

СТАНОВИЩЕ

относно дисертационен труд на тема

„ПРИЦЕЛНИ МИШЕНИ НА БИОАКТИВНИ ДОБАВКИ С ФИТОГЕННИ КОМПОНЕНТИ В РЕПРОДУКТИВНАТА СИСТЕМА“,

Представен от доц. Елена Кузминична Кистанова

За присъждане на научна степен „доктор на науките“, Научна област 6.0, Аграрни науки и ветеринарна медицина, Професионално направление: 6.4 Ветеринарна медицина

От доц. д-р Антон Лазаринов Антонов, катедра „Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения“, Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, гр. Стара Загора.

На основание Заповед №1850/15. 06. 2022 г. на Ректора на Тракийски университет е определено научно жури, което на 28. 06. 2022 г. проведе първо заседание, на което бях избран за изготвяне на писмено становище.

Актуалност на темата

През последните десетилетия се наблюдава интензивно увеличаване населението на планетата, съпроводено от увеличени хранителни нужди. Това е свързано с научно търсене на решения, свързани със стимулиране продуктивността и репродукцията на животните с безопасни за здравето биологично активни вещества. В предложения дисертационен труд са обобщени резултати от задълбочени научно-приложни изследвания на въздействието на различни натурални биоактивни добавки при клетъчни модели, лабораторни и селскостопански животни (мишки, зайци, свине, биволи, нерези и кочове), които аргументират актуалността на дисертационната тема.

Структура на дисертацията

Представеният дисертационен труд е структуриран върху 216 страници: абстракт -2 стр.; съкращения и символи, използвани в текста – 1 стр.; увод – 3 стр.; анализ на изследвания по проблема или литературен преглед – 29 стр.; цел и задачи – 2 стр.; материал и методи – 19 стр.; резултати и дискусия – 76 стр.; насоки и перспективи за изследвания на натурални биодобавки с потенциал за репродуктивната система – 3 стр.; изводи – 3 стр.;

препоръки за практиката – 1 стр.; научни приноси – 8 стр.; списък на публикациите и проектите във връзка с дисертацията – 3 стр.; литература -34 стр.; приложения -21 стр.

Абстракт и увод

Тук изчерпателно са посочени мотивите за извършване на изследванията за стимулиране на репродукцията чрез натурални биологично активни вещества чрез подобряване на репродуктивното здраве и оптимизиране на хранителните ресурси, рефлектиращи върху репродуктивното здраве чрез цялостното си въздействие върху организма.

Анализ на изследвания по проблема или литературен преглед

Подробен и изчерпателен е, базирайки се на 447 публикации, от които само 5 бр. на кирилица (1 от тях дисертация на български език) и 442 бр. на латиница. Навлизайки в този раздел не може да не ни направи впечатление фактът, че 256 от цитираните научни труда са публикувани след 2010 г. Това ярко подчертава актуалността на проблематиката, с което започва самият раздел. Извършен е качествен сравнителен анализ на изследваните природни добавки Спирулина, ВемохербТ, ПровитЕ10%Супер, хомогенат от търтееви ларви, Ауфертин и орегонин, подчертавайки биоактивните субстанции, съдържащи се в тях, както и влиянието им върху репродуктивния процес.

Анализът на литературата е извършен с голяма прецизност, показваща отлично познаване състоянието на проблема и е позволило на авторката добре да аргументира разработката на избраната тема.

Цел и задачи

Въз основа на анализа от досегашните изследвания и получените резултати е формулирана теоретична хипотеза за необходимостта от по-задълбоченото проучване на нутригеномния ефект на фитогенните биоактивни субстанции в различни органи и тъкани на организма и разкриване на техните възможности да влияят върху генната експресия към по-добро репродуктивно здраве, устойчив имунитет и адекватни реакции на стрес, които са в основата на добрия репродуктивен потенциал.

Всичко това позволява вярно да се определи посоката на изследванията и методологията, с която да се изпълни това. Отлично формулирана е целта - да се определят потенциалните мишени в репродуктивната система за приложение на натурални добавки с фитогенни компоненти върху основа на научни изследвания с лабораторни животни и клетъчни култури, научно-приложни опити със селскостопански животни и биоинформатичен анализ на гени с експериментално установена промяна в експресията. С изпълнението на поставените 5 задачи се търсят възможности за изясняване на дискуссионни въпроси с научно-приложен и приложен характер и постигане на набелязаната цел.

