране на ензима и оттам отчитане на по-ниска активност. В своите изследвания при кочове и други автори (**Стефанов, 2007; Fatihah et al., 2015**), също установяват, че след криоконсервация активността на ензима LDH-C4 в спермалната плазма намалява двукратно, отколкото преди замразяване, придружено с понижаване броя на сперматозоиди с праволинейно настъпателно движение.

Достоверни разлики между породите се установиха при извънклетъчната активност на ензима LDH-C4 в спермална плазма преди замразяване (фиг.16) и след размразяване (фиг.17).



Фиг.16 Достоверни разлики между породите преди замразяване.



Фиг.17 Достоверни разлики между породите след размразяване.

При изследване на вътреклетъчната активност на ензима във воден екстракт преди замразяване (табл. 11) получихме по-висока активност на ензима, отколкото в спермалната плазма. Приемаме го за нормално, тъй като ензима е вътреклетъчен (в сперматозоиди, сперматиди и сперматоцити), а в семенната течност (т.е. извънклетъчно) се получава от разпукани сперматозоиди (или излив) и затова при неувредени сперматозоиди извънклетъчно активността му е малка, а при значителни увреждания на сперматозоидите (повече разпукани клетки – по-голям излив) извънклетъчната активност ще се повиши.

Табл. 11: Вътреклетъчна ензимната активност на лактат дехидрогеназа (LDH-C4) във воден екстракт преди замразяване и след размразяване.

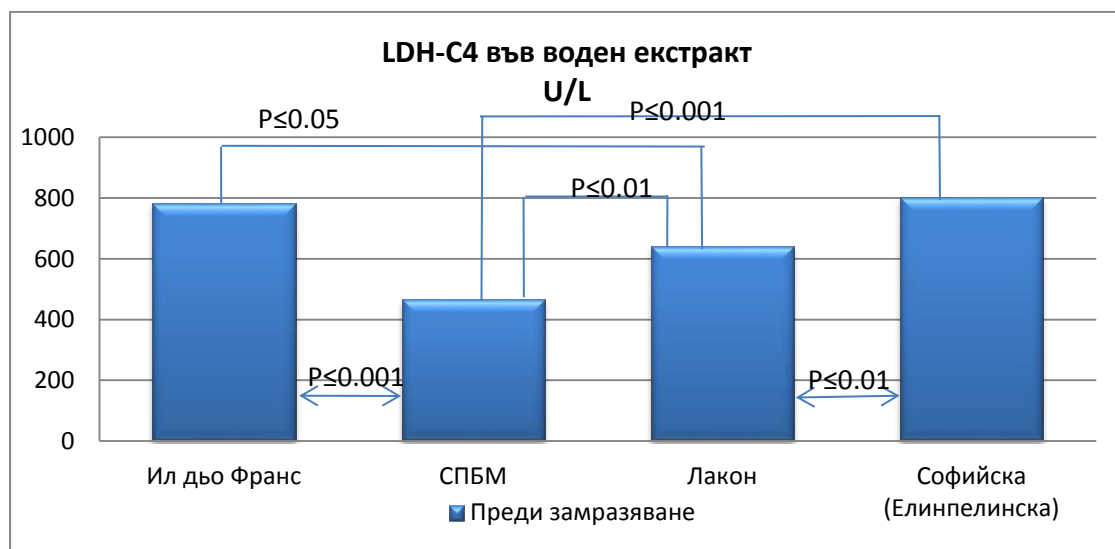
Порода	LDH-C4 преди замразяване U/L $\bar{x} \pm SE$	LDH-C4 след размразяване U/L $\bar{x} \pm SE$
Ил дьо Франс n=13	783.92 ± 58.61	499.61 ± 73.70 **
СПБМ n=14	466.14 ± 26.88	204.32 ± 21.79***
Лакон n=10	642.40 ± 26.26	207.40 ± 37.51***
Софийска (ЕП) n=12	803.25 ± 45.39	514.00 ± 50.55***

Забележка: Достоверност: **P<0.01; ***P<0.001;

