



РЕЦЕНЗИЯ

От:

доц. д-р Калин Йорданов Христов

Катедра „Хирургия, рентгенология, акушерство и гинекология“,
Факултет „Ветеринарна медицина“, Лесотехнически Университет

Научна специалност: „Акушерство и гинекология на животните и болести на новородените животни“, професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина

Относно: дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна специалност „Акушерство и гинекология на животните и болести на новородените животни“, професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина

Автор на дисертационния труд: Бранимир Алдинов Синапов

Тема на дисертационния труд: „Влияние на кинематичните параметри на семенната течност и ранното гонадотропиново третиране върху репродуктивното състояние и ембрионалната смъртност при овце от направление за мляко“

Научен ръководител: Проф. д-р Станимир Ангелов Йотов

Основание за представяне на становището: участие в състава на научно жури по защита на дисертационния труд съгласно Заповед № 1209/26.03.2024 на Ректора на Тракийски университет.

1. Информация за дисертанта

Дисертантът маг. Бранимир Алдинов Синапов със заповед № 352/17.02.2021 на Ректора на ТрУ е зачислен за редовен докторант по докторска програма „Акушерство и гинекология на животните и болести на новородените животни“ за периода 01.03.2021 - 01.03.2024 год. Първоначалната тема на докторантурата е „Проучване на ембрионалната смъртност при овцете“, която в последствие със заповед №3295/28.09.2023 е променена на настоящата „Влияние на кинематичните параметри на семенната течност и ранното гонадотропиново третиране върху репродуктивното състояние и ембрионалната смъртност при овце от направление за мляко“. Със заповед №4361/04.12.2023 год., докторантът е отчислен с право на защита.

Бранимир Алдинов Синапов е роден на 06.11.1982 год. в град Хасково. През 2002 година завършва средното си образование в Техникум по Ветеринарна медицина - Ст. Загора със професионална квалификация „Ветеринарен техник“. Същата година започва висшето си образование във Ветеринарномедицински факултет на Тракийски университет, което успешно завършва през 2008 год. Веднага след завършването си започва работа като ветеринарен лекар в една от най-големите кравеферми в България. В периода 2018 – 2020 година продължава професионалната си практика с продуктивни животни във ферма на територията на Република Северна Македония. От 2020 до момента работи като регистриран ветеринарен лекар в кравеферма и овцеферма на Агримилк ЕООД.



По време на обучението си като докторант в катедра “Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения”, преминава множество курсове свързани със статистическа обработка на данни, защита и хуманно отношение към опитни животни, английски език, педагогика за асистенти и докторанти и компютърна грамотност и умения.

2. Обща характеристика на представения дисертационен труд

Актуалност на темата: Асистираните репродуктивни технологии, синхронизация на еструса и изкуственото осеменяване със семенна течност от елитни разплодници са високо ефективни инструменти за постигане на оптимална репродукция в съвременните овцеферми за производство на мляко. Основните насоки за осигуряване на адекватно репродуктивно състояние на овцете след приложение на асистираните репродуктивни технологии са използване на семенна течност от селектирани кочове, внедряване на съвременни диагностични методи за доказване на бременност и ембриофеталните загуби и хормонално третиране с цел превенция на ембрионалната смъртност.

Проучването на промените в основните механизми протектиращи бременността в най-ранния етап след осеменяване и откриването на точни индикатори за доказване на ранна бременност и негативните събития в началната гестационната фаза, са от ключово значение за редуциране на ембрионалните и фетални загуби. Независимо от получените до момента данни, въпросите за репродуктивното състояние на овцете от мляко направление след приложение на асистираните репродуктивни технологии синхронизация на еструса и изкуствено осеменяване, все още представляват интерес за научната общност.

Ето защо, темата на дисертационния труд е актуална, а резултатите ще бъдат от изключителна полза за ветеринарномедицинската наука и практика.

Структура и обем: Дисертационния труд е написан на 180 страници и е добре балансиран по отношение на обема на отделните части: Увод - 2 стр., Литературен обзор - 49 стр.; Цел и задачи - 1 стр.; Материали и методи - 22 стр.; Резултати - 23 стр.; Обсъждане - 28 стр.; Изводи - 3 стр.; Приноси и препоръки - 2 страница. За визуализиране на използваните методи и на получените резултати в дисертационния труд са изготвени 10 таблици и 26 фигури. В дисертационния труд е използвана литература от 385 източника, от които 9 на кирилица и 376 на латиница.