Материал и методи

В този раздел са включени сравнителни и обобщаващи анализи на резултати от научно-практически експерименти с животни и лабораторни изследвания на репродуктивни органи, тъкани, гамети и клетъчни модели след въздействието на нехормонални натурални биоактивни добавки. Посочено е, че условията на живот, хранене и отглеждане на експерименталните селскостопански животни са в съответствие с Българското ветеринарното законодателство, а експерименталната работа с животни е извършена след одобрението на Комисията по етика към животните към Българската агенция за безопасност на храните.

Като експериментален материал за проучване на нехормоналните натурални добавки върху репродуктивната система са използвани достатъчен брой животни (199 женски и 9 мъжки) от различни видове: бели мишки, зайци, свине, биволици, нерези и кочове, а екстрактът от елша, съдържащ орегонин, е изпитан върху клетъчни модели – първични миши ембрионални фибробласти и клетъчни линии. Подробно са описани големият брой методи (10 броя) за оценка на репродуктивните параметри, митохондриалната активност и нутригеномния ефект от приложените биоактивни добавки. Приложеният статистически метод допринася за пълното установяване на въздействието на всички нехормонални натурални биоактивни добавки върху репродуктивната система на опитните животни и при клетъчните линии.

Експериментите с женски животни включват седем опитни постановки *in vivo* при женски животни и една върху клетъчна линия – първични миши ембрионални фибробласти,

а при мъжките – два броя. Дизайнът на опитите е правилно структуриран и изключително подробно формулиран.

Резултати и дискусия

Тук е направен анализ на промените, които настъпват в репродуктивните параметри при различни видове лабораторни и селскостопански животни след действието *in vivo* на различни по произход, но сходни по състав на активните фитогенни субстанции натурални добавки, като резултатите са групирани в зависимост от атакуваните мишени като хормони, гамети, гаметогенеза или родени приплоди при един вид и/или един пол животни. Дисертационният труд е онагледен чрез 46 фигури, всички с отлично качество, а резултатите от изследванията са много добре обобщени в 30 подробни таблици.

Получените резултати са свидетелство за това, че гените на репродуктивната тъкан служат за мишени на използваните нехормонални натурални биоактивни добавки. Безспорно е доказан ефекта на техните активни субстанции да променят експресията на гени в репродуктивната тъкан на ниво мРНК транскрипти и на протеиново ниво, като те могат да бъдат както такива, свързани със структурни и функционални промени на гаметите, а така също и гени, отговорни за епигенетичната регулация. Установено е, че резултатите от приложението на изпитваните биоактивни добавки се определят от техния състав, от репродуктивния период, от продължителността на въздействието им и от хормоналния статус на организма.

В този раздел е извършен и интегративен анализ на нутригеномния ефект на биоактивните добавки върху репродуктивната тъкан. Идентифицирани са молекулярните механизми, довели до наблюдаваните промени в генната експресия, рефлектираща върху фоликулогенезата, нивото на половите хормони, количеството и качеството на гаметите, и развитието на ембриони. Посредством няколко онлайн платформи е извършено прогнозиране на генно-регулаторната мрежа на експресиранияте гени GDF9 и BMP15, които от една страна обогатяват основните мрежи, свързани с растежа и развитието на женските гамети, а от друга участват съвместно или самостоятелно в специфични биологични процеси в яйчниците. Въз основа на резултатите и дискусията е изготвен анализ и прогнозиране на транскрипционните фактори и регулиращите микроРНКи на изследваните диференциално експресирани гени, както и прогноза на редица други свързани с тях гени. Дискусията е

направена професионално, като умело са съпоставени собствените резултати с тези на другите автори, което подчертава още веднъж добрата литературна осведоменост на авторката.

Насоки и перспективи за изследвания на натурални биодобавки с потенциал за репродуктивната система

В раздела е извършен анализ на перспективността за изследване повлияването на репродуктивните функции на животните чрез приложение на изследваните натурални хранителни добавки Спирулина, ВемохербТ, ПровитЕ10%Супер, хомогенат от търтееви ларви, Ауфертин и орегонин, а именно - за подобряване репродуктивния потенциал чрез повлияване митохондриалните функции в репродуктивната система, като елемент на редица съвременни репродуктивни биотехнологии, за получаване на приплоди с определен пол, за преодоляване следродилния анеструс на едри преживни животни и оптимизиране работата на имунната система. Всички тези доказано установени ефекти определят изключителната перспективност на изследванията в това направление.