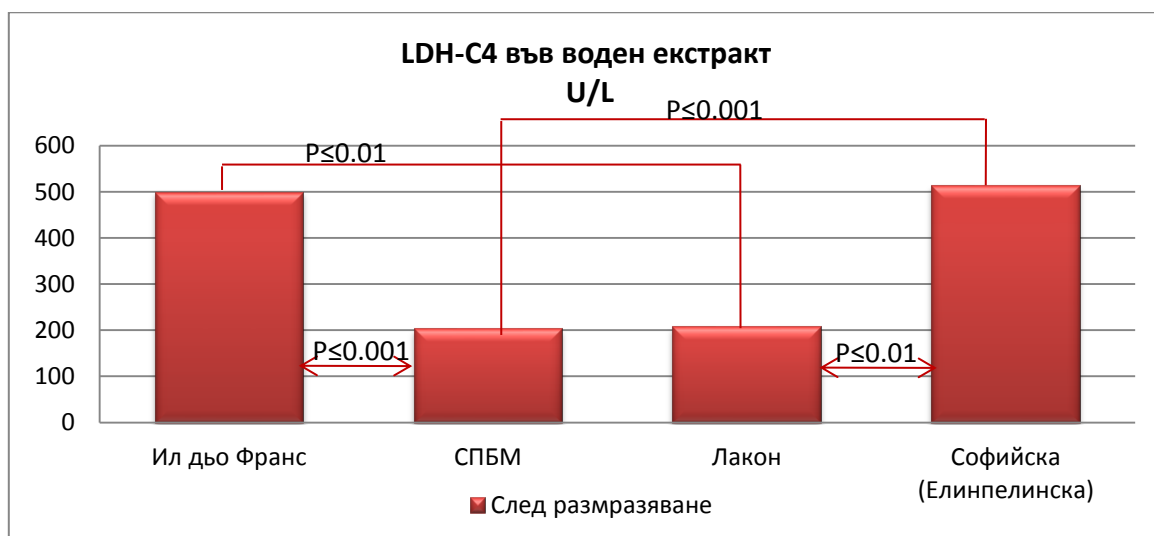
Получените от нас данни са в унисон с резултатите на **Stefanov et al. (2013)**, както и с **Fatihah et al. (2015)**, които докладват същия ефект след криоконсервация. **Brooks (2001)** предполага, че една от главните причини за ниска заплодяемост при

използването на замразена сперма от коч е загуба на активността на LDH-C4 при голям процент от сперматозоидите след криоконсервация. Инхибирането на вътреклетъчната активност на LDH блокира процеса на капацитация, което води до понижаване на оплодителната способност.

Достоверни разлики между породите се установиха и при вътреклетъчната активност на ензима LDH-C4 във воден екстракт преди замразяване (фиг.18) и след размразяване (фиг.19).



Фиг.18 Достоверни разлики между породите преди замразяване.



Фиг.19 Достоверни разлики между породите след размразяване.

Функцията на ензима гама-глутамил трансфераза (γ GT) не е добре дефинирана. Според някои автори ензимът е специфичен маркер на спермата, играе важна роля в

окислително-редукционния баланс и изпълнява защитна функция по време на преноса и съхранението на сперматозоидите в епидидиума (Hinton et al., 1991).

Преди замразяване, в спермалната плазма установихме близки стойности за активността на ензима между изследваните породи (табл. 12). След размразяване на еякулатите и изследване на активността на ензима в спермалната плазма установихме, че и при този ензим има понижаване на активност след криоконсервация.

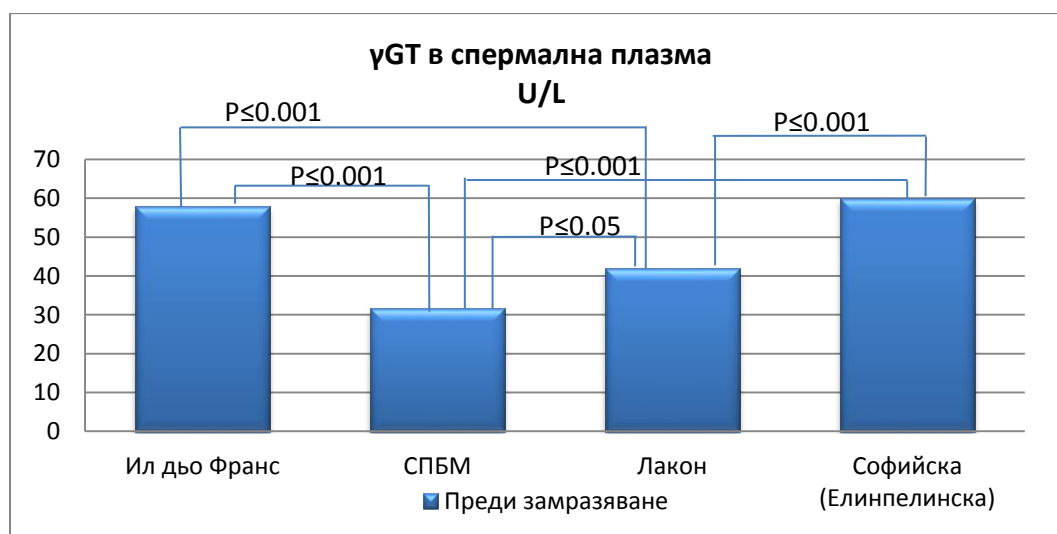
Табл. 12 Извънклетъчна ензимна активност на гама-глутамил трансфераза (γ GT) в спермалната плазма преди замразяване и след размразяване.