Литературен обзор: Литературният обзор включва изчерпателна информация относно размножителния период, полов цикъл и хормонални промени през различните фази на половия цикъл при овцете, някои приложни аспекти на асистираните репродуктивни технологии за синхронизация на еструса и изкуственото осеменяване при овцете, както и развитието на ембриона, плацентата и протекция на бременността през ранния гестационен период на овцете. Информацията се допълва от задълбоченото разглеждане на въпроса за прогестероновия профил и гликопротеините свързани с бременността.

Обърнато е също внимание на възможностите за приложение на ехографското изследване при овце през ранния гестационен период за диагностика на бременността, проследяване на ембриофеталното развитие и ембрионалната смъртност при овцете. Във връзка с поставените задачи, в литературния обзор, дисертанта разглежда и проучва въпроса



относно ефекта на ранното третиране с гонадропини върху репродуктивното състояние и ембрионалната смъртност при овцете. Отлично впечатление прави заключителният анализ на литературния преглед и работната хипотеза.

Литературният обзор е написан компетентно на добър литературен български език с лесен за четене и възприемане научен стил. В него ясно проличават задълбочените знания и информираност на докторанта и изградените умения да прави аналитично обобщение на научната литература. Смятам, че целта добре и пълно определя същността на разработения труд, а задачите са поставени в логична последователност и са формулирани конкретно, точно и са адекватни за постигане на поставената цел.

Материали и методи: В експерименталните модели са включени общо 34 коча и 643 високопродуктивни овце-майки от направление за мляко от породите Източнофризийска овца и Асааф. Експерименталния дизайн и опитните постановки са правилно подбрани.

За изпълнение на заложената цел са използвани утвърдени и съвременни методи на изследване, като всички те са адекватни за постигане на поставените задачи.

3. Оценка на получените резултати

Резултатите от проведените от докторанта изследвания са представени на 23 страници, като са включени 26 фигури и 10 таблици.

Представените резултати показват значително влияние на породата на кочовете върху показателите характеризиращи подвижността и скоростните характеристики на сперматозоните, както и индивидуална вариабилност между кочовете от проучваните породи.

При отчитане на репродуктивно състояние на овцете е установено влияние на породата върху някои от неговите характеристики. Едноплодните бременности са значително повече при породата Асааф, отколкото при Източнофризийските овце ($46.5 \pm 24.5\%$ срещу $20.6 \pm 9.7\%$; $P < 0.01$), докато резултатът за триплодната бременност е противоположен ($19.1 \pm 16.7\%$ срещу 4.2 ± 7.2 ; $P < 0.04$). Установена е тенденция ($P = 0.051$) увеличената стойност на бременността да води до повишаване на средния брой на родените агнета и силна положителна зависимост между СБА и ТБ ($P < 0.05$). Същевременно средният брой на родените агнета корелира отрицателно с едноплодната бременност и положително с триплодната бременност ($P < 0.05$).

Установена е също така тенденция към увеличаване на процента на бременните овце в GnRH групата, спрямо контролната група ($P = 0.54$). Анализът на ефектите на отделните фактори върху прогестероновите концентрации показва, че те нямат съвместно влияние върху P4 профила (GnRH x PC, сила на ефекта = 0.26, $P = 0.65$). Освен това ретроспективният анализ на концентрацията на прогестерон, измерена на 12-ия ден след изкуственото осеменяване и данните от ехографското изследване, показват вероятност за настъпила ранна ембрионална смъртност в 33.3% и 24.3%, съответно при контролните и GnRH третирани овце, но без регистрирана статистическа разлика ($P = 0.19$). Изчислената обща стойност на ранната ембрионална смъртност за двете групи е 25.4%.



