

## ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ

### ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ – СТ. ЗАГОРА

#### РЕЦЕНЗИЯ

От: проф. д-р Запрянка Николаева Шиндарска, ФВМ, ЛТУ- София, пенсионер

**Научна специалност:** Хранене на селскостопанските животни и технология на фуражите

**Професионално направление:** 6.3 Животновъдство

**Относно:** Дисертационен труд за присъждане на научна степен „доктор на науките“ по **Научна специалност** “Акушерство и гинекология на животните и болести на новородените животни“, **Професионално направление** 6.4. Ветеринарна медицина, **Област на висше образование** 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина във ВМФ на Тр.У- Ст. Загора.

**Автор на дисертационния труд:** Елена Кузминична Кистанова

**Тема на дисертационния труд:** Прицелни мишени на биоактивни добавки с фитогенни компоненти в репродуктивната система

**Основание за представяне на рецензия:** Участие в състава на научното жури по защита на дисертационния труд, съгласно Заповед 1850/ 15.06.2022 на Ректора на ТрУ- Ст. Загора.

#### 1. Оценка на представените материали по процедурата

За изготвяне на рецензията бяха представени всички изисквани документи описани в Правилника за развитие на академичния състав в Тракийски Университет ( съгл. Чл.58.ал.2). Пакета документи включва: Заявление до Декана за допускане до публична защита, Декларация за достоверност на представените материали, Информационна карта за защитен дисертационен труд ( на бълг. и англ. ), Творческа автобиография, Дипломи за завършено: Висше образование ОКС“ Магистър“ и ОНС „ Доктор“ ( нотариално заверени), Дисертация за присъждане на научна степен „ Доктор на науките“, Автореферат на дисертационния труд ( с резюме на български и английски), Списък и копие на научните публикации във връзка с дисертацията, Списък и копия на цитирания на публикации във връзка с дисертацията, Справка на научните приноси на дисертацията, Протокол от заседанието на разширения съвет на катедрата с предложение на членове на научното жури.

#### 2. Биографични данни за автора на дисертационния труд

Дисертантката доц. Кистанова е родена на 19.06.1958г в Русия. Завършва средното си образование в Общобразователна гимназия №1 в гр .Николск - Русия. В периода 1975-1980 следва в Пензенски държавен педагогически институт в гр .Пенза специалност - биология и химия. В периода 1982-1985г се обучава в докторска програма в научно-изследователски институт по физиология на деца и юноши при академия на педагогическите науки на СССР - Москва по специалностите – Анатомия на човека и Физиология на човека и животните. Защищава успешно дисертация на тема: „Морфофункциональное становление

микроремоциркуляторна системы брыжейки белой крысы в процессе полового созревания . След успешната защита (1985 ) до 1988г работи ката ст.преподавател в к-ра Анатомия и физиология на животните. От 1989 до 2006 работи в ИЖН – Костинброд в отдел „Репродукция“ като н.с. Іст ( гл.ас), след което преминава в Института по Биология и имунология на размножаването към БАН, където е и до настоящия момент. През 2009г. става доцент по научната специалност „Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването. От 2011 до 2014 година е зам. директор на Института по биология и имунология на размножаването към БАН. Майчин език е руски, като владее отлично български, много добре – английски и добре немски език. Притежава добри организаторски умения свързани с координиране и управление на проекти. Провела е множество специализации в различни държави по света, като по-важните от тях свързани с тематиката на настоящия дисертационен труд са: Пензенска държавна селскостопанска академия- Русия, Чешка Академия на науките, Китайска академия на науките - Пекин, Ветеринарен факултет на Университета в Милано- Италия, Вагенингенски университет – Холандия. Има над 110 публикации и над 200 цитирания и участие в проекти с международно финансиране (6 броя), проекти към МОН (13 броя) и проекти по линия на БАН (3броя). Член е на редколегии на множество списания.

### **3. Обща характеристика на представения дисертационен труд**

#### **Структура и обем**

Дисертационния труд е структуриран съгласно изискванията на ЗРАСРБ и правилника на Тракийски Университет. Написан е на 223 страници. Включва следните раздели: Увод-3стр, Литературен преглед – 30 стр., Цел и задачи- 2стр., Материал и метод -20стр., Резултати и дискусия – 75 стр., Насоки и перспективи – 3стр., Изводи – 3стр., Препоръки за практиката – 1 стр., Научни приноси – 8стр., Списък на публикациите и проектите във връзка с дисертацията – 3стр., Литература - 14 стр. и Приложения – 30 стр. В структурно отношение е добре балансиран по отношение на обем в отделните раздели, като най-голям е раздела „Резултати и обсъждане“.

