



## СТАНОВИЩЕ

за оценяване на дисертационен труд на тема „Влияние на кинематичните параметри на семенната течност и ранното гонадотропиново третиране върху репродуктивното състояние и ембрионалната смъртност при овце от направление за мляко”, за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” по докторска програма „Акушерство и гинекология на животните и болести новородени животни”, професионално направление 6.4 „Ветеринарна медицина”, област на висше образование 6, „Аграрни науки и ветеринарна медицина”, представен от докторант - редовна форма на обучение **Бранимир Алдинов Синапов**, предсрочно отчислен с право на защита със заповед на Ректора на Тракийски университет № 4361/04.12.2023 г.

**От:** проф. д-р Пламен Иванчев Георгиев, катедра „Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения”, Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора, член на научно жури определено със заповед №10209 от 26.03.2024 г. на Ректора на Тракийски университет.

Всички материали и етапи свързани с процедурата са в съответствие с актуалната законова рамка.

Представеният дисертационен труд е написан на 179 страници, с 26 фигури и 10 таблици.

Тематиката е актуална и добре аргументирана от автора. Практическата насоченост на изложения материал се съчетава с достъпност, което несъмнено би провокирало интереса на ветеринарни лекари и специалисти от практиката. Библиографската справка включва 385 литературните източници, като 16% (над 90) са от последните 10 години, а 9 са на кирилица.

В „Литературният обзор” са обособени седем раздела. Основните направления респ. тематиката на дисертацията в които ни насочва авторът са високотехнологични методи за преценка на семенна течност, оптимизиране на диагностиката на бременност и регистрация на ембрионална смъртност, както и роля на ранното гонадотропиново третиране за подобряване на резултати от асистиран репродуктивни технологии. Считаю, че дисертантът е запознат много добре с литературните данни свързани с поставените проблеми, области на ветеринарна медицина и проведени опити.

На тази база, като насока за работа и проучвания дисертантът си поставя **цел** да проучи влиянието на някои кинематични параметри на семенната течност и ранното гонадотропиново третиране върху различни показатели на репродуктивното състояние и ембрионалната смъртност при овце от направление за мляко, след приложение на асистиран репродуктивни технологии през размножителен сезон.

За изпълнение на тази цел са поставени **4 задачи**, подредени в логическа последователност в съответствие с предвидения алгоритъм на работа – роля на кинематични параметри на семенната течност, ранно гонадотропиново третиране, профили на прогестерон и гликопротеини свързани с бременността, както и тяхната взаимовръзка с

нейното протичане и ембрионална смъртност. Същността на работата на докторанта е посветена на изпитване на взаимовръзката между асистирана репродуктивна техника при овце от направление за мляко, андрологичен статус при мъжки разплодници и резултати от различни методи за установяване и контрол на бременност. Във всеки един момент личи съвременен почерк при съставяне на плана на работа.

**Опитните постановки и методики** са описано изчерпателно и в същността си напълно удовлетворяват изискуемото за един труд от такъв ранг. Създават предпоставки за разширяване на досегашния обхват от познания. Използване на голям брой животни, при производствени условия и то в две ферми внася допълнителна трудност при извършване на научно-изследователска работа. Обезпечаване на всичко това прави възможно реализация на една нелесна задача и позволява да се направят необходимите изводи.

Успоредно с класическите методи за изследване са използвани и нови съвременни такива, като компютърно асистиран спермален анализ (Computer Assisted Sperm Analysis), ехография, ензимно-свързан имуофлуоресцентен анализ за измерване на хормони, ELISA система за определяне на гликопротеините свързани с бременността, прецизни методики за статистически анализ и др. Получените резултати са представени подробно и изчерпателно. Представеният труд е обезпечен напълно и достатъчно с таблици, фигури и снимки. Авторът демонстрира възможности да систематизира и обобщава.