Резултатите от изследването на гликопротеините свързани с бременността показват отсъствие на разлики в PAGs профилите при овце с едно и също репродуктивно състояние в контролната и GnRH групата между 4-ти и 35-ти ден след изкуственото осеменяване. Средните стойности на PAGs при всички животни в периода от ден 0 до ден 20-ти след изкуственото осеменяване са >0.100 и значително по-ниски от индикативната стойност за бременност на теста.

При изследването на влияние на ранното третиране с GnRH върху репродуктивното състояние и биометричните показатели диаметър на маточния лумен и размер на ембриона при овце с нормално протичаща бременност и частична късна ембрионална смъртност е регистрирана тенденция към повишаване на стойността на бременността при GnRH третираните овце, спрямо контролните животни (69.2% срещу 58.3%; $P=0.098$).

Резултатите от измерванията на диаметъра на маточния лумен и размера на ембриона ($n=31$) показват липса на съществени различия в изследваните биометрични показатели между контролни и GnRH третирани овце и в зависимост от вида на бременността за периода 20-35^{ия} ден. Стойностите и в двете групи корелират силно положително с дните на бременността ($R=0.89$ и $R=0.92$; $P<0.05$). Достоверни разлики в стойностите на ДМЛ и РЕ между не третирани и хормонално третирани овце обаче не са доказани.

Установено е че при частична загуба на ембрион, интензитетът на нарастване на диаметъра на маточния лумен не се променя значително. Въпреки това, размерът на ембриона при овце с частична късна ембрионална смърт на ден 25 е понижен, в сравнение с този при животни с нормално протичаща бременност ($P<0.05$). По-късно стойността на този биометричен показател се повишава, като на 35-ия ден достига регистрираната стойност при овце с нормално протичаща бременност.

Всички резултати дават изчерпателна информация за направените проучвания. Добро впечатление прави пълния и точен статистически анализ, което допринася за изследване на научната хипотеза, залегнала в основата на дисертацията. Използвани са подходящи начини на визуализация, което позволява точно проследяване на промените и особеностите.

4. Оценка на обсъждането, научните и научно-приложни приноси

Обсъждането задълбочено и компетентно интерпретира получените резултати с данните на други автори. Това е индикатор за аналитичност, задълбоченост и добра подготовка на докторанта по въпроса, залегнал в научната хипотеза и поставените задачи. Въз основа на резултатите и направеното обсъждане са формулирани 9 извода. Изведените от резултатите и изводите приноси са дефинирани кратко и ясно. Те включват 4 оригинални приноси и 5 потвърдителни, като всички те синтезирано показват приноса на настоящата работа в научната и клинична сфера по отношение репродукцията при овцете. Приемам приносите във вида, в който са представени. Положително оценявам подготовените препоръки за практиката.

5. Оценка на публикациите по дисертацията



Резултатите от дисертацията са представени на международни и национални научени форуми, което потвърждава качеството на направените изследвания. Във връзка с дисертацията до момента са подготвени и публикувани общо 4 статии, 3 на английски език и 1 на български език. Две от публикациите са публикувани в списания с IF и SJR, което е още един висок атестат за качеството на проведените изследвания и получените от тях резултати. Допълнителен атестат за качеството на работа на докторанта е факта, че освен в статиите свързани с дисертацията, той участва в авторските колективи на още 8 научни статии, публикувани в Web of Science и Scopus. Общия IF е 3,2, а SJR – 1,264.

6. Оценка на автореферата

Запознат съм с автореферата и намирам, че той отразява напълно и адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

7. Критични бележки, препоръки и въпроси

Нямам критични бележки по същество относно темата, методите и резултатите. В представеният заключителен вариант на дисертацията докторанта се е съобразил с почти всички направени препоръки към него, повреме на апробацията пред разширения катедрен съвет. Имам няколко препоръки към докторанта, най-вече относно оформянето на дисертационния труд:

- в т. 2.6 е посочено, че пробите са взети в „специални“ вакуумни спруветки, според мен би трябвало да се опише точното съдържание на спруветките.;
- фигурите в отделните точки да бъдат с еднакъв размер;

Предвид ежедневната клиничната дейност на докторанта, му препоръчвам да продължи своите изследвания не само по темата на дисертацията, но и по други въпроси свързани с репродуктивния процес и неговото направление при овцете. Това ще бъде от полза както за професионално му развитие, така и за развитие на научните знания в репродукцията на ДПЖ.

