

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Иван Пенчев Георгиев дн, катедра „Фармакология, физиология на животните, биохимия и химия“, ВМФ, ТрУ, Стара Загора, научна специалност “Физиология на животните и човека“

Относно дисертационен труд за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ на тема „ПРИЦЕЛНИ МИШЕНИ НА БИОАКТИВНИ ДОБАВКИ С ФИТОГЕННИ КОМПОНЕНТИ В РЕПРОДУКТИВНАТА СИСТЕМА“ представен от доц. д-р Елена Кистанова, към катедра "Акушерство, репродукция и репродуктивни нарушения", ВМФ, ТрУ, Стара Загора

Преди да започна изложението на становището си по същество ще, отбележа факта, че дисертационният труд и съпътстващите го документи са напълно в съответствие с изискванията на нормативните актове, вкл. и Правилника за развитие на академичния състав в Тракийски университет, Стара Загора. Представен е и нужният доказателствен материал, вкл. и декларация от автора за достоверност на информацията.

Проблем и актуалност на темата на дисертационния труд

При планиране и подготовка на всяка научна работа, вкл. и дисертационен труд, е необходимо да има проблем. В случая проблемът е ясен: неконтролируемостта и прекомерно използване на различни лекарствени препарати, особено антибиотици, както при човека така и при животните и наложените ограничения за използване на хормонални препарати в животновъдството. В тази връзка през последните години все повече нараства интереса на научната общност към разработване на нови препарати от растителен произход под формата на натурални хранителни добавки. Подобни препарати намират все по-широко приложение в животновъдството за стимулиране растежа и развитието на подрастващите животни както и за подобряване продуктивните качества с цел увеличаване продукцията на месо и мляко. В същото време, използването на натурални хранителни добавки за стимулиране на репродуктивните качества на животните е твърде ограничено. Ето защо, намирам темата и проблематиката на настоящия дисертационен труд за много актуални, тъй като допринася за изясняване ефекта на приложените добавки и техните биологично-активни съставки (полифеноли, есенциални ненаситени мастни киселини, витамини, минерали и др.) върху

функцията на репродуктивната система при женските и мъжките животни. Високо оценявам избора от автора подход, а именно да тества ефектите на натуралните добавки при различни видове животни (продуктивни, лабораторни), което в съчетание с изследванията *in vitro*, върху клетъчни култури, дава по-големи възможности за една по-задълбочена интерпретация на получените резултати относно повлияването на функцията на репродуктивната система и репродуктивния процес като цяло. Този комплексен подход е особено важен за една дисертация за получаване на научната степен „Доктор на науките“.

Структура на дисертационния труд

Ще отбележа, че дисертацията е много добре структурирана с необходимия баланс между отделните части и съдържа всички раздели както следва: Увод; Анализ на изследвания по проблема (Литературен преглед); Цел и задачи; Материал и методи; Резултати и дискусия; Изводи; Препоръки за практиката; Научни приноси; Списък на публикациите и проектите във връзка с дисертацията; Литература и приложения.

Увод, литературен преглед, цел и задачи

В увода авторът е анонсирал основния проблем на дисертационния труд, а именно необходимостта от прилагане на различни натурални хранителни добавки за стимулиране и подобряване на репродуктивните качества на животните на фона на наложените ограничения от използването на хормонални препарати и нутритивни антибиотици в животновъдството.

Изтъкнати са също така предимствата на многокомпонентните натурални добавки на растителна основа като афродизиаки с пряк ефект върху репродуктивната система и натурални растежни фактори с косвено позитивно влияние върху репродукцията. В литературния преглед е направен подробен критичен анализ на наличната научна информация по проблемите на дисертационния труд. Общо в дисертацията са цитирани голям брой литературни източници – 447, болшинството, от които са от последните 10-15 години, което показва много добрата осведоменост на автора на известните досега ефекти на използваните в дисертацията натурални растителни добавки. Извършен е сравнителен анализ на състава на използваните добавки и на съдържащите се в тях биологично активни субстанции – полифеноли, витамини, минерали, мастни киселини. Обърнато е специално

внимание на липсата на достатъчно данни относно влиянието им върху репродуктивната система при женските и мъжките животни.