Порода	γ GT преди замразяване U/L X \pm SE	γ GT след размразяване U/L X \pm SE
Ил дьо Франс n=13	57.84 \pm 4.67	40.07 \pm 3.30***
СПБМ n=14	31.71 \pm 1.57	22.14 \pm 0.91***
Лакон n=10	41.90 \pm 1.70	30.10 \pm 1.91***
Софийска (ЕП) n=12	59.91 \pm 2.48	36.83 \pm 2.31***

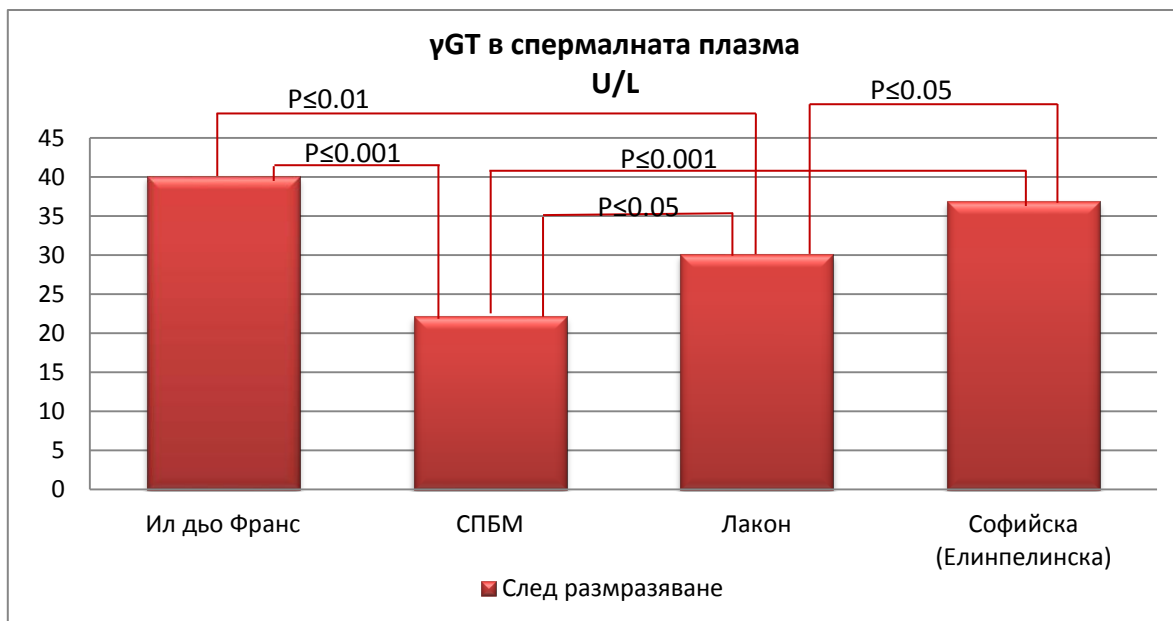
Забележка: Достоверност: ***P \leq 0.001;

Получените от нас стойности на γ GT са в пъти по-ниски от получените стойности при Zakrzewska et al.(2002).

Достоверни разлики между породите се установиха при извънклетъчната активност на ензима гама-глутамил трансфераза (γ GT) преди замразяване (фиг. 20), които се запазиха и след размразяване (фиг. 21).



Фиг. 20 Достоверни разлики между породите преди замразяване.



Фиг.21 Достоверни разлики между породите след размразяване.