8. Заключение

Дисертационният труд изготвен от Бранимир Синапов го очертава като млад изследовател, със самостоятелно мислене и солидни познания в областта на репродукцията.

Достойнствата на дисертационния труд, публикационната активност, личният принос на докторанта и изпълнените изисквания за необходимите количествени и качествени критерии ми дават пълно основание да дам моята положителна оценка на представения дисертационен труд и предлагам на уважаемото научно жури да присъди на Бранимир Алдинов Синапов образователната и научна степен „ДОКТОР“ в област на висше образование 6. Аграрни науки и Ветеринарна медицина, професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност „Акушерство и гинекология на животните и болести на новородените животни“

1.05.2024 г.

Изготвил рецензията:

Гр. София

А А
А А А

/доц. д-р Калин Христов/



REVIEW

Assoc. Prof. PhD. Kalin Yordanov Hristov

Department „Surgery, Radiology, Obstetrics and Gynecology“

Faculty of Veterinary Medicine, University of Forestry

Scientific specialty: "Obstetrics and gynecology of animals and diseases of newborn animals",

professional field: 6.4. Veterinary Medicine

Regarding: PhD thesis for obtaining of PhD degree in scientific specialty " Obstetrics and

gynecology of animals and diseases of newborn animals",

professional field: 6.4. Veterinary Medicine

Author of the PhD thesis: Branimir Aldinov Sinapov

Title of the PhD thesis: „Influence of spermatozoa kinematic parameters and early gonadotropin treatment on reproductive status and embryonic mortality in dairy sheep“

Scientific supervisor: Prof. Stanimir Angelov Yotov, PhD

Grounds for presenting the opinion: member of the scientific jury for the defense of the PhD thesis according to Order № 1209/26.03.2024 of the Rector of Thracian University.

1. Information about the PhD student

Doctoral student Branimir Aldinov Sinapov, by order No. 352/17.02.2021 of the Rector of TrU, was enrolled as a full-time PhD student in the doctoral program "Obstetrics and gynecology of animals and diseases of newborn animals" for the period 01.03.2021 - 01.03.2024. The initial topic of the PhD thesis is "Study of embryonic mortality in sheep", which was subsequently changed by order No. 3295/28.09.2023 to the present one "Influence of spermatozoa kinematic parameters and early gonadotropin treatment on reproductive status and embryonic mortality in dairy sheep". Subsequently, by order No. 4361/04.12.2023, was acquires a right of defence.

Branimir Aldinov Sinapov was born on November 6, 1982 in Haskovo. In 2002, he completed his secondary education at the College of Veterinary Medicine - St. Zagora with professional qualification "veterinary technician". In the same year, he began his higher education at the Faculty of Veterinary Medicine of Thracian University, which he successfully completed in 2008. Immediately after graduation, he began working as a veterinarian in one of the largest cow farms in Bulgaria. In the period 2018-2020, he continues his professional practice with productive animals on a farm in the territory of the Republic of North Macedonia. From 2020 until now, he works as a registered veterinarian in a cow farm and a sheep farm of Agrimilk.



During his studies as a doctoral student in the Department of Obstetrics, Reproduction and Reproductive Disorders, he completed numerous courses related to statistical data processing, protection and welfare of experimental animals, English language, pedagogy for teaching assistants and PhD students, and computer literacy and skills.

2. General characteristics of the presented dissertation (PhD thesis)

Relevance of the topic: Assisted reproductive technologies, estrus synchronization and artificial insemination with a sperm from elite breeders are highly effective tools for achieving optimal reproduction in modern dairy sheep farms. The main guidelines for ensuring an adequate reproductive state of sheep after the application of assisted reproductive technologies are the use of sperm from selected rams, the implementation of modern diagnostic methods for proving pregnancy and embryo-fetal losses, and hormonal treatment in order to prevent embryonic mortality.

The study of changes in the main mechanisms protecting pregnancy in the earliest stage after insemination and the discovery of accurate indicators to prove early pregnancy and negative events in the initial gestational phase are of key importance for the reduction of embryonic and fetal losses. Regardless of the data obtained so far, questions about the reproductive status of dairy sheep after the application of assisted reproductive technologies, estrus synchronization and artificial insemination, are still of interest to the scientific community.