Изводи

Получената информация от проведените изследвания е анализирана и въз основа на нея са направени съответните изводи. Те отразяват големия обем научно-изследователска работа, извършена при разработването на дисертационния труд. Изводите са разделени на две групи – общи (3 бр.) и такива за конкретните изследвани добавки с фитогенни компоненти (24 бр.).

Препоръки за практиката

Много полезните 5 броя препоръки за практиката са едно от достоинства на този дисертационен труд.

Научни приноси

Първоначално са посочени 3 броя фундаментални приноси, последвани от 2 броя с потвърдителен характер и оригинални приноси, обединени в 3 групи, а именно - представящи нови данни за въздействието на изследваните биодобавки с фитогенни компоненти на ниво репродуктивна система при женски и мъжки животни; представляващи

нови научни знания за ефекти на натуралните добавки върху митохондриите в репродуктивната тъкан и гаметите; служещи като доказателства за нутригеномния ефект на натуралните добавки върху репродуктивната система или ефект на генетично ниво.

Доказателство за иновативността на изследванията са получените 2 броя патенти по темата на дисертацията, както и приложените 12 броя представени в дисертацията авторски статии, които са публикувани в списания, реферирани в световната мрежа Scopus, а седем от тях – в списания, класирани в първия квартал (Q1) в съответните области, които са продукт от работата по 6 броя проекти.

Приложения

В раздела на първо място е посочен биохимичния състав на приложените добавки, както и потенциалните генни мишени на добавки с фитогенни компоненти, свързани с биологични процеси и сигнални пътища в репродукцията.

Според представеното приложение относно минималните национални изисквания за научна степен "доктор на науките" съгласно ЗРАСРБ и приложение 8.2, доц. Кистанова изцяло покрива, а в някои показатели значително превишава посочените критерии. Представен е и съответния доказателствен материал.

Автореферат

Представеният автореферат от доц. Кистанова е в пълно съответствие на дисертационния труд, правилно структуриран и е изготвен съгласно изискванията на ЗРАСРБ.

Заклучение

В заключение считам, че дисертационният труд отговаря на всички изисквания на ЗРАСРБ и ППЗРАСРБ, като въз основа на изтъкнатите актуалност, иновативност, постигнати оригинални и потвърдителни приноси, богата литературна осведоменост, подходящо оформление и документиране на информацията, предлагам на уважаемото жури да присъди научната степен "доктор на науките" на доц. Елена Кузминична Кистанова в област на висше образование 6.0 Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално

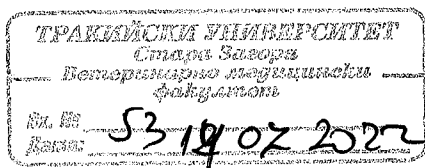
направление 6.4. Ветеринарна медицина, научна специалност „Акушерство и гинекология
на животните и болести на новородените животни“.

12. 06. 2022 г.

Стара Загора

Изготвил:.....

(доц. д-р Антон Антонов)



OPINION

Concerning: DSc thesis “TARGETS OF BIOACTIVE ADDITIVES WITH PHYTOGENIC COMPONENTS IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM” presented by associate professor Elena Kuzminichna Kistanova, PhD for awarding the scientific degree “Doctor of Sciences” in the scientific area 6.0 “Agrarian sciences and Veterinary medicine”, professional direction 6.4 “Veterinary medicine”

From Associate professor Anton Lazarinov Antonov, DVM, PhD from the Department of “Obstetrics, Reproduction and Reproductive disorders”, Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora.

On the base of Order No1850/15. 06. 2022 г , Rector of Trakia University — Stara Zagora appointed the scientific jury, which held a first meeting on June 28, 2022. On this meeting, I was selected to prepare a written opinion.

Relevance of the DSc thesis topic

In recent decades, an intensive increase of the planet's population has been observed, accompanied by increased food needs. This provokes the scientific search for solutions related to stimulating the productivity and reproduction of animals with the health-safe biologically active substances. The proposed dissertation summarizes the results from scientific and applied research on the impact of various natural bioactive additives in cell models, laboratory and farm animals (mice, rabbits, pigs, buffaloes, boars and rams), which argue for the actuality of the dissertation’s topic.

