

**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СТАРА ЗАГОРА
ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

Катедра „Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения“

Елена Кузминична Кистанова

**ПРИЦЕЛНИ МИШЕНИ НА БИОАКТИВНИ ДОБАВКИ С ФИТОГЕННИ
КОМПОНЕНТИ В РЕПРОДУКТИВНАТА СИСТЕМА**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд

за присъждане на научна степен

„доктор на науките“

Научна област 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина;
Професионално направление 6.4 Ветеринарна медицина

Стара Загора
2022

Дисертационният труд е написан на 216 страници, включва 43 фигури и 39 таблици.
Библиографията съдържа 447 литературни източника, от които 5 на кирилица и 442 на латиница.
Номерацията на разделите, фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията.

Изследванията по дисертационния труд са проведени в лабораториите на ИБИР-БАН и в животновъдните бази и лабораториите на партниращи организации – ЗИ-Шумен, ТрУ-Стара Загора и Аграрен Университет на гр.Пенза, Русия.

Данните са получени в резултат от изпълнение на проекти:

- 1."Влияние на биологично активни вещества с нехормонален произход върху репродуктивния потенциал на животните“. От 2007 – до сега, финасиран от БАН. Ръководител доц. Е.Кистанова.
2. Епигенетика и околна среда преди заплождането: Околната среда преди заплождането като епигенетичен лост за оптимизиране на продуктивността и здравословното състояние при селскостопанските животни, ДКОСТ 01/15 -2016 г (12 000лв) финасиран от ФНИ-МОН. Ръководител доц. Е.Кистанова.
- 3.Вариабилност на индивидуалната реакция при употреба на биологично активни вещества от растителни храни и причиняващи я фактори. ДКОСТ 01/10 - 2016-2018 гт (40 000лв) финасиран от ФНИ-МОН. Ръководител доц. Е.Кистанова.
4. “Влияние на полифенол орегонин /екстрахиран от растения на семейство елша/ върху епигенетични маркери в репродуктивната и сърдечно-съдовата системи“. Двустранен с Латвия. ЕБР (2017-2019), финасиран от БАН. Ръководител доц. Е.Кистанова.
- 5.Национална научна програма „ Репродуктивни биотехнологии в животновъдството в България - РЕПРОБИОТЕХ“ 2019-2021 (320 000лв), финасиран от МОН. Координатор проф. Н.Василев, ТрУ-Ст.Загора.
6. Национална научна програма „ Интелигентно животновъдство - ИНТЕЖИВО“2021-2024гг. (95 000лв), финасиран от МОН. Координатор Д.Ярков, ТрУ-Ст.Загора.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 22 г. от часа в ТрУ-Ст. Загора, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ТрУ-Стара Загора, пред

Научно жури в състав:

Вътрешни членове: Проф. д-р Н.Василев – ВМФ, ТрУ-Ст. Загора; Проф. д-р И. Георгиев – ВМФ, ТрУ-Ст.Загора; Доц. д-р А. Антонов – ВМФ, ТрУ-Ст.Загора. **Резервен член:** Проф. д-р Г. Георгиев - ВМФ, ТрУ-Ст.Загора.

Външни членове: Проф.д-р А.Апостолов – ЗИ-Шумен, ССА; Проф.д-р З. Шиндарска – ФВМ, ЛТУ-София; Проф.д-р М.Игнатова – ИЖН-Костинброд, ССА; Доц.д-р К.Христов – ФВМ, ЛТУ-София. **Резервен член:** Доц. д-р Н. Станчева- ЗИ-Шумен, ССА.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение

АБСТРАКТ

Бързо увеличаващото се население на планетата изисква увеличено производство на хранителни продукти, което налага стимулиране продуктивността и репродукцията на животните с безопасни за здраве биологично активни вещества. В настоящ дисертационен труд са обобщени експериментални данни от дългогодишни изследвания на въздействието на натурални биоактивни добавки Спирулина, ВемохербТ, ПровитЕ10%Супер, хомогенат от търтееви лаври, Ауфертин и орегонин при клетъчни модели, лабораторни и селскостопански животни (мишки, зайци, свине, биволи, нерези и кочове). Разработката включва сравнителен анализ на 10 експериментални постановки с 199 женски и 9 мъжки животни. Чрез комплекс на съвременни експериментални и биоинформатични методи бяха определени прицелните мишени на биодобавки в репродуктивната система: мъжки и женски репродуктивни клетки, процес на тяхното съзряване, клетъчна органела митохондрия, гени и техните регулатори (транскрипционни фактори, микроРНКи), участващи в репродуктивния процес. Доказано е подобряването на митохондриалната функционалност в оварии, ооцити, кумулусни клетки и сперматозоиди чрез увеличаване активността и експресията на митохондриалните ензими участващи в окислително фосфорилиране (мтНД1, цитохром С) и увеличаване броя копия митохондриална ДНК. Нутригеномният ефект на натуралните биодобавки се изразява в промяна експресията както на функционалните за репродукция гени (BMP15 GDF9), така и на гените, кодиращи ензими, отговорни за епигенетичната регулация (ДНК-метилтрансферази 1, 3a и 3b). Експерименталните данни убедително доказаха, че натуралните биодобавки са перспективно средство за контрол на репродуктивното здраве на животните без негативни последици. Върху основа на получените резултати са разработени подходящи за използване в практиката технологии за оптимизиране протокола за суперовулация на лабораторни животни, за повишаване репродуктивния потенциал на селскостопанските животни, и за съхраняване на сперма в охладено състояние с използване на натурални добавки.

ABSTRACT

The rapidly growing human population of the planet requires increased food production that needs stimulating the productivity and reproduction of animals with safe biologically active substances. The present thesis summarizes the experimental data from long-term studies on the effects of natural bioactive additives as Spirulina, VemoHerbT, ProvitE10% Super, homogenate of drone brood, Aufertin and oregonin in cell models, laboratory and farm animals (pigs, mice, pigs, mice, boars and rams). The work includes the deep analysis of 10 experiments conducted with 199 female and 9 male animals. A complex of modern experimental and bioinformatics methods allows determining the following targets of bioactive additives in the reproductive system: male and female gametes, gametogenesis, cell organelle mitochondria, genes and their regulators (transcription factors, miRNAs) involved in the reproductive process. It has been established the improvement of the mitochondrial function in ovaries, oocytes, cumulus cells and sperm by increasing the activity and expression of mitochondrial enzymes involved in oxidative phosphorylation (mtND1, cytochrome C) and increasing the number of mtDNA copies. The nutrigenomic effect of natural bioactive additives was manifested as an altered expression of both reproductive functional genes (BMP15 GDF9) and genes encoding enzymes responsible for the epigenetic regulation (DNA methyltransferases 1, 3a and 3b). Experimental data have convincingly shown that natural supplements are a promising tool for controlling the reproductive health of animals without negative consequences. Based on the obtained results, applicable in practice technologies for optimization of the protocol for superovulation of laboratory animals, for increasing the reproductive potential of farm animals, and for storing of cooled semen with using the natural additives have been suggested.

Съкращения и символи използвани в текста

АТР-аденозин трифосфат
BSA-Говежди серумен албумин
BMP15- костен морфогенетичен протеин 15
GDF9 – растежен фактор на диференциация 9
Dnmt1- ДНК (цитозин-5) -метилтрансфераза 1
Dnmt3a- ДНК (цитозин-5) -метилтрансфераза 3A
Dnmt3b- ДНК (цитозин-5) -метилтрансфераза 3B
mtDNA (мтДНК)- митохондриална ДНК
MtDnmt 1- митохондриална ДНК (цитозин-5) -метилтрансфераза 1
MT-ND1-митохондриално кодирана NADH дехидрогеназа 1
ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина
мРНК- матрична или информационна РНК
миРНК- микроРНК
GnRH- гонадотропин рилизинг хормон
KiSS1- Metastasis Suppressor -киспептин
SAM-S- аденозилметионин
ELISA - Ензимно-свързан имуносорбентен анализ
BXT - ВемоХербТ
ХТЛ - хомогенат от търтееви ларви
CASA - компютърно-асистиран спермоанализ
ТФ - Транскрипционни фактори
ChEA3 - ChIP-X Enrichment Analysis 3
GSEA - Gene Set Enrichment Analysis
TRAP - transcription factor affinity prediction
STRING -Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
ARCHS4 - all RNA-seq and ChIP-seq sample and signature search (ARCHS4)
miRDB(miRNA database) - база данни за микроРНКи
miRTarBase(database contains miRNA-target interactions) - база данни за взаимодействие на микроРНКи с таргенти гени
MiRWalk (Database: Prediction of possible miRNA binding sites from 3 genomes) - база данни за прогнозиране на микроРНК свързващи сайтове за три генома- човек, мишка и плъх
TargetScan (web server that predicts biological targets of microRNAs)- сървър за прогнозиране на биологични мишени на микроРНКи
GO – генна онтология
KEGG- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

1. УВОД

Бързо увеличаващото се население на планетата изисква увеличено производство на хранителни продукти. Един от начините за това е интензивното животновъдство, ключов елемент от което е стимулиране продуктивността и репродукцията на животните. Важен механизъм за такова стимулиране са биологично активните вещества: органични и неорганични субстанции, оказващи в минимални количества значително влияние върху живия организъм. Едно от най-важните и необходими качества за оптимално функциониране на репродуктивната система е здравето, позволяващо производство на качествени гамети – задължително условие за здраво потомство. Стимулирането на репродукцията чрез биологично активни вещества съдържа два главни изследователски аспекта: (1) подобряване на репродуктивното здраве и (2) оптимизиране на хранителните ресурси, рефлектиращи върху репродуктивното здраве чрез цялостното си въздействие върху организма.

С развитието на технологиите за изолиране и пречистване на хормоналните субстанции, както и с химичното им синтезиране, изследователите получават възможност да контролират и да управляват репродуктивния процес. Многократното хормонално стимулиране на яйчниците обаче както на човека, така и на животните, не е съвсем безобидно, и води до сериозни проблеми като развитие на туморни образувания, кръвоизливи в овариите и хормонален дисбаланс. Освен това, често използване на хормони при селскостопанските животни има негативни последици: натрупването им в млякото и месото влошава екологичността на продуктите. Това налагат непрестанно търсене на нови подходи към протоколите за суперовулация, които биха могли да осигурят по-голямо количество ооцити с добро качество след еднократно хормонално третиране.

Ограниченията за използване на хормони и антибиотици с цел увеличаване масата на животните стават мощен стимул за търсене и разработка на нови, безопасни за човешкото здраве биологично активни добавки (биодобавки). Приоритетно направление в издирването им стават вещества с растителен произход, микроводорасли, продукти от пчеларството, и др. Търсенето на добавки за репродуктивната система се насочва в две главни направления: (1) търсене на нови афродизиаки с директно въздействие върху репродукцията и (2) търсене на натурални растежни стимулатори с допълнително позитивно действие върху репродукцията, което е особено важно за отглеждане на ремонтните животни.

Натуралните добавки като правило са многокомпонентни, което е позитивно за организма, но създава трудности за разкриване конкретните механизми на действието им. Преодоляването на тези трудности изисква натрупване на значителна база експериментални данни получени както *in vivo* при различни животни, доказващи ефекта на биодобавките с фитогенни компоненти върху различни мишени в репродуктивната система, така и *in vitro* за разкриване на механизмите на тяхното действие. От съществено значение са изследванията на дозите, времето на репродуктивния период, и продължителността на прилагане на натурални добавки.

2. ЦЕЛ, ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКА ХИПОТЕЗА И ЗАДАЧИ

Цел на дисертационния труд е да определи потенциалните мишени в репродуктивната система за приложение на натурални биодобавки със сходни фитогенни компоненти върху (БДФК) основа на: (1) научни изследвания с лабораторни животни и клетъчни култури; (2) научно-приложни опити със селскостопански животни; и (3) биоинформатичен анализ на гени с експериментално установена промяна в експресията.

Изследователска хипотеза:

– натуралните биодобавки, чрез комплементарността и синергизма на биоактивните им компоненти, на системно ниво могат да влияят върху протичане на отделни процеси в репродуктивната система: стероидогенеза, гаметогенеза и ембриогенеза;

- наличието в натурални добавки на значителни количества фитогенни компоненти с изразени антиоксидантни свойства (витамини, микроелементи, мастни киселини и фенолни съединения) е основание да се приеме, че митохондриите на клетките в репродуктивните органи са мишена на тези субстанции на субклетъчно ниво;

- доказаното за отделните фитогенни компоненти влияние върху генната експресия в различни органи е основание да се приеме, че и самите биодобавки могат да имат нутригеномен ефект и върху репродуктивната система, променяйки експресията на гени, свързани с гаметогенезата и качеството на гаметите;

- сходството в състава на фитогенните биоактивни компоненти в различни натурални добавки е основание да се предположат еднотипни реакции от страна на репродуктивната система към всяка от тези добавки на клетъчно, субклетъчно и генно ниво.

За аргументация на хипотезата бяха поставени следните **изследователски задачи**:

- да се направи сравнителен анализ на фитогенни компоненти в изследваните биоактивни добавки;
- да се направи анализ на ефекта на изследваните добавки с фитогенни компоненти върху важни репродуктивни параметри като хормонален статус, състояние на гаметогенезата, количеството и качеството на гаметите, количеството ембриони и получени приплоди при различни животни;

- да се оцени състоянието на митохондриите в репродуктивната тъкан, в гаметите *in vivo* и в клетъчния модел *in vitro*, след прилагане на тези добавки;

- да се направи анализ на нутригеномния ефект на добавките върху репродуктивната тъкан и гаметите *in vivo* и клетъчния модел *in vitro*;

- чрез биоинформатичен анализ на гени с установена промяна в експресията след действието на натурални добавки да се проследи обогатяване/модулиране на биологичните процеси и сигналните пътища, свързани с репродукцията.

3.МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1Методологичен подход

Методологията включва сравнителни и обобщаващи анализи на резултати от научно-практически експерименти с животни и лабораторни изследвания на репродуктивни органи, тъкани, гаметите и клетъчни модели, след въздействието на нехормонални натурални биоактивни добавки.

За минимизиране ефекта от индивидуалната вариабилност на отговора към въздействието, организацията на опитите *in vivo* бе осъществена върху принципите:

- подбор на сходни по възраст, живо тегло и произход животни за експерименталните и контролни групи;

- гарантиране на максимално сходни условия за отглеждане и хранене на експерименталната и контролната групи;

- индивидуално хранене на всяко експериментално животно за гарантиране постъпването в организма му на биоактивните субстанции в точно определената планирана за експерименталната работа доза;

- спазване на юридическите и етични регламенти за хуманно отношение към животните, използвани за експериментални цели.

Първите два принципа гарантират развитието на относително сходни микробиоми с ключова роля за усвояване на хранителните добавки, които са резултат както от генетиката на животните, така и от начина на хранене и отглеждане.

Научната достоверност се базира на максимално пълната и цялостна регистрация, логическа и статистическа оценка на изследваните параметри.

Подборът на биоактивните добавки е обусловен от свойствата и биохимичният състав на всяка от тях, и е основан на проведени и публикувани резултати от експериментални изследвания и анализи. В експерименталната работа са използвани най-вече многокомпонентни натурални биодобавки като синьо-зеленото водорасло *Arthrospira platensis* (Спирулина, СП), екстракт на растението *Tribulus terrestris* (ВемоХербТ, ВХТ), хомогенат от търтееви ларви (ХТЛ), Ауфертин (Ayefertin), добавката ПровитЕ10%Супер, съдържаща растението артишок (*Cynara scolymus*). Полифенолът орегонин (като пречистен извлек от кората на елша-*Alnus incana*) е използван само в опити *in vitro* с клетъчни култури и сперматозоиди.

Спирулината е широко използвана хранителна добавка за животни, с високо протеиново съдържание и антиоксидантни свойства. Трибестанът е известен най-вече като афродизиак, но съдържащите в него биоактивни компоненти оказват въздействие върху всички системи на организма. Хомогенатът от търтееви лаври има богат състав на хранителни вещества (протеини, захари, аминокиселини), но се проявява и като афродизиак поради хормоналните субстанции в състава му. Ауфертинът е комбинирана добавка от четири билки с високо съдържание на ненаситени мастни киселини и техни естери с важна роля за синтеза на простагландини в организма. Витаминът Е, минералите от добавка ПровитЕ10%Супер, полифенолите от артишок, и орегонинът от кората на елша, са вещества с подчертани антиоксидантни свойства.

Съдържанието на активните компоненти в тези добавки беше анализирано както върху основа информацията за тях, предоставена от производителите им, така и чрез лабораторните им изследвания по наша заявка.

Условията на живот, хранене и отглеждане на експерименталните селскостопански животни бяха в съответствие с Българското ветеринарното законодателство (25.01.2011), хармонизирано с Регламент 86/609 на ЕС за условията на живот и благополучие на експериментални животни.

Експерименталната работа с лабораторни животни от вивариума на ИБИР-БАН бе проведена след одобряване на изследователските планове и протоколи от Комисията по етика към животните към Българската агенция за безопасност на храните със стандартна оперативна процедура “Издаване на разрешително за използване на животни в опити” в съответствие със Заповед РД11-280/16-02-2013 на Министъра на земеделието, храните и горите на Република България, и съгласно Наредба 20 от 01.11.2012, основана на европейска директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета на Европа относно защитата на животните, използвани за научни цели (“Разрешение за използване на животни в експерименти” N84/04.10.2013, дата на валидност 04.10.2018 г.).

3.2 Методи

Чрез основните методи като „сравнителен и обобщаващ анализ“ и „биоинформатичен анализ и прогнозиране“ бяха проанализирани 10 експериментални постановки с 6 биодобавки с фитогенни компоненти върху 199 женски и 9 мъжки животни:

Женски животни	Мъжки животни	Клетъчни модели
бели мишки (75 бр.)	нерези(6 бр.)	първични миши ембрионални
зайци (70 бр.)	кочове (3 бр.)	фибробласти (МЕФ)
свине (41 бр.)		клетъчна линия NIH/3T3
биволици (13 бр.)		