Дисертацията съдържа 46 фигури и 30 таблици. В литературния списък са включени общо 447 публикации, като само 5 от тях са на кирилица, а останалите на латиница. Прави впечатление, че повечето от използваните източници са от последните 5-10 години, което говори за иновативност на проблема залегнал в дисертацията.

#### **Актуалност**

Дисертацията представлява комплексен, целенасочен и актуален по проблематика труд. През последните години все повече нараства групата препарати, известни като „ботанически“, билкови“ или „природни“, които намират приложение както в хуманната , така и във ветеринарната медицина. Действието на тези препарати е разностранно при животните: спиране развитието на патогенни бактерии, подпомагане храносмилането, вкл. активиране на ендогенните ензими чрез подобряване резорбцията, антиоксидантно действие и намаляване на авто-оксидативния стрес, стимулиране или модулиране имунната реактивност, увеличаване поносимостта към токсини и подобряване дейността на черния дроб. Темата е актуална не само за ветеринарната медицина, но и за хуманната медицина. Търсенето на естествени стимулатори, които да активират фоликулогенезата, да повишат суперовулаторния отговор и да подобрят качеството на гаметите е основен приоритет на изследователите в днешно време. Използването на безопасни средства за стимулация на яйчниковата функция ще намали негативния ефект върху развитието на ембрионите и имплантацията им и ще увеличи възможността за заплъждане , нормално протичане на бременността и раждане на здраво потомство. В настоящия дисертационен труд се третираат въпроси свързани с механизма на стимулиране на биологично активни вещества, оказващи в минимални количества значително положително влияние върху продуктивността и репродукцията на животните. Ограниченията за използване на хормони и

антибиотици (от 2007г) стимулира изследователите в търсене и разработване на нови, безопасни за здравето биологично активни добавки, като приоритетно са тези от растителен произход, с положително въздействие върху репродукцията. Актуалността на дисертационния труд е свързана с получените резултати, които позволяват използването на подходящи технологии в практиката за оптимизиране на овулацията и повишаване на репродуктивния потенциал на селскостопанските животни, както и възможност за съхраняване на сперма в охладено състояние.

### **Увод и Литературен преглед**

**Уводът** на дисертацията е целенасочен и обосновава необходимостта от този тип изследвания, както и големите възможности на билковите добавки, по отношение на репродукцията при селскостопанските животни.

**Литературния преглед** включва богата информация по проблематиката на дисертационния труд. Структуриран е в няколко основни насоки: Чрез използване на множество литературни източника (повечето от последните 10 години) дисертантката изтъква актуалността на проблема и необходимостта от търсене на алтернативни източници на растежните хормони и антибиотичните стимулатори изтъквайки малкия брой и частични проучвания на ефекта на нови растежни стимулатори върху репродукцията на животните. Подробно са описани природните биоактивни добавки, както и тяхното действие върху селскостопанските животни, Направен е и сравнителен анализ на изследваните добавки и ефекта при различните животни, Анализирани са също и биоактивните субстанции на натуралните добавки и тяхното влияние върху репродукцията.

Авторката е събрала и анализирала съвременна литература (от последните 10год), като е обърнала внимание на най-новите изследвания през последните 2-3 години. Това ми дава основание да потвърдя добрата литературна осведоменост на дисертантката, което поставя и добра основа на изследванията в дисертацията.

### **Цел и Задачи**

**Целта** е формулирана правилно и напълно съответства на темата на дисертацията. Задачите са коректно поставени и осигуряват изпълнението на целта, която се базира на изследователска хипотеза включваща твърденията: че, натуралните биодобавки чрез биоактивните им компоненти на системно ниво могат да влияят върху протичане на отделните процеси в репродуктивната система – стероидогенеза, гаметогенеза, ембриогенеза; наличието в натуралните добавки на значителни количества фитогенни компоненти с изразени антиоксидантни свойства е основание да се приеме, че митохондриите на клетките в репродуктивните органи са мишени на субклетъчно ниво; влияние на фитогенните компоненти върху генната експресия.