Structure of the DSc thesis

The presented thesis is written on 216 pages and has typical structure for the dissertation paper as follow: abstract-2pp., list of abbreviations -1p., introduction – 3pp., literature review-29pp., objective and tasks – 2pp., material and methods -19 pp., results and discussion – 79pp., directions and perspectives of research on the natural bioactives with potential for the reproductive system – 3pp., conclusions -3pp., recommendations for the practice -1 p., scientific contributions

– 8 pp., the author's publications and research projects related to the thesis topic – 3pp., references - 34 pp., appendixes – 21pp.

Abstract and introduction

In these parts of thesis, the main reasons for carrying out a research on stimulation of the reproduction with natural bioactive substances by improving the reproductive health and optimizing nutritional resources, reflecting on reproductive health through its overall impact on the body, have been comprehensively indicated.

Analysis of the research on the problem or literature review

The analysis is detailed and comprehensive, based on 447 publications, of which only 5 references are in Cyrillic (1 of them a dissertation in Bulgarian) and 442 references in Latin. Looking around this section, we cannot fail to be impressed by the fact that 256 of the cited scientific articles are published after 2010. This clearly emphasizes the research topic actuality, which has been reflected at the beginning of the section. A qualitative comparative analysis of the studied natural supplements Spirulina, VemoHerbT, ProvitE10%Super, drone brood homogenate, Aufertin and oregonin has been performed, highlighting the bioactive substances contained in them, as well as their influence on the reproductive process.

The literature review has been performed with a great precision, showing excellent knowledge of state of the art of problem, which allowed to the author to argue well the development of chosen topic.

Objective and tasks

Based on the analysis of the previous research and the obtained results, a theoretical hypothesis has been formulated about the nutrigenomic effect of phytogetic bioactive substances in various organs and tissues of the body as well as in the reproductive system. The hypothesis assumes the ability of bioactives to affect the genes, which can improve the reproductive health, ensure the sustained immunity and adequate stress responses that underlie good reproductive potential. All this allows accurately determining the direction of research and the methodology for it carrying out. The goal has been perfectly stated - to determine the potential targets in the reproductive system for the application of natural supplements with phytogetic components based on the scientific research with laboratory animals and cell cultures, scientific and applied

experiments with livestock animals and bioinformatic analysis of genes with experimentally established change in the expression. By completing of the set of five tasks, author seeks to solve and clarify the scientific-applied and applied discussable questions and to achieve the intended goal.

Material and methods

This section includes the comparative and generalized analyzes of the results from the scientific-applied animal experiments and from the laboratory studies of reproductive organs, tissues, gametes and cell models after exposure to non-hormonal natural bioactive supplements. It has been stated that the conditions of life, feeding and rearing of the experimental livestock animals were in accordance with the Bulgarian veterinary legislation, and the experimental work with laboratory animals was carried out after the approval of the Animal Ethics Committee of the Bulgarian Food Safety Agency.

A sufficient number of animals (199 females and 9 males) of various species were used as an experimental material for studying the effect of non-hormonal natural supplements on the reproductive system: white mice, rabbits, pigs, buffaloes, boars and rams. Additionally, the alder extract, containing oregonin, was tested on cell models – the primary mouse embryonic fibroblasts and cell lines. The large number of methods (10 items) for evaluating the reproductive parameters, mitochondrial activity and the nutrigenomic effect of applied bioactive supplements have been described in detail. The used statistical methods contribute to establishing the significant impact of all bioactive supplements on the reproductive system in the experimental animals and on cell lines. Trials include seven experimental setups *in vivo* in female animals and one on a cell line - primary mouse embryonic fibroblasts, and two in male animals. The design of each experiment was properly structured and formulated in detail.

Results and discussion

Here an analysis of the changes has been presented, occurring in the reproductive parameters of different laboratory and livestock animal species treated *in vivo* with natural supplements, which are different by origin, but similar by composition of active phytogetic substances. The results have been grouped depending on the attacked targets such as hormones, gametes, gametogenesis and offspring in one specie and/or one sex of animals. The dissertation

has been illustrated by 46 figures with excellent quality. In addition, the research results have been very well summarized in 30 detailed tables.