За получаване на експерименталните данни бе използван широк набор от изследователски методи за оценка репродуктивните параметри и нутригеномния ефект от приложените биоактивни добавки.

- ❖ Протокол за суперовулация и микроманипулационни техники за получаване на ооцити, кумулсни клетки и ембриони;
- ❖ Хистологични и имунохистохимични методи – за анализ на състояние на яйчниците, фоликулогенезата и експресия на протеини GDF9, BMP15 и mtND1;
- ❖ ELISA-ензимно-свързан имуносорбентен анализ за изследване на нивата на хормони;
- ❖ Полимеразно-верижна реакция в реално време (RT-PCR) за анализ на експресията на гени bmp-15, gdf-9, Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, mtDnmt1 и определяне брой копия митохондриална ДНК (mtDNA);
- ❖ CASA – компютърно асистиран спермоанализ – за оценка на кинематичните параметри на сперматозоиди;
- ❖ Спектрофотометрия за анализ на ензимната активност на митохондриален ензим цитохром С оксидаза;
- ❖ Светлинна и конфокална микроскопия с използване на различни типове оцветяване за оценка на митохондриалното състояние на мъжки и женски гамети;
- ❖ Ултрасонография – за оценка на състояние на овариите при in vivo експерименти
- ❖ Биоинформатичен анализ на гени с променена експресия в отговор на биодобавки с фитогенни компоненти и модулираните от тях биологични процеси и сигнални пътища, свързани с репродуктивните процеси.
- ❖ Статистическа обработка на резултатите:

За обработка на резултатите бяха използвани различни методи за статистическия анализ, заложи в програмния софтуер „STATISTICA” (StatSoft, Tulsa, OK, USA). За всеки показател се определяше средна аритметична стойност (mean) и стандартна грешка на средната аритметична ($\pm$ SEM). Преценка сходството на получените разпределения експериментални данни с нормалното бе извършвана с теста Колмагоров–Смирнов. В зависимост от броя анализирани варианти и доближаването на данните до нормалното разпределение, бяха използвани параметрични и непараметрични методи на вариационната статистика. Сравняването на резултатите между групите е извършено с „Independent Sample T-test” при нормално разпределение, и с „Mann–Whitney U-test” или „Wilcoxon test” при нехомогенно разпределение (при независими и свързани данни съответно). За анализ на корелационите връзки между параметрите беше използван корелационният коефициент на Пирсън. При всички експерименти за статистически достоверни разлики се приемаха резултати с ниво на значимост $p < 0.05$.

4.РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

4.1.Сравнителен анализ на изследваните природни добавки

Въпреки различния си произход (растения, водорасло и продукт на пчеларство), изброените по-горе добавки имат редица сходни биоактивни компоненти, включващи и фитогенни такива (табл. 1).

Таблица 1. Сравнителен анализ на биоактивните компоненти в изследваните натурални добавки.

Добавки	Протеини	Вторични метаболити		Витамини	Микро-и макро елементи	Специфични компоненти
		Полифеноли	Масни киселини			
Спирулина	++	+(Фенолни киселини)	++ (Палмитин ова, олеинова, γ-инолева, γ-линоленов а)	+++ (A, C, D, E, K, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)	++	Пигменти: фикоцианин, хлорофил
ВемохербТ	–?	++	+	+(C)	+	

		(Фенолни киселини, флаваноиди, Фитостероли)	(Палмитин ова, олеинова, д окосатетра енова)			
ПровитЕ Е10%–Супер	–	+	+	+	+++	
		(Фенолни киселини, флаваноиди)	(Палмитин ова, линолева, алфа- линоленов а)	(E)		
Хомогенат от търтеви ларви	+	+	+	++ +	++	Хормонални субстанции, екдистероиди
		(Фенолни киселини, флаваноиди)	(Палмитин ова, олеинова)	(Cholin, A, E, B1, B 2 , B6, D)		
Ауфертин	–?	++	+++	+	+	
		(Флаваноиди, фенолни киселини)	(Палмитин ова, олеинова, линоленов а, триенови)	(E)		
Екстракт от кора на елша –орегонин	–	+++	–	–	–	
		(Флаваноиди- Диарилхептан оид)				

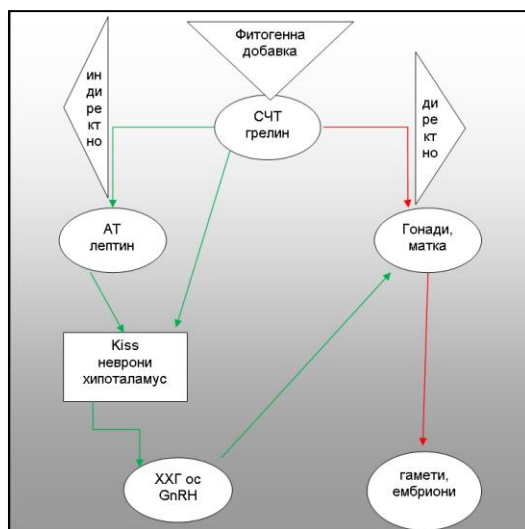
*Количеството символи “+” отразява преобладаване на компонента в състава на добавката; “–” – липса на компонента; „–?“ – несъществено съдържание на компонента

Първо съществено сходство между добавките е че всички съдържат полифенолни съединения. Второ сходство е че всички (без орегонина), съдържат мастни киселини, витамини, микро- и макроелементи. Посочените сходства вероятно са причина и за сходството на въздействието им, описано в научната литература. Тези добавки имат антиоксидантни свойства, антибактериален и антигъбиичен ефект, стимулират имунитета, токсични са за туморните клетки (Zhu et al., 2004;2005; Lee et al., 2005; Bundy et al., 2008; Balaji, 2013; Pham et al., 2016; Afkhami–Ardakani et al., 2018; Semerdjieva and Zheljaskov, 2019). Наличието на допълнителни компоненти като протеини в Спирулината и в хомогената от търтеви ларви стимулират растежа на организма и се използват за угодяване на животни (Otto and Malau–Aduli, 2017;Здоровьева и съав., 2018; Lecocq et al., 2018). Последните две добавки са най-богати на витамини от широкия спектър. Съдържанието на мастни киселини е най-голямо в Ауфертина, което прави тази добавка особено ценна за възстановяване на яйчниковата активност в следродилния анеструс. Хормоналните субстанции на ХТЛ и хормон-подобни съединения на *Tribulus terrestris* са основа за третиране на репродуктивните проблеми, а екдистероидите на ХТЛ намират приложение във фитнес-индустрията (Dinan and Lafont, 2006; Gama et al., 2014; Shoinbayeva et al., 2017). Въпреки широката известност на някои от тези добавки, данните за ефекта им върху репродуктивната система, в частност, женската, са малобройни или напълно отсъстват, което и провокира нашият изследователски интерес към тях.

4.2. Прицелни мишени на биодобавки на ниво репродуктивна система : хормони, гаметогенеза, гамети, ембриони и родени приплоди

Общите принципи на действие на натурални хранителни добавки върху репродуктивната система са представени на фиг.1. След метаболизиране от микробиома и навлизане на метаболитите (или на непроменените субстанции) в кръвта, става възможно достигането им до репродуктивните органи. Има данни за наличност на фитогенни субстанции (мастни киселини, полифеноли, минерални елементи) в репродуктивните жлези, което предполага прякото им въздействие върху репродуктивната тъкан (de Boer et al., 2005; D'Archivio et al., 2010; Del Rio et al., 2010). Добавките влияят също и върху липидния метаболизъм в черния дроб и адипозната тъкан, върху производството на хормона лептин, и върху производството на стомашния хормон грелин. Тези метаболитни хормони са свързващо звено ('мост') между метаболизма и репродукцията (Tena-Sempere et al., 2013). Въздействието на метаболитните хормони върху kiss-невроните на хипоталамуса, произвеждащи kiss-пептини (KiSS1), които стимулират производството на гонадолиберини (GnRH), регулиращи цялата хипоталамо-хипофизно-гонадната ос, е доказано експериментално (Roa et al., 2008).

Главната цел за използване на нехормонални биодобавки е стимулиране производството на по-голям брой качествени гамети, ембриони и здраво потомство. Затова фокусът на анализа на влиянието им е насочен към основните параметри на репродуктивната система, които се явяват прицелни мишени на биодобавките на организмено и системно ниво.



Фигура 1. Схема, отразяваща действието на фитогенните добавки върху репродуктивната система при мъжки и женски организми (СЧТ: стомашно-чревен тракт; АТ: адипозна тъкан; XXГ: хипоталамо-хипофизно-гонадната ос; GnRH: гонадотропин релизинг хормони).

4.2.1. Овулирали ооцити и ембриони при миши модели, получавали добавките Спирулина и ПровитЕ10%Супер

Първоначалните изследвания с биодобавки бяха проведени с лабораторни женски бели мишки. Половозрелите женски животни получаваха добавките в продължение на 30 дни преди третиране за суперовулация. Тази продължителност позволява включване на активните субстанции в метаболизма на организма и осигурява протичане на не по-малко от 4–5 естрални цикъла в условията на променен метаболизъм. Достоверно по-голям брой овулирали ооцити спрямо контролната група бяха получени при изхранване и с двете добавки: Спирулина и ПровитЕ (Таб.2).

Таблица 2. Овулирали ооцити и получени ембриони при суперовулирали мишки получавали Спирулина и ПровитЕ10% Супер.

Параметри	S.platensis	ПровитЕ10%Супер
Овулирали ооцити, брой	26±2.1 vs 21.3±2.4 (p=0.002)	31.3±12.4 vs 22.6±9.9 (p=0.04)
Процент увеличение спрямо контрола	22.1	38.4
Ембриони с 2 бластомера	22.0±6.3 vs 17.0±5.8,(p=0.08)	-
Процент увеличение спрямо контрола	29.4	

Резултатите от двата експеримента показват, че при еднаква хормонална стимулация на животните броят на овулиралите ооцити, както и броят започнали развитие ембриони, е по-висок в групите, получавали биоактивни добавки. Дали промените са засегнали само количеството на зреещи ооцити? Следващият опит със зайкини показа, че въпреки недостоверните разлики между броя оплодени яйцеклетки, се наблюдава разлика между качеството на ооцитите и получените приплоди.

4.2.2. Родени приплоди при зайци, получавали добавките Спирулина и ВемоХербТ

Таблица 3. Родени и оцелели приплоди при зайци получавали Спирулина и ВХТ.

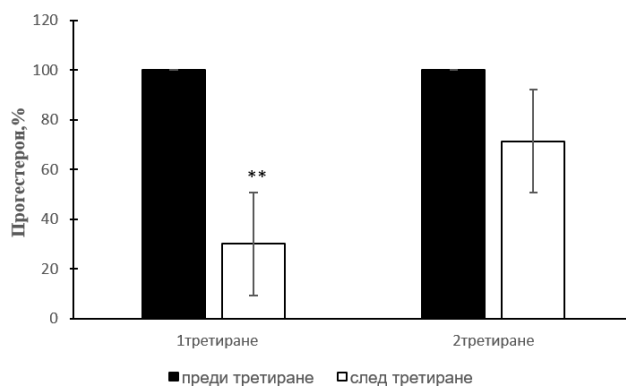
Групи	Показатели			
	Родени, брой на зайкиня	Оцелели до 14 ден, брой на зайкиня	Средно живо тегло на новородени към 20 ден, кг	Получени зайчета
S.platensis (n=7)	7.43±0.78 vs 5.57±0.99	4.14±1.06 vs 2.43±1.36	281.30±13.53 vs 218.8±4.67	29 vs 17
Промени, %	+33	+70.5	+28.5	+70.5
P - стойност	N.S	0.02	0.01	+12 бр.
ВемоХербТ(n=7)	7.14±0.86 vs 6.29±0.84	6.14±1.16 vs 2.29±0.71	314.9±20.31 vs 254.4±15.71	34 vs 16
Промени, %	+13.5	+168	+23.7	+112
P - стойност	N.S	0.005	0.02	+18 бр.

Средното тегло на новородените и в двете експериментални групи зайци беше по-високо в сравнение с контролните. Тези експерименти регистрират и ефект от продължителността на приема на добавките: по-висок прираст на живо тегло се наблюдава при зайчета, чиито майки получавали Спирулина в продължение на 4 месеца (28.5% при Спирулина срещу 23.7% при ВемоХербТ). Най-значимият резултат от експерименталните постановки със зайци е наличие на повече приплоди в края на опита, защото броят на оцелелите до 14-ия ден зайчета е бил достоверно по-голям за майките, получавали и Трибестан, и Спирулина като добавки.

4.2.3. Хормони, фоликулогенеза и родени приплоди при биволи, получавали добавката Ауфертин

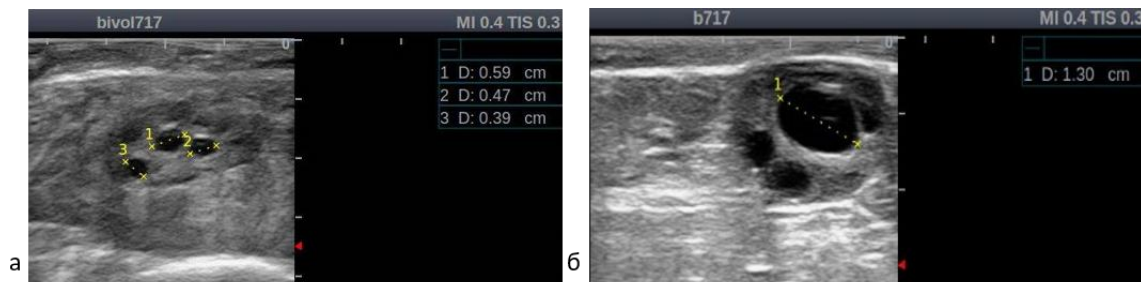
Доказателствата за влияние върху репродукцията на системно ниво (върху прогестерона, протичането на фоликулогенеза, приплоди) бяха получени и при прилагане на изцяло фитогенна биодобавка – Ауфертин при биволици.

На 20-ия ден след отелването нивата на прогестерона в контролните и експерименталните групи не се различаваха достоверно: $1,3 \pm 1,55$ ng/ml в контролната и $1,6 \pm 1,75$ ng/ml в експерименталната.



Фигура 2. Промени в нивата на прогестерон при третиране с Ауфертин биволици: данните са представени като процент спрямо нивото на прогестерона преди третирането, разликата е достоверна при $P < 0.01$ (Ilieva et al.&Kistanova, 2021).

И двата приема на добавката (на 21-ия и 31-ия ден след отелване) провокираха сходна динамика на редукция нивото на прогестерона (фиг.2). Между състоянието на яйчниците на биволиците от двете групи на 20-ия ден нямаше съществена разлика: при всички животни бяха налице малки фоликули и само при отделни биволици – единични фоликули със среден размер. В експерименталната група още на 24-ия ден след първото третиране се увеличи броят на животните с големи фоликули (фиг. 3).



Фигура 3. Фоликули в яйчниците на биволици: а – преди третиране с Ауфертин (20 ден постпартум); б – след третиране (24 ден постпартум) (Ilieva et al. ...&Kistanova, 2021).

Две от биволиците проявиха еструс и бяха покрити от бик. Биволиците, не проявили еструс в рамките на 10 дни след първото третиране, получиха втора доза от добавката. На 34-ия ден след второто третиране бяха регистрирани големи фоликули при 80% и жълти тела при 60% от тези животни. Бикът откри три биволици в еструс. При другите две биволици, въпреки наличието на фоликули с размер 11–12,6 mm, не беше забелязана проява на еструс. Възстановяването на цикличната активност на яйчниците на тези животни бе потвърдена по-късно с откриване на жълти тела при ултрасонографски преглед.

Таблица 4. Сравнителен анализ на биологични параметри и брой бременности при контролни и опитни биволици (Ilieva et al. ...&Kistanova, 2021).

Параметри	Контролна (n=6)			Експериментална (n=7)			Р - между групи
Период на отелване	14 март - 22 април 2019			29 март - 29 април 2019			
Възраст (години)	7 ± 2.4			6.6 ± 2.3			НД
Телесно тегло (kg)	583.3 ± 18.9			577.1 ± 15.1			НД
Среден брой лактации	3.8 ± 1.79			3.4 ± 2.07			НД
Разпределяне по брой раждания	ПР	ВР	МР	ПР	ВР	МР	
	1/6	1/6	4/6	2/7	1/7	4/7	НД за всички
Бременост	0/1	0/1	1/4	0/2	0/1	4/4	0.04 за МР
р между подгрупи по брой раждания	ПР vs. МР	ВР vs. МР	ПР + ВР vs. МР	ПР vs. МР	ВР vs. МР	ПР + ВР vs. МР	
	p = 0.61	p = 0.61	p = 0.47	p = 0.02	p = 0.04	p = 0.01	

(НД - недостовърно; ПР - първораждали, ВР - раждали втори път; МР - многократно раждали)

Ултразвуковият преглед на 70-ия ден след отелване регистрира като бременни три животни от експерименталната и едно от контролната група, а на 90-я ден –още една бременност в експерименталната група.

Прилагането на билковата добавка Ауфертин с високо съдържание на мастни киселини на ранни стадии след омалачване (от 21-ия ден) помага ефективно за преодоляване на следродилния анеструс и скъсяване на периода между отелвания при биволици от породата Българска Мура. Добавката не само стимулира растежа на фоликулите и успешната овулация, но също така увеличава с 40.5 % честотата на бременност в третираната група животни в сравнение с контролната в рамките на 70 дни след отелването. Четири малачета бяха родени в рамките на една година след отелването (интервалът на отелване е 362.7± 6.21 дни) в експерименталната група, и само едно в контролната.

