СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
СОФИЯ
Вх. № НУ1-114
29.05.2024г.

СТАНОВИЩЕ

относно дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „Доктор" в област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина професионално, направление 6.3. Животновъдство, научна специалност „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването"

Тема и автор на дисертационния труд: дисертационния труд е на тема „Ин витро методи за асистирана репродукция при селскостопански животни", разработен от ас. Цветелина Янчева Тодорова.

Член на научното жури: доц. д-р Таня Стефанова Иванова, Институт по животновъдни науки – Костинброд с научна специалност „Овцевъдство и козевъдство" назначена за член на научното жури със Заповед № РД 05-80 от 02.04.2024г. на Председателя на Селскостопанска академия – София.

I. Актуалност на изследвания проблем

Асистираните репродуктивни технологии се използват в животновъдството за подобряване на общия генетичен профил на стадата. Те включват изкуствено осеменяване, ембриотрансфер, нуклеарен трансфер на соматични клетки и *in vitro* производство на ембриони. Получаването на ембриони от говеда чрез *in vitro* методи има значение, както като технология за разработване на нови научни методи, така и при развъдната работа. В *in vitro* лабораториите и сега успешно се криоконсервират матурирани ооцити и ембриони.

Въпреки постигнатите до момента резултати, е необходимо да се подобри метода *in vitro* за получаване на ембриони от говеда и да се проучи влиянието на витрификацията на матурирани ооцити и ембриони върху тяхното развитие. В тази връзка настоящия дисертационен труд е съсредоточен върху проучване на ефекта: от метода за получаване на кумулусно-ооцитни комплекси, на функционалното състояние на яйчниците, на продължителността на *in vitro* матурацията, на кумулусните клетки по време на витрификация и прилагането на опростен метод за витрификация на ембриони.

II. Цел, задачи и методи на изследване (хипотези на дисертационния труд)

Целта на настоящото проучване е да се подобри метода за получаване на ембриони от говеда *in vitro* и да се проучи влиянието на криоконсервацията на ооцити и ембриони чрез витрификация върху тяхното развитие. За изпълнението й докторантът си е постовил седем задачи.

Изследването е проведено през периода февруари 2019 – март 2023 г. като от кланица са взети морфологически интактни яйчници от заклани крави. Получени са кумулусно – ооцитните комплекси чрез пункция или чрез нарязване, които са селекционирани по морфологически критерии. Извършена е матурация в *Модифициран Паркър медиум,* последвана от *in vitro* оплождане, *in vitro* култивиране и витрификация.

Получените резултати за кумулусно-ооцитните комплекси, продължителността на *in vitro* матурацията и метода за витрификация на ембриони S3 са подходящи за практиката. Този метод е прост и лесен за използване и може да се препоръча да се прилага при ембриотрансфер.

III. Визуализация и интерпретация на получените резултати. Използвана литература

Докторант Цветелина Янчева Тодорова е визуализирала своя дисертационен труд с 14 таблици, 17 фигури и 23 снимки. Интерпретациите са направени професионално, съобразени са с получените резултати, поставените задачи и целта. Използвани са 179 автора, които отговалят на темата на дисертацията.

IV. Приноси на дисертационния труд

Докторант Цветелина Янчева Тодорова е формулирала общо 7 приноса от разарботването на ностоящия дисертационен труд.

Три от тях са **оригинални научни приноси**:

1. Оптимизирани са условията за *in vitro* култивиране. Установено е, че култивирането в хранителна среда SOF с добавка на 5% FCS достоверно повишава процента на получените бластоцисти.

2. Установена е значително по-висока степен на преживяемост на витрифицираните денудирани ооцити култивирани в присъствието на кумулусни клетки.
3. Разработена е опростена система за опаковане на ембрионите преди витрифициране с използване на стандартни пайети.

Останалите четири **приноса са с научено-приложен и потвърдителен** характер:

1. Подобрен е метода за получаване на ембриони от говеда *in vitro*, чрез модификации на утвърдени схеми.
2. Получени са нови данни за влиянието на размера на фоликулите върху качеството на ембрионите.
3. Установено е предимството на метода за получаване на ооцити чрез пунктиране на фоликулите.
4. Потвърдена е най-оптималната продължителност на *in vitro* матурацията.

V. Оценка на качеството на научните публикации, отразяващи резултатите в дисертацията

Представена е една публикация свързана с дисертационния труд, която отразява част от получените резултати.

VI. Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Нямам критични бележки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на приложените от докторанта различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ССА.

Това ми дава основание да оценя **положително** дисертационния труд и да предложа да се присъди на Цветелина Янчева Тодорова образователната и научна степен „Доктор" в област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.3. Животновъдство,

научна специалност „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването“.

Дата: 16.05.2024 г.