The obtained results provide clear evidence that the genes of the reproductive tissue are the targets for the used non-hormonal natural bioactive supplements. The ability of the active substances to change the gene expression in the reproductive tissue at the mRNA transcripts and protein levels has been undoubtedly proven. The affected genes are both related to structural and functional changes of the gametes, and responsible for epigenetic regulation. It has been established that the effect of the tested bioactive supplements is determined by their composition, by the reproductive period and duration of their application and by hormonal status of the body.

In this section, an integrative analysis of the nutrigenomic effect of bioactive supplements on reproductive tissue has been also performed. The molecular mechanisms related to the observed gene expression changes, which reflecting folliculogenesis, sex hormone levels, gamete quantity and quality, and embryo development, have been identified. By means of several online platforms, a prediction of the gene-regulatory network of the genes GDF9 and BMP15 has been performed. These important genes on the one hand enriches the main networks related to the growth and development of female gametes, and on the other hand jointly or independently participate in the specific biological processes in the ovary. Based on the results and discussion, an analysis and prediction of the transcription factors and regulating microRNAs of the investigated differentially expressed genes, as well as a prediction of a number of other related genes, was prepared. The discussion has been done professionally, skillfully comparing own results with those of other authors that emphasizes once again the good knowledge of scientific literary of the author.

Directions and perspectives for research on natural bioactive supplements with potential for the reproductive system

Different perspectives for research on such natural bioactive supplements as Spirulina, VemoHerbT, ProvitE10%Super, drone brood homogenate, Aufertin and oregonin have been discussed in this section: the ability of bioactives to improve the reproductive potential by influencing the mitochondrial functions; the opportunity to be included as an element of a number of modern reproductive biotechnologies; the use for obtaining offspring of a certain sex; the application for overcoming postpartum anestrus in large ruminants and optimizing the function of the immune system. All proven positive effects of bioactive additives determine an exceptional perspective of research in this area.

Conclusions

The information received from the conducted research has been well analyzed and the relevant conclusions was drawn based on it. They reflect the large amount of research work completed during the development of the dissertation. The conclusions have been divided into two groups - general (3 items) and specific for each investigated supplement with phytogetic components (24 items).

Recommendations for the practice

Five very useful recommendations for practice are one of the worth of this dissertation paper.

Scientific contributions

Initially, three numbers of fundamental contributions have been indicated, followed by two contributions of an affirmative nature and many original contributions, united in three groups:

- new data on the impact of the investigated bioactive supplements with phytogetic components at the level of the reproductive system in female and male animals;
- new scientific knowledge about effects of natural supplements on the mitochondria in the reproductive tissue and gametes;
- new evidences for the nutrigenomic influence of natural supplements on the reproductive system (or an effect at the genetic level).

Two patents, developing on the topic of this DSc thesis, as well as 12 author's articles published in journals reviewed in Scopus database (seven of them in journals ranked in the first quartile (Q1) in the relevant areas), which are the product of the 6 completed scientific projects, confirm the innovativeness of the presented research.

Appendixes

First two appendixes in this section present the biochemical composition of the applied supplements and the predicted potential gene targets of supplements with phytogetic components related to biological processes and signaling pathways in reproduction.

Third appendix presents the data about the compliance with minimal national requirements for awarding the scientific degree "Doctor of Sciences" according to the Law on development of academic staff in Republic of Bulgaria and form 8.2. The verification of compliance shows that

Associate professor Elena Kistanova fully covers, and by some indicators significantly exceeds the stated criteria. The relevant materials confirmed this statement have been also presented.

Self-abstract

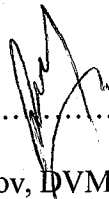
The self- abstract presented by Associate professor Elena Kistanova is in full compliance with the dissertation paper, properly structured and prepared according to the requirements of the Law on development of academic staff in Republic of Bulgaria.

Conclusion

In conclusion, I consider that the dissertation paper complies with all requirements of the Law on development of academic staff in Republic of Bulgaria and the Rules of its application. Based on the highlighted relevance, innovation, achieved original and affirmative contributions, rich literary awareness, appropriate layout and presentation of scientific information in the dissertation, I propose to the estimated jury to award Associate professor Elena Kuzminichna Kistanova the scientific degree "Doctor of Sciences" in the scientific area 6.0 "Agricultural sciences and veterinary medicine", professional direction 6.4. "Veterinary medicine", scientific specialty "Obstetrics and gynecology of animals and diseases of newborn animals".

12. 06. 2022 г.

Stara Zagora

Review prepared by:.....

(Associate professor A. Antonov, DVM, PhD)