Осъщественият от нас биохимичен анализ на Ауфертин регистрира, че линоловата киселина е основната мастна киселина в пробата (42% срещу 14,3% за триеновите киселини). Редица проучвания съобщават, че тази незаменима мастна киселина служи *in vivo* като предшественик на арахидоновата киселина, чиято основна функция е участието в синтеза на простагландини от 2–серия като PGF2 и PGE2, свързани с репродукцията на бозайниците (Gunstone, 2003; Mattos et al, 2004; Dirandeh et al., 2015). В Ауфертин бяха намерени и естери на триеновите киселини и на алфа-линоленовата киселина, принадлежащи към група n–3 полиненаситени мастни киселини (PUFA). След консумацията алфа-линоленова киселина се метаболизира до важните ейкозапентаенова киселина (C20:5) и докозахексаенова киселина (C22:6) киселини, а C20 е предшественик на биосинтеза на 3–серия простагландини (Gunstone, 2003; Mattos et al, 2004). Простагландинът E2 има много важна роля по време на ранна бременност като лутеопротективен фактор, помагач за запазване на жълтото тяло и блокиране действието на PGF върху него (Wiltbank et al., 2018). Освен увеличаване на синтеза на простагландин E2, ейкозапентаеновата киселина генерира простагландин E3 (PGE3), притежаващ по-ниска възпалителна способност и по-малка активност (Siriwardhana et al., 2012),

който може да намали имунологичните проблеми на майка при разпознаване на бременността. Наличието в Ауфертин на п-3 и п-6 полиненаситени мастни киселини в подходящо съотношение отключва фоликуларния растеж с формиране на доминантен фоликул, и осигурява запазването на бременността.

4.2.4. Хормони и фоликулогенеза при свине, получавали добавки Спирулина и хомогенат от търтееви ларви

Действието на добавките Спирулина и хомогенат от търтеевите ларви на системно ниво върху репродукцията (хормони, фоликулогенеза, ооцити) е потвърдено също и при свине.

Добавките като Спирулина и хомогенат от търтееви ларви (ХТЛ) са с добър потенциал за угояване на животните, тъй като освен фитогенните биоактивни съставки съдържат и голямо количество хранителни вещества. Прилагането на Спирулина в две дози (2 г и 3 г на глава) не промени достоверно такива морфометрични параметри на репродуктивната система на свине като тегло на яйчниците, дължина на маточните рога и широчина на просвета им. С макроскопска оценка на яйчниците обаче бе установен достоверно по-голям брой фоликули с размер над 6 мм при животните, получавали 3 г Спирулина (Табл.5).

Таблица 5. Макроскопски анализ на яйчниците на свине на 180-ия ден от третиране със *S.platensis*. Резултатите са представени като среден брой структури на животно на яйчник (Abadjieva et al. ...& Kistanova, 2018).

Групи	Показатели		
	Фоликули 2-6 mm	Фоликули > 6mm	Жълти тела
Контролна	21.3±1.1	4.1±0.6	3.2±0.3
SP2g	22.2±1.8	4.5±0.5	4.1±0.3
SP3g	10±1.1*	8.5±0.6*	7±0.4*

* P<0.05 спрямо контролна група

Хормоналните изследвания показаха, че въпреки по-ниските стойности прогестерон при контролната група, плазмените нива на този хормон бяха регистрирани и в трите групи, което потвърждава наличието на функционални жълти тела при всички животни на тази възраст. Сравнително голямата вариация на нивата прогестерон и естрадиол в трите групи животни може да се обясни с факта, че към момента на измерването отделните животни са били на различни фази от естралния цикъл(Табл.6.).

Таблица 6. Плазмени нива на прогестерон, естрадиол и грелин на заклани на 180-ия ден свине, третирани със Спирулина (Abadjieva et al. ...& Kistanova, 2018).

Хормони	Групи		
	Контролна	SP2g	SP3g
Прогестерон, nmol/L	0.7±0.2	2.1±0.6*	2.4±0.7*
Естрадиол, pmol/L	283.8±36.2	169.3±45.9	205.4±40.3
Грелин, pg/m L	94.0±9.9	125.9±9.3*	115.6±13.9

* P<0.05 спрямо контролна група

При експерименталните животни е измерено по-високо ниво грелин. Интересен е фактът, че само при експерименталните животни бе наблюдавана достоверна корелация между грелин и естрадиол, независимо от дозата на третиране със Спирулина ($r=0.75-0.84$ $p<0.05$). Положителна корелация между грелин и прогестерон бе наблюдавана при всички изследвани групи ($r=0.79-0.94$, $P<0.005$). Редица изследвания от последното десетилетие предполагат, че грелинът участва в контрола на ключови аспекти на репродуктивната функция, включително началото на пубертета (Fernandez–Fernandez et al. 2006; Muccioli et al. 2011; Tena–Sempere et al. 2013). Рецептори за грелин присъстват в много от периферните тъкани, както и в тъканите на яйчниците (Gaytan et al. 2003). Получените резултати са достатъчно основание да се приеме, че овулацията на третираните със Спирулина животни се е проявила по-рано в сравнение с контролните животни. В подкрепа на това са и данните за хормоналните нива. И в двете експериментални групи нивото на прогестерон беше над 1 nmol/L , означаващо настъпилата полова зрелост на животните. В групата, третирана с 3 г Спирулина, бяха намерени и согрога albicans като доказателства, че тези животни са преминали поне през два естрални цикъла.

Резултатите от анализа на яйчниците на свине на 180-ия ден след началото на третирането им с хомогенат от търтееви ларви показва, че яйчниците на третираните животни са с по-голяма дължина. Обзорът на хистологичните препарати от експерименталните животни потвърди активното въвличане в фоликулогенезата на по-голям брой примордиални фоликули, както и че развиващите се фоликули са с по-голям диаметър (табл. 7; фиг.4).

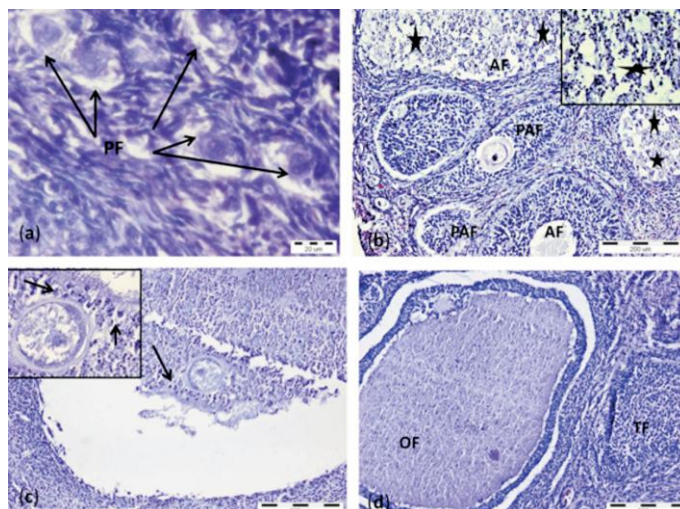
Таблица 7. Морфометрични параметри на яйчниците на подрастващи свине, получавали към диетата си хомогенат от търтееви ларви (ХТЛ)(Kistanova et al., 2020).

Групи	Параметри						
	ТЯ	ДЯ	ШЯ	Диаметър на фоликуларни структури			
	(g)	(mm)	(mm)	(μm)			
				Примордиални (n=28)	Първични (n=15)	Третични (n=20)	Граафови (n=15)
Контролна (N=10)	17.2±1.2	29.5±2.8	21.4±1.7	26.6±1.9	51.0±4.8	265.3±48.9	1761.9±115.4
ХТЛ (N=10)	18.6±1.5	35.9±1.8	24.8±2.2	28.2±1.0	82.4±9.2	505.1±70.1	1587.9±98.2
<i>P - стойност</i>	0.47	0.04	0.17	0.054	0.03	0.01	0.068

Легенда: ТЯ - тегло на яйчника; ДЯ - дължина на яйчника; ШЯ – широчина на яйчника;

N: брой животни в групата; n: брой на изследвани структури

При тези животни бе забелязано също и намаляване размера на граафовите фоликули, както и признаците на атрезия в тях (фиг. 4с).



Фигура 4. Фоликулогенеза в яйчниците на свине: а–с: третирани с ХТЛ; d: контролни; PF: примордиални фоликули; PAF: преантрални; AF: антрални; OF: овулаторен. Със звездички и стрелки в инсърт са отбелязани атретичните телца (Kistanova et al., 2020).

Добавянето на ХТЛ към диетата на подрастващи свине стимулира фоликулогенезата им, особено в ранните ѝ фази, което несъмнено оказва ефект и върху качеството на ооцитите.

Признаците на атрезия в големите фоликули могат да бъдат провокирани от дисбаланс между локалната продукция на естроген и андроген, по-специално поради намаляване на продукцията на естрадиол–17 β (Guthrie et al. 1995). Една от причините за това е наличието в ХТЛ на естрадиол в по-големи количества по отношение на останалите стероидни хормони (Бурмистрова и съав., 2014; Shoinbayeva et al., 2017).

4.2.5 Сперматогенеза и качество на спермата на нерези, получавали добавка Спирулина

Половозрели мъжки животни (нерези) бяха третирани с биодобавка преди получаване на еякулати от тях за изкуствено осеменяване. Периодът на третиране бе съобразен с продължителността на пълния цикъл на сперматогенеза, която е 40 дни за нерези, с цел изследване на сперматозоидите, развили се и узрели в условията на вече включената в метаболизма добавка.

Таблица 8. Влияние на Спирулина, включена в диетата на нерези за 40 дни, върху качеството на сперма (Kistanova et al., 2009).

Периоди	Параметри					
	Обем (ml)	Концентрация ($\times 10^6/\text{ml}$)	Подвижност (%)	Преживяемост при 15°C (%)		
				24 час	48 час	72 час
Предопитен период (6 нереза 36 еякулата)	276,0 $\pm 37,9$	300,0 $\pm 18,4$	75,6 $\pm 2,7$	69,1 $\pm 4,0^a$	63,7 $\pm 5,5^a$	54,1 $\pm 5,8^{aa}$
Следопитен период	306,5	327,5	79,3	74,9	70,5	65,0

(6 переза 36 еякулата)	$\pm 41,7^*$	$\pm 15,4$	$\pm 2,5^*$	$\pm 2,6^{*a}$	$\pm 2,4^a$	$\pm 2,3^{*aa}$
---------------------------	--------------	------------	-------------	----------------	-------------	-----------------

* – $P < 0,05$ спрямо предопитен период;^{a,aa} – $P < 0,05$ and $P < 0,01$ – спрямо 24-я час в двата период

В следопитния период обемът на еякулатите и концентрацията на сперматозоидите, подвижността на сперматозоидите и оцеляването им при съхраняване до 72 часа при 15°C са с по-високи значения (Табл.8). Също така беше наблюдавана и по-висока устойчивост на сперматозоидите към температура 39°C: към седмия час от престоя при тази температура бяха отчетени три пъти повече живи сперматозоиди в следопитния период в сравнение с предопитния ($5.05 \pm 2.8\%$ и $16.0 \pm 4.5\%$ съответно).

4.3. Митохондриите - субклетъчни мишени на биоактивните фитогенни добавки

Съставът на използваните в експерименталната ни работа добавки съдържа редица фитогенни компоненти: полифеноли, мастни киселини, пигменти, витамини и микроелементи с ясно изразени антиоксидантни свойства. Много от експериментите ни регистрират сходна промяна на митохондриалната функционалност в клетките на репродуктивната система след добавяне на натурални добавки със сходни фитогенни компоненти към диетата на животните.

4.3.1. Митохондриални ензими и брой копия мтДНК в овариите на мишки и в клетъчен модел на миши ембрионални фибробласти, третирани с добавките Спирулина, ПровитЕ10%Супер и орегонин

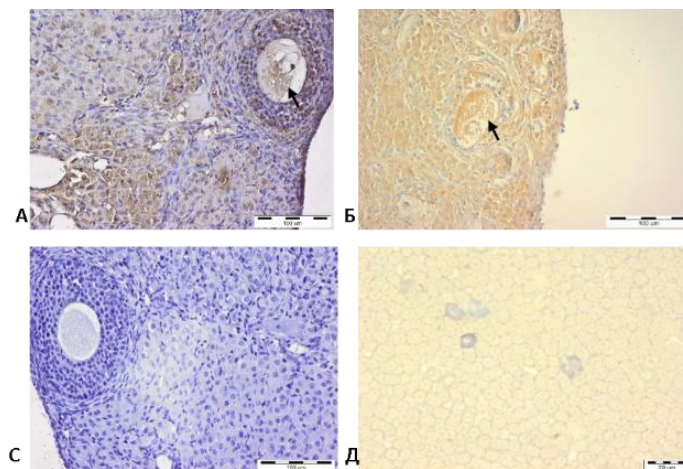
Активността на митохондриалния ензим цитохром С оксидаза (COX) беше изследвана в овариалната тъкан на мишки, получавали Спирулина преди супреовулацията (Табл.9).

Таблица 9. Влияние на Спирулина върху активността на митохондриалния ензим цитохром С оксидаза в овариите на мишки (модифицирана от Kistanova et al., 2009).

Групи	Тегло на яйчника (g)	Съдържание на протеин (mg/g)	Цитохром С оксидаза (nmol/min/mg протеин)
Контрола (n=10)	31.5 ± 8.53	2.75 ± 0.53	941.1 ± 27.1
Spirulina (n=10)	45.9 ± 10.0	4.07 ± 0.38	1067.3 ± 77.3
P - стойност	0.03	0.001	0.04

Тетрираните с добавката животни бяха с по-голямо тегло на яйчниците и с по-високо съдържание на протеин в тях. Активността на COX в овариите на мишки, получавали Спирулина, беше достоверно по-висока (с 13 %) в сравнение с контролните животни.

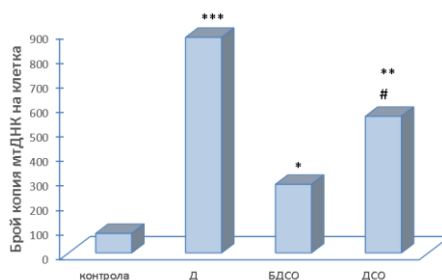
В експеримента с добавка ПровитЕ10%Супер в овариите на мишки беше изследвана експресията на протеиново ниво на още един ензим от дихателната верига на митохондриите – митохондриално кодираната никотинамид аденин динуклеотид дехидрогеназа 1 (MT–ND1). Най-силен сигнал при визуализацията на белтъка MT–ND 1 бе установен в ооцитите на експерименталната група животни, получавали хранителната добавка (фиг. 5). При тези животни бе регистрирана и увеличена експресия на MT–ND1 в интерстициалните клетки около развиващите се първични фоликули.



Фигура 5. Експресия на MTND1 в яйчници на мишки. А: суперовулирани; Б: суперовулирани и получавали добавка ПровитЕ10%Супер; С: негативна контрола на антитяло; Д: тъканна негативна контрола - еритроцити от кръвта на мишка. Стрелките посочват експресията на протеина в ооцитите.

В същия опит беше изследван и броят копия митохондриална ДНК (мтДНК) в овариите и кумулусните клетки на овулирани ооцити. Наблюдаваното драстично намаляване на броя копия мтДНК в овариите на експерименталната група животни е косвено доказателство за по-успешна супреовулация след подхранване с добавката, защото най-голям брой митохондрии се намира в овулиралите зрели ооцити.

Броят копия на мтДНК в кумулусните клетки на ооцитите, добити чрез дисекция на яйчниците на третираните с добавката животни от експерименталната група беше достоверно по-висок в сравнение с контролната (фиг. 6).

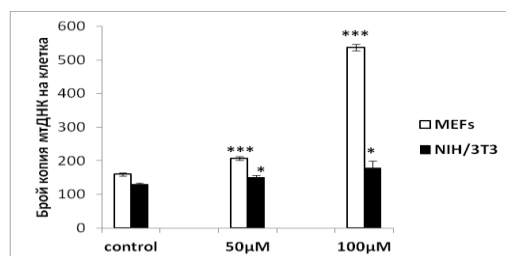


Фигура 6. Промени в броя копия митохондриална ДНК в кумулусни клетки на ооцити, добити чрез дисекция на яйчника и овулирани след процедура за суперовулация. Д-добавка; БДСО- суперовулирани без добавка; ДСО- суперовулирани с добавка.

Самото хормонално третиране също води до увеличаване броя копия ДНК в кумулусните клетки. Подобен ефект бе наблюдаван и при суперовулираните животни, получавали добавката. Кумулусните клетки на тези животни съдържаха по-голям брой копия мтДНК както спрямо контролните, така и спрямо суперовулираните животни, не получавали добавката. Вероятна причина за това е необходимостта да бъде гарантирано по-интензивното съзряване на по-голям брой ооцити. Съществуват доказателства, че успешното оплождане и развитието на ембриона зависи не само от критичния брой копия мтДНК в ооцита (El Shourbagy et al, 2006; Spikings et al., 2007), но и от необходимия брой копия мтДНК в кумулусните клетки (Desquiret-Dumas et al., 2017).

Способността на полифенолите да влияят върху броя копия мтДНК бе доказана при миши клетъчни модели. При третиране с полифенола орегонин, в първичните миши ембрионални фибробласти (МЕФ) и в

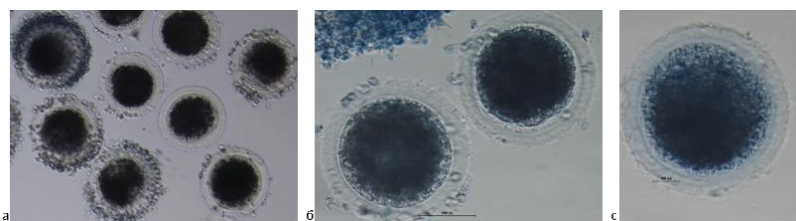
клетъчната линия на миши ембрионални фибробласти (NIH/3T3) бе установено увеличаване на броя копия мтДНК (фиг. 7).



Фигура 7. Брой копия мтДНК в първични клетъчни линии, и в клетъчна линия NIH/3T3 на миши ембрионални фибробласти, третирани с орегонин (Krasilnikova et al. ...& Kistanova 2018).