ИЗГОТВИЛ СТАНОВИЩЕТО:

(доц. д-р Таня Иванова)

STANDPOINT

regarding dissertation work for obtaining the educational and scientific degree "Doctor" in higher education 6. Agricultural sciences and veterinary medicine, professional direction 6.3. Animal husbandry, scientific specialty "Breeding of agricultural animals, biology and biotechnology of reproduction".

Topic and author of the dissertation: "*In Vitro* Methods for Assisted Reproduction in Farm Animals", author Tsvetelina Iancheva Todorova.

Member of the scientific jury: Associate Professor Dr. Tania Stefanova Ivanova, Institute of Animal Sciences - Kostinbrod with scientific specialty "Sheep and Goat Breeding", appointed as a member of the scientific jury by Order No. RD 05-80 of 02.04.2024. of the Chairman of the Agricultural Academy – Sofia

I. Relevance of the studied problem

Assisted reproductive technologies are used in animal husbandry to improve the overall genetic profile of the herds. These include artificial insemination, embryo transfer, somatic cell nuclear transfer and *in vitro* embryo production. Obtaining bovine embryos by *in vitro* methods is important both as a technology for developing new scientific methods and in breeding work. Matured oocytes and embryos are now successfully cryopreserved in *in vitro* laboratories.

Despite the results achieved so far, it is necessary to improve the method for obtaining bovine embryos and to study the influence of vitrification of matured oocytes and embryos on their development. In this regard, the current dissertation is focused on the study of the effect: of the method for obtaining cumulus-oocyte complexes, on the functional state of the ovaries, on the duration of *in vitro* maturation, on the cumulus cells during vitrification and the application of a simplified vitrification method of embryos.

II. Purpose, tasks and research methods (hypotheses of the dissertation)

The present dissertation aims to improve the method of obtaining bovine embryos *in vitro* and to study the influence of cryopreservation of oocytes and embryos by vitrification on their development. For its implementation, the doctoral student has set himself seven tasks.

The dissertation was conducted in the period February 2019 - March 2023, and morphologically intact ovaries from slaughtered cows were taken from a slaughterhouse. The cumulus-oocyte complexes were obtained by aspiration or by cutting, which were selected according to morphological criteria. Maturation was performed in Modified Parker medium, followed by *in vitro* fertilization, *in vitro* culture and vitrification.

The obtained results for the cumulus-oocyte complexes, the duration of *in vitro* maturation and the S3 embryo vitrification method are relevant for practice. This method is simple and easy to use and can be recommended for use in embryo transfer.

III. Visualization and interpretation of the results obtained. Literature used

PhD student Tsvetelina Iancheva Todorova has visualized her dissertation work with 14 tables, 17 figures and 23 photos. The interpretations are made professionally, they are consistent with the results obtained, the tasks and the goal. 179 authors who correspond to the topic of the dissertation were used.

IV. Contributions of the dissertation

PhD student Tsvetelina Iancheva Todorova formulated a total of 7 contributions from the development of the current dissertation work.

Three of them are original scientific fundamental contributions:

1. The conditions for *in vitro* cultivation are optimized. Cultivation in SOF medium supplemented with 5% FCS was found to reliably increase the percentage of blastocysts obtained.
2. A significantly higher survival rate of vitrified denuded oocytes cultured in the presence of cumulus cells was found.
3. A simplified system was developed for packing the embryos before vitrification using standard straws.

The remaining four contributions are of a scientific-applied and confirmatory nature:

1. The method for obtaining embryos from cattle *in vitro* has been improved, through modifications of established schemes.
2. New data have been obtained on the influence of follicle size on embryo quality.

3. The advantage of the method of obtaining oocytes by aspirating the follicles has been established.
4. The most optimal duration of *in vitro* maturation has been confirmed.

V. Quality evaluation of scientific publications, presenting the dissertation results

One publication related to the dissertation is presented, which reflects part of the obtained results.

VI. Critical remarks, questions, and recommendations to the candidate

I have no critical notes.

CONCLUSION

Based on the different research methods applied by the PhD student, the correctly performed experiments, the generalizations and conclusions made, I believe that the presented dissertation meets the requirements of the Law for Development of the Scientific Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations on the terms and conditions for obtaining scientific degrees and for holding academic positions in the Agriculture Academy.

This gives me the reason to positively evaluate the dissertation work and propose to award Tsvetelina Iancheva Todorova the educational and scientific degree "Doctor" in the field of higher education 6. Agricultural sciences and veterinary medicine, professional direction 6.3. Animal husbandry, scientific specialty "Breeding of agricultural animals, biology and biotechnology of reproduction".

Date: 16/05/2024

Reviewer :

(Assoc. Prof. Dr. Tanya Ivanova)