Целта на изследванията е правилно формулирана и напълно съответства на темата на дисертационния труд. Работната хипотеза съдържа в синтезиран вид очакваните резултати относно ефектите на добавките върху функцията на репродуктивните органи. Поставени са общо 5 главни задачи, чието изпълнение гарантира постигането на поставената цел. Много добро впечатление прави съчетаването на изследванията *in vivo* и *in vitro*, което дава възможност за една по-широка и по-задълбочена дискусия на собствените резултати както на ниво организъм, така и на клетъчно и молекулярно-генетично ниво. Ще отбележа, че е извършена адекватна статистическа обработка на експерименталните данни, вкл. и тестване за нормално разпределение. В зависимост от това дали данните са нормално или ненормално разпределени са избрани подходящи тестове за определяне статистическата значимост на разликите между групите, което е гаранция за достоверността на получените резултати. Извършен е също така и корелационен анализ на стойностите на параметрите от отделните измерения както и бионформационен анализ.

Резултати и дискусия

Получените резултати са много добре онагледени (47 фигури и 29 таблици) и подробно и компетентно описани в текста. В същото време, авторът е избрал варианта да представи разделите „Резултати“ и „Дискусия“ заедно. Не го отчитам като грешка, но бих предпочел те да са дадено отделно, каквито са изискванията в повечето реномирани научни списания. Оценявам високо приложения от доц. Кистанова подход при описване на резултатите, а именно от общото към частното. Първо са представени експерименталните данни от установените системни ефекти на натуралните добавки на ниво организъм с акцент върху репродуктивната система на женски и мъжки животни от различни видове, последвани от данни за митохондриите и молекулярно-генетичен анализ на експресията на различни гени в полови клетки с пряко отношение към гаметогенезата. Така например, установено е положително влияние на натуралните добавки (спирулина, ауфертин, трибестан и хомогенат от търиеви ларви) със сходен състав по отношение на фитогенните съставки при мъжки и женски животни върху хормоналния статус (естрадиол, прогестерон, лептин, грелин), гаметогенезата (размер и брой на фоликулите, брой оволирани ооцити,

качества на гаметите и др.), както и върху състоянието на ембрионите и броя на родените и оцелелите приплоди). Проведените *in vivo* (яйчници) и *in vitro* (клетъчна линия NIH/3T3 на миши ембрионални фибробласти) изследвания показват, че натуралните добавки спирулина, провитЕ10%Супер и орегонин повишават функционалната активност на митохондриите като увеличават броя копия на мтДНК и активността и експресията на някои ключови митохондриални ензими от окислителното фосфорилиране (цитохром С оксидаза и никотинамид аденин динуклеотид дехидрогеназа 1) и окислително-редукционния потенциал на митохондриите и по този начин повишават качеството получените гамети. Подобен позитивен ефект върху митондриите на фитогенните добавки е установен и в *in vitro* изследванията на сперматозоидите на нерези и кочове при съхранението им в охладено състояние, изразяващо се в запазена подвижност и оплодителна способност. Данните от молекулярно-биологичните анализи чрез real time RT-PCR показват, че и трите използвани препарати - Спирулина, ВемоХербТ и хомогенат от търтееви ларви повишават генната експресия на два важни за развитието и зреенето на фоликулите растежни фактори - GDF9 и BMP15 в ооцитите и в кумулусните клетки на зайци и свине. Важно е да се отбележи, че стимулиращия ефект на тези препарати освен на РНК ниво е доказан имунохистохимично и на протеиново ниво. В опити *in vitro* с две клетъчни линии – миши ембрионални фибробласти (MEFs) и NIH/3T3 са установени дозово зависими ефекти на орегонин (полифенол) върху експресия на някои ДНК метилтрансферази като важни гени за епигенетични повлиявания, вкл. и от натурални биодобавки.