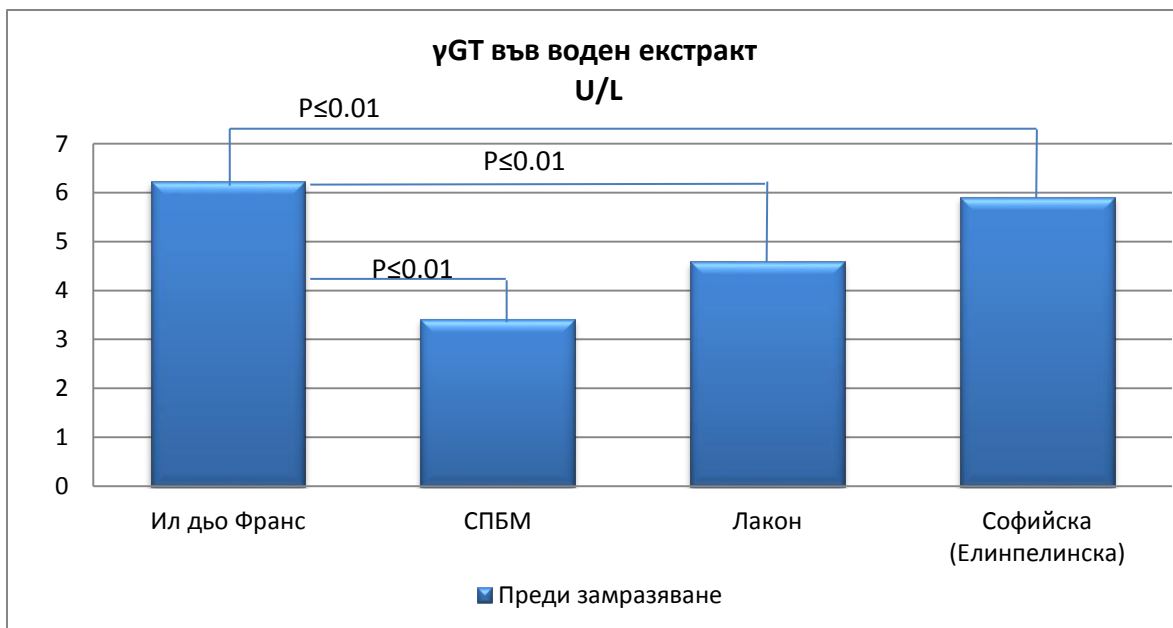
При изследване на втреклетъчната активността на ензима γ GT във воден екстракт след криоконсервация отново установихме, че активността се понижава с около 50% (табл. 13), като резултатите ни съвпадат с установеното от **Stefanov et al. (2013)**.

Табл. 13: Втреклетъчна ензимна активност на гама-глутамил трансфераза (γ GT) във воден екстракт преди замразяване и след размразяване.

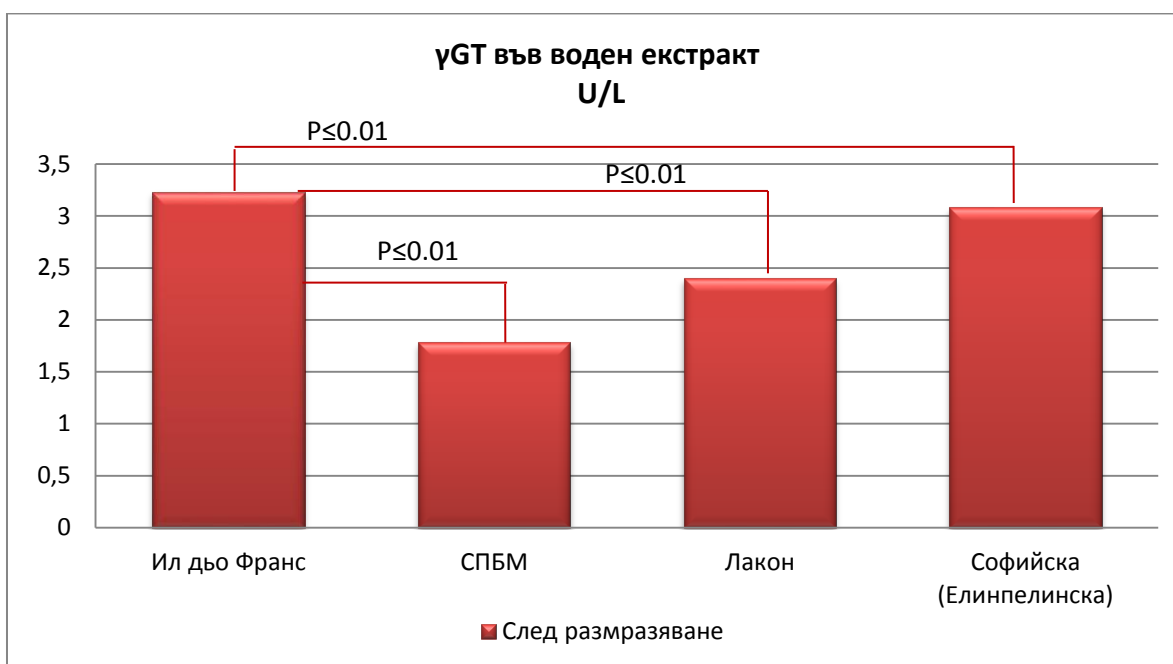
Порода	γ GT преди замразяване U/L X \pm SE	γ GT след размразяване U/L X \pm SE
Ил дьо Франс n=13	6.23 \pm 0.37	3.23 \pm 0.25***
СПБМ n=14	3.42 \pm 1.34	1.78 \pm 0.89***
Лакон n=10	4.60 \pm 0.40	2.40 \pm 0.16***
Софийска (ЕП) n=12	5.91 \pm 0.41	3.08 \pm 0.14***

Забележка: Достоверност: ***P \leq 0.001;

На фиг. 22 и 23 е представен достоверният ефект на породата върху втреклетъчната ензимната активност във воден екстракт на ензима γ GT преди замразяване, който се запази и след размразяване.



Фиг.22 Достоверни разлики между породите преди замразяване.



Фиг.23 Достоверни разлики между породите след размразяване.

V.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Криоконсервацията на сперма от селскостопански животни предлага много предимства в производствените системи, особено в генетично отношение. Процесът на криоконсервация причинява увреждане на клетките, което намалява процента на жизнеспособните сперматозоиди. Следователно, може да се очаква, че когато се използва изкуствено осеменяване със замразена сперма получената плодовитост е по-ниска в сравнение с използването на свежа сперма.

Слабо проучено, но изключително важно е да се изясни влиянието, което криоконсервацията оказва върху сперматозоидите не само при даден вид животни, а и при различните порода. Сперматозоидите от коч показват голяма вариабилност при замразяване-размразяване влияеща се както от сезона, така и от самата порода. Чрез изследвания насочени към ефекта на породата можем да предложим в практиката индивидуални подходи за криоконсервация на сперма от кочове. Също така можем да дадем препоръки, при кои породи използването на замразена-размразена сперма не е желателно.

Нашите проучвания започнахме със стандартния анализ на спермата и установяване на подвижността на сперматозоидите преди замразяване и след размразяване при четири породи овце (Ил дьо Франс, Софийска (Елинпелинска), Лакон и Синтетична популация българска млечна). Чрез компютърен спермоанализатор (CASA) установихме понижаване на общата подвижност на сперматозоидите след криоконсервация с 35-45%. Еякулатите на породите Ил дьо Франс и Софийска (Елинпелинска) се оказаха с по-добри криоколерантни качества от породите за мляко (Лакон и СПБМ). Кинематичните параметри и при четирите породи се повлияха по сходен начин. При изследване виталитета на сперматозоидите, породите Лакон и СПБМ показаха по-нисък процент живи сперматозоиди след размразяване (Лакон – 70.08%; СПБМ – 65.83%), в сравнение с другите две породи (Ил дьо Франс – 87.25% и Софийска (ЕП) – 84.91%).

При изследване на морфологичния статус на сперматозоидите, по-висок процент увредени сперматозоиди след криоконсервация се установиха при СПБМ (31%). При другите три породи процента на нормални сперматозоиди след криоконсервация е сходен (80.10% - 84.54%). Всички получени резултати са в границите допустими за

използване на еякулатите при изкуствено осеменяване със замразена-размразена сперма.

При обработката на сперма е възможно да се предизвика оксидативен стрес, ето защо разширихме нашите проучвания и в тази насока. Процеса на криоконсервация създава физически и химически стрес върху спермалната мембрана, което последователно намалява жизнеспособността на сперматозоидите и способността за оплождане. Супероксид дисмутазата (SOD) като ключов антиоксидантен ензим обезврежда както вътреклетъчни, така и извънклетъчни супероксидни радикали и предпазва липидната мембрана от оксидативно увреждане. Получените стойности на ензима преди замразяване са с около 40-50% по-висока активност отколкото след размразяване, най-висока активност на ензима се запази при породите Ил дьо Франс (380.16 U/ml) и Софийска (ЕП) (363.29 U/ml). Каталазата (CAT) е ензим, който помага за поддържане на мембранната цялост на акрозомата и стабилизира плазмолемата на сперматозоидите. Активността на CAT също се понижи процеса на криоконсервация, като най-висока активност запазва при порода Ил дьо Франс ($2.72 \text{ U}/1 \times 10^6 \text{ sp.}$).

Сперматозоидите от коч съдържат висок процент полиненаситени мастни киселини и сравнително нисък процент на холестерол и фосфолипиди в плазмената мембрана в сравнение с други видове преживни животни. Това прави мембраната на сперматозоидите предразположена към липидна пероксидация, водеща до нарушаване на структурата и функцията на мембраните на сперматозоидите и акрозомата. В нашите проучвания концентрацията на ТБК-РС в сперматозоидите се повиши очаквано повече при породите СПБМ ($2.42 \text{ nmol MDA}/10 \times 10^6 \text{ sp.}$) и Лакон ($2.11 \text{ nmol MDA}/10 \times 10^6 \text{ sp.}$), и по-малко при породите – Ил дьо Франс ($1.85 \text{ nmol MDA}/10 \times 10^6 \text{ sp.}$) и Софийска порода ($1.53 \text{ nmol MDA}/10 \times 10^6 \text{ sp.}$).

Като краен продукт от ОС е апоптоза на клетките, при което клетъчните ензими се освобождават в спермалната плазма. Ето защо решихме да изследваме и активността на ензимите – LDH-C4 и γ GT преди замразяване и след размразяване, като добри показатели за оплодителната способност на сперматозоидите. В резултат на нашите проучвания установихме понижаване на активността и на двата ензима след криоконсервация. По-високи стойности за ензима LDH-C4 се установиха при породи Ил дьо Франс и Софийска (ЕП), а по-слаба активност на ензима беше установена при млечните породи (Лакон и СПБМ). Активността на γ GT също беше по-висока при

породите Ил дьо Франс и Софийска (ЕП) от колкото при двете млечни породи (Лакон и СПБМ).

При всички изследвания се установиха достоверни породни разлики след криоконсервация, с което се надяваме, че проведените от нас изследвания и получени резултати ще допринесат за задълбочаване на проучванията в тази област. Както и по-пълното и мащабно изследване влиянието на породните особености върху криотолерантността на сперматозоидите при различни селскостопански животни.

VI. ИЗВОДИ

Настоящият дисертационен труд имаше за цел да изследва влиянието на породата върху потенциала за замразяване и размразяване на сперма от кочове. В резултат на правените изследвания бяха направени следните изводи:

Изводи с потвърдителен характер:

1. Криоконсервацията понижава подвижността на сперматозоидите и увеличава процента на абнормални сперматозоиди.
2. Криоконсервацията предизвиква понижаване активността на ензимите LDH-C4 и γ GT.
3. Активността на LDH-C4 и γ GT корелира с подвижността на сперматозоидите.
4. Активността на ензима γ GT корелира със SOD и CAT.
5. Криоконсервацията предизвиква понижена активност на ензимите от антиоксидантната защита на сперматозоидите - SOD и CAT. Установена е право пропорционална зависимост между броя на подвижните сперматозоиди и активността на двата ензима.
6. Установи се обратна пропорционална зависимост между степента на липидна пероксидация и подвижността на сперматозоидите.

Изводи с оригинален характер:

1. Установени са достоверни породни разлики при изследване мотилитета, скоростните параметри, виталитета на сперматозоидите както преди замразяване, така и след криоконсервация.
2. Установиха се достоверни породни разлики по отношение на морфологичния статус на сперматозоидите само след криоконсервация.
3. Установени са достоверни породни разлики в активността на ензимите LDH-C4 и γ GT – както преди замразяване, така и след криоконсервация.
4. Установиха се достоверни породни разлики по отношение на ензимната активност на САТ и степента на липидна пероксидация на сперматозоидите само след криоконсервация.
5. Автохтонната българска порода (Софийска) и породата за месо – Ил дьо Франс, се отличават с по-добра криотолерантност на сперматозоидите от изследваните породи за мляко – СПБМ и Лакон.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път бяха получени данни за активността на ензимите SOD, САТ и нивото на липидна пероксидация в сперматозоиди от автохтонната българска порода - Софийска (Елинпелинска) преди замразяване и след размразяване.
2. За първи път бяха получени данни за междупородната вариабилност на антиоксидантната ензимна защита на сперматозоидите при овце.

X. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. Препоръчваме при криоконсервация да се подхожда индивидуално към спермата на всяка порода, тъй като се наблюдават породни различия.
2. Породите, които имат по-добра антиоксидантна ензимна защита на сперматозоидите са по-неподатливи към ОС при манипулация на спермата им. Следователно, препоръчваме именно те да се използват за изкуствено осеменяване със замразена-размразена сперма, тъй като при тях могат да се очакват по-добри резултати.
3. При породите с по-ниска антиоксидантна ензимна защита на сперматозоидите, препоръчваме да се използват разреждатели съдържащи антиоксиданти, които да подтиснат развитието на ОС и да запазят/подобрят качеството на еякулатите.
4. Препоръчваме оценката на биохимичните компоненти и ензими в спермалната плазма като биологични маркери за качество на еякулата.

XI. СПИСЪК НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, УЧАСТИЯ И ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации:

1. **Madlena Andreeva**, Nikola Metodiev, Paulina Taushanova, Rossen Stefanov. Influence of cryopreservation on the velocity parameters of spermatozoa from breeds of Lacaune and Ile de France sheep. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, 71, 12, 2018, ISSN:2367-5535, DOI:10.7546/CRABS.2018.12.1, 1719. SJR:0.21, **ISI IF:0.27**
2. **Andreeva M.**, Metodiev N., Stefanov R.. Effect of cryopreservation on sperm parameter of rams from Lacaune breed. Proceedings International symposium on animal science 2018, 2018, ISBN:978-86-7834-316-2, 59-63
3. **Madlena Andreeva**, Nikola Metodiev, Bogdan Cekic, Rossen Stefanov. Study of the effect of low temperatures on the morphological status. Biotechnology in Animal Husbandry, In Proceeding 2019, pp 373-381. ISBN 978-86-82431-76-3

4. **Madlena Andreeva, Rossen Stefanov.** Influence of the cryopreservation on the vitality of the sperm of the different breeds of rams. Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 2020. ISSN 2534-9333 (под печат)

Научни форуми:

1. **Andreeva M.,** Metodiev N., Tsvetkov Ts., Stefanov R. The influence of the sheep breed on the cryotolerance of spermatozoa. Internation Scientific Conference „Veterinary Medicine in Service of People“ October 6-7, 2017; Stara Zagora, Bulgaria – **постер**
2. **Andreeva M.,** Metodiev N., Stefanov R. Effect of cryopreservation on sperm parameter of rams from Lacaune breed. International Symposium on Animal Science 2018, 22-23 November, 2018. Belgrade – Zemun, Serbia – **доклад**
3. **Madlena Andreeva,** Nikola Metodiev, Bogdan Cekic, Rossen Stefanov. STUDY OF THE EFFECTS OF LOW TEMPERATURES ON THE MORPHOLOGICAL STATUS OF RAM SPERMATOZOA - 12th International Symposium "Modern Trends in Livestock Production" 9-11 October 2019, Belgrade – Serbia – **постер**
4. **Madlena Andreeva,** Mihail Chervenkov, Teodora Ivanova, Rossen Stefanov. Changes in the kinematic parameters of semen in Sofia sheep breed rams after freezing–thawing. „TRADITION AND MODERNITY IN VETERINARY MEDICINE“ 24-26.04.2020, Sofia,Bulgaria – **доклад**

Изследванията в разработения дисертационен труд се осъществиха с подкрепата на проекти:

1. Национален с ИЖН- Костинброд 2016-2019

Договор № Ж 126. – *„Анализ и оценка на влиянието на различни фактори върху параметрите на селекционните и репродуктивните признаци за оптимизация и управление на производството в овцевъдството.“*

2. НП "Млади учени и постдокторанти", Модул „Млад учен“ – ПМС 203/19.09.18г.

„Изследване влиянието на породните особености при овце върху криотолерантността на сперматозоидите“