4.3.2. Митохондриална мрежа в свински ооцити при диета със Спирулина

Чрез оцветяване с брилиант крезил блу беше оценена компетентността на ооцитите, получени от овариите на контролни и опитни животни (Фиг.8). Този тест позволява определяне на активността на глюкозо-6-фосфат дехидрогеназата (G6PD): ензим, активен в съзряващите ооцити, но намаляващ активността си в ооцитите, завършили фазата си на растеж.



Фигура 8. ВCB- и ВCB+ свински ооцити след инкубиране с брилиант крезил блу. а: контролна група, 20×; б и с: третирани с 3г Спирулина, 40×.

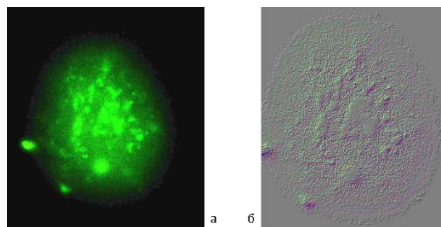
Таблица 10. Компетентност на получените ооцити от яйчниците на експериментални животни.

Групи	Получени ооцити, брой/яйчник	Крезил блу тест, % позитивни (ВCB ⁺)
Контролна (n=7)	15.6±0.9	55.1±2.4
SP2g (n=7)	17.4±1.3	54.2±4.6
SP3g (n=7)	18.2±0.5	63.8±3.2*

*P < 0.05

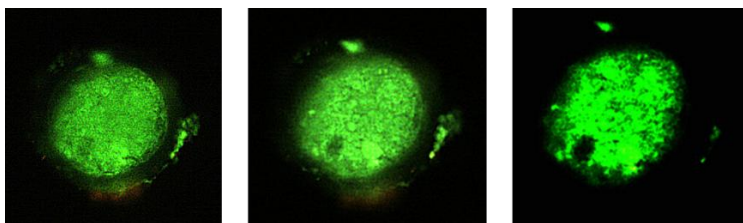
При животните от експерименталната група, получаваха 3 г Спирулина, беше наблюдавана тенденция за по-голям брой добити ооцити и достоверно по-висок процент крезил блу позитивни (табл. 10). Съгласно Egerszegi et al (2010) и Tsai et al. (2018) прогресията на мейоза, митохондриалните характеристики и оплодителната способност са по-добри в ВCB+ в сравнение с ВCB- свински ооцити. За по-голям брой активни митохондрии в ВCB+ ооцити на овце и кози съобщават Catalá et al (2011) и Rodriguez-Gonzales et al. (2002), съответно.

Редица автори смятат, че тестът ВCB е индиректен маркер на ооцитите с добре функциониращ митохондриален апарат (Spikings et al., 2007; Bhojwani et al., 2007; Cagnone et al., 2016).



Фигура 9. Дифузна митохондриална мрежа в ооцит на свиня от контролната група (конфокална микроскопия). а: JC9 оцветяване, 63×; б: стереоизображение.

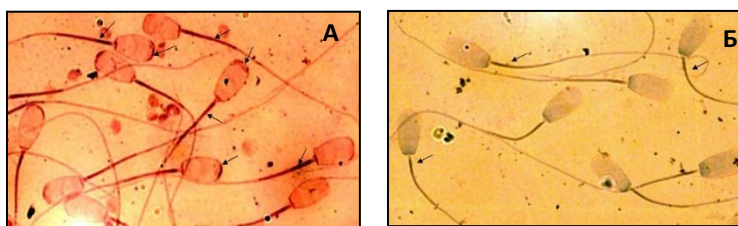
В нашите експерименти това бе потвърдено с оцветяването на ооцити с флуорохромната боя за митохондрии JC9. В ооцитите на животните от експериментална група, получавали 3 г Спирулина, беше наблюдавана по-плътна и поляризирана към ядрото митохондриална мрежа, което е признак за по-висока степен на зрялост на ооцита (Bavister and Squirrell, 2000; Sun et al., 2001) (фиг. 9 и фиг. 10).



Фигура 10. Плътна митохондриална мрежа, поляризирана към ядрото в ооцит на свиня от експериментална група, хранена с 3 г Спирулина (конфокална микроскопия, JC9, 63×). Микрофотографиите отразяват различна дълбочина на виртуалния срез.

4.3.3. Антиоксидантен статус на сперматозоидите на нерези, получавали добавката Спирулина

Способността на Спирулина да влияе върху антиоксидантния статус на гаметите беше доказана и при мъжки животни. Беше направен нитроблу тетразолиев тест за оценка натрупването на кислородни радикали в сперматозоидите преди и след третирането на нерези със Спирулина. Резултатите показаха, че в предопитния период при 70% от сперматозоидите се наблюдава натрупване на формазанови зърна в акрозомата и в средната част на сперматозоида (фиг.11).

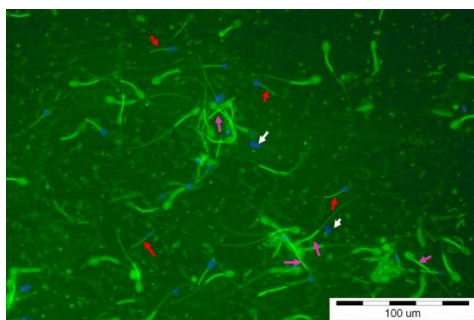


Фигура 11. Нитроблу тетразолиев тест (NTB) тест на сперматозоиди от нерез. А: предопитен период; Б: следопитен период. Стрелки посочват наличието на фармазан.

Наличието на фармазанови зерна корелира с натрупването на свободни кислородни радикали (Amarasekara et al, 2012). В следопитния период се наблюдава рязко намаление на съдържанието на фармазан в акрозомната част на сперматозоида (фиг. 11, Б). Резултатите от NBT теста показаха, че сперматозоидите, получени в следопитния период, са с по-висока способност за неутрализиране на свободни кислородни радикали (ROS). Антиоксидантните компоненти на Спирулина изглежда са допринесли за намаляване на оксидативния стрес в сперматозоидите, гарантирайки необходимото ниво на NADPH и екзогенните антиоксиданти за балансиране на окислително-редукционния процес.

4.3.4. Митохондриална активност в сперматозоидите на коч, съхранявани с добавката орегонин

Ефектът от биодобавката върху митохондриалния статус на сперматозоидите беше доказан и в опит *in vitro* с полифенол орегонин. След оцветяване с MitoView Green и Hoechst бяха наблюдавани сперматозоиди с различен митохондриален статус както в контролните, така и в експерименталните проби след съхраняване на сперма в продължение на 24 часа при 5° C (фиг. 12).



Фигура 12. Митохондрии в сперматозоиди на коч, третиран с орегонин, на 24-ия час от съхраняване при 5° C. Митохондрииите са оцветени с MitoView (ярко зелено), а ядрата са оцветени с Hoechst (синьо). Ув. 40×. Розови стрелки: клетки с активни митохондрии; червени стрелки: клетки със затихващи митохондрии; бели стрелки: клетки с нефункционални митохондрии. Главите и опашките на сперматозоидите показват неспецифично зелено оцветяване (Abadjieva et al. ...& Kistanova, 2020).

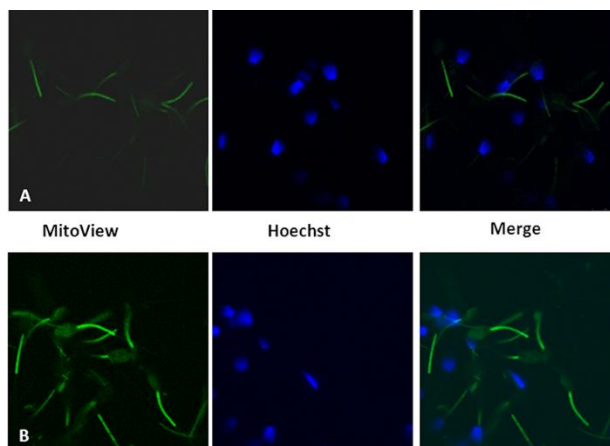
Количественият анализ показва, че на 24-ия и на 48-ия час от съхраняване на сперма при 5°C процентът на сперматозоидите с активни митохондрии е по-висок в пробите, третиран с орегонин, в сравнение с контролните (табл. 11).

Таблица 11. Промени на митохондриалния статус в сперматозоиди на коч в контролните и в третираните с орегонин проби, съхранявани 48 часа при температура 5°C (Abadjieva et al. ...& Kistanova, 2020).

Митохондриален статус	Активен (%)		Затихващ (%)		Нефункционален (%)	
	Контрола	+ орегонин	Контрола	+ орегонин	Контрола	+ орегонин
Еякуланти (n=18)						
Време на съхранение						
24 час	39.7±2.9	54.6±2.3 ^a	29.7±2.4	32.7±3.6	30.8±2.7	12.7±1.4 ^a
48 час	26.7±1.9	44.6±3.6 ^a	33.4±4.4	41.3±5.3	39.9±4.1	14.2±2.9 ^a

^a - $P < 0.05$ спрямо контрола

Наблюдението на проби с лазер-сканиращия конфокален микроскоп на 72-ия час от престоя им при 5°C показва, че митохондриалната маса в клетки, съхранявани с орегонин, е по-запазена (добре изразена ярко зелена флуоресценция на снимката), отколкото в контролните проби, където флуоресцентният сигнал беше значително по-слаб (фиг. 13).



Фигура 13. Митохондрии в сперматозоидите на коч в контролни (А) и обработени с орегонин (В) проби на 72-ия час от съхраняване при 5°C. Лазер-сканираща конфокална микроскопсия, 63× (Abadjieva et al. ...& Kistanova, 2020).

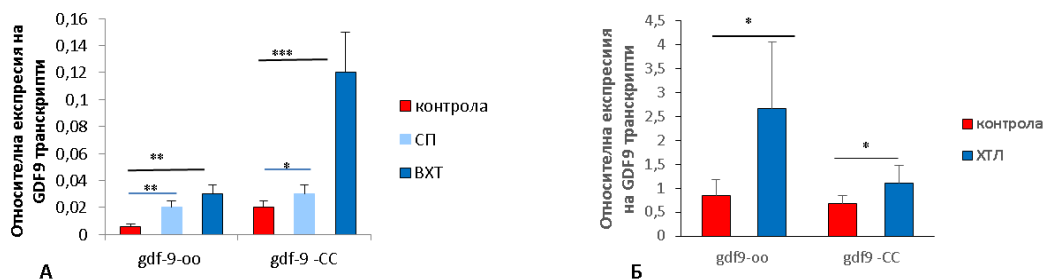
Тестът за плодовитост *in vivo* допълнително обоснова наличието на запазен капацитет за оплождане на сперматозоидите. На 20-ия ден след изкуственото осеменяване процентът на бременност в контролната и експерименталната група бе 60% и 80% съответно. Вторият ултразвуков преглед потвърди тези резултати

Продължителното съхраняване на сперматозоиди от коч в охладено състояние може да генерира голямо количество ROS, което влияе отрицателно върху функцията на сперматозоидите и има като резултат загуба на оплодителната им способност (Busak и Tekin, 2007). Орегонинът вероятно допринася за абсорбцията и неутрализацията на ROS в охладените сперматозоиди на коч и за намаляване на липидната пероксидация (Ponomarenko et al., 2014; Telysheva et al., 2011). Съществуват данни за способността на орегонина да индуцира експресията на гени, свързани с осигуряване на антиоксидантния баланс (Lundquist et al., 2015), и да влияе върху броя на копията на митохондриалната ДНК в клетката (Krasilnikova et al.,...&Kistanova, 2018). Изглежда че орегонинът осигурява оптимална антиоксидантна защита без да нарушава оплодителната способност на спермата. Резултатите от теста *in vivo* подкрепят това предположение.

4.4. Генни мишени на биодобавки с фитогенни компоненти (нутригеномен ефект)

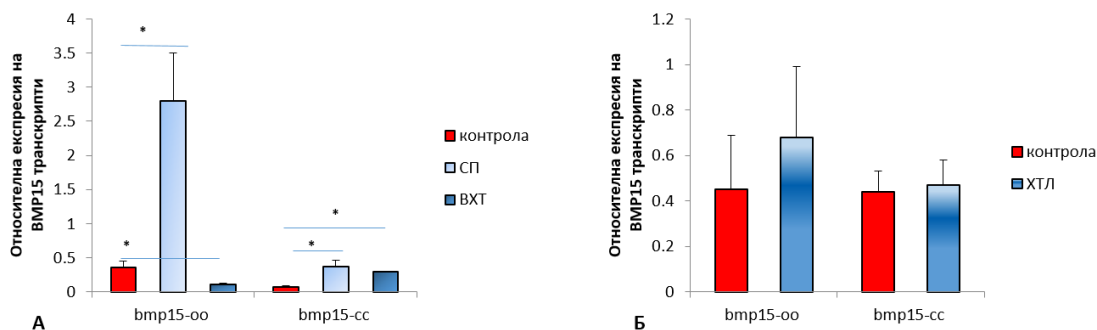
4.4.1 мРНК транскрипти и протеини на BMP15 и GDF9 в ооцити и кумулусни клетки при зайци и свине, получавали добавките Спирулина, Трибестан и хомогенат от търтееви ларви

И за трите изследвани добавки – Спирулина, ВемоХербТ и хомогенат от търтееви ларви – бе регистрирано въздействие върху експресията на мРНК транскрипти на GDF9 и BMP15 в ооцитите и кумулусните клетки при зайци и свине (фиг.14-15).



Фигура 14. Промени в експресията на мРНК транскрипти на ген GDF9 в ооцити и кумулусни клетки на зайци (А) и свине (Б), консумирали Спирулина, ВемоХербТ и хомогенат от търтееви ларви. СП-Спирулина; ВХТ- ВемохербТ; ХТЛ- хомогенат от търтееви ларви.

Заслужава внимание и специфичното влияние на отделните добавки върху експресията на изследваните растежни фактори. ВемохербТ и хомогенатът от търтееви ларви причиниха достоверно увеличаване експресията на GDF9 както в ооцитите, така и в кумулусните клетки (фиг. 14), като най-значително такова бе отбелязано в ооцитите. Спирулината показва по-изразен ефект върху увеличаване експресията на BMP15 и в ооцитите, и в кумулусните клетки (фиг. 15).



Фигура 15. Промени в експресия на мРНК транскрипти на ген BMP15 в ооцити и кумулусни клетки на зайци (А) и свине (Б), консумирали Спирулина, ВемоХербТ и хомогенат от търтееви ларви.

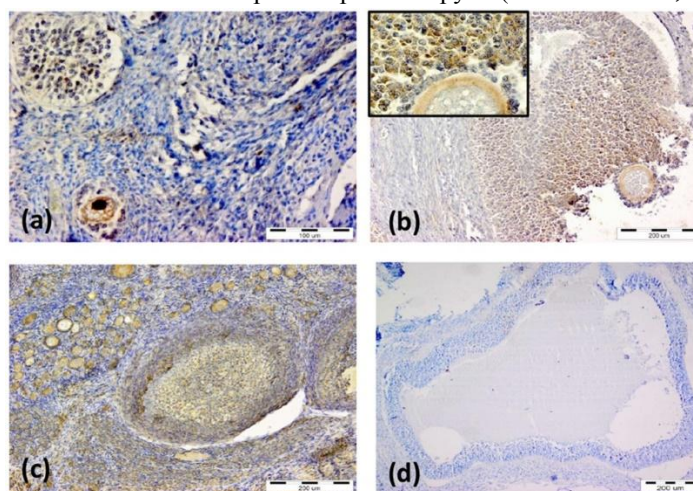
При третиране с хомогенат от търтееви ларви се забелязва само тенденция за промени в експресията на BMP15 транскриптите (фиг.15, Б). По отношение на ВемохербТ бе наблюдавано дори потискане на този фактор в ооцитите.

Значението на ооцит-специфичните фактори GDF9 и BMP15 за растежа и узряването на ооцитите е добре проучено през последните 20 години, включително и върху нокаут животни. Данните са обобщени в редица обзори (Otsuka et al., 2011; Li et al., 2014; de Castro et al., 2016; Belli and Shimasaki, 2018; Dalbies-Tran et al., 2020; Park et al., 2020). При повечето бозайници експресията на тези гени е установена както в ооцитите, така и в кумулусните клетки в ранните фази от развитието им. GDF9 и BMP15 стимулират растежа на фоликулите в яйчниците чрез пролиферация и диференциация на гранулозните клетки, и чрез синтез на стероиди (Orisaka et al, 2009). Това ги прави подходящи мишени за действието на външни фактори, в това число и хранителни, с цел провокиране развитието на по-голям брой фоликули от овариалния резерв. Изследванията в тази област обаче са ограничени, и нашите резултати за ефекта на фитогенните добавки върху тези гени са едни от първите.

Степента на промяна в експресията на техните мРНК, както се вижда, зависи от спецификата на добавката (дали потенциалът ѝ е повече строителен или енергиен като на Спирулина и ХТЛ, или проявява хормоноподобно действие като ВемохербТ), както и от продължителността на приема. Промените в ооцитите са най-значими при продължителен прием, в това число целият период на полово съзряване. При краткосрочното въздействие преди заплождане експерименталните резултати показаха по-изразена реакция

при кумулусните клетки. Изследване на овариите на дъщерно поколение на зайци, третирани с фитогенни добавки, показва че наблюдаваните промени в експресията на мРНК-транскриптите на BMP15 се запазват. Увеличената експресия на BMP15 транскрипти в ооцитите и кумулусните клетки след консумация на Спирулина остава по-висока и при дъщерите им, а намалената експресия на BMP15 транскрипти в ооцитите след консумация на Трибестан остава по-ниска и в ооцитите на дъщерите им. Промените в експресията на GDF9 транскрипти не се наследиха в дъщерното поколение (Abadjieva & Kistanova, 2016; Abadjieva et al.,...&Kistanova, 2018).