Специално внимание искам да обърна на извършения от автора биоинформационен анализ на гените с променена експресия в яйчниците след въздействието с биологично активните добавки. Въвеждането на собствените експериментални данни за генната експресия на важните регулатори на развитието и зреенето на фоликулите - GDF9 и BMP15 както и тези за ДНК метилтрансферазите в различни *on-line* електронни платформи с бази данни позволява да се установят сложните взаимовръзки и взаимоотношения между тези гени и кодираните от тях протеини с генните експресии на значителен брой транскрипционни фактори, имащи пряко отношение към функцията на яйчниците. Всичко това дава възможност за прогнозиране на наследяването от следващото поколение животни на промените в експресията на тези гени и по-точен избор на добавки за повлияване на конкретен процес, напр. растеж и зреене на фоликул, гаметогенеза, качества на гаметите и

др. Дискусията на дисертационния труд е написана много компетентно с необходимата задълбоченост и критичност при обясненията на собствените резултати. Получените експериментални данни в дисертационния труд са много умело интерпретирани на фона на известното до момента относно влиянието на изследваните добавки и техните биологично активни съставки върху функцията на репродуктивната система. Това до голяма степен се дължи на избрания от автора подход, който вече описах по-горе, а именно съчетаването на изследвания *in vivo* при различни видове животни с изследвания *in vitro* върху клетъчни култури както от репродуктивните органи на животните така и готови клетъчни линии от мишки. Тъй като много от резултатите са получени за пръв път в това изследване, високо оценявам уменията на автора да дава адекватни обяснения на установените научни факти, както и да формулира съответни хипотези. Това неминуемо допринася за по-пълното изясняване на клетъчните и субклетъчните механизми, чрез които използваните натурални добавки стимулират функцията на репродуктивните органи. Направените изводи са конкретни и непосредствено произтичат от получените резултати. Приемам направените приноси, които представят в обобщен вид научната и научно-приложната стойност на постигнатото в дисертационния труд. Като член на Разширения съвет на катедрата виждам, че доц. Кистанова се е съобразила с много от направените бележки и препоръки. Авторефератът отразява точно получените в дисертацията резултати и направените изводи и приноси.

Най-важни индикатори за качествата на всеки дисертационен труд са свързаните с него публикации, респективно списанията, в които са публикувани и тяхната цитируемост. В тази връзка ще отбележа, че доц. Кистанова представя 12 публикации като всички са в списания индексирани и реферирани в Web Science или Scopus. Шест от статиите са в списания от Q1 и една в Q3. В списанията с ИФ и SJR са общо 9 публикации. Специално внимание искам да обърна на факта, че ИФ на списанията е висок и варира от 0,492 до 5,94, което по безспорен начин показва високата научна стойност на получените в дисертацията резултати. В тази връзка неслучайно от представените 18 цитирания, 16 са в списания, които са индексирани и реферирани в Scopus или Web Science. Авторът има 15 участия (доклади и постери) на международни научни форуми в страната и чужбина, в т. ч. 2 пленарни доклада. Има и 2 защитени и признати патента с материали от дисертацията съответно през 2019 г. и 2020 г., което е много добър атестат за научно-приложния характер на проведените

изследвания и получените резултати. Много добро впечатление прави фактът, че доц. Кистанова участва в общо 6 научни проекта (на 4 от тях е научен ръководител) към БАН, МОН и ФНИ с много добро финансиране и пряко свързани с тематиката на дисертацията.

