

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Наско Йовчев Василев, научна специалност „Акушерство и гинекология на животните и болести на новородените животни“, катедра „Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения“, Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора, на основание заповед № 1580 от 15.06.2022 г. на Ректора на Тракийски университет и протокол № 1 от 28.06.2022 г.

относно дисертационен труд на тема „Прицелни мишени на биоактивни добавки с фитогенни компоненти в репродуктивната система“ разработен от доц. д-р Елена Кузминична Кистанова.

за получаване на научната степен „Доктор на науките“ в област на висше образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина“, професионално направление 6.4. „Ветеринарна медицина“, научна специалност „Акушерство и гинекология на животните и болести на новородените животни.

Представените документи отговарят на изискванията на Закона за Развитие на Академичния състав в Република България и Правилника за неговото приложение утвърден в Тракийски университет.

Доц. Кистанова е представила справка с Наукометричните показатели на минималните национални изисквания за научна степен "доктор на науките" съгласно ЗРАСРБ. При необходимости 350 точки са приложени доказателства за 527.7 точки.

Бързо увеличаващото се население на планетата изисква увеличено производство на хранителни продукти, налагащо стимулиране продуктивността и репродуктивната способност на животните с безопасни за животинското и човешко здраве биологично активни вещества.

Натуралните добавки 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, доказващи ефекта на фитогенните добавки върху различни мишени в репродуктивната система. Трябва да се отбележи, че репродуктивната система, се формира преди началото на пубертета, поради което влияние върху нейното развитие освен наследствеността оказват също околната среда и условията на отглеждане.

Актуалност на темата. Ограниченията за използване на хормони и антибиотици предизвикат повишено търсене и разработване на биологично активни вещества, особено с растителен произход, микроводорасли, продукти от пчеларството, и др. Въпреки различния си произход (растения, водорасли и продукт на пчеларство) добавките имат редица сходни биоактивни компоненти, включващи и фитогенни такива. Извършените изследвания с прилагането на различни биоактивни вещества за оценка на репродуктивните показатели представляват иновативни решения за заместване на традиционните хормонални препарати в управлението на репродуктивния процес на животните.

В представеният дисертационен труд са обобщени експериментални данни от проведени дългогодишни изследвания на въздействието на натуралните биоактивни добавки при клетъчни модели, експериментални и селскостопански животни (мишки, зайци, свине, нерези, кочове и биволици).

Като най-обещаващи алтернативи са предложени фитобиотици, бактериофаги, пробиотици, пребиотици и синбиотици. Тези добавки влияят върху метаболизма на организмено ниво, и неминуемо рефлектират и върху репродуктивната система. За първи път в нашата страна приложихме успешно билковия препарат Ауфергин за преодоляване на следродилния анеструс при биволици. Получени са нови данни за влиянието на хомогенат от търтееви ларви върху фоликулогенезата и експресията на ооцит-специфичните растежни фактори GDF9 и BMP15. Иновативни са изследванията проведени с

T. terrestris върху женската репродуктивна система на зайци, доказващи ефекта на добавката върху генната експресия в ооцитите и кумулсните клетки на две последователни поколения.

Актуалността и иновативността на изследванията се потвърждава и от факта, че по темата на дисертацията са регистрирани два патента и публикувани научни статии в реферирани и индексирани списания в световната мрежа Scopus, като седем от тях – в списания, класирани в първия кваartil (Q1) на съответните области.

Литературен преглед. Представени са литературни данни за разнообразието от биологично активни субстанции и добавки, произхода им, състава и въздействието при приемане от животинския организъм. Извършен е сравнителен анализ на предимствата от прилагането на природните добавки и тяхното влияние върху репродуктивната система. Подробно са представени използваните в експериментите биологични добавки, както и данни за въздействието им върху репродуктивните параметри при опитните животни. При извършеният сравнителен анализ относно актуалността на проблематиката, състава и свойствата на биологичните добавки са интерпретирани 447 литературни източника, от тях пет на кирилица и 442 на латиница, като приблизително половината са от последните десет години.

Публикуваните експериментални резултати за въздействието на биоактивните субстанции показват, че всяка една от тях има свое уникално значение за нормалното протичане на репродуктивния процес. Много изследователи посочват значително по-благоприятния ефект върху този процес от едновременното прилагане на няколко биоактивни субстанции.

Цел. Формулираната от авторът цел на дисертационния труд е да се определят потенциалните мишени в репродуктивната система след приложение на натурални добавки с фитогенни компоненти.

Материал и методи. Подборът на биоактивните добавки е обусловен от свойствата и биохимичния състав на всяка от тях, и е основан на проведени и публикувани резултати от извършени изследвания. 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), Ayefertin, добавката Провит Е10% Супер, съдържаща растението артишок (*Cynara scolymus*). Полифенолът Орегонин (като пречистен извлек от кората на елша-*Alnus incana*) е използван в *in vitro* опити с клетъчни култури и сперматозоиди.

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

Проведени са десет експериментални постановки с 199 женски и 9 мъжки животни. Използван е широк набор от изследователски методи за оценка репродуктивните параметри и нутригеномния ефект от приложените биоактивни добавки. Получените резултати са подложени на статистическа обработка.

Методологията включва сравнителни и обобщаващи анализи на резултати от научно-практически експерименти с животни и лабораторни изследвания на репродуктивни органи, тъкани, гамети и клетъчни модели, след въздействието на нехормонални натурални биоактивни добавки. Приложен е широк набор от изследователски методи за оценка репродуктивните параметри, митохондриалната активност и нутригеномния ефект от приложените биоактивни добавки. С помоща на RT-PCR бяха оценени промените в нивата на транскрипти на GDF9 и BMP15 гени в ооцити и кумулусни клетки от опитните животни. Както и CASA анализ на кинематичните параметри на сперматозоиди.

Резултати и обсъждане. Получените резултати са представени чрез 30 таблици, 46 фигури и приложения. Те представляват доказателствен материал за това че приемането на биологичните добавки въздействат на

половите органи и оказват положително влияние за възстановяването на половоцикличната дейност при женските животни и сперматогенезата при мъжките индивиди. В голямата си част са подкрепени и от резултати на други колективи, които потвърждават или награждат известното до момента за ефекта на фитогенните съставки.

Извършен е анализ на промените в репродуктивните параметри при различни видове животни – лабораторни и селскостопански, след действието *in vivo* на различни по произход, но сходни по състав на активните фитогенни субстанции от натуралните добавки. Резултатите са групирани в зависимост от атакуваните мишени като хормони, гамети, гаметогенеза или родени приплоди при един вид и/или един пол животни.

Авторът на дисертационния труд не извършва общоприложимото обсъждане, а представя анализ на постигнатото и извеждане на насоки за продължаване на изследванията с цел детайлна оценка на използваните биологично активни вещества. Добро впечатление прави задълбоченият сравнителен анализ на получените резултати, който допринася за последващото формиране на изводите и приносите по дисертационния труд.

Изводи. Формулирани са две групи изводи отразяващи регистрираните положителни ефекти от прилагането на натуралните био добавки. В първата група са намерили отражение ефектите на натурални добавки върху отделни компоненти на репродуктивния процес се определя от синергетичното и комплементарно действие на биоактивните им субстанции, включително и фитогенните: витамини, вторични метаболитни съединения на растения (полифеноли, мастни киселини и др.), макро- и микроелементи. Извеждат се прицелните мишени на фитогенните добавки с потенциал за подобряване на репродукция - метаболитните и половите хормони (на организмено и системно ниво); гаметогенезата и гаметите (на системно и клетъчно ниво); клетъчните органели митохондрии (на субклеточно ниво) и гените на репродуктивната тъкан и гаметите. Втората група изводи са базирани на

получените резултати от прилагането на различните добавки с фитогенни компоненти.

Разработването на дисертационния труд е базиран на установяване на прицелните мишени в репродуктивната система на животинския организъм под въздействието на нехормоналните натурални биодобавки. Приносите на тази разработка са следствие от получените резултати, които в научен и приложен аспект са с оригинален, потвърдителен и фундаментален характер.

Фундаменталните научни приноси на дисертацията се изразяват в изясняване влиянието на биодобавките върху репродуктивната система, посредством тяхното въздействие върху множество нива на организма: системно (репродуктивна система), клетъчно (гамети), субклетъчно (митохондрии) и генетично.

Оригиналните научни приноси в зависимост от действието на биодобавките върху различните нива на организма са обединени в три групи.

В първата група са представени получените нови данни за влиянието на използваните биодобавки с фитогенни компоненти на ниво репродуктивна система при женски и мъжки животни. Регистрираните промени в нивата на стероидните хормони в женския организъм при различни видове животни са доказателство за благоприятното действие и корелират с установените нива на метаболитните хормони, стимулирането на фоликулогенезата, узряването на гаметите (Спирулина, хомогенат от търтееви ларви и Ауфертин), подобрена сперматогенеза (Спирулина) и раждането на жизнено потомство (Спирулина и Трибестан).

Втората група се основават на резултатите, представляващи нови научни познания за ефектите на натуралните добавки върху митохондриите в репродуктивната тъкан и гамети. Установено е *in vivo* повишена активност на цитохром С оксидазата, резултиращо в по-голям брой овулирани ооцити след процедури за суперовулация. Както и по-високата компетентност за развитие на ооцитите, и наличието в тях на по-добре функциониращ митохондриален

апарат и по-голям брой копия мтДНК (Спирулина, биодобавка с артишок и екстракт от кора на *Alnus incana*).

Третата група са базирани на доказателствата за нутригеномния ефект на натуралните добавки върху репродуктивната система изразяващ се в повишена експресия на ооцит-специфичните растежни фактори, кодирани от гени GDF9 и BMP15. Регистрирани са промени в експресията на гените, кодиращи ензимите, отговорни за метилирането на ДНК, в ооцитите и кумулусните клетки (Спирулина, ВемоХербТ и хомогенатът от търтееви ларви). Полифенолът орегонин предизвика промяна в експресията на гените, кодиращи ДНК-метилтрансферазите доказано с клетъчен модел на ембрионални миши фибробласти.

Препоръки за практиката. На основание на получените резултати са разработени пет подходящи за приложение в практиката процедури за оптимизиране протокола за суперовулация на лабораторни животни, за повишаване репродуктивния потенциал на селскостопанските животни, и за съхраняване на семенна течност от кочове при 5°C до 48 часа след получаване.

Списък на публикации по проекта за дисертация. Доц. Кистанова представя дванадесет научни публикации във връзка с разработената тема и два регистрирани патента. Получените резултати са публикувани в списания, реферирани в световната мрежа Scopus, а седем от тях – в списания, класирани в квантил Q1 в съответните области. Водещ автор (първи или последен като ръководител на изследователския колектив) -11 бр. и в съавторство – 1 бр. Посочени са осемнадесет цитирания в реферирани и индексирани списания в Scopus & WoS и две в нереперирани на шест от публикуваните научни статии.

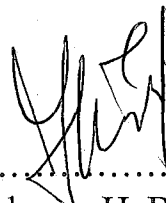
Авторефератът отразява основните раздели на дисертационния труд и отговаря на изискванията.

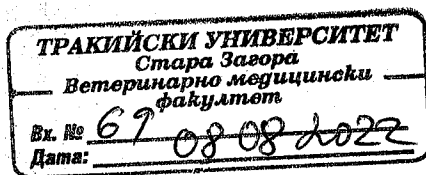
Заключение. Дисертационният труд притежава актуалност и иновативност. Методите на изследване са съвременни. Получените резултати са с оригинален характер и практическо значение. Всичко това ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Позволявам си да предложа на почитаемото научно жури също да гласува положително и да присъди научната степен „Доктор на науките“ на доц. Елена Кистанова по научна специалност „Акушерство и гинекология на животните и болести на новородените животни“, професионално направление 6.4. „Ветеринарна медицина“ в област на висше образование 6. „Аграрни науки и ветеринарна медицина“.

27.07.2022 г.
гр. Стара Загора

Изготвил рецензията :
проф. д-р Н. Василев





R E V I E W

of Professor Nasko Yovchev Vasilev, DVM, PhD, scientific specialty "Obstetrics and gynecology of animals and diseases of newborn animals", department of "Obstetrics, Reproduction and Reproductive disorders", Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora on the base of Order No1850/15. 06. 2022 by the Rector of Trakia University — Stara Zagora and Protocol No 1 from 28.06.2022 .

Concerning: DSc thesis "Targets of bioactive additives with phytogetic components in the reproductive system" presented by Associate Professor Elena Kuzminichna Kistanova, PhD for awarding the scientific degree "Doctor of Sciences" in the scientific area 6.0 "Agrarian sciences and Veterinary medicine", professional direction 6.4 "Veterinary medicine", scientific specialty "Obstetrics and gynecology of animals and diseases of newborn animals"

The submitted documents meet the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for its application approved at Trakia University.

Assoc. Prof. Kistanova, PhD has presented the data of scientific measurable indicators, which are in full compliance with the minimum national requirements for the scientific degree "Doctor of Sciences" according to the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria. For the required 350 points, evidence for 527.7 points has been attached.

The rapidly increasing population of the planet requires increased production of food products. The solution of this problem could be done by stimulation of the productivity and reproductive capacity of animals with biologically active substances that are safe for animal and human health. Natural supplements are multi-component, which is positive for the body, but creates difficulties for

revealing the specific mechanisms of their action. Overcoming these difficulties requires the accumulation of a substantial base of experimental data proving the effect of phytogetic supplements on various targets in the reproductive system. It should be noted that the reproductive system forms before the onset of puberty, therefore, in addition to heredity, the environment and growing conditions influence its development as well.

Relevance of the topic. Restrictions on the use of hormones and antibiotics cause increased demand and development of biologically active substances, especially of plant origin, microalgae, beekeeping products, etc. Despite their different origin (plants, algae and beekeeping product), the supplements have a number of similar bioactive components, including phytogetic ones. The research carried out with the application of various bioactive substances for the assessment of reproductive indicators represents innovative solutions for replacing traditional hormonal preparations in the management of the reproductive process of livestock animals. The presented dissertation summarizes experimental data from long-term studies on the impact of natural bioactive additives in cell models, experimental and livestock animals (mice, rabbits, pigs, boars, rams and buffaloes). Phytobiotics, bacteriophages, probiotics, prebiotics and synbiotics have been proposed as the most promising alternatives. These supplements affect the metabolism at the organismal level, and inevitably reflect on the reproductive system as well. For the first time in our country, was successfully applied the herbal preparation Aufertin to overcome postpartum anestrus in buffaloes. New data were obtained on the influence of a drone brood homogenate on the folliculogenesis and the expression of the oocyte-specific growth factors GDF9 and BMP15. Innovative are the studies with *T. terrestris* on the female reproductive system of rabbits, proving the effect of the supplement on gene expression in oocytes and cumulus cells of two consecutive generations.

The relevance and innovation of the research has also confirmed by the fact that two patents have been registered on the subject of the dissertation and

scientific articles have been published in peer-review and indexed in the Scopus and Web of Science databases journals, including seven of them in journals ranked in the first quartile (Q1) of relevant areas.

Literature review. Literary data on the variety of biologically active substances and additives, their origin, composition and impact on the animal organism has been presented. A comparative analysis of the advantages of the application of natural supplements and their influence on the reproductive system was carried out. The biological supplements used in the experiments are presented in detail, as well as data on their impact on the reproductive parameters of the experimental animals. During the comparative analysis regarding the actuality of the problem, the composition and properties of biological additives, 447 literary sources were interpreted, of which five were in Cyrillic and 442 were in Latin, and approximately half of them were from the last ten years. Published experimental results on the impact of bioactive substances show that each of them has its own unique importance for the normal course of the reproductive process. Many researchers indicate the significantly more favorable effect on this process of the simultaneous application of several bioactive substances.

Goal. The aim of the dissertation formulated by the author is to determine the potential targets in the reproductive system, on which the application of natural additives with phytogetic components affects.

Material and methods.

The selection of bioactive additives was determined by the properties and biochemical composition of each of them, and was based on the conducted and published research results. In the experimental work, mostly multi-component natural bioadditives were used, such as the blue-green algae *Arthrospira platensis* (Spirulina, SP), extract of the plant *Tribulus terrestris* (VemoHerbT, VHT), drone brood homogenate (DBH), Ayefertin, the supplement Provit E10% Super, containing the artichoke plant (*Cynara scolymus*). The polyphenol Oregonin (as a purified extract from *Alnus incana* bark) was used in *in vitro* experiments with cell

cultures and spermatozoa. The main goal of biologically active substances application is to stimulate the production of a greater number of quality gametes, embryos and healthy offspring. Therefore, the focus of the analysis of their influence was directed to the main parameters of the reproductive system, which are the targets of bioadditives at the systemic and organismic level. Ten experimental setups were conducted with 199 female and 9 male animals. A wide range of research methods was used to evaluate the reproductive parameters and the nutrigenomic effect of the applied bioactive supplements. The obtained results were subjected to statistical processing. The methodology includes comparative and general analyzes of the results from scientific-practical experiments with animals and laboratory studies of reproductive organs, tissues, gametes and cell models, after the application of non-hormonal natural bioactive supplements. A wide range of research methods was applied to evaluate reproductive parameters, mitochondrial activity and the nutrigenomic effect of applied bioactive supplements. Changes in transcript levels of GDF9 and BMP15 genes in oocytes and cumulus cells from the experimental animals were assessed by RT-PCR, as well as CASA analysis of sperm kinematic parameters was done.

Results and discussion. The obtained results has been illustrated by 30 tables, 46 figures and appendixes. They represent evidence that the intake of biological supplements affects the sexual organs and has a positive effect on the recovery of cyclic activity in female animals and spermatogenesis in male individuals. For the most part, they are supported by the results of other collectives, which confirm or upgrade the known data about the effect of phytogetic ingredients. An analysis of the changes in the reproductive parameters in different types of animals - laboratory and livestock, after the in vivo action of, different in origin, but similar in composition, active phytogetic substances from the natural supplements has been carried out. The results have been grouped depending on the targets attacked such as hormones, gametes, gametogenesis or offspring born in one species and/or one sex of animals.

The author of the dissertation does not carry out a conventional discussion, but presents an analysis of what has been achieved and deriving guidelines for continuing research with the aim of a detailed assessment of the biologically active substances used. A good impression has been done by the in-depth comparative analysis of the obtained results, which contributes to the subsequent formation of the conclusions and scientific contributions of the DSc thesis.

Conclusions.

Two groups of conclusions have been formulated reflecting the registered positive effects of the natural bio-additives application. In the first group, the effects of natural supplements on parameters of the reproductive process are reflected by the synergistic and complementary action of their bioactive substances, including phytogetic: vitamins, secondary metabolic compounds of plants (polyphenols, fatty acids, etc.), macro - and trace elements. The targets of the phytogetic supplements with the potential to improve reproduction are derived - the metabolic and sex hormones (at the organismic and systemic levels); gametogenesis and gametes (at the systemic and cellular level); the cell organelle mitochondria (at the subcellular level) and the genes of reproductive tissue and gametes. The second group of conclusions relates to the results obtained from the application of each supplement with phytogetic components.

The development of the dissertation is based on establishing the targets in the reproductive system of the animal organism, which can be influenced by non-hormonal natural bioadditives. The contributions of this development are consequences of the obtained results, which in a scientific and applied aspect are original, affirmative and fundamental in nature.

The fundamental scientific contributions of the dissertation have been elucidate the impact of biosupplements on the reproductive system, through their impact on multiple levels of the organism: systemic (reproductive system), cellular (gametes), subcellular (mitochondria) and genetic.

The original scientific contributions depending on the action of the bio-additives at different levels of the organism are united in three groups. The first

group presents the new data on the influence of the used bioadditives with phytogetic components on the level of the reproductive system in female and male animals. The registered changes in the steroid hormones levels in the female organism in different species of animals are a proof of the beneficial effect of the additives. These changes correlate with levels of the metabolic hormones, with stimulation of the folliculogenesis, with maturation of the gametes (Spirulina, homogenate of beetle larvae and Aufertin), improved spermatogenesis (Spirulina) and with birth of the viable offspring (Spirulina and Tribestan). The second group includes a new scientific knowledge about the effects of natural supplements on mitochondria in reproductive tissue and gametes. Increased cytochrome C oxidase activity has been found *in vivo*, resulting in a higher number of ovulated oocytes after superovulation procedures. In addition, the higher competence for oocyte development, and the presence in them of a better functioning mitochondrial apparatus and a greater number of mtDNA copies (Spirulina, artichoke biosupplement and Alcus incana bark extract) have been established. The third group is based on the evidence of the nutrigenomic effect of natural supplements on the reproductive system resulted in an increased expression of oocyte-specific growth factors encoded by genes GDF9 and BMP15 (Spirulina, VemoHerbT and the homogenate of beetle larvae). Changes in the expression of the genes encoding the enzymes responsible for DNA methylation were recorded in oocytes and cumulus cells (Provite10%Super). The polyphenol oregonin also caused a change in the expression of genes encoding DNA-methyltransferases as demonstrated by a cell model of embryonic mouse fibroblasts.

Recommendations for practice. Based on the results obtained, five practical applications were developed: to optimize the protocol for superovulation in laboratory animals, to increase the reproductive potential of farm animals, and to store the semen from rams at 5°C for up to 48 hours after collection.

List of publications on the DSc thesis. Prof. Kistanova presents twelve scientific publications in connection with the developed topic and two registered patents. The obtained results were published in journals indexed in the

Scopus&WoS databases, and seven of them in journals ranked in the Q1 quartile in the relevant fields. She is a leading author (first or last as head of the research team) - in 11 and a co-author – in 1. Eighteen citations of the six published scientific articles have been indicated in peer-reviewed and indexed in Scopus & WoS journals and two in non-refereed.

The self-abstract reflects the main sections of the dissertation and meets the requirements.

Conclusion. The DSc thesis possesses an actuality and innovation. The research methods are up-to-date. The obtained results are original and of practical importance. All this gives me reason to rate it **POSITIVELY**. I allow myself to propose to the honorable scientific jury to also vote positively and award the scientific degree "Doctor of Sciences" to Associate Professor Elena Kistanova, PhD in the scientific specialty "Obstetrics and gynecology of animals and diseases of newborn animals", professional direction 6.4. "Veterinary Medicine", scientific area 6. "Agrarian Sciences and Veterinary Medicine".

27.07.2022
Stara Zagora

Review prepared by :.....
(Professor N.Vasilev, DVM, PhD)