Имунохистохимичният анализ на експресията на протеини GDF9 и BMP15 при изследваните животни показва кореспондиращо увеличаване на тези протеини с увеличаване на нивото на мРНК транскрипти след подхранване с добавките Спирулина и Трибестан (Abadjieva & Kistanova, 2016; Abadjieva et al.,...&Kistanova 2018). При третиране с ХТЛ същата тенденция е характерна за GDF9. Въпреки недостоверните промени в експресията на мРНК транскрипти на BMP15 след подхранване с ХТЛ, сигналът на BMP15 протеин бе съществено по-висок в овариите при тази група (Kistanova et al., 2020; фиг.16).

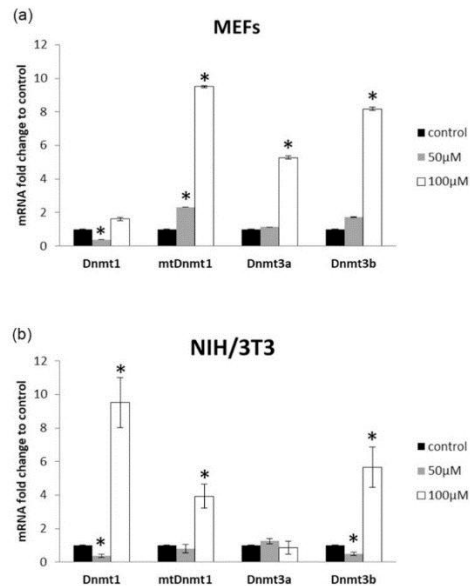


Фигура 16. Експресия на BMP15 в овариите на третирани с ХТЛ свине. а: вторичен ооцити и гранулозни клетки на третичен фоликул, 40х; b: ооцит и гранулозни клетки в Граафов фоликул, 20х, инсърт 40х; с: позитивна тъканна контрола на яйчник на плъх; d: негативна контрола на анти тяло. Оцв. Хематоксилин. (Kistanova et al., 2020).

Промените в експресията на ооцит-специфичните фактори се отразиха върху увеличената активност на фоликулогенезата при зайци (Abadjieva & Kistanova, 2016; Abadjieva et al.,...&Kistanova 2018) и свине (Kistanova et al., 2020; фиг. 4 от раздел 4.2.4). Изследванията ни потвърждават резултатите, регистрирали влиянието на по-високата експресия на тези гени върху фоликуларния растеж, матurationта и фертилизацията на ооцитите (Juengel & McNatty, 2005; Li et al., 2014; Kahraman et al., 2018; Belli and Shimasaki, 2018).

4.4.2 мРНК транскрипти на ДНК-метилтрансферази в миши ембрионални фибробласти, третирани с добавката орегонин

Изследвано бе въздействието на натурални биодобавки с фитогенни компоненти върху мРНК транскрипти на важни за епигенетичните промени гени – ДНК-метилтрансферази. В условията на клетъчния модел ‘миши ембрионални фибробласти’ бе доказано, че полифенолът орегонин е в състояние да променя експресията на мРНК транскрипти на Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b и mt-Dnmt1 (фиг. 17).

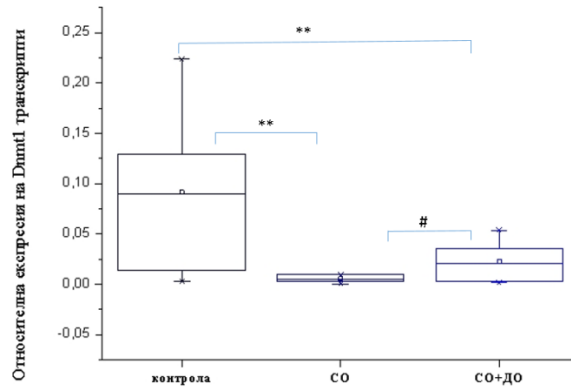


Фигура 17. Промени в експресията на мРНК транскрипти на ДНК-метилтрансферази в МЕФ и NIH/3T3 клетки след инкубиране с орегонин в концентрации 50 и 100 μM (Krasilnikova et al. ...&Kistanova, 2018).

Корелационният анализ показва, че между експресираните Dnmts в MEF и NIH/3T3 клетки има различни корелационни връзки. Беше определена висока положителна корелация между mtDnmt1 и Dnmt3b, както и между Dnmt3b и Dnmt3a в MEFs ($r=0.997$, $p=0.03$ и $r=0.993$, $p=0.04$). Такава бе установена и между броя копия мтДНК и експресията на mtDnmt1 и Dnmt3b транскрипти в MEFs ($r=0.999$, $p=0.012$). Това може да се обясни с известния факт, че ензимната функция на ДНК-метилтрансферази зависи от донора на метиловата група SAM, необходимо условие за чието производство е нормалното функциониране на митохондриите (Minocherhomji et al., 2012). Зависимостта на метилиране на ДНК от количеството на митохондриите е потвърдена от Smiraglia et al.(2008), анализирали промените в метилационен статус на няколко гена в отговор промяната (намаляване и увеличаване) на броя копия мтДНК.

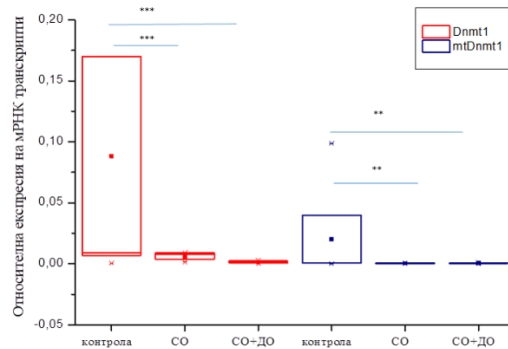
4.4.3. мРНК транскрипти на ДНК-метилтрансферази в ооцити и кумулусни клетки при суперовулирани мишки, получавали добавката ПровитЕ10%Супер

Беше проучено въздействието на добавката ПровитЕ10%Супер, съдържаща богат на полифеноли артишок, върху експресията на транскрипти на ДНК-метилтрансферази в ооцити и кумулусни клетки на суперовулирани мишки. Експресията на Dnmt 1 при I/CO/ и II/CO+ДО/ опитни групи е достоверно по-ниска в сравнение с контролната група ($p=0.042$). В третираната с добавката експериментална група бе регистрирана двойно по-висока експресия на Dnmt 1 в сравнение с експерименталната група, подложена само на супреовулация (фиг. 18).



Фигура 18. Експресия на мРНК транскрипти на Dnmt 1 в ооцити при контролна, I и II експериментални групи. ** $P < 0.01$ спрямо контрола; # $P < 0.05$ спрямо CO животни. CO-супероулирани; CO+ДО-супероулирани и третирани с добавка животни (модифицирана от данни на Младенова, 2019).

Насоката в промените на транскрипти на Dnmt 1 в кумулсните клетки е сходна с тенденцията на промените, наблюдавани при ооцитите (фиг.19).



Фигура 19. Експресия на мРНК транскрипти на Dnmt 1 и mtDnmt1 в кумулусни клетки при контролната, I и II експериментални групи.

Изследвани бяха и промените в експресията на ДНК-метилтрансфери 3a и 3b в ооцитите. Достоверно по-висока експресия на Dnmt 3a бе забелязана в овулирани ооцити на хормонално третирани животни в сравнение с контролните. Не бе намерена достоверна разлика между експресията на Dnmt 3b транскрипти в трите групи.

По време на развитието на ооцита се осъществява епигенетично репрограмане, предполагащо изтриване на родителското метилиране на ДНК на началните етапи и установяване на нов метилационен профил към момента на узряване на ооцита (Yu et al., 2020). Проучването на транскрипти на ДНК-метилтрансфери в миши ооцити на различни фази от развитието им показва, че най-активната транскрипция е характерна за фазата 'зародишен везикул' и намалява в 'метафаза II' (Lucifero et al., 2007). Нашите резултати за високи нива на Dnmt 1 транскрипти в ооцитите при контролните животни и значителното им намаляване в овулиралите ооцити кореспондират с тези изследвания. Намаляването на Dnmt 1 транскрипти в кумулсните клетки след супероулиация и още по-значителното им намаляване след третиране с биодобавката ПровитЕ, може да се приеме като свидетелство за активна генна експресия в тези клетки, които трябва да гарантират ускорения растеж на по-голям брой ооцити, участващи в развитието след хормоналната стимулация.

4.5. Биоинформатичен анализ на гени с установена промяна в експресията в яйчници и прогнозиране на допълнителни потенциални генни мишени

Установените промени в експресията на гените след въздействието на изследваните биоактивни добавки са обобщени в таблица 12.

Таблица 12. Промени в експресията на гени след въздействие на биоактивни добавки с фитогенни компоненти.

Добавка	Вид животно	Гени		Органи, клетки
Спирулина	Зайци	мРНК GDF9	↑	Ооцити
		мРНК BMP15	↑	Кумулусни клетки
		протеин GDF9	↑	
		протеин BMP15	↑	
ВемохербТ	Зайци	мРНК GDF9	↑	Ооцити
		мРНК BMP15	↓	Кумулусни клетки
		протеин GDF9	↑	
		протеин BMP15	↑	
Хомогенат от търтееви лаври	Свине	мРНК GDF9	↑	Ооцити
		протеин GDF9	↑	Кумулусни клетки
		протеин BMP15	↑	
ПровитЕ 10%Супер (артишок, витамин Е и минерали)	Мишки	мРНК Dnmt1	↑	Ооцити
		мРНК Dnmt3a	↓	Кумулусни клетки
		мРНК Dnmt1	↓	
		протеин mtND1	↑	

Орегонин 50 μ M	Мишки	mPHK Dnmt1	↓	Първични ембрионални фибробласти
		mPHK Dnmt3b	↑	
		mPHK mtDnmt1	↑	

Известно е, че гените работят като единен оркестър, където всеки инструмент (ген) е само малка част, свързана органично с останалите участници, и се регулира както на ниво транскрипция (транскрипционни фактори), така и на ниво транслация (микроРНК) (Mercatelli et al., 2020). Натрупаните експериментални данни за взаимозависими промени на генната експресия в резултат на различни външни въздействия, включително хранителни, позволиха създаване на бази данни, чрез които е възможно проследяване на междугенните взаимодействия. Високият процент хомологичност на гените GDF9 и BMP15 при зайци, свине и човек (83% за BMP15, Yin et al. (2008) и 72% за GDF9, Sun et al. (2017)) бе преценен като достатъчно основание за използване на бази данни за човешки гени при биоинформатичен анализ на генната експресия при зайци и свине поради отсъствието засега на бази данни за междугенните взаимодействия за последните. Също така сходството в протичането на основните репродуктивни процеси при повечето бозайници позволява използването им като модели за прогнозиране на процесите в човешкия организъм. Биоинформатичният анализ на експресията на ДНК-метилтрансферази, изследвана при мишки и миши клетки, бе направен върху основа на база данни за междугенните взаимодействия на мишки.

4.5.1. Прогнозиране на генно-регулаторната мрежа на гени GDF9 и BMP15

За идентифициране на основните сигнални пътища, които могат да бъдат модулирани/или обогатени в отговор на прием на биодобавки, диференциално експресирани гени GDF9 и BMP15 бяха въведени в онлайн платформата Enrichr (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>). При анализа бяха разгледани само биологични процеси и сигнални пътища, свързани с овариалната функция, чиято асоциация с изследваните гени е доказана с висока степен на достоверност ($p < 0.01$).

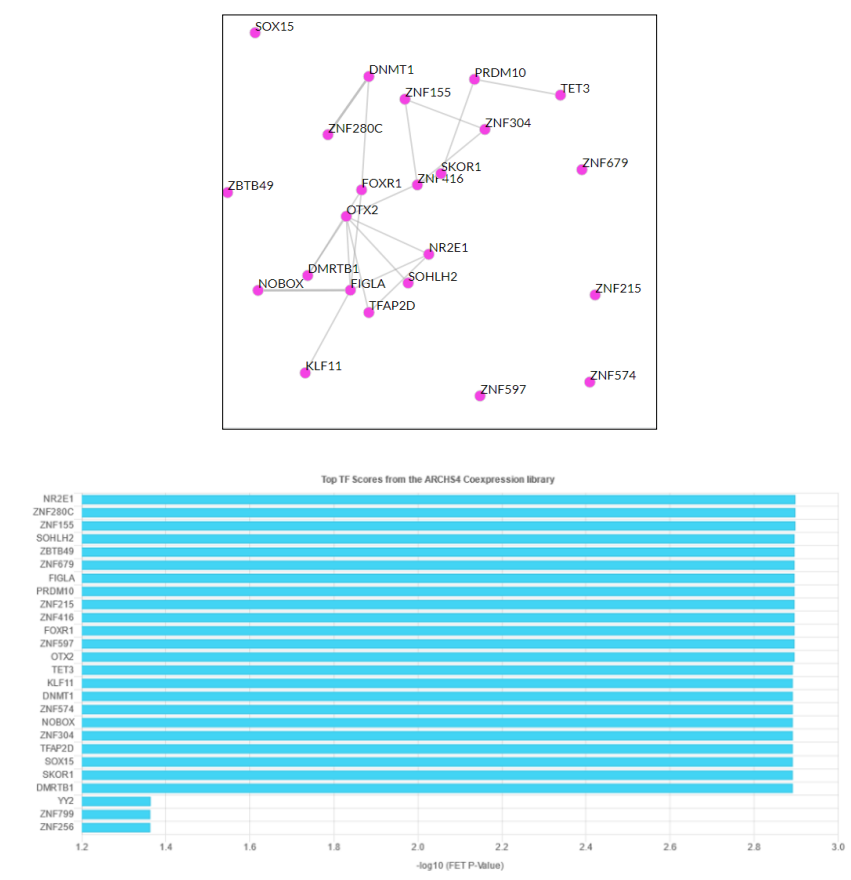
Таблица 13. Основни биологични процеси и сигнални пътища в оварии, модулирани с промяна на експресия на гени GDF9 и BMP15 по данни на Enrichr.

Гени	Биологичен процес/ сигнални пътища	Принадлежност на гена към мрежа, <i>P</i> - стойност	Общ брой гени
BMP15, GDF9	Развитие на женски гамети (Female gamete generation, GO:0007292)	0.0000015	161
BMP15, GDF9	Клетъчен отговор на BMP стимули (Cellular response to BMP stimulus, GO:0071773)	0.0000187	183
BMP15	Развитие на фоликули в оварии (Ovarian follicle development, GO:0001541)	0.000062	79
BMP15	Стероидгенеза в оварии (Ovarian steroidogenesis, KEGG:hsa04913)	0.000006125	57
GDF9	Овариални гени за нарушен фертилитет (Ovarian infertility genes, PW:0001699)	0.002998	44

Резултатите от анализа потвърдиха, че и двата гена (GDF9 и BMP15), променящи експресията си при въздействие на фитогенни добавки, обогатяват основните мрежи (включващи 344 гена), свързани с растежа и развитието на женските гамети (табл.13).

Генната експресия се променя в съответствие с ‘партитурата’, изпълнявана от ‘оркестъра’ от сложни генно-регулаторни мрежи (GRN) с множество равнища (Maniatis и Reed, 2002) в отговор на промяната на физиологичните условия, в които съществува организъмът или клетката. Гените се включват и изключват по предварително програмиран от транскрипционни фактори (ТФ) начин, чиито свързващи сайтове са близо до промотърите на контролираните от тях гени.

От данните на онлайн-платформата [ChEA3](#) (библиотека ARCHS4- "all RNA-seq and ChIP-seq sample and signature search", Lachmann et al., 2018) се вижда, че GDF9 и BMP15 имат над 20 общи транскрипционни фактори, ко-експресията на които е с висока достоверност ($p < 2E-04$) (фиг. 20)



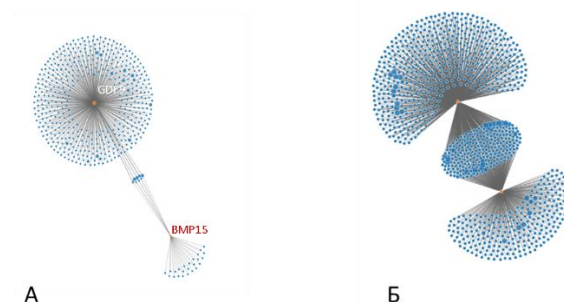
Фигура 20. Прогнозирана мрежа транскрипционни фактори, регулиращи транскрипцията на гените GDF9 и BMP15 в овариите ([ChEA3](#), [library ARCHS4](#)).

Другият важен фактор, регулиращ експресията на мРНК транскриптите, са микроРНКи. Това са къси некодиращи нуклеотидни последователности (18–25 нуклеотида), имащи свойството да се свързват комплементарно с матричната РНК на определен ген или на група от гени. Свързвайки се с 5' и 3' некодиращите региони, микроРНКите (miRNAs) индуцират разграждане на мРНК, което прекратява процеса на трансляция (Gu et al., 2014).

Таблица 14. Брой прогнозиран микроРНК за GDF9 и BMP15 мРНК (miRwalk 3.0).

Позиция върху мРНК	GDF9	BMP15
3'UTR	189	6
5'UTR	746	31
CDS	2051	565

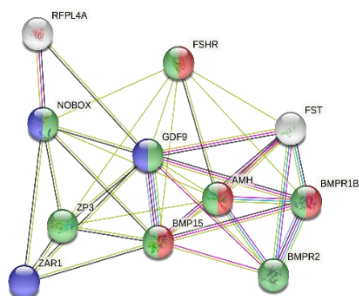
Според биоинформатичните данни, мРНК и на двата изследвани от нас гена се регулират от множество общи микроРНК, които в същото време могат да регулират и транскрипционните им фактори. Тези данни подкрепят експерименталните ни резултати. Всяко третиране с фитодобавки на зайци и свине бе придружено с промяна в експресията и на двата гена.



Фигура 21. МикроРНК, регулиращи мРНК на GDF9 и BMP15 в 5'-я некодиращ регион (А) и в кодиращ регион (Б).