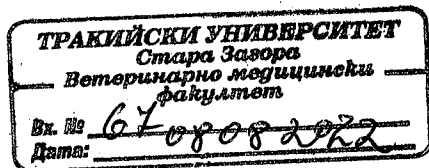
В заключение, считам, че поставената цел е успешно изпълнена. По структура и съдържание дисертационният труд, отговаря напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника за развитие на академичния състав в Тракийски университет за научната степен „Доктор на науките“. Доц. Кистанова покрива напълно „Минималните национални изисквания“ в Научна област 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина, професионално направление 6.4 Ветеринарна медицина както като общ брой точки (527.7), така и като точки по групи показатели за научната степен "Доктор на науките". Направени са редица оригинални приноси с важно научно-теоретично и научно-приложно значение относно влияние на различните натурални нутритивни добавки върху репродуктивната система на животни от различни видове. Акцентът е поставен на изясняване клетъчните и субклетъчните механизми, чрез които биологично-активните съставки (полифеноли, антиоксиданти, ненаситени мастни киселини, витамини микро- и макроеlementи) стимулират функцията на яйчниците и качествата на гаметите при мъжки и женски животни. Публикациите по дисертационния труд са в специализирани научни издания, индексирани и реферирани в световните бази данни Web of science и Scopus и са с висок импакт фактор и/или импакт ранг като са получили и голям брой цитирания в реномирани списания, въпреки сравнително краткия период след тяхното публикуване. Ето защо, давам положителна оценка на проведените изследвания и получените в дисертационния труд резултати и ще гласувам **„За“ присъждане на научната степен „Доктор на науките“ на доц. Елена Кистанова** в професионално направление 6.4. Ветеринарна медицина и научна област 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина.

27.07.2022 г.

Стара Загора

Подпис:

(проф. д-р Иван Пенчев дн)



OPINION

of Professor Ivan Penchev Georgiev, DVM, DSc from the Department of „Pharmacology, physiology of animals, biochemistry and chemistry“, Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora, scientific specialty “Physiology of animals and human“

Concerning: DSc thesis for awarding the scientific degree “Doctor of Sciences” titled “TARGETS OF BIOACTIVE ADDITIVES WITH PHYTOGENIC COMPONENTS IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM” presented by Associate Professor Elena Kuzminichna Kistanova, PhD at the department of “Obstetrics, Reproduction and Reproductive disorders”, Faculty of Veterinary Medicine at Trakia University, Stara Zagora.

Before the presentation of my opinion in essence, I will point out the fact that the dissertation and accompanying documents are fully in accordance with the requirements of the normative acts, incl. and the Regulations for the Development of the Academic Staff at Trakia University, Stara Zagora. The necessary evidentiary material has been also presented, incl. and a declaration by the author about the reliability of the information.

Problem and actuality of DSc thesis topic

When planning and preparing any scientific work, incl. and dissertation, it is necessary to have a problem. In this case, the problem is clear: the uncontrollable and excessive use of various medicinal preparations, especially antibiotics, both in humans and in animals, and the imposed restrictions on the use of hormonal preparations in animal husbandry. In this regard, in recent years, the interest of the scientific community to developing new preparations of plant origin in the form of natural food additives has been growing. Such preparations are increasingly used in animal husbandry to stimulate the growth and development of young animals, as well as to improve productive qualities in order to increase the production of meat and milk. At the same time, the use of natural nutritional supplements to stimulate the reproductive qualities of animals is too limited. Therefore, I find the topic and issues of the current DSc thesis very relevant, as it contributes to clarifying the effect of applied supplements and their biologically active ingredients (polyphenols, essential unsaturated fatty acids, vitamins, minerals, etc.) on the function of the reproductive system in female and male animals. I highly appreciate the approach

chosen by the author, namely to test the effects of natural supplements in different types of animals (livestock, laboratory), which, combined with *in vitro* studies, on cell cultures, gives greater opportunities for a deeper interpretation of the obtained results regarding the influence on the function of the reproductive system and the reproductive process in general. This complex approach is especially important for a dissertation to obtain the scientific degree "Doctor of Science".

Structure of the DSc thesis

I will note that the dissertation is very well structured with the necessary balance between the individual parts and contains all the sections as follows: Introduction; Analysis of research on the problem (Literature review); Purpose and tasks; Material and methods; Results and discussion; Conclusions; Recommendations for practice; Scientific contributions; List of publications and projects related to the dissertation; References and appendixes.