**Задачи.** За аргументация на хипотезата са поставени пет задачи включващи: сравнителен анализ на фитогенни компоненти в изследваните биоактивни добавки, проследяване ефекта върху важни репродуктивни параметри, оценка на състоянието на митохондриите в репродуктивната тъкан, анализ на нитрогенния ефект, биоинформатичен анализ на гени с възможност за модулиране на биологичните процеси и сигнални пътища, свързани с репродукцията.

### **Материал и методи на изследване**

Използван е методологичен подход, който включва сравнителни и обобщаващи анализи от научно –приложни експерименти със животни и лабораторни изследвания на репродуктивните органи и тъкани след въздействие на натурални биоактивни добавки. В дисертационния труд са включени широк набор от изследователски методи, които са

съвременни ( протоколи) и се отнасят за супер овулация, оценка на яйчниците, биохимични изследвания на кръвни проби, както и нивата на хормони в кръвния серум, генно- експресионен анализ на ооцити. В експериментите са използвани, както лабораторни животни ( бели мишки – експ. пост. 1,2 и 3), така и селскостопански животни – зайци( пост. 4 и5), свине ( пост.6 и 7), биволици ( пост.8), нерези ( постл9) и кочове ( пост.10).

Получените резултати са обработени статистически с програмен софтуер “ Statistica”.

#### **4. Оценка на получените научни и научно-приложни резултати**

Получените резултати от анализите и експериментите включени в дисертационния труд са представени в 23 таблици и 40 фигури. Те са изложени последователно, като са обяснени и подкрепени с цитирания от други автори. Прави добро впечатление направените кратки заключения и обобщения в края на всеки раздел. Установено е, че всички хранителни добавки съдържат полифенолни съединения ( без орегонина) и мастни киселини, витамини, микро- и макроелементи. Всички те имат антиоксидантни свойства. Обърнато е специално внимание на основните прицелни мишени на натуралните добавки със сходни фитогенни компоненти прилагани както в период на полово съзряване, така и при полово зрели мъжки и женски животни, а те са : метаболитни и полови хормони, гаметогенезата, гаметите , ембрионите и родените и оцелели приплоди. Доказателство за това е , че след метаболизиране от микробиома и навлизане на метаболитите в кръвта, става възможно достигането им до репродуктивните органи с главна цел стимулиране производството на по-голям брой качествени гамети , ембриони и здраво потомство. Установена е корелация между метаболитния хормон грелин и половите хормони при животни получавали спирулина в процеса на полово съзряване. Потвърждава се и регулиращата роля на метаболитните хормони във функциониране на репродуктивната система. В раздела се дискутират и обсъждат митохондриите като субклетъчни мишени на биоактивните фитогенни добавки, като е установена увеличената им функционалност в репродуктивните тъкани и гаметите, което на *in vivo* ниво се характеризира с увеличена активност и по-висока експресия на ензими участващи в окислителното фосфорилиране.

Разглежда се и се дискутира въпроса за нутригеномния ефект на биоактивните добавки в резултат на промяна експресията на гени в репродуктивната тъкан на ниво“ РНК транскрипти“ и на протеиново ниво. Счита се за необходимо да отбележа, че в края на раздела е направен и биоинформатичен анализ, който дава възможност за прогнозиране на транскрипционните фактори.

Получените резултати дисертантката коректно обобщава в две групи изводи:

**Общи изводи** – 3 броя . Тези изводи важат за всички натурални добавки и включват : ефекта им върху отделните компоненти на репродуктивния процес, който се определя от синергетично и комплементарно действие на биоактивните им субстанции, Всички прицелни мишени на добавките със сходни фитогенни компоненти имат потенциала за подобряване на репродукцията при различни видове животни ,Биоинформатичния анализ е адекватен инструмент за достоверно прогнозиране на регулаторните елементи на диференциално експресирани гени.

**Изводи за отделните добавки с фитогенни компоненти** : спирулина ( при мъжки и женски) – констатиран е ефект и влияние: върху половите хормони, метаболитния хормон – грелин, стимулиране на фоликулогенезата, подобряване сперматогенезата и качеството на спермата; *Вемо Херб* ( зайкини)- променя експресията на гени, активира фоликулогенезата; *Хомогенат от търтееви лаври* (свине ) – променя експресията на гени и активира фоликулогенезата ранен стадий; *провит E10% супер*( мишки ) – подобрява суперовулацията , увеличава експресията на митохондриален протеин, променя експресията на транскриптите на гени кодиращи ДНК метил трансферази; *Ауфертин* ( биволици)- възстановява яйчниковата

активност, повлиява върху митохондриалните функции, повишава и запазва митохондриалната активност в сперматозоидите; *Орегонин* (in vitro експерименти)- променя експресията на транскриптите на гени, повлиява върху митохондриалните функции, повишава и запазва митохондриална активност.

#### **5. Оценка на научните и научно-приложни приноси**

Справката за приносите е изготвена коректно, съответства на проведените изследвания и получените резултати и я приемам напълно. Приносите са разделени на : **оригинални, потвърдителни и фундаментални.**

**Оригиналните научни приноси** са разделени на три групи : *В първа група* са представени нови данни за въздействието на биодобавките с фитогенни компоненти на ниво репродуктивна система при женски мъжки животни ( 5 броя), *Във втора група* са резултатите представящи нови научни знания за ефекта на натуралните добавки върху митохондриите в репродуктивната тъкан и гамети ( 8 броя), *Трета група оригинални научни приноси* представят нутригеномния ефект на натуралните добавки върху репродуктивната система и „ ефекта на генетично ниво“.

**Фундаменталните научни** приноси са свързани с изясняване същността на влиянието на биодобавките върху репродуктивната система ( 3 броя).

**С потвърдителен характер** са два приноса.

Дисертантката е представила и два патента във връзка с дисертацията ,което говори за иновативност на изследванията.

#### **6. Препоръка за практиката**

Получените резултати и произтичащите от тях изводи , както и приносите, повечето от които с оригинален характер дават възможност да се направят препоръки за практиката ( 5 броя), които са с конкретни дози за съответния вид животно, както и продължителност на третиране.

#### **7. Оценка на публикациите свързани с дисертацията**

Във връзка с дисертацията авторката е представила 12 публикации. В повечето от тях (11 от 12) тя е отбелязана като ръководител на изследователска група, който планира, проектира и контролира изследването. Счита за необходимо да отбележа, че всички представени в дисертацията публикации са рецензирани от научната област и са публикувани в списания , реферирани в световната мрежа **Scopus**, а седем от тях – в списания класирани в първия квартал ( Q1) в съответната област.

Данните използвани в научните публикации , направените изводи, приноси и препоръки за практиката са в резултат на **изпълнение на проекти** ( 6 броя), като 4-ри от тях са финансирани от МОН и два от БАН.

От представените 12 броя публикации шест са цитирани , като повечето от тях имат над 2 цитирания. Тези данни показват способността на автора да бъде успешен ръководител на научните колективи и отразяват богатата научноизследователска дейност, свързана с развитието на дисертационния труд.

#### **8. Оценка на автореферата**

Представеният автореферат отговаря на изискванията за придобиване на научна степен „ доктор на науките“. Правилно е структуриран, ясно отразява целта, задачите, получените резултати и произтичащите от тях изводи и приноси. В него е включено и кратко резюме на английски език.

### **9. Съответствие с минималните национални изисквания за придобиване на научна степен „ доктор на науките“**

При направената справка за съответствие се установява, че кандидатката покрива , а в някои случаи надвишава минималните национални изисквания. По група показатели А и Б , съответно по показател А-Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „ доктор“-50 точки, по показател Б – Дисертационен труд за присъждане на научна степен „ доктор на науките“ – 100 точки. По група показатели Г ( от 5 до 12) сумата е 104,4 точки при минимално изискване 100точки. По група показатели Д (от 13 до 15) при минимални изисквания от 100точки, кандидатката има 280точки, което почти трикратно надвишава минималните изисквания. Общия брой точки от всички показатели е 527,7 точки.

### **10. Критични бележки, препоръки и въпроси**


В оценявания дисертационен труд и много добре оформените изискуеми материали не открих съществени пропуски. С направените бележки и препоръки при разглеждане на проекта дисертацията докторантката се е съобразила и коригирала. Препоръчвам на доц. Кистанова да популяризира своите разработки и чрез научно –приложни публикации, за да могат препоръките за практиката да бъдат използвани и реално осъществими.

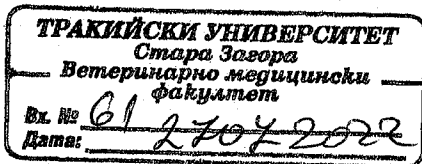
### **Заклучение**

Разработеният дисертационен труд на тема: „ Прицелни мишени на биоактивни добавки с фитогенни компоненти в репродуктивната система“ представен от доц. д-р Елена Кузминична Кистанова за присъждане на научната степен „ доктор на науките“ е актуален, с ясна научна стойност и определено практическо значение. Постигнати са много добри резултати, на базата на които са формирани изводите и приносите. Повечето от представените публикации, свързани с дисертацията са публикувани в авторитетни научни издания и имат добър отзвук сред научната общност. Направените приноси са значими и представляват сериозна крачка в изясняване на въпросите свързани с използването на биоактивни добавки с фитогенни компоненти в репродуктивната система при различни видове животни. Считам, че труда напълно отговаря на високите критерии за придобиване на научна степен „ Доктор на науките“. Дисертационният труд и публикационната активност съответстват на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България( ЗРАСРБ), Правилника за приложението му, както и специфичните изисквания на Правилника на ТрУ – Ст. Загора.

**Всичко това ми дава основание убедено да гласувам положително и предлагам на почитаемите членове на научното жури също да подкрепят да бъде присъдена *Научна степен „ Доктор на науките “* на доц. д-р Елена Кузминична Кистанова по Научна специалност „ Акушерство и гинекология на животните и болести при новородени животни“, Професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина, Област на висше образование 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина на ТрУ- Ст. Загора.**

02.08.2022  
София

Подпис:   
/проф. д-р З.Шиндарска/



**TRAKIA UNIVERSITY**  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**REVIEW**

**From:** Prof. Zaprianka Nikolaeva Shindarska, PhD, Faculty of Veterinary Medicine, Forestry University – Sofia

**Scientific specialty:** Animal nutrition and feed technology

**Professional field:** 6.3. Livestock

**Regarding:** Doctoral thesis for the conferment of educational and scientific degree “*Doctor of Sciences*” in the *Scientific specialty* “Animal Obstetrics and Gynecology and Diseases of Newborn Animals”, *Professional field /direction* 6.4 Veterinary medicine, *Scientific area* 6. Agricultural sciences and veterinary medicine, at the Faculty of veterinary medicine (FVM) of Trakia University- Stara Zagora

**Author of the dissertation:** Elena Kuzminichna Kistanova

**Topic of the dissertation:** Targets of bioactive additives with phytogetic components in the reproductive system

**Reason for presenting the review:** Participation as a member of the Scientific jury for the defense of the dissertation according to Order № 1850/ 15.06.2022 of the Rector of Trakia University- St. Zagora

**1. Assessment of the materials presented for the procedure**

For the preparation of the review, all the required documents described in The regulations for the development of the academic staff at Thrakia University (according to Art. 58, para.2). The package of documents includes: Application to the Dean for admission to public defense, Declaration of credibility of the presented materials, Information card for protected dissertation work (in Bulgarian and English), creative autobiography, Diplomas for completed: Higher education "Master" and "Doctor" (notarized), Dissertation for the award of the scientific degree "Doctor of Sciences", Author's abstract of the dissertation work (with summary in Bulgarian and English), List and copy of scientific publications in connection with the dissertation, List and copies of citations of publications in connection with the dissertation, Reference of the scientific contributions of the dissertation, Minutes of the meeting of the extended council of the department with a proposal of members of the scientific jury.

**2. Biographical data about the author disertation**

Assoc. Prof. Kistanova, PhD, was born on 19.06.1958 in Russia. He completed his secondary education at General Education High School No. 1 in the city of Nikolsk - Russia. In the period 1975-1980, she attended the Penza State Pedagogical Institute in the city of Penza, majoring in biology and chemistry. In the period 1982-1985, she studied in a doctoral program at the research institute for the physiology of children and adolescents at the Academy of Pedagogical Sciences of the Union of Soviet Socialist Republics - Moscow, specializing in Human Anatomy and Human and Animal Physiology. He successfully defended a dissertation on the topic: "Morphofunctional formation of the microchemocirculatory system of the white

rat mesentery during puberty". After the successful defense (1985) until 1988 she worked as a senior lecturer in the Department of Animal Anatomy and Physiology. From 1989 to 2006 she worked at the Institute in animal breeding sciences - Kostinbrod in the "Reproduction" department as a Chief assistant, after which she moved to the Institute of Reproductive Biology and Immunology at the Bulgarian Academy of Sciences, where she is until now. In 2009 became an associate professor in the scientific specialty "Breeding of agricultural animals, biology and reproduction biotechnology". From 2011 to 2014, she was deputy Director of the Institute of Reproductive Biology and Immunology at the Bulgarian Academy of Sciences. Mother tongue is Russian, she speaks excellent Bulgarian, very good English and good German. Possesses good organizational skills related to project coordination and management. She has held numerous specializations in various countries around the world, the most important of which are related to the subject of this dissertation work: Penza State Agricultural Academy - Russia, Czech Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences - Beijing, Veterinary Faculty of the University of Milan - Italy, Wageningen University - The Netherlands. There are over 110 publications and over 200 citations and participation in projects with international funding (6 items), projects at the Ministry of Education and Culture (13 items) and projects under the Bulgarian Academy of Sciences (3 items). She is a member of the editorial boards of numerous journals.

### **3. General characteristics of the presented dissertation thesis**

#### **Structure and volume**

The dissertation is structured according to the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff of the Republic of Bulgaria and the rules of the Thracian University. It is written on 223 pages. It includes the following sections: Introduction - 3 pages, Literature review - 30 pages, Aim and objectives - 2 pages, Material and method - 20 pages, Results and discussion - 75 pages, Directions and perspectives - 3 pages, Conclusions - 3 pages, Recommendations for practice - 1 page, Scientific contributions - 8 pages, List of publications and projects related to the dissertation - 3 pages, References - 14 pages and Appendices - 30 pages. Structurally, it is well balanced in terms of volume in individual sections, with the Results and Discussion section being the largest.

The dissertation contains 46 figures and 30 tables. A total of 447 publications are included in the bibliography, with only 5 of them in Cyrillic and the rest in Latin. It is noteworthy that most of the sources used are from the last 5-10 years, which speaks of the innovative nature of the problem in the dissertation.

#### **Actuality**

The dissertation is a complex, purposeful and topical work. In recent years, the group of preparations known as "botanical", herbal" or "natural" has been growing more and more, which are used in both human and veterinary medicine. The action of these preparations is versatile in animals: stopping the development of pathogenic bacteria, supporting digestion, incl. activating endogenous enzymes by improving resorption, antioxidant action and reducing auto-oxidative stress, stimulating or modulating immune reactivity, increasing tolerance to toxins and improving liver activity. The topic is relevant not only for veterinary medicine, but also for human medicine. The search for natural stimulators to activate folliculogenesis, enhance the superovulatory response and improve gamete quality is a major priority of researchers nowadays. The use of safe means to stimulate ovarian function will reduce the negative effect on the development of embryos and their implantation and increase the possibility of fertilization, normal course of pregnancy and birth of healthy offspring. In the current dissertation work, questions related to the mechanism of stimulation of biologically active substances, having a significant positive influence on the productivity and reproduction



of animals in minimal quantities, are treated. Restrictions on the use of hormones and antibiotics (since 2007) stimulated researchers in the search and development of new, safe for health biologically active supplements, priority being those of plant origin, with a positive impact on reproduction. The relevance of the dissertation work is related to the obtained results, which allow the use of appropriate technologies in practice to optimize ovulation and increase the reproductive potential of farm animals, as well as the possibility of storing sperm in a cooled state.

### **Introduction and Literature Review**

*The introduction* of the dissertation is purposeful and justifies the need for this type of research, as well as the great possibilities of herbal supplements, in terms of reproduction in farm animals.

*The literature review* includes a wealth of information on the issues of the dissertation work. It is structured in several main directions: By using numerous literary sources (mostly from the last 10 years), the dissertation emphasizes the relevance of the problem and the need to search for alternative sources of growth hormones and antibiotic stimulators, emphasizing the small number and partial studies of the effect of new growth stimulators on animal reproduction. The natural bioactive additives are described in detail, as well as their effect on farm animals. A comparative analysis of the studied additives and the effect in different animals was also made. The bioactive substances of the natural additives and their influence on reproduction were also analyzed.

The author has collected and analyzed modern literature (from the last 10 years), paying attention to the latest research in the last 2-3 years. This gives me reason to confirm the good literary awareness of the dissertation student, which also lays a good foundation for the research in the dissertation.

### **Purpose and Tasks**

*The objective* is formulated correctly and fully corresponds to the topic of the dissertation. The tasks are correctly set and ensure the fulfillment of the goal, which is based on a research hypothesis including the following statements: that natural bioadditives through their bioactive components at the systemic level can influence the course of individual processes in the reproductive system - steroidogenesis, gametogenesis, embryogenesis; the presence in natural supplements of significant amounts of phytogetic components with pronounced antioxidant properties is a reason to assume that the mitochondria of cells in the reproductive organs are targets at the subcellular level; influence of phytogetic components on gene expression.

*Tasks.* Five tasks have been set for argumentation of the hypothesis, including: comparative analysis of phytogetic components in the studied bioactive supplements, tracking the effect on important reproductive parameters, assessment of the state of mitochondria in the reproductive tissue, analysis of the nitrogen effect, bioinformatic analysis of genes with the possibility of modulating biological processes and signaling pathways related to reproduction.

### **Material and research methods**

A methodological approach was used, which includes comparative and general analyzes from scientific-applied experiments with animals and laboratory studies of reproductive organs and tissues after exposure to natural bioactive supplements. The dissertation includes a wide range of research methods that are modern (protocols) and refer to super ovulation, evaluation of ovaries, biochemical tests of blood samples, as well as hormone levels in blood serum, gene expression analysis of oocytes. In the experiments, both laboratory animals (white mice -

experimental staging 1,2 and 3) and farm animals - rabbits (staging 4 and 5), pigs (staging 6 and 7), buffaloes (staging 8), boars (staging 9) and rams (staging 10).

The obtained results were processed statistically with "Statistica" software.

#### **4. Evaluation of the obtained scientific and scientific-applied results**

The obtained results of the analyzes and experiments included in the dissertation work are presented in 23 tables and 40 figures. They are presented in sequence, explained and supported by quotations from other authors. The brief conclusions and summaries at the end of each section make a good impression. It was established that all nutritional supplements in addition to polyphenolic compounds also contain the fatty acids, vitamins, micro- and macroelements (without oregonin). They all have antioxidant properties. Special attention has been paid to the main targets of natural supplements with similar phytogetic components applied both in the period of sexual maturation and in sexually mature male and female animals, and they are: metabolic and sex hormones, gametogenesis, gametes, embryos and born and surviving offspring. Proof of this is that after being metabolized by the microbiome and the metabolites entering the blood, it becomes possible for them to reach the reproductive organs with the main goal of stimulating the production of a larger number of quality gametes, embryos and healthy offspring. A correlation was established between the metabolic hormone ghrelin and sex hormones in animals that received spirulina in the process of sexual maturation. The regulatory role of metabolic hormones in the functioning of the reproductive system is also confirmed. The section discusses and discusses mitochondria as subcellular targets of bioactive phytogetic supplements, and their increased functionality in reproductive tissues and gametes has been established, which at the in vivo level is characterized by increased activity and higher expression of enzymes involved in oxidative phosphorylation.

The question of the nutrigenomic effect of bioactive supplements as a result of changing the expression of genes in the reproductive tissue at the level of mRNA transcripts and at the protein level is examined and discussed. I consider it necessary to point out that at the end of this section a bioinformatic analysis was also made, which makes it possible to predict the transcription factors.

The candidate correctly summarizes the obtained results into two groups of conclusions:

**General conclusions** - 3 pieces. These conclusions apply to all natural supplements and include: their effect on individual components of the reproductive process, which is determined by a synergistic and complementary action of their bioactive substances, All target targets of supplements with similar phytogetic components have the potential to improve reproduction in different species animals, Bioinformatics analysis is an adequate tool for reliably predicting the regulatory elements of differentially expressed genes.

**Conclusions about the individual supplements with phytogetic components:** spirulina (for males and females) - an effect and influence was found: on sex hormones, the metabolic hormone - ghrelin, stimulation of folliculogenesis, improvement of spermatogenesis and sperm quality; *Vemo Herb* (rabbits) - changes the expression of genes, activates folliculogenesis; *Homogenate of male bee larva* (pigs) – changes the expression of genes and activates early stage folliculogenesis; *provit E10% super* (mice) – improves superovulation, increases the expression of mitochondrial protein, changes the expression of transcripts of genes encoding DNA methyl transferases; *Aufertin* (buffalo) - restores ovarian activity, affects mitochondrial functions, increases and preserves mitochondrial activity in spermatozoa; *Oregonin* (in vitro experiments) - changes the expression of gene transcripts, affects mitochondrial functions, increases and preserves mitochondrial activity.

#### **5. Evaluation of scientific and scientific-applied contributions**

The report on the contributions has been prepared correctly, it corresponds to the research conducted and the results obtained, and I fully accept it. Contributions are divided into: **original, confirmatory and fundamental**.

**The original scientific contributions** are divided into three groups: In the first group, new data are presented on the impact of biosupplements with phyto-genic components on the reproductive system level in female and male animals (5 numbers), In the second group are the results presenting new scientific knowledge about the effect of natural supplements on mitochondria in reproductive tissue and gametes (8 numbers), A third group of original scientific contributions presents the nutrigenomic effect of natural supplements on the reproductive system and the "effect at the genetic level".

**The fundamental scientific contributions** are related to clarifying the essence of the influence of bio-additives on the reproductive system (3 numbers).

Two contributions are of a **confirmatory nature**.

The dissertation has also presented two patents in connection with the dissertation, which speaks of the innovativeness of the research.

## **6. Recommendation for the practice**

The results obtained and the conclusions derived from them, as well as the contributions, most of which are of an original nature, given the opportunity to make recommendations for practice (5 numbers), which have specific doses for the relevant animal species, as well as duration of treatment.

## **7. Evaluation of the publications related to the dissertation**

In connection with the dissertation, the author presented 12 publications. In most of them (10 from 12) she has noticed as leader of research group who planned, designed and supervised the research.

I consider it necessary to point out that all the publications presented in the dissertation have been reviewed by the scientific field and have been published in journals referenced in the Scopus world network, and seven of them in journals ranked in the first quartile (Q1) in the respective field.

The data used in the scientific publications, the conclusions drawn, contributions and recommendations for practice are the result of the implementation of projects (6 projects), with 4 of them financed by the Ministry of Education and Culture and two by the Bulgarian Academy of Sciences.

Of the 12 publications presented, six are cited, and most of them have more than 2 citations. These data show the author's ability to be a successful leader of the research teams and reflect the rich scientific research activity related to the development of the dissertation work.

## **8. Evaluation of the thesis self-abstract**

The submitted abstract meets the requirements for obtaining the scientific degree "Doctor of Science". It is properly structured, clearly reflects the purpose, the tasks, the results obtained and the resulting conclusions and contributions. It also includes a short summary in English.

## **9. Compliance with the minimum national requirements for obtaining the "Doctor of Science" degree**

When the compliance check is made, it is established that the candidate meets, and in some cases exceeds, the minimum national requirements. According to group of indicators A and B, respectively, according to indicator A - Dissertation work for awarding the educational and scientific degree "Doctor" - 50 points, according to indicator B - Dissertation work for

awarding the scientific degree "Doctor of Science" - 100 points. According to group D indicators (from 5 to 12), the amount is 104.4 points with a minimum requirement of 100 points. According to group E indicators (from 13 to 15) with minimum requirements of 100 points, the candidate has 280 points, which is almost three times more than the minimum requirements. The total number of points from all indicators is 527.7 points.

#### **10. Criticisms, recommendations and questions**


I did not find any significant gaps in the graded dissertation and the very well-formed required materials. The candidate complied and corrected the notes and recommendations made when reviewing the draft dissertation. I recommend Assoc. Prof. Kistanova to popularize her developments also through scientific and applied publications, so that the recommendations for practice can be used and actually implemented.

#### **Conclusion**

The developed dissertation on the topic: "Targets of bioactive additives with phytogetic components in the reproductive system" presented by Assoc. Prof. Dr. Elena Kuzminichna Kistanova for awarding the scientific degree "Doctor of Sciences" is topical, with a clear scientific value and a certain practical significance. Very good results were achieved, on the basis of which the conclusions and contributions were formed. Most of the presented publications related to the dissertation have been published in peer-reviewed scientific journals and have a good response among the scientific community. The contributions made are significant and represent a serious step in clarifying the issues related to the use of bioactive supplements with phytogetic components in the reproductive system of various animal species. I believe that the thesis fully meets the high criteria for obtaining the scientific degree "Doctor of Sciences". The dissertation work and the publication activity correspond to the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its application, as well as the specific requirements of the Regulations of Thracia University - Stara Zagora.

**All this gives me reason to *vote positively* and I suggest to the honorable members of the scientific jury to also support the awarding of the *Scientific degree "Doctor of Sciences" to Assoc. Prof. Elena Kuzminichna Kistanova, PhD in the Scientific specialty "Animal Obstetrics and Gynecology and Diseases of Newborn Animals", Professional direction 6.4. Veterinary Medicine, Scientific area 6. Agricultural Sciences and Veterinary Medicine.* (последното изтрих, защото това за цялата страна, не само за Ст.Загора)**

02.08.2022  
Sofia

Signature:   
/prof. Dr. Z. Shindarska/