Therefore, the topic of the dissertation work is relevant, and the results will be extremely useful for veterinary science and practice.

Structure and volume: The PhD thesis is written on 180 pages and is well balanced in terms of the volume of the individual parts: Introduction - 2 pages, Literature overview - 49; Purpose and tasks - 1 page; Materials and methods - 22 pages; Results - 23 pages; Discussion - 28 pages; Conclusions - 3 pages; Contributions and recommendations - 2 pages. To visualize the results obtained in the dissertation, 10 tables and 26 figures have been prepared. The dissertation used literature from 385 sources, of which 9 in Cyrillic and 376 in Latin language.

Review of the literature: The literature review includes comprehensive information on the reproductive period, sex cycle and hormonal changes during the different phases of the sex cycle in sheep, some applied aspects of assisted reproductive technologies for estrus synchronization and artificial insemination in sheep, as well as the development of the embryo, placenta and protection of pregnancy during the early gestation period of sheep. The information is complemented by an in-depth examination of the progesterone profile and pregnancy-related glycoproteins.

Attention has also been paid to the possibilities of applying ultrasound examination in sheep during the early gestational period for pregnancy diagnosis, monitoring of embryo-fetal development and embryonic mortality in sheep. In connection with the set tasks, in the literature review, the dissertation examines and studies the question regarding the effect of early treatment with gonadotropins on the reproductive state and embryonic mortality in sheep. The final analysis of the literature review and working hypothesis makes an excellent impression.

The literary review is competently written in a good literary Bulgarian language with an easy-to-read and easy-to-understand scientific style. It clearly shows the in-depth knowledge and



awareness of the PhD student and the developed skills to make an analytical summary of the scientific literature. I believe that the goal well and fully defines the essence of the work developed, and the tasks are set in a logical sequence and are formulated specifically, precisely and are adequate to achieve the set goal.

Materials and methods: A total of 34 rams and 643 highly productive ewes from the East Friesian and Asaaf breeds for milk were included in the experimental models. The experimental design and experimental setups are properly selected.

Established and modern research methods were used to fulfill the set goal, and all of them are adequate to achieve the set tasks.

3. Evaluation of the results

The results of the research conducted by the PhD student are presented on 23 pages, including 26 figures and 10 tables.

The presented results show a significant influence of the breed of the rams on the indicators characterizing the motility and speed characteristics of the spermatozoa, as well as individual variability between the rams of the studied breeds.

When considering the reproductive state of the sheep, an influence of the breed on some of its characteristics was found. Singleton pregnancies were significantly more common in Asaaf than in East Friesian sheep ($46.5 \pm 24.5\%$ vs. $20.6 \pm 9.7\%$; $P < 0.01$), while the result for triplet pregnancies was the opposite ($19.1 \pm 16.7\%$ vs. 4.2 ± 7.2 ; $P < 0.04$). A tendency ($P = 0.051$) was found for increased pregnancy value to increase the average number of lambs born and a strong positive relationship between SBA and TB ($P < 0.05$). At the same time, the average number of lambs born correlated negatively with singleton pregnancy and positively with triplet pregnancy ($P < 0.05$).

There was also a trend towards an increase in the percentage of pregnant ewes in the GnRH group compared to the control group ($P = 0.54$). Analysis of the effects of individual factors on progesterone concentrations showed that they had no joint influence on the P4 profile (GnRH x PC, effect power=0.26, $P = 0.65$). Furthermore, retrospective analysis of progesterone concentration measured on day 12 after artificial insemination and ultrasound data showed a probability of early embryonic mortality occurring in 33.3% and 24.3%, respectively, in control and GnRH-treated ewes, but no statistical significance was recorded. difference ($P = 0.19$). The estimated total value of early embryonic mortality for both groups was 25.4%.

The results of the study of the glycoproteins associated with pregnancy showed the absence of differences in PAGs profiles in ewes of the same reproductive status in the control and GnRH groups between the 4th and 35th day after artificial insemination. The mean values of PAGs in all animals from day 0 to day 20 after artificial insemination were > 0.100 and significantly lower than the indicative pregnancy value of the test.