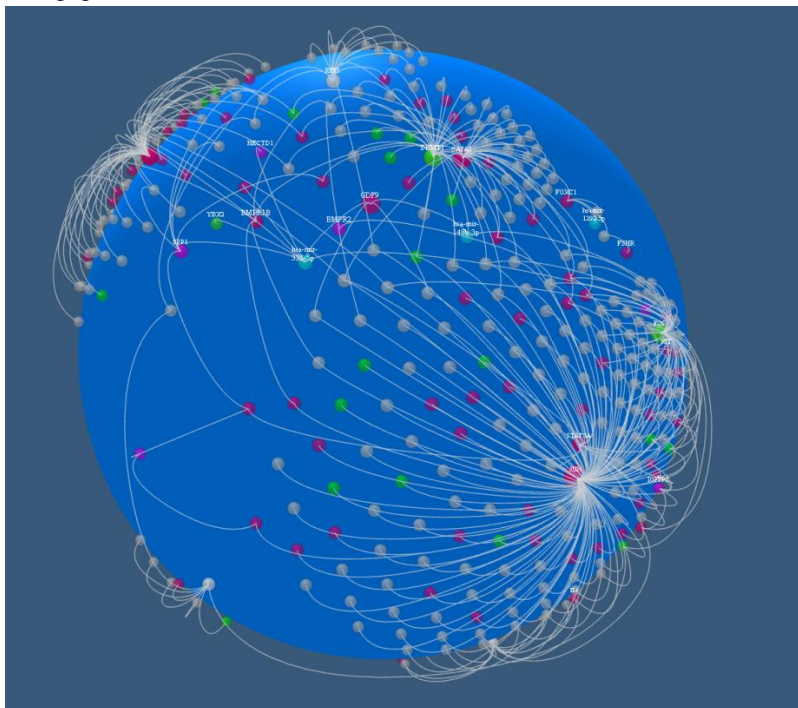
Резултатите от биоинформатичния анализ потвърждават и могат да обяснят наблюдаваното в експерименталната работа наследяване от следващото поколение животни на промените в експресията на ген BMP15. Наследяването на количествени промени на признака обикновено е свързано с епигенетичното наследяване. Анотираните от програма като транскрипционни фактори на GDF9 и BMP15, ДНMT1 и TET3 са молекули, отговорни за епигенетичните промени. ДНMT1 (DNA-methyltransferase1), както и ген BMP15, са прицелни мишени на общата микроРНК-и has-mir-4767. TET3 (tet methylcytosine dioxygenase 3) и BMP15 се регулират от три общи микроРНК: has-mir-6078, has-mir-3689b-3p и has-mir-3689c-3p. TET ензимите, както вече е изяснено, са отговорни за изтриване моделите на метилиране на родителската ДНК (St-John, 2019).

Експерименталните ни данни показаха, че и нивото на протеините, кодирани от тези гени, след третиране с добавки се променя. Анализът на взаимодействието им бе направен с помощта на онлайн-платформата STRING. GDF9 и BMP15 имат тесни експериментално доказани връзки както помежду си, така и с редица други участващи в репродуктивния процес протеини (фиг. 22).



Фигура 22. Протеин-протеин взаимодействия на BMP15 и GDF9. С различни цветове са означени биологичните процеси с участие на съответните протеини.

За интегриран анализ на цялата генно-регулаторна мрежа от изследваните от нас гени BMP15 и GDF9, данните за техните микроРНКи, транскрипционни фактори и протеин-протеинови взаимодействия бяха въведени в онлайн-платформата OmicsNet.



Фигура 23. Схема на генно-регулаторна мрежа на GDF9 и BMP15, илюстрираща обогатяване с нейните гени на следните биологични процеси: репродуктивен процес (GO:0022414; маркирани с червен цвят); отговор на хранителни вещества (GO:0031667; маркирани със зелен цвят) (за първична е приета мрежа "ТФ-гени").

На основа въведените данни софтуерът OmicsNet прогнозира мрежа от 343 генетични елемента с 420 връзки между тях в 23 биологични процеса (Фиг.23). Анализът на прогнозираната мрежа разкри девет биологични процеса и сигнални пътища, свързани с репродукцията и метаболизма, обогатяването на които с гени от мрежата бе доказано с голяма достоверност (табл. 15).

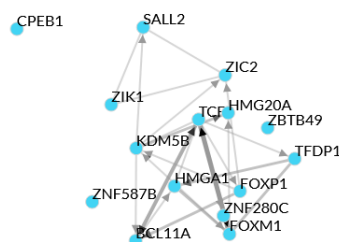
Таблица 15. Биологични процеси и сигнални пътища обогатени/модулирани с гени от прогнозираната генно- регулаторна мрежа на BMP15 и GDF9.

№	Биологичен процес / сигнален път	Брой гени от прогнозираната мрежата / общ брой гени в процес или сигнален път	Достоверност, <i>P</i> – стойност
1	Прогестерон опосредвано съзряване на оцита (Progesterone-mediated oocyte maturation, KEGG:hsa04914)	15/85	0.00584
2	Стероидогенеза в овариин (Ovarian steroidogenesis, KEGG:hsa04913)	9/57	0.00671
3	Сигнален път на естроген (Estrogen signaling pathway, KEGG:hsa 04915)	8/138	0.0971
4	Овулаторен цикъл (ovulation cycle, GO:0042698)	14/63	1.18E-15
5	Развитие на ембриона (Embryo development, GO:0009790)	58/1296	0.00791
6	Отговор на стимули на стероиден хормон (Response to steroid hormone stimulus, GO:0048545)	38/223	6.36E-20
7	Сигнален път на пролактин (Prolactin signaling pathway, KEGG:hsa04917)	6/70	0.0358
8	Отговор на външни стимули/нивото на хранителни вещества (Response to external stimulus/ response to nutrient levels, GO:0031667)	48/345	4.40E-12
9	Метаболитен процес на мастни киселини (Fatty acid metabolic process, GO:0006631)	9/416	0.019

Биоинформатичният анализ показва, че наблюдаваните от нас промени в експресията на ооцит-специфичните фактори BMP15 и GDF9 в ооцити и кумулсни клетки могат да рефлектират върху протичането на редица важни процеси в репродуктивната система (развитието на ембриона, стероидогенеза, и др.), като в същото време генерират и отговори на външни стимули (в това число към хранителни вещества).

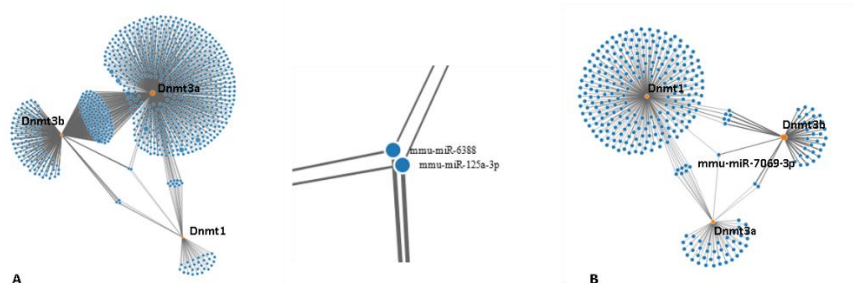
4.5.2. Прогнозиране на генно-регулаторната мрежа на мРНК транскрипти на ДНК-метилтрансферази

Сходен биоинформатичен подход беше приложен за прогнозиране и анализиране на генно-регулаторната мрежа за транскриптите Dnmt1, Dnmt3a и Dnmt3b, на основа бази данни за миши гени (фиг. 24).



Фигура 24. Транскрипционни фактори на ДНК-метилтрансферази 1, 3a и 3b (избрани са 15 от всички библиотеки на ChEA3 на основа интегративен анализ).

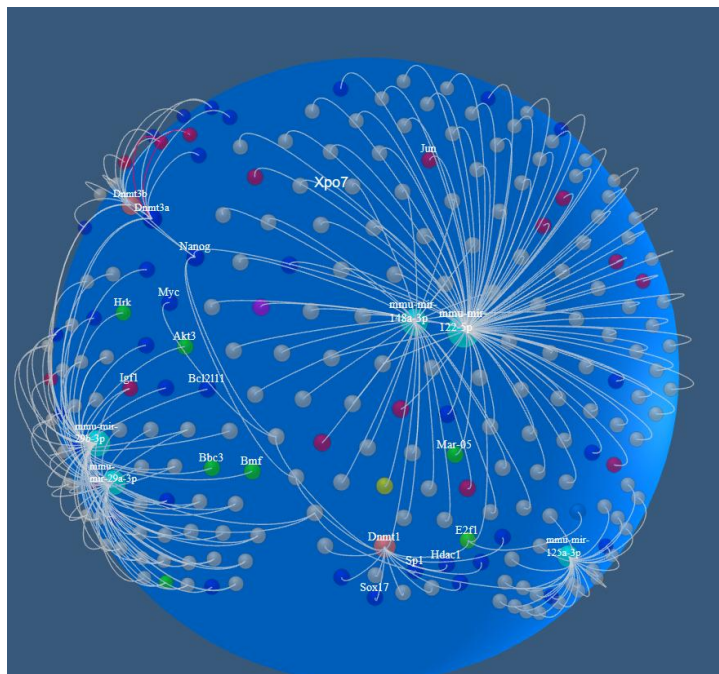
Търсенето на регулиращи микроРНК-и за транскриптите на ДНК-метилтрансферази показва, че по-голямо количество се прогнозира за 3'-я не кодиращ край. Две от общите миРНК могат да регулират и трите транскрипта в 3'-я и една в 5' не кодиращ край (Фиг. 25).



Фигура 25. Прогнозирани микроРНК за 3' (A): и 5'(B) не кодиращи региони на транскриптите на ДНК-метилтрансферази.

Интересно е да се отбележи, че транскриптите Dnmt3a, Dnmt3b в 3'-я не кодиращ край се регулират от множество общи миРНК-и (фиг.25,A). Двата гена имат също така и множество общи транскрипционни фактори. Тези данни са в подкрепа на получените от нас експериментални резултати за достоверна положителна корелация между експресията на Dnmt3a и Dnmt3b в овулирани ооцити ($R=0.98$, $p<0.001$) и първични миши ембрионални фибробласти ($R=0.99$, $p=0.041$).

Данните за траскрипционни фактори и миРНКи, прогнозирани като регулатори на транскриптите на ДНК-метилтрансферази, бяха въведени в OmicsNet за визуализиране генно-регулаторната мрежа на тези гени (фиг. 26).



Фигура 1. Схема на генно-регулаторната мрежа на ДНК-метилтрансферазни гени в овариите. С различни цветове на възлите са означени биологичните процеси обогатени с тези гени. Сини: развитие на ембриона; зелени: формиране на митохондрия; червени: репродуктивен процес(за първична е приета мрежа "микроРНК-гени").

Прогнозираната мрежа съдържа 232 генетични елементи с 270 връзки между тях в 15 биологични процеса и сигнални пътища. Приоритет в анализа на тази мрежа бе разкриване на гените, обогатяващи биологичните процеси и сигналните пътища, свързани с репродукцията(табл.16).

Таблица 16. Биологични процеси и сигнални пътища обогатени/модулирани с гени от прогнозираната генно-регулаторна мрежа на Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b.

№	Биологичен процес/ сигнален път	Брой гени от прогнозираната мрежата/общ брой гени в процес или сигнален път	P - стойност
1	Прогестерон опосредвано съзряване на оцита (Progesterone-mediated oocyte maturation, KEGG:mmu04914)	11/85	0.0498
2	Развитие на ембриона (Embryo development, GO:0009790)	80/1296	5.12E-23
3	Репродуктивен процес (Reproductive process, GO:0022414)	29/1598	0.000735
4	Сигнален път на пролактин(Prolactin signaling pathway, KEGG:mmu04917)	8/70	0.00448
5	Отговор на органични съставки с ароматичен пръстен (Response to organic cyclic compound,GO: 0071407)	117/546	4.40E-12
6	Формиране на митохондрия (Mitochondrion)	57/502	0.000456

Особен интерес представлява фактът, че гените от анализираната мрежа са част от биологични процеси, представляващи отговор на органични съставки с ароматен пръстен и формиране на митохондрии. В представената тук експериментална работа бяха наблюдавани промени в експресията на ДНК-метилтрансферази при третиране с фитогенни добавки, съдържащи голямо количество полифеноли (вторични метаболити, чиято структура съдържа ароматен пръстен). Също така експресията на ДНК-метилтрансферази показва ясна корелация с броя копия митохондриална ДНК след третиране с фитодобавки. Биоинформатичният анализ подкрепя получените експериментални резултати.

Резултатите от биоинформатичния анализ показват достатъчно убедително, че експериментално установените промени на транскриптите и протеините на гени BMP15, GDF9 и транскриптите на Dnmts са само малка част от влиянието на биодобавки с фитогенни компоненти върху генната експресия в овариите. С тях се обогатяват биологичните процеси и сигналните пътища, управляващи поведението на репродуктивните клетки, които са изградени от десетки генни елементи, намиращи се в динамично равновесие и едновременно взаимодействащи помежду си.

5. ИЗВОДИ

Общи изводи

1. Ефектът на натурални добавки върху отделни компоненти на репродуктивния процес се определя от синергетичното и комплементарно (взаимно допълващо се) действие на биоактивните им субстанции, включително и фитогенните: вторични метаболитни съединения на растения (полифеноли, мастни киселини и др.), витамини, макро- и микроелементи.

2. Прицелните мишени на добавки със сходни фитогенни компоненти с потенциал за подобряване на репродукцията са сходни при различни видове животни. Това са (Фиг.П-1- П-4):

- метаболитните и половите хормони (на организмено и системно ниво);
- гаметогенезата и гаметите (на системно и клетъчно ниво);
- клетъчните органели митохондрии (на субклеточно ниво);
- гените на репродуктивната тъкан и гаметите, участващи в биологичните процеси и сигналните пътища, регулиращи репродуктивните процеси.

3. Биоинформатичният анализ е адекватен инструмент за достоверно прогнозиране на регулаторни елементи (транскрипционни фактори и микроРНКи) на диференциално експресирани гени след третиране с фитогенни добавки и обогатяване/моделиране с тях на биологичните процеси и сигналните пътища, регулиращи репродукцията.

Изводи за изследваните добавки с фитогенни компоненти

1. Спирулина (*A. platensis*)

– при женски животни:

- 1.1. Увеличава добива на ембриони и активността на цитохром С оксидаза в овариите след суперовулация (мишки);
- 1.2. Променя нивото на половите хормони (свине);
- 1.3. Повлиява нивото на метаболитния хормон грелин (свине);
- 1.4. Стимулира фоликулогенезата (свине и зайци);
- 1.5. Способства за формиране и узряване на митохондриалната мрежа в ооцити (свине)
- 1.6. Променя експресията на гени, кодиращи морфогенетичните фактори (GDF9, BMP15) в ооцитите и кумулусните клетки при животни от две поколения (зайкини);
- 1.7. Подобрява оцеляването на родените приплоди (зайкини).

– при мъжки животни (нерези):

- 1.8. Подобрява сперматогенезата;
- 1.9. Подобрява качеството на спермата чрез поддръжка на необходимия окислително-редукционен баланс.

2. ВемоХербТ (*T.terrestris*) (зайкини)

- 2.1. Променя експресията на гени, кодиращи морфогенетичните фактори (GDF9, BMP15) в ооцитите и кумулусните клетки при животни от две поколения;
- 2.2. Стимулира фоликулогенезата;
- 2.3. Подобрява оцеляването на родените приплоди.

3. Хомогенат от търтееви ларви (свине)

- 3.1. Променя експресията на гени, кодиращи морфогенетичните фактори (GDF9, BMP15) в ооцитите и в кумулусните клетки;
- 3.2. Активира фоликулогенезата на ранен стадий чрез въвличане в развитието на по-голям брой примордиални фоликули.

4. ПровитЕ10%Супер(мишки)

- 4.1. Подобрява суперовулаторния отговор рефлектиращ в повишен брой овулирали ооцити;
- 4.2. Увеличава броя копия митохондриална ДНК в клетките на оварии;
- 4.3. Увеличава експресията на митохондриален протеин MTND1 в овариалните клетки;
- 4.4. Променя експресията на транскриптите на гени, кодиращи ДНК-метилтрансферази, отговорни за метилиране на ДНК, в ооцити и кумулусни клетки.

5. Ауфертин (биволици)

- 5.1. Благоприятства преодоляване на следродилан анеструс;
- 5.2. Възстановява яйчниковата активност;
- 5.3. Стимулира развитие на доминантен фоликул;
- 5.4. Увеличава честотата на бременност при заплождаване до 70-ия ден след отелване.

6. Орегонин (експерименти *in vitro*)

- 6.1. Променя експресията на транскриптите на гени, кодиращи ДНК-метилтрансферазите (миши ембрионални фибробласти);
- 6.2. Повлиява върху митохондриалните функции чрез увеличаване броя копия митохондриална ДНК (миши ембрионални фибробласти);
- 6.3. Повишава и запазва митохондриалната активност в сперматозоиди, съхранявани при температура 5°C (сперматозоиди на коч).

6. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. Спирулината (*A. platensis*) в доза 3g/глава може успешно да се прилага при подрастващи ремонтни прасета след отбиване до настъпване на пубертета. Резултат от подхранването е своевременно начало на пубертета, активно протичане на фоликулогенезата и овулиране на качествени яйцеклетки.

2. Подхранването на нерези със Спирулина в доза 1.4g/глава в продължение на 40 дни преди получаване на сперма за изкуствено осеменяване ще стимулира сперматогенезата и има като резултат получаване на еякулати с по-голям обем, по-добра подвижност на сперматозоидите, и по-висок процент на запазените живи сперматозоиди, съхранявани при 15°C.

3. Фитогенната добавка Ауфертин се препоръчва за преодоляване на следродилан анеструс на биволици и успешното им заплождаване. Прилага се в доза 3 g/100 kg живо тегло двукратно индивидуално пер

ос през три последователни дни от 21-ия ден и 31-ия ден постпартум. Обезпечава до 70% заплождање в рамките на 90 дни след отелване.

4. Фитогенната добавка орегонин може да бъде препоръчана за приложение в овцевъдството като технология за съхраняване на семенна течност в охладено състояние по време на осеменителни кампании. Добавянето на орегонин към сперморазредител в количество 100µM за 200×10^6 сперматозоиди/ml увеличава митохондриалната им активност и осигурява наличието на достатъчно голям брой активно подвижни сперматозоиди при 5°C до 48 часа след получаване на спермата.

5. Добавките Спирулина (*A. platensis*) и ПровитЕ10%Супер (витамин Е+ *Cynara scolymus L.*) могат да се препоръчат за подобряване на протоколите за суперовулация при лабораторни животни с цел получаване на по-голям брой овулирани ооцити и ембриони за експериментални цели. Спирулина в доза 2 µg/g и ПровитЕ10%Супер в доза 1.5 µg/g живо тегло могат да се прилагат 30 дни преди началото на хормоналното третиране.

7. НАУЧНИ ПРИНОСИ

Приносите на тази разработка са постигнатите успехи в научен и в приложен аспект от издирване на мишени на биодобавките в репродуктивната система, които имат оригинален, потвърдителен и фундаментален характер.

Фундаментални научни приноси на дисертацията са в изясняване същността на влиянието на биодобавките върху репродуктивната система, а именно експериментално получените доказателства, че:

- ✓ Въздействието на биодобавките, съдържащи фитогенни компоненти, е върху множество нива на организма: системно (репродуктивна система), клетъчно (гамети), субклетъчно (митохондрии) и генетично.
- ✓ Особено важно от научна и практическа гледна точка е въздействието на биодобавките върху женския организъм, тъй като то не се изчерпва само с ефекта върху репродуктивната система на майката, а се реализира и върху новия организъм (ембрион) и репродуктивната му система, която се формира по време на ембрионалното развитие.
- ✓ Натуралните биодобавки, благодарение на многокомпонентния си състав, синергизма и комплементарността на въздействие на биоактивните си субстанции, са перспективно природно средство за подобряване и контрол на репродуктивното здраве и репродуктивния потенциал на животните без негативни последици.

В съответствие със спецификата на действието на биодобавките върху различни нива на организма оригиналните научни приноси са обединени в три групи.

- ✓ Експериментално е доказано, че натуралните биодобавки, съдържащи сходни фитогенни субстанции оказват сходно въздействие на **ниво репродуктивната система**, което се изразява:
 - в промяна секрецията на полови (прогестерон, естрадиол) и метаболитни (грелин) хормони;
 - в стимулиране на гаметогенезата чрез активно включване в развитието на примордиалните фоликули;
 - в увеличаване броя съзряващи гамети (ооцити и сперматозоиди);
 - в подобряване на оплодителната им способност;
 - в увеличаване количеството родени и оцелели приплоди.
- ✓ Един от механизмите на действието на натуралните биодобавки с фитогенни компоненти на **субклетъчно ниво** е промяна на митохондриалната функционалност в овариите, ооцитите, кумулусни клетки и сперматозоиди, която се изразява:
 - в увеличаване активността и експресията на митохондриалните ензими участващи в окислително фосфорилиране (mtND1, цитохром С), водещи до по-добър енергиен статут на клетките;
 - в увеличаване броя копия мтДНК;
 - в увеличаване на обща митохондриална активност в гаметите.

- ✓ Доказан е нутригеномният ефект (**ефектът на генно ниво**) на натуралните биодобавки върху репродуктивната тъкан, изразяващ се:
 - в промяна експресията на функционалните за репродукция гени (BMP15 GDF9);
 - в промяна експресията на гените, кодиращи ензими, отговорни за епигенетичната регулация (ДНК-метилтрансферази 1, 3a и 3b).
- ✓ Чрез биоинформатичен анализ са прогнозирани генно-регулаторните мрежи на диференциално експресирани гени BMP15, GDF9, Dnmt1, 3a и 3b в овариите след въздействие на биодобавки с фитогенни компоненти. Обогащаването/модулирането на биологичните процеси и сигналните пътища в репродукцията чрез включване в тях на диференциално експресирани гени и регулаторните им елементи (транскрипционни фактори и микроРНКи) задълбочават наши познания относно възможните механизми на действието на натурални биодобавки върху репродуктивната система. Гените аотирани в тези сигнални пътища са потенциални маркери за ефекта на биодобавките и представляват обширна актуална област за бъдещи изследвания.

8. ИНОВАТИВНОСТ НА ИЗСЛЕДВАНИЯ

Иновативността на изследванията се потвърждава от факта, че по темата на дисертацията са получени два патента. Потвърждава се и от това, че всички представени в дисертацията авторски публикации са рецензирани от научната общност и са публикувани в списания, реферирани в световната мрежа Scopus, а седем от тях – в списания, класирани в първия кваartil (Q1) в съответните области.

Данните за въздействието на *A.platensis* (спирулина) върху женската и мъжката репродуктивни системи, гаметогенезата, ембриогенезата, оцеляването на приплодите, промените в генната експресия в ооцитите и кумулусните клетки на мишки, зайци и свине, са получени и публикувани за първи път от нас, макар Спирулината да е добре известна хранителна добавка.

Иновативни са изследванията и на известния мъжки афродизиак *T.terrestris* върху женската репродуктивна система на зайци, доказващи ефекта на добавката върху (1) промяната на генната експресия в ооцитите и кумулусните клетки на две последователни поколения, и (2) върху по-доброто оцеляване на родените приплоди от майки, получавали добавката.

Получени са нови данни за влиянието на **хомогенат от търтееви ларви** върху фоликулогенезата и експресията на ооцит-специфичните растежни фактори GDF9 и BMP15 при подрастващи свине като резултат от подхранването им с препарата по време на половото съзряване.

Иновативни са и получените от нас изследователски резултати за действието на добавките **ПровитЕ10% Супер** и **Ауфертин** върху репродуктивните процеси при женските животни (подобни досега не са публикувани). За първи път в нашата страна приложихме успешно билковия препарат **Ауфертин** за преодоляване следродилния анеструс при биволици.

Данните за ефекта на **полифенол орегонин от кора на елша** върху клетките, свързани с репродукцията (миши първични ембрионални фибробласти и сперматозоиди на коч), изразен в промяна експресията на отговорните за епигенетичните ензими гени, броя копия митохондриална ДНК, и митохондриалната активност, са с иновативен характер, и някои от тези изследователски резултати са защитени с патент.

Патенти:

1. Krasilnikova E., Telesheva G., **Kistanova E.**, Abadjieva D., Stoyanova E., Chervenkov M., Tretjakovs P., Berkis U., Dizbite T., Lauberts M. 2018. Remedy for increasing mitochondrial DNA in mammalian cells. 20.11.2019/22.04.2022, IPC No. A61K36/00, EU Patent, **No. 15 451**, Priority date 17 Jul 2018, Priority No. P-18-67. <http://databases.lrpv.gov.lv/databases/lv/patent/details/p-18-67/>

2. Krasilnikova E., Telesheva G., **Kistanova E.**, Abadjieva D., Stoyanova E., Chervenkov M., Ivanova L., Berkis U., Dizbite T., Lauberte L., 2020. Agent for decreasing activity of methyltransferase in mammal cells. 20 -11- 2020, IPC No. A61K31/351, EU Patent, **No. 15 385**, , Priority date 04 Jun 2018, Priority No. P-18-47 <http://databases.lrpv.gov.lv/databases/lv/patent/details/p-18-47/>

9. ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

1. Mladenova V., Abadjieva D., **Kistanova E.** Histological study of the ovaries from the superovulated mouse supplemented by bioactive feed additive. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 19, 2, 2016, 23-36 **CABI-WoS**
2. Abadjieva D., **E. Kistanova**. Tribulus terrestris Alters the Expression of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Rabbit Ovaries of Mothers and F1 Female Offspring. 11 (2), PLoS ONE, 2016, ISSN:19326203, DOI:e0150400. doi:10.1371/journal.pone.0150400, ISI **IF:3.3 Q1**
3. Mladenova B, Abadjieva D., Shumkis A., Shimkine A, **Kistanova E.** Changes in the expression of the aromatase and superovulatory response in mice treated with the feed additive ProvitE10%Super. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 23/2017, 2, ISSN:1310-0351, 304-309. **SJR-0.154**
4. Abadjieva D, Nedeva R., Marchev Y., Jordanova G., Chervenkov M., Dineva J., Shumkis A., Shimkine A., Teerds K., **Kistanova E.** Arthrospira (Spirulina) platensis supplementation affects folliculogenesis, progesterone and ghrelin levels in fattening pre-pubertal gilts. Journal of Applied Phycology, 29, Springer, 2017, ISSN:0921-8971, DOI:<https://doi.org/10.1007/s10811-017-1263-7>, 1-8. ISI **IF:2.616 , Q1**
5. Mladenova V., D. Abadjieva; **E. Kistanova**. Effect of the vitamin E enriched feed additive and superovulation on the parameters of the reproductive tract in mice. Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (2),89 -99. **CABI-WoS**.
6. Krasilnikova, J., Lauberte, L., Stoyanova, E., Abadjieva D, Chervenkov M., Mori M., De Paolis E., Mladenova M., Telesheva G., Botta, B., **Kistanova, E.** Oregonin from Alnus incana bark affects DNA methyltransferases expression and mitochondrial DNA copies in mouse embryonic fibroblasts . Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2018, 33:1, 1055-1063, DOI: 10.1080/14756366.2018.1476504. **IF:3,638, SJR-1,04 Q1**
7. Abadjieva, D., Shimkus, A., Shimkiene, A., Rashev, P., **Kistanova, E.** Transgenerational beneficial effect of Arthrospira (Spirulina) platensis on the rabbit ovaries. Journal of Applied Phycology, 2018, 30(3):1691-1700. **IF:2,616., SJR- 0,784, Q1**
8. Здравьева Е.В., Боряев Г.И., Носов А.В., Катаев О.Г., Мелоян Г.М., Землянова Ю.В., **Кистанова Е.К.** Гормональный статус и продуктивные качества молодняка свиней при включении в рацион кормления гомогената трутневого расплода. Аграрный научный журнал. 2018. № 2. С.3-7. ISSN-2313-8432, 10.28983/asj.v0i2.366, <https://elibrary.ru/item.asp?id=32521247> **WoSc**.
9. **Kistanova E.**, E. Zdroveva, M. Nevitov, A. Nosov, M. Vysokikh, I. Sukhanova, P. Vishnyakova, D. Abadjieva, D. Ankova, P. Rashev, G. Boryaev. Drone brood feed supplement impacts on the folliculogenesis in growing gilts. Veterinarski arhiv, 2020, 90 (6), 583-592. DOI: 10.24099/vet.arhiv.0886 ISSN 0372-5480, **IF 0.492 Q3, SJR 0.24**
10. Abadjieva D., S.Yotov , V. Mladenova, L. Lauberte, , I. Kalvanov, J. Krasilnikova, G. Telesheva, **E. Kistanova**. Positive effect of natural antioxidant oregonin from Alnus incana bark on ram semen quality stored at 5 °C for 48 h. Research in veterinary science, 2020, 131, 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.021> **Q1, SJR 0.64, IF-1.892**
11. Ilieva Y, Vasilev N, Fasulkov I, Penchev P, Abadjieva D, Mladenova V, Ilyazova A, Mihaylova D, Yotov S, **Kistanova E.** Resumption of Cyclic Ovarian Activity by Herbal Preparation AyuFertin in Bulgarian Murrah Buffaloes at Early Postpartum. *Animals*. 2021; 11(2):420. <https://doi.org/10.3390/ani11020420> **SJR 0.6; Q1; IF 2.752.**
12. Monfoulet LE, Ruskovska T, Ajdzanovic V, Havlik J, Vauzour D, Bayram B, Krga I, Fabiola CJK, **Kistanova E**, Abadjieva D, Massaro M, Scodetti E, Deligiannidou E, Kontogiorgis C, Arola-Arnal A, van Schothorst EM, Morand C, Milenkovic D. Molecular Determinants of the Cardiometabolic Improvements of Dietary Flavanols Identified by an Integrative Analysis of Nutrigenomic Data From a Systematic Review of Animal Studies. *Mol Nutr Food Res*. 2021 May 28:e2100227. doi: 10.1002/mnfr.202100227. PMID: 34048642. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100227> **IF 5.914, Q1**

10. ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ НА НУЧНИ ФОРУМИ (от система Sonix на БАН)

- **Звено:** (ИБИР) Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов”
- **Секция:** (ИБИР) Имуноневроендокринология
- **Име:** (ИБИР/0019) Кистанова, Елена
- **Обхват на форума:** Международен
- **Година:** 2015 ÷ 2022

№	Период на провеждане	Място на провеждане	Име на форума	Автори и наименование на доклада
1	15.10.2015 - 16.10.2015	Балотещи, Румъния	Dairy livestock production in Eastern Europe	1. Kistanova, E. Biological active substances as an ecological tool for improving the reproductive parameters in dairy animals (доклад по покана)
2	03.03.2016 - 03.03.2016	Moscow, Russia	The Future of Agriculture: Grand Challenges and Technological Change	2. Kistanova, E. Biotechnology improvement and international collaboration to foster the development of Bulgaria’s livestock breeding (доклад по покана)
3	18.05.2016 - 19.05.2016	Velingrad, Bulgaria	Cross-species Epigenetics, Gametogenesis and Embryogenesis	3. Abadjieva D., Chervenkov M., Mladenova V., Kistanova E.. Effect of <i>Spirulina platensis</i> supplementation on the expression of the oocyte-specific genes in rabbits (Доклад) 4. Stoyanova E, Ivanova T, Kistanova E, Alexandrova A, Chervenkov M. Effect of <i>Melissa officinalis</i> L. extract on the methylation state in mouse embryonic fibroblast cells (Постер)
4	11.10.2017 - 13.10.2017	Belgrade, Serbia	11th International Symposium “Modern Trends in Livestock Production”	5. Elena Kistanova, D.Abadjieva, V. Mladenova. Interindividual variability in response to bioactive compounds from <i>Tribulus terrestris</i> and <i>Arthrospira platensis</i> in animals (Пленарен доклад)
5	20.06.2019 - 23.06.2019	Constanța, Romania	11th National Congress with international participation of the Romanian Society of Cell Biology. The 37th Annual scientific session of the Romanian Society of Cell	6. E. Kistanova, Yotov S., Ivanova M., D. Abadjieva, Krasilnikova J., G. Telesheva, V. Mladenova, L. Lauberte, P. Taushanova. Storage of liquid semen: perspective of using the plant bioactives (Пленарен доклад)

			Biology	
6	06.10.2015 - 07.10.2015	Hersonissos, Crete, Greece	EPICONCEPT Conference 2015	7. Abadjieva, D, Kistanova, E. Transgenerational effect of Tribulus terrestris feed additive on follicle development in rabbit's ovaries (Почреп)
7	13.09.2016 - 15.09.2016	Norwich, England	1st International Conference Food Bioactive and Health	8. Abadjieva D., Mladenova V., Kistanova E.. Sex dependent effect of Spirulina platensis on the blood parameters of rabbits (Почреп) -
8	26.09.2016 - 29.09.2016	Giardini Naxos, Italy	Epigenetics and Periconception Environment	9. Abadjieva D., Kistanova E.. Changes of the BMP15 expression in rabbit' ovaries, provoked by supplementing does with Spirulina platensis, inherit in F1 offspring (Почреп)
9	25.06.2017 - 29.06.2017	Sofia, Bulgaria	Natural Bio-antioxidants-as a base for new synthetic drugs and food additives/supplements	10. M. Chervenkov, T. Ivanova, E. Stoyanova, A. Alexandrova , E. Tzvetanova, L. Tancheva, A. Georgieva, E. Kistanova. On the level of induced lipid peroxidation in mouse liver. (Почреп)
10	05.07.2017 - 08.07.2017	Minsk, Belarus	The 3rdInternational Symposium on EuroAsian Biodiversity	11. Gennady Boryayev, Elena Kistanova , Yelena Zdorovyeva, Alexey Nosov, Oleg Katayev. Influence of Homogenate of Drone Brood on Biochemical Parameters of Blood and Productivity of Growing Pigs (Почреп)
11	12.09.2017 - 13.09.2017	Albena, Bulgaria	Technology Platforms for 3D Cell Culture	12. Desislava Abadjieva, Elena Stoyanova, Michail Chervenkov, Vanya Mladenova, Liga Lauberte, Galina Telysheva, Jelena Krasilnikova, Kistanova Elena. Study on natural modulators of DNA methylation from Alnus incana (L.) in NIH/3T3 cells: dose and purity dependent effect (Почреп)
12	20.09.2017 - 21.09.2017	Thessaloniki, Greece	3rd Scientific Workshop. POSITIVE/Cost/Action Omics breakthroughs in the health effects of plant food bioactive	13. D. Abadjieva, E. Stoyanova, M. Chervenkov, V. Mladenova, L. Lauberte, G. Telysheva, J. Krasilnikova, E. Kistanova. Comparison of the polyphenol oregonin effect on DNA methyltransferases expression in NIN/3T3 and MEF (Почреп)
13	18.10.2017 - 21.10.2017	Bansko, Bulgaria	3rd International Conference on Natural Products Utilization:	14. J. Krasilnikova, L. Lauberte, E. Stoyanova, D. Abadjieva, M Chervenkov, V Mladenova, G. Telysheva, E. Kistanova.

			from Plants to Pharmacy Shelf	Oregonin alters expression of DNA methyltransferases mRNA transcripts in mouse embryonic fibroblasts (Постер)
14	15.06.2018 - 17.06.2018	Варна, България	15th International Symposium for Immunology of Reproduction	15. Ваня Младенова, Десислава Абаджиева, Елена Кистанова . Mitochondrial DNA copy number and expression of the mitochondrial encoded NADH dehydrogenase 1 (MT-ND1) in the ovary of superovulated mice (Постер) -
15	19.09.2019 - 22.09.2019	St Petersburg, Russia	European Society for Domestic Animal Reproduction	16. D. Abadjieva, Sv. Grigorova, V. Mladenova, D. Ankova, E. Kistanova . Expression of the osteopontin (SPP1) and calbindin (CALB1) mRNAs in the egg shell gland of layers supplemented by Cynara Scolimus L. (Постер) 17. Kistanova, E. , Iotov, St., Ivanova, M., Krasilnikova, J., Telesheva, G., Lauberte, L., Abadjieva, D., Mladenova, V, Gradinarska, D.. Testing of natural antioxidant oregonin on ram semen quality (Постер) 18. Ivanova M., N. Vasilev, Krasilnikova J., G. Telesheva, L. Lauberte, D. Abadjieva, P. Taushanova, V. Mladenova, T. Tsvetkov, E. Kistanova . Effect of oregonin from Alnus incana back on the motility and enzyme activity of cooled ram semen (Постер)

11. ЦИТИРАНИЯ НА ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Abadjieva D., **E. Kistanova**. Tribulus terrestris Alters the Expression of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Rabbit Ovaries of Mothers and F1 Female Offspring. 11 (2), PLoS ONE, 2016, ISSN:19326203, DOI:e0150400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150400>.

Цитира се в:

1. Caixia Sun, Shuyu Xie, Tao Huang, Wei Zhang, Ansi Wang, Dan Wang, Ming Li, Guirong Sun. Molecular characterization and expression of the GDF9 gene in New Zealand white rabbits. *Journal of Genetics*, June 2017, Volume 96, Issue 2, pp 313–318. <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jgen/096/02/0313-0318> **Scopus**
2. Pokrywka A, Morawin B, Krzywański J, Zembruń-Lacny A. An Overview on Tribulus terrestris in Sports Nutrition and Energy Regulation. In book *Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity*, 2017, chapter 9, p.155-165, Publisher "Academic Press" <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805413-0.00009-0> <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128054130000090> **Scopus**
3. Naseri L., M Akbari bazm, M Khazaei, A Review on Therapeutic Effects of Tribulus terrestris. *J. Med. Plants*, 11- 2019, 4(72): 1-22, http://jmp.ir/browse.php?a_id=2700&sid=1&slc_lang=en **Scopus**

4. Sirotkin, Alexander V., Alexa Richard, Abdel Halim Harrathc. "Puncturevine (*Tribulus terrestris* L.) affects the proliferation, apoptosis, and ghrelin response of ovarian cells". *Reproductive Biology*, January 2020, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1642431X19303638> **Scopus**
5. Ali Ghanbari, Nasim Akhshi, Seyed Ershad Nedaei, Adriano Mollica, Ina Yosifova Aneva, Yaping Qi, Pan Liao, Sara Darakhshan, Mohammad Hosein Farzaei, Jianbo Xiao, Javier Echeverria. *Tribulus terrestris and female reproductive system health: A comprehensive review*. *Phytomedicine*, 2021, 153462, ISSN 0944-7113. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153462> **Scopus**

2.Krasilnikova E., Lauberte E., Stoyanova E., Abadjieva D., Chervenkov M., Mori M., de Paolis E., Mladenova V.,Telusheva G., Botta B., **Kistanova E.** Oregonin from *Alnus incana* bark affects DNA methyltransferases expression and mitochondrial DNA copies in mouse embryonic fibroblasts. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33, 1, Taylor&Francis online, 2018, ISSN:1475-6366, DOI: <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1476504> , 1055-1063.

Цитира се:

1. Kyo Bin Kang, Sunmin Woo, Madeleine Ernstb, Justin J.J.van der Hooft, Louis-Félix Nothias, Ricardo R.da Silva, Pieter C.Dorrestein, Sang HyunSung, Mina Lee, 2020. Assessing specialized metabolite diversity of *Alnus* species by a digitized LC–MS/MS data analysis workflow. *Phytochemistry*, Vol. 173, May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112292> , **Scopus**
2. YANG Xiao-min WANG Jun-juan WANG De-Long LU Xu-ke CHEN Xiu-gui GUO Li-xue WANG Shuai CHEN Chao WANG Xiao-ge HAN Ming-ge YE Wu-wei. Functional Verification and Bioinformatics Analysis of Cotton GhDMT3 Gene. *Biotechnology Bulletin*,2019,Vol.35,No.1,11-16. ISSN 1002-5464 – **не е реферирано в Scopus&WoS**
http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-SWJT201901004.htm
3. Ebrahim Samodien, Carmen Pfeiffer, Melisse Erasmus, Lawrence Mabasa, Johan Louw, Rabia Johnson. 2019. Diet induced DNA methylation within the hypothalamic arcuate nucleus and dysregulated leptin and insulin signaling in the pathophysiology of obesity. *Food Sci Nutr*. 2019;00:1–15. DOI: 10.1002/fsn3.1169. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.1169> **Scopus**

3.Abadjieva D., Yotov S., Mladenova V., Lauberte L., Kalvanov I., Krasilnikova J., Telesheva G, **Kistanova E..** Positive effect of natural antioxidant oregonin from *Alnus incana* bark on ram semen quality stored at 5 °C for 48 h. *Research in Veterinary Science*, 131, ELSEVIER, 2020, ISSN:0034-5288, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.021> , 153-158. SJR (Scopus):0.64, JCR-IF (Web of Science):1.892

Цитира се:

1. IM Saadeldin, WA Khalil, MG Alharbi, SH Lee . *The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation*. *Animals*, 2020, 10(12), 2281. <https://doi.org/10.3390/ani10122281> **Scopus**
2. Bashawat M., B.Hensel, K.Müller, M.Schulze. *Cooled storage of semen from livestock animals (Part II): Camelids, goats, and sheep*. *Animal Reproduction Science*, Vol. 234, 2021, 106855 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106855> , **Scopus**
3. Kameni, S. , Meutchieye, F. and Ngoula, F. (2021) *Liquid Storage of Ram Semen: Associated Damages and Improvement*. *Open Journal of Animal Sciences*, 11, 473-500, 2021. doi: 10.4236/ojas.2021.113033- **не е реферирано в Scopus&WoS**

4.Abadjieva D., R. Nedeva, Marchev Y., Jordanova G., Chervenkov M., Dineva J., Shumkis A, Shimkine A., Teerds K., **Kistanova E.** *Arthrospira (Spirulina) platensis* supplementation affects folliculogenesis, progesterone and ghrelin levels in fattening pre-pubertal gilts. *Journal of Applied Phycology*, 30, 1, Springer, 2018, ISSN:0921-8971, DOI:<https://doi.org/10.1007/s10811-017-1263-7>, 445-452. SJR:0.784, ISI IF:2.616

1. Izabela Michalaka, Małgorzata Mironiuka Katarzyna Godlewska Justyna Tryndac Krzysztof Maryczcd, 2019. *Arthrospira (Spirulina) platensis: An effective biosorbent for nutrients. Process Biochemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.004> , **Scopus**
2. El-Ratel, I.T., Gabr, A.A.-W. Effect of spirulina and vitamin E on reproduction and in vitro embryo production in heat-stressed rabbits. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2019, 22(11), pp. 545-553. DOI: [10.3923/pjbs.2019.545.553](https://doi.org/10.3923/pjbs.2019.545.553) **Scopus**
3. Hendarto, H., Widyanugraha, M.Y.A., Widjiati, Darmosoekarto, S. Curcumin improves the regulation of ovarian folliculogenesis in culture media with peritoneal fluid from infertile women with endometriosis. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 2020, 14(2), pp. 1603-1608 <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v14i2.3154> **Scopus**

5.Kistanova E., Zdoroveva E., Nevitov M., Nosov D., Vysokik M., Sukhanova I., Vishnyakova P., Abadjieva D., Ankova D., Rashev P., Boryaev G. Drone brood fed supplement impacts on the folliculogenesis in growing gilts. *Veterinarski arhiv*, 90, 6, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, 2020, ISSN:1331-8055, DOI:DOI: 10.1093/emboj/cdg405, 583-592. SJR (Scopus):0.242, JCR-IF (Web of Science):0.492

Ļumupa ce s:

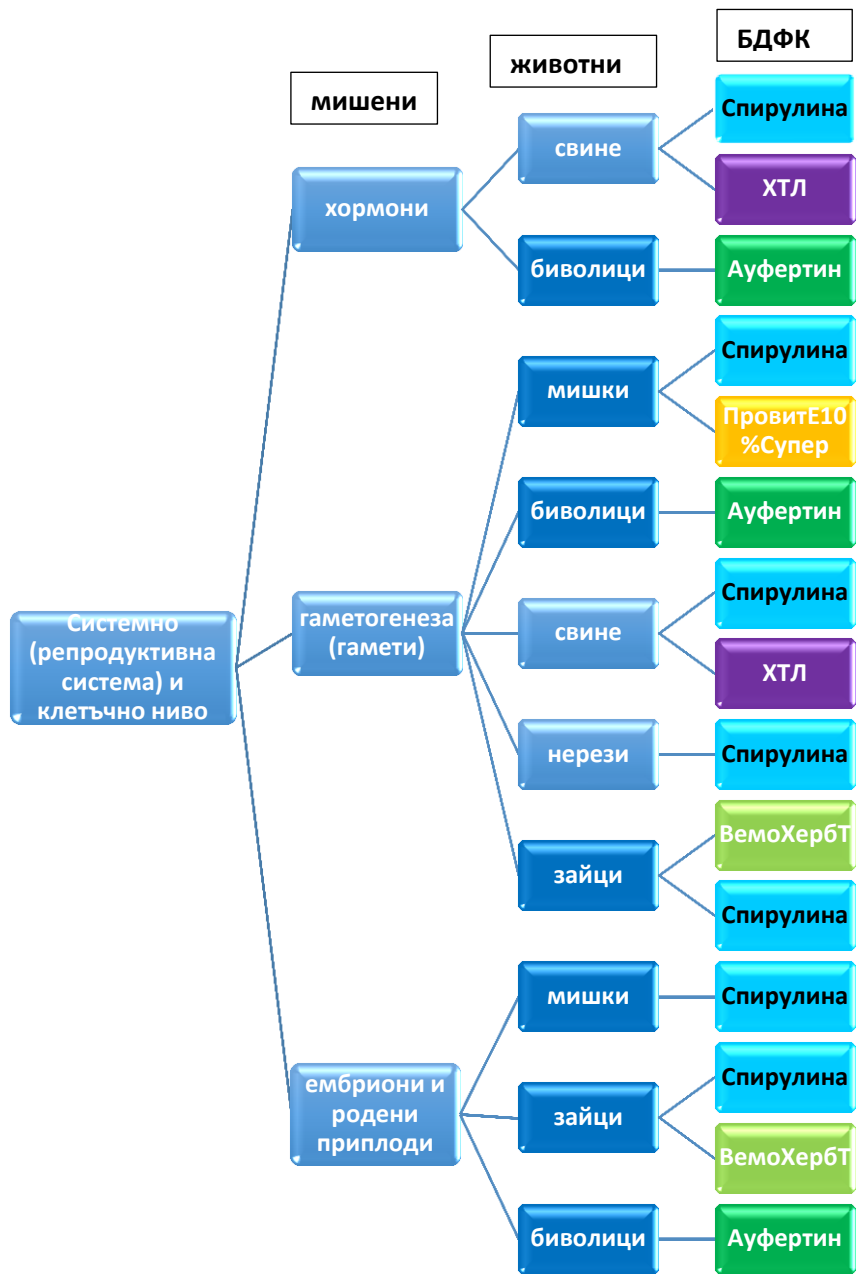
1. Sidor, E.; Milek, M.; Tomczyk, M.; Dżugan, M. Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Drone Brood Homogenate Regarding the Stage of Larval Development. *Antioxidants* 2021, 10, 639. <https://doi.org/10.3390/antiox10050639> , **Scopus**
2. Daryin A I , Kerdyashov N N, Busov A A and Zykina E A. "Influence of technological factors on the reproductive performance of sows in an industrial breeder". *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 953 (2022) 012015. doi:10.1088/1755-1315/953/1/012015, **Scopus**
3. Mitrofanov D., Budnikova N. (2022) "Drone Brood: Food and Apitherapeutic Agent." In: Muratov A., Ignateva S. (eds) *Fundamental and Applied Scientific Research in the Development of Agriculture in the Far East (AFE-2021)*. AFE 2021. *Lecture Notes in Networks and Systems*, vol 354, pp 142-151. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-91405-9_16 , **Scopus**
4. Rutka Iveta, Galoburda Ruta, Galins Janis, Galin Ainarsa "bee drone brood homogenate chemical composition, stabilization and application: a review". *Research for rural development*, 2021, VOL. 36, p. 96-103. SJR:0.21 DOI: https://www2.llu.lv/research_conf/proceedings2021/docs/LatviaResRuralDev_27th_2021-96-103.pdf **Scopus**

6. Monfoulet L-M., Ruskovska T., Ajdžanović V., Havlik J, Vauzour V., Bayram B., Krga I., **Kistanova E.**, Abadjieva D., Massaro M., Scoditti E., Deligi E., Kontogiorgis C., Arola-Arna A.I., van Schothorst E.M., Morand C., Dragan M., Karla C-J. Molecular Determinants of the Cardiometabolic Improvements of Dietary Flavanols Identified by an Integrative Analysis of Nutrigenomic Data from a Systematic Review of Animal Studies. *Molecular Nutrition and Food Research*, 64, 14, Wiley Online Journal, 2021, ISSN:1613-4133, DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100227>, SJR (Scopus):1.5, JCR-IF (Web of Science):5.914

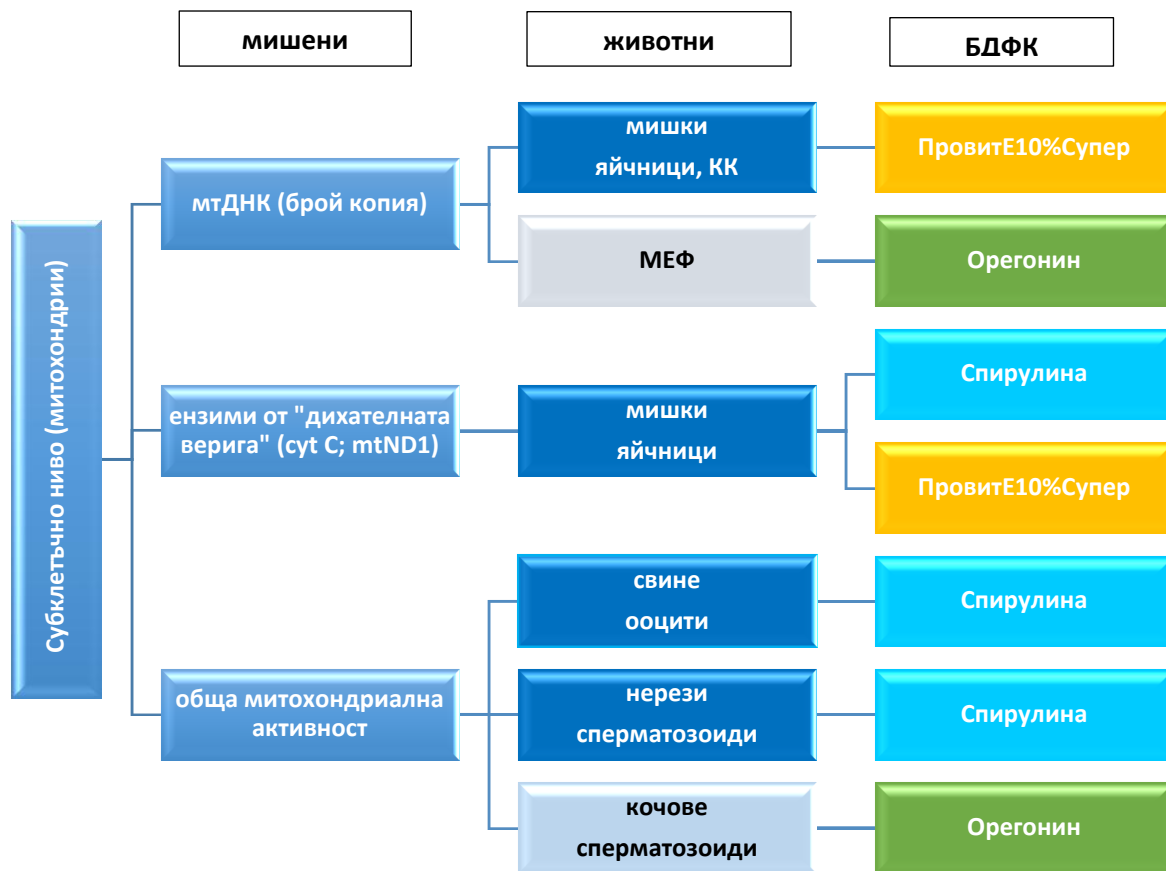
Ļumupa ce s:

1. Carlos E. Iglesias-Aguirre, a Adrián Cortés-Martín, a María Á. Ávila-Gálvez, b, c Juan A. Giménez-Bastida, a María V. Selma, a Antonio González-Sarriás a and Juan Carlos Espín. "Main drivers of (poly)phenol effects on human health: metabolite production and/or gut microbiota-associated metabolites?" *Food & Function*, DOI: <https://doi.org/10.1039/D1FO02033A>, **Scopus**
2. Hanghang Lou, Lifei Hu, Hongyun Lu, Tianyu Wei, Qihe Chen. "Metabolic Engineering of Microbial Cell Factories for Biosynthesis of Flavonoids: A Review". *Molecules* 2021, 26(15), 4522; <https://doi.org/10.3390/molecules26154522> , **Scopus**

Фиг. П-1. Прицелни мишени на БДФК на ниво репродуктивната система



Фиг. П-2. Прицелни мишени на БДФК на субклетъчно ниво



Фиг. П-3. Прицелни мишени на БДФК на генетично ниво