Introduction, literature review, aim and objectives

In the introduction, the author announced the main problem of the dissertation work, namely the need to apply various natural nutritional supplements to stimulate and improve the reproductive qualities of animals against the restrictions imposed by the use of hormonal preparations and nutritional antibiotics in animal husbandry. The advantages of multicomponent natural plant-based supplements such as aphrodisiacs with a direct effect on the reproductive system and natural growth factors with an indirect positive influence on reproduction have also been highlighted. In the literature review, a detailed critical analysis of the available scientific information on the problems of the dissertation has been done. In total, a large number of literary sources are cited in the dissertation - 447, the majority of which are from the last 10-15 years, which shows the very good awareness of the author about the hitherto known effects of the natural plant supplements used in the dissertation. A comparative analysis of the composition of the additives used and of the biologically active substances contained in them - polyphenols, vitamins, minerals, fatty acids - was carried out. Special attention has been paid to the lack of sufficient data regarding their influence on the reproductive system in female and male animals.

The purpose of the research is correctly formulated and fully corresponds to the topic of the DSc thesis. The working hypothesis assumes in a synthesized form the expected results

regarding the effects of supplements on the function of the reproductive organs. A total of 5 main tasks have been set, the implementation of which guarantees the achievement of the set goal. A very good impression is made by the combination of *in vivo* and *in vitro* studies, which enables a broader and more in-depth discussion of the own results both at the level of the organism and at the cellular and molecular-genetic level. I will note that adequate statistical processing of the experimental data was carried out, incl. and testing for normal distribution. Depending on whether the data are normally or abnormally distributed, appropriate tests were chosen to determine the statistical significance of differences between groups, which is a guarantee of the reliability of the results obtained. A correlation analysis of the parameter values between individual measurements as well as a bioinformatics analysis was also performed.

Results and Discussion

The obtained results are very well illustrated (by 47 figures and 29 tables) and described in detail and competently in the text. At the same time, the author chose the option to present the Results and Discussion sections together. I don't take it as an error, but I would prefer that they were given separately, as it is required in most reputable scientific journals. I highly appreciate the approach applied by Assoc.Prof. Kistanova for describing the results: moving from the general to the particular. First, the experimental data from the established systemic effects of natural supplements at the organismic level has been presented with an emphasis on the reproductive system of female and male animals of various species, followed by mitochondrial data and molecular genetic analysis of the expression of various genes directly related to germ cells and gametogenesis. For example, a positive influence of natural supplements (Spirulina, Aufertin, Tribestan and drone brood homogenate) with a similar composition in terms of phytogetic ingredients was found in male and female animals on the hormonal status (estradiol, progesterone, leptin, ghrelin), gametogenesis (size and number of follicles, number of ovulated oocytes, quality of gametes, etc.), as well as on the embryo quality and the number of born and surviving offspring. *In vivo* (ovary) and *in vitro* (NIH/3T3 mouse embryonic fibroblast cell line) studies have shown that the natural supplements Spirulina, ProvitE10%Super and oregonin increase the functional activity of mitochondria by increasing mtDNA copy number and the activity and expression of some key mitochondrial enzymes of oxidative phosphorylation (cytochrome C oxidase and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase 1) and the redox

potential of mitochondria and by this way to increase the quality of the obtained gametes. A similar positive effect on the mitochondria of the phytogetic supplements was also found in the *in vitro* studies of the spermatozoa of boars and rams during their storage in a cooled state, expressed in preserved motility and fertilizing ability. The data from the molecular biological analyzes by real time PCR show that all three used additives - Spirulina, VemoHerbT and drone brood homogenate increase the gene expression of two growth factors important for the development and maturation of follicles - GDF9 and BMP15 in oocytes and in the cumulus cells of rabbits and pigs. It is important to note that the stimulating effect of these preparations, in addition to the mRNA level, has been proven immunohistochemically at the protein level. *In vitro* experiments with two cell lines - mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and NIH/3T3 have been established a dose-dependent effects of oregonin (polyphenol) on the expression of some DNA methyltransferases as important genes for epigenetic modulations, incl. and from the side of natural bio-additives.