In the study of the influence of early treatment with GnRH on reproductive status and biometric parameters, uterine lumen diameter and embryo size in ewes with a normal pregnancy and partial late embryonic mortality, a tendency to increase the value of pregnancy in GnRH-treated ewes was recorded, compared to the control animals (69.2% vs. 58.3% ; $P = 0.098$).



The results of the measurements of the diameter of the uterine lumen and the size of the embryo ($n=31$) show no significant differences in the studied biometric indicators between control and GnRH treated sheep and depending on the type of pregnancy for the period 20-35th day. Values in both groups correlated strongly positively with days of gestation ($R=0.89$ and $R=0.92$; $P<0.05$). However, reliable differences in DML and PE values between untreated and hormone-treated sheep have not been demonstrated.

It was established that with partial embryo loss, the intensity of increase in the diameter of the uterine lumen does not change significantly. However, embryo size in ewes with partial late embryonic death on day 25 was reduced compared to that in animals with normal pregnancy ($P<0.05$). Later, the value of this biometric index increases, reaching the recorded value in ewes with a normal pregnancy on day 35.

All results give comprehensive information about the studies done. A good impression is made by the complete and accurate statistical analysis, which contributes to the research of the scientific hypothesis underlying the dissertation. Appropriate visualization methods are used, which allows accurate tracking of changes and features.

4. Evaluation of the discussion, scientific and scientific-applied contributions

The discussion thoroughly and competently interprets the obtained results with the data of other authors. This is an indicator of analyticalness, thoroughness and good preparation of the doctoral student on the issue underlying the scientific hypothesis and the tasks set. Based on the results and the discussion, 9 conclusions were formulated. The contributions derived from the results and conclusions are defined concisely and clearly. They included 4 original contributions and 5 corroborative ones, all of which synthesize the contribution of the current work in the scientific and clinical spheres regarding reproduction in sheep. I accept contributions as presented. I positively appreciate the prepared recommendations for the practice.

5. Evaluation of the publications associated with the dissertation

The results of the dissertation have been presented at international and national scientific forums, which confirms the quality of the research done. In connection with the dissertation, a total of 4 articles have been prepared and published so far, 3 in English and 1 in Bulgarian. Two of the publications were published in journals with IF and SJR, which is another high certificate for the quality of the research conducted and the results obtained from them. An additional certificate for the quality of the doctoral student's work is the fact that, in addition to the articles related to the dissertation, he participated in the author collectives of 8 more scientific articles published in Web of Science and Scopus. Overall IF is 3.2 and SJR is 1.264.

6. Evaluation of the abstract of the PhD thesis

I am familiar with the abstract and I find that it reflects fully and adequately the content and achievements of the dissertation.

7. Critical remarks, recommendations and questions



I have no substantive critical remarks about the subject, methods, and results from the dissertation. In the presented final version of the dissertation, the PhD student complied with almost all the recommendations made to him during the approval before the expanded departmental council. I have several recommendations for the doctoral student, especially regarding the design of the dissertation:

- in item 2.6 it is stated that the samples were taken in "special" vacuum tubes, in my opinion the exact contents of the tubes should be described;
- the figures in the individual parts, should be of the same size;

Given the daily clinical activity of the doctoral student, I recommend him to continue his research not only on the topic of the dissertation, but also on other issues related to the reproductive process and its direction in sheep. This will be beneficial both for his professional development and for the development of scientific knowledge in the reproduction of the small ruminants.

8. Conclusion

The dissertation prepared by Branimir Sinapov outlines him as a young researcher, with independent thinking and solid knowledge in the field of reproduction.

The merits of the dissertation work, the publication activity, the personal contribution of the PhD student and the fulfilled requirements for the necessary quantitative and qualitative criteria give me full reason to give my positive assessment of the presented PhD thesis and I propose to the respected scientific jury to award Branimir Aldinov Sinapov the educational and scientific degree "PhD" in the field of higher education 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, professional direction: 6.4. Veterinary medicine, scientific specialty "Obstetrics and gynecology of animals and diseases of newborn animals"

1.05.2024 г.

Sofia

Signature::

/Assoc Prof. PhD. Kalin Hristov/