**Дисертантът намира**, че показателите средна скорост на пътя (VAP), линейност на движението (LIN) и праволинейни настъпателни движения (STR) корелират положително ( $R \geq 0.55$ ;  $P < 0.05$ ) с общата и прогресивната подвижност на сперматозоидите, докато криволинейната скорост (VCL) има отрицателна корелация ( $R \geq 0.59$ ;  $P < 0.05$ ) с подвижността на спермата. Установени са коефициентите на корелация между кинематичните параметри на сперматозоидите от кочове от двете изследвани породи Източнофрезийска и Асааф и характеристиките на репродуктивното състояние при осеменени овце. Повишаването на стойностите на показателите VAP, LIN и STR кореспондира силно положително ( $R = 0.62$ ;  $R = 0.86$  и  $R = 0.55$ ;  $P < 0.05$ ) със стойността на бременността. Прогресивната подвижност, VAP, LIN и STR биха могли да се използват като подходящи индикатори при селекцията на кочове. Особено ценно е, изследване на възможностите за определяне на ембрионалната смъртност при овце, чрез съпоставяне на три метода – ултразвуково изследване, определяне на прогестерон, както и гликопротеини свързани с бременността. Като цяло ранното гонадотропиново третиране на 4-я ден след изкуствено осеменяване оказва благоприятно влияние върху фертилитета и протичане на бременността. Прогресивното намаляване на гликопротеините свързани с бременността при двукратно последователно измерване през десетдневен период след 25-ия ден на бременността може да бъде индикатор не само за установяването ѝ, но и за регистриране настъпила или предстояща късна ембрионална смъртност. В това отношение този показател е по-надежден маркер в сравнение с прогестерона.

**В раздел «Обсъждане»** е направено едно творческо обобщение на получените резултати, формулирани са определени хипотези. Дисертантът се е постарал да намери отговори, липсващи до този момент в различните литературни източници в това число и

най-съвременни. Бранимир Синапов притежава необходимите познания и възможности за анализиране и съпоставяне на литературни и собствени данни. Всичко това е послужило за набелязване на цели за по-нататъшни изследвания. Съществена част от резултатите са оригинални и са полезни не само за ветеринарномедицинската практиката, но и за теорията на репродуктивната биология.

**Представените изводи са 9 на брой.** Голямата част от тях в резюмиран вид обобщават самите достойнства и актуалността на получените резултати. Намирам, че в по-голямата си част те са изчерпателни и правилно формулирани. Кореспондират с поставената цел и отделните задачи. Благодарение на тях са формирани оригиналните и потвърдителните приноси. Те представляват още едно свидетелство за актуалността и значимостта на дисертационния труд.

Със своята работа, ангажираност и усилия, д-р Синапов е реализирал на практика опитните постановки при теренни производствени условия, с достатъчно включване на лабораторната работа както и безупречен статистически анализ. Във всяка една част проличава компетентното присъствие на научния ръководител проф. Станимир Йотов. Основни достойнства на дисертацията са свързани с проведените кинематични изследвания на сперма от кочове, установяване на ембрионалната смъртност, както и намиране на фактори които я повлияват. Реалното практически значение на получените резултати се отнася за преобладаваща част от популацията на овце. Представят се оригинални новости за подобряване на репродуктивния процес при този вид животни.

**Основната ми забележка** в този дисертационен труд е по отношение на извод 9. Не съществуват достатъчно доказателства за една такава категоричност във начина на формулираното му. Авторът приема хипотезата, че умиращите на 25-я ден ембриони оказват задържащ ефект върху развитието на останалите живи, като впоследствие последните навакват изоставането си. Според мен е по-вероятно, маркирани като изоставачи в растежа си на 25-я ден ембриони при последвалото измерване да са вече мъртви (липсват). Тогава се отчитат единствено останалите живи, които са с нормални размери. Друг недостатък на работата е, че на определени места в текста се откриват непрецизирани изразни средства и неточности, представени усложнено, понякога дори противоречиво. Като примери в това отношение биха могли да се посочат най-долни абзаци на стр. 50, 85 и др.

Във връзка с дисертацията кандидатът има **четири публикации**, отпечатани в престижни чужди и наши издания, една от които е с импакт фактор (Web of science), а друга с импакт ранг (Scopus). Резултатите са представени на три конференции в България. Дисертантът преизпълнява минималните изисквания заложили в „Правилник за развитие на академичния състав на Тракийски университет“. Бранимир Синапов е изявен ветеринарен лекар от практиката с дългогодишен опит.

**Представеният автореферат** отразява обективно структурата и съдържанието на дисертационния труд.

## Заклучение

Считам, че проведените опитни постановки и написаното от дисертанта отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ, както и „Правилник за развитие на академичния състав в Тракийски университет“. Всички документи свързани с процедурата са изрядни.

В резултат на това съм твърдо „ЗА“ и си позволявам да предложа на почитаемото Научно жури също да гласува положително и да присъди на **Бранимир Алдинов Синапов образователна и научна степен „доктор“** по докторска програма „Акушерство и гинекология на животните и болести новородени животни“, професионално направление 6.4 „Ветеринарна медицина“, област на висше образование 6, „Аграрни науки и ветеринарна медицина“.

13.05.2024 г.  
Стара Загора

Изготвил становището:  
(проф. д-р Пламен Георгиев)

.23



## STATEMENT

for the evaluation of the dissertation on "**Effect of semen kinematic parameters and early gonadotropin treatment on reproductive status and embryonic mortality in dairy ewes**", for the award of the educational and scientific degree of "**Doctor**" in the doctoral programme "Obstetrics and Gynaecology of Animals and Diseases of Newborns", professional area specialisation 6.4 "Veterinary Medicine", field of higher education 6 "Agricultural Sciences and Veterinary Medicine", submitted by PhD student - **Branimir Aldinov Sinapov**, granted the right to defend a dissertation by order of the Rector of Trakia University No. 4361/04.12.2023

**By: Prof. Plamen Ivanchev Georgiev**, DVM, Department of Obstetrics, Reproduction and Reproductive Disorders, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Member of the Scientific Jury appointed by Order №10209 of 26.03.2024 of the Rector of Trakia University.

**All materials and steps** related to the procedure are in accordance with the current legal framework.

**The submitted dissertation** is written in 179 pages, with 26 figures and 10 tables. The topic is up-to-date and well argued by the author. The practical orientation of the presented material is combined with accessibility, which would undoubtedly provoke the interest of veterinarians and practitioners. The bibliography includes 385 references, 16% (over 90) are from the last 10 years and 9 are in Cyrillic.

**"The literary review"** is divided into seven sections. The main areas or topics of the dissertation in which the author is leading us are high-tech methods for semen analysis, optimisation of pregnancy diagnosis and embryonic mortality registration, and the role of early gonadotropin treatment in improving the results of assisted reproductive technologies. I believe that the doctoral candidate is very familiar with the literature on the problems raised, the areas of veterinary medicine and the experiments carried out.

On this basis, as a **guideline for work** and research, the thesis aims to study the influence of some kinematic parameters of seminal fluid and early gonadotropin treatment on various indices of reproductive status and embryonic mortality in dairy sheep following the application of assisted reproductive technologies during the breeding season.

In order to achieve this goal, **4 tasks have been set**, arranged in a logical sequence according to the intended work algorithm - the role of semen kinematic parameters, early gonadotropin treatment, progesterone and glycoprotein profiles associated with pregnancy and their correlation with its course and embryonic mortality. The main focus of the PhD student's work is to examine the relationship between assisted reproduction techniques in dairy ewes, the andrological status of the male sires and the results of different methods of pregnancy detection and control. The work plan is written in a modern style.

**The experimental design and methods** are described in detail and, in terms of content, fully meet the requirements of a work of this level. They create the conditions for extending the scope of previous knowledge. The use of a large number of animals, under field conditions and

on two farms, adds to the difficulty of carrying out the research. The provision of all this makes it possible to carry out a not easy task and to draw the necessary conclusions.

In parallel with the classical methods of examination, new modern methodologies have been used, such as Computer Assisted Sperm Analysis, ultrasonography, enzyme-linked immunofluorescence analysis for hormone measurement, ELISA system for determination of pregnancy-associated glycoproteins, precise methodologies for statistical analysis, etc. The results obtained are presented in a detailed and comprehensive manner. The work is fully and adequately supported by tables, figures and photographs. The author demonstrates the ability to systematise and generalise.

**The dissertator found** that the Average path velocity (VAP), linearity (LIN), and straight-line velocity (STR) correlated positively ( $R \geq 0.55$ ;  $P < 0.05$ ) with total and progressive sperm motility, whereas curvilinear velocity (VCL) had a negative correlation ( $R \geq 0.59$ ;  $P < 0.05$ ) with sperm motility. The correlation coefficients between the kinematic parameters of spermatozoa from rams of the two investigated breeds, East Friesian and Asaaf sheep, and the reproductive state characteristics in inseminated ewes were determined. The increase in the values of the VAP, LIN and STR parameters correlated strongly positively ( $R = 0.62$ ;  $R = 0.86$  and  $R = 0.55$ ;  $P < 0.05$ ) with the pregnancy rate. Progressive motility, VAP, LIN and STR could be used as suitable indicators in selection of rams. Particularly valuable is the study of the feasibility of determining embryonic mortality in ewes by comparing three methods - ultrasound, progesterone determination, and pregnancy-associated glycoproteins. In general, early gonadotropin treatment on day 4 after artificial insemination has a beneficial effect on fertility and pregnancy progression. The progressive decrease in pregnancy-associated glycoproteins when measured twice consecutively over a ten-day period after day 25 of pregnancy may be an indicator not only of its establishment, but also of late embryonic mortality occurring or imminent. In this respect, this indicator is a more reliable marker than progesterone.

**In the discussion section**, a very creative summary of the results is made and certain hypotheses are formulated. The dissertator has tried to find answers that are missing in the various literature sources, including the most recent ones. Branimir Sinapov has the necessary knowledge and skills to analyse and compare literature and his own data. All this has served to identify targets for further research. A significant part of the results are original and useful not only for veterinary practice but also for the theory of reproductive biology.

**There are 9 conclusions.** Most of them summarise the merits and relevance of the findings. I find them mostly comprehensive and well formulated. They correspond to the stated objective and to the various tasks. Thanks to them, the original and confirmatory contributions have been formed. They provide additional evidence of the relevance and significance of the dissertation.

With his work, engagement and effort, Branimir Sinapov has put into practice the experimental setup under field production conditions, with sufficient inclusion of laboratory work as well as flawless statistical analysis. In every part the competent presence of the scientific supervisor prof. Stanimir Yotov is noticeable. The main merits of the dissertation are related to the kinematic studies conducted on semen from rams, establishing embryonic mortality, and finding factors that

influence it. The real practical significance of the results obtained applies to the vast majority of the sheep population. Original innovations for improving the reproductive process in this species of animals are presented.

**My main reservation** about this dissertation concerns conclusion 9. There is insufficient evidence for such categorical certainty in the way it is formulated. The author accepts the hypothesis that embryos dying on day 25 have a retarding effect on the development of the remaining living embryos, which subsequently catch up. In my opinion, it is more likely that the embryos marked as growth retarded on day 25 in the subsequent measurement are already dead (missing). In this case, only the remaining live embryos of normal size are counted. Another shortcoming of the paper is that at certain points in the text there are unspecified expressions and inaccuracies that are presented in a complicated, sometimes even contradictory way. Examples of this are the lowest paragraphs on pages 50, 85, etc.

In regard to the dissertation, the candidate has **four publications** appearing in prestigious foreign and national journals, one of which has an impact factor (Web of science) and another with an impact rank (Scopus). The results have been presented at three conferences in Bulgaria. The dissertant exceeds the minimum requirements set in the " Rules for the development of the academic staff at Trakia University ". Branimir Sinapov is an outstanding veterinarian in practice with many years of experience.

The presented **self-abstract** objectively reflects the structure and content of the dissertation.

### **Conclusion**

I am of the opinion that the experimental design and the dissertation written by the doctoral candidate meet the requirements of the "Act on development of the academic staff in the republic of Bulgaria, "Regulations on the implementation of the development of academic staff in the republic of Bulgaria act", Rules for the development of the academic staff at Trakia University ". All documents related to the procedure are in order.

As a result, I am firmly in favour and I take the liberty to propose to the Honourable Scientific Jury to also **vote positively** and to award the degree of **Doctor of Education and Science to Branimir Aldinov Sinapov** in the doctoral programme "Obstetrics and Gynaecology of Animals and Diseases of Newborns", professional area specialisation 6.4 "Veterinary Medicine", field of higher education 6, "Agricultural Sciences and Veterinary Medicine"

13th of May 2024  
Stara Zagora

Prepared the Statement:

(Prof. Plamen Georgiev)