I would like to draw a special attention to the author's bioinformatic analysis of genes with altered expression in the ovaries after exposure to biologically active supplements. The introduction of the own experimental data on the gene expression of the important regulators of follicle development and maturation - GDF9 and BMP15 as well as those on DNA methyltransferases in various on-line electronic database platforms allows to establish the complex interrelationships and relationships between these genes and the encoded of these proteins with the gene expressions of a significant number of transcription factors directly related to ovarian function. All this allows predicting the inheriting in the next generation of animals the changing in the expression of these genes and doing a more accurate choice of additives, influencing a specific process, e.g. follicle growth and maturation, gametogenesis, gamete qualities, etc. The discussion of the thesis is very competently written with the necessary depth and criticality in the explanations of the own results. The obtained experimental data in the dissertation are very skillfully interpreted against known to date data regarding the influence of the studied additives and their biologically active ingredients on the function of the reproductive system. This is possibly due to the author's chosen approach, which I have already described above, namely the combination of *in vivo* studies in various animal species with *in vitro* studies on cell cultures from both animal reproductive organs and ready-to-use mouse cell lines. Since many of the results were obtained for the first time in this study, I highly appreciate the author's

skills to provide adequate explanations of established scientific facts, as well as to formulate relevant hypotheses. This inevitably contributes to a more complete elucidation of the cellular and subcellular mechanisms by which the used natural additives stimulate the function of the reproductive organs. The drawn conclusions are specific and have directly derived from the obtained results. I accept the contributions, which present in a generalized form the scientific and scientific-applied value of dissertation achievements. As a member of the Extended Council of the department, I would like to note that Assoc. Prof. Kistanova complied with many of the comments and recommendations made during the discussion. The self-abstract accurately reflects the results obtained in the dissertation as well as the made conclusions and contributions.

The most important indicators of the quality of each dissertation are the related publications, respectively the journals, in which they were published, and their citation rate. In this regard, I will note that Assoc. Prof. Kistanova presents 12 publications, all of which are in peer-reviewed journals indexed in Web Science or Scopus databases. Seven of the articles are in Q1 journals and one in Q3. There are a total of 9 publications in journals with IF and SJR. I would like to pay special attention to the fact that the IF of the journals is high and ranges from 0.492 to 5.94, which indisputably shows the high scientific value of the results obtained in the dissertation. In this regard, it is no coincidence that of the 18 citations presented, 16 are in the peer-reviewed and indexed in Scopus or Web Science journals. The author has 15 participations (reports and posters) at international scientific forums in the country and abroad, including 2 plenary reports. There are also 2 recognized patents on the results included in the dissertation in 2019 and 2020, respectively, which is a very good certificate for the scientific-applied nature of the conducted research and obtained results. A very good impression is made by the fact that Assoc. Prof. Kistanova participated in 6 scientific projects (four she supervised) at BAS, MES and FNI with very good funding and directly related to the subject of the dissertation.

In conclusion, I consider that the set goal has been successfully fulfilled. In terms of structure and content, the dissertation fully meets the requirements of the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Bulgaria, the Regulations for its Application and the Regulations for the Development of the Academic Staff at Trakia University for the scientific degree "Doctor of Sciences". Assoc. Prof. Kistanova, PhD fully covers "Minimum national requirements" in Scientific area 6. "Agricultural sciences and veterinary

medicine", professional direction 6.4 "Veterinary medicine" both as a total number of points (527.7) and as points by groups of indicators for the scientific degree "Doctor of Sciences". A number of original contributions with scientific-fundamental and scientific-applied importance regarding the influence of various natural nutritional supplements on the reproductive system of animals of various species has been achieved. The focus has been placed on clarifying the cellular and subcellular mechanisms, through which the biologically active ingredients (polyphenols, antioxidants, unsaturated fatty acid acids, vitamins; micro- and macroelements) stimulate ovarian function and gamete qualities in male and female animals. The publications related to the DSc thesis were published in specialized scientific journals, peer-reviewed and indexed in the global databases Web of science and Scopus with high impact factor and/or impact rank, having also a large number of citations in renowned journals, despite the relatively short period after their publication. Therefore, I give a **positive** assessment of the conducted research and obtained in the dissertation results and I will vote **"YES" awarding the scientific degree "Doctor of Sciences" to Assoc.Prof. Elena Kistanova, PhD** in professional direction 6.4."Veterinary medicine" and scientific area 6. "Agrarian sciences and Veterinary Medicine".

27.07.2022 .

Stara Zagora

Signature:



(Prof. Ivan Penchev, DVM